



**Ciencia y Tecnología**

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS DE LA BIOSÍNTESIS DE ALCALOIDES  
BENCILISOQUINOLÍNICOS EN *Argemone mexicana*  
EN CONDICIONES DE INFECCIÓN FÚNGICA**

Tesis que presenta

**M. C. GLADYS DEL CARMEN HERNÁNDEZ ELERIA**

En opción al título de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: **OPCIÓN BIOQUÍMICA Y  
BIOLOGÍA MOLECULAR**)

Mérida, Yucatán, México

2025

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*

*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



## RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Gladys del Carmen Hernández Eleria titulado **“Análisis de la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana* en condiciones de infección fúngica”**, fue realizado en la Unidad de Biología integrativa, en la línea de investigación Metabolismo integrativo, en el Laboratorio 25 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Felipe A. Vázquez Flota, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, opción Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de este Centro.

Atentamente



---

Dr. José Luis Hernández Stefanoni

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 12 de marzo de 2025

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que, a razón de lo anterior, y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y se regirán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_



M. C. Gladys del Carmen Hernández Eleria

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biología Integrativa del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Los alcaloides bencilisoquinolínicos en la interacción planta ambiente. *Argemone mexicana* como modelo de estudio” (CONAHCYT; CBF 2023-2024-1879) bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI; antes CONAHCYT) por la beca otorgada (2020-000026-02NACF-09212) para realizar estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) a través de la Unidad de Biología Integrativa por brindar todas las facilidades para concluir este trabajo.

De manera muy especial agradezco al Dr. Felipe A. Vázquez Flota por su valiosa asesoría y por estar disponible siempre, ya que su acompañamiento hizo todo este trabajo mucho más sencillo.

A los integrantes de mi comité tutorial y revisores de tesis: Dra. Renata Rivera Madrid, Dr. Gumersindo Mirón López, Dr. Gregorio del C. Godoy Hernández, Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores, Dr. Anuar Ahmed Magaña Álvarez y Dr. René Garruña Hernández, por sus valiosas aportaciones y experiencias que enriquecieron este trabajo.

Dr. José Armando Muñoz Sánchez por su paciencia, amabilidad y disposición en el laboratorio y Dra. Ángela Kú González por su ayuda con la microscopía electrónica de barrido, al M.C. Miguel A. Tzec Simá, por su apoyo en la extracción del ADN de hongos.

Al Grupo de Estudios Moleculares aplicados a la Biología (GeMBio), en particular a la Dra. Daisy Pérez Brito por su apoyo en el desarrollo del trabajo experimental con los hongos y al Dr. Anuar Ahmed Magaña Álvarez.

Agradezco a la M.C. Miriam del Socorro Monforte González por su disponibilidad para obtener los datos de cromatografía en capa delgada.

A mis compañeros del Lab. 25, M.C. Fernanda De la Cruz Velueta, IBQ. Julia Sarahi Balam Díaz, Dr. Ignacio Laines Hidalgo, Ing. Ramiro Pérez González y Dr. Lloyd Loza-Muller, por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

## **DEDICATORIAS**

Especialmente a mi madre B. Flor Heleria Guzmán donde quiera que te encuentres, fuiste un gran ejemplo de toda una familia, para la cual agradezco infinitamente. MUCHAS GRACIAS...

A mi padre, Efrén H. Vázquez, por ser mi motivación diaria, mi estímulo y mi orgullo.

A Baltazar Prieto Morales, por su cariño, paciencia, comprensión y valentía durante este recorrido. Estoy lo suficientemente agradecida.

A mis hermanos, por todo lo que han hecho por mí, especialmente a Lupita y Alicia, quienes a pesar de lo distinto que somos siempre me han apoyado.

A mis sobrinos, particularmente a Yoali De Jesús y Ángel E. De Jesús, por su cariño y cuidado cuando más los necesité.

A Froilán De Jesús Olivera, agradezco de corazón cada momento compartido y su incondicional apoyo.

A mis amigos, por estar siempre allí para mí, ofreciendo su aliento y su amistad sincera, su muestra de afecto ha trascendido el ámbito académico.

Y a todos los que me apoyaron durante este proceso.

## LISTA DE PRODUCTOS GENERADOS

### Artículo científico:

- Hernández-Eleria GC, Hernández-Hernández EA, Muñoz-Sánchez JA, Pérez-Brito DC, Benzylisoquinoline alkaloids in compatible fungus interaction with a non-model plant: *Argemone mexicana* L. *J Plant Pathol* (2025). <https://doi.org/10.1007/s42161-025-01850-0>

### Presentaciones en congresos:

- Hernández-Eleria GC, Hernández-Hernández EA, Muñoz-Sánchez JA, Vázquez-Flota F. **LA INFECCIÓN POR HONGOS PATÓGENOS DESENCADENA CAMBIOS EN EL METABOLISMO DE LOS ALCALOIDES BENCILISOQUINOLÍNICOS EN *Argemone mexicana***. XI Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sur-Sureste. 8-11 de nov 2022. San Francisco de Campeche, Camp., México. Modalidad cartel.
- Hernández-Eleria GC, Hernández-Hernández EA, Vázquez-Flota FA. **The *Argemone-Corynespora* system as model for the study of the contribution of benzylisoquinoline alkaloids in plant-fungus interactions**. XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica. 16-21 de octubre de 2022. Mérida, Yucatán. Modalidad cartel.
- Hernández-Eleria GC, Hernández-Hernández EA, Vázquez-Flota FA. **Alcaloides bencilisoquinolínicos en la interacción *Argemone mexicana* -*Corynespora cassicola***". 4to. Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal. 23 al 25 de octubre de 2023, Mérida, Yucatán; modalidad oral.
- **Actividades de divulgación:**
- CICY Casa Abierta 2023: **"El arcoíris escondido (cromatografía en plantas)"**.
- Ciencia Cakotanú, A.C. **"Expo Feria Ambiental 2023"**.
- Ciencia Cakotanú, A.C. **Día internacional de la mujer y la niña en la ciencia 2023**.
- Ciencia Cakotanú, A.C. **Día internacional de la mujer y la niña en la ciencia 2024, "Cromatografía en alcaloides"**.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
1.1. Descripción botánica y distribución de <i>Argemone mexicana</i> .....	3
1.1.1. Clasificación taxonómica .....	4
1.1.2. Aplicaciones de <i>A. mexicana</i> .....	5
1.2. Alcaloides presentes en <i>A. mexicana</i> .....	6
1.3. Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's).....	6
1.4. Biosíntesis de alcaloides ABI's en <i>A. mexicana</i> . .....	9
1.5. Los hongos como patógenos de las plantas.....	13
1.6. Interacción planta-patógeno .....	13
1.7. Los metabolitos secundarios en el sistema defensivo de las plantas.....	16
1.8. Los alcaloides en la defensa contra infecciones por patógenos .....	17
1.9. Recapitulación de los antecedentes .....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
JUSTIFICACIÓN .....	21
HIPÓTESIS .....	21
OBJETIVO GENERAL .....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22
<b>CAPÍTULO I AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS ASOCIADOS A LESIONES FOLIARES EN <i>Argemone mexicana</i></b> .....	<b>24</b>
2.1. INTRODUCCIÓN .....	24
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25

2.2.1. Observación de los hongos presentes en las lesiones foliares .....	25
2.2.2. Aislamiento e identificación de los hongos asociados a lesiones foliares .....	26
2.2.3. Análisis filogenético de los hongos aislados .....	27
2.3. RESULTADOS .....	29
2.3.1. Procedimiento para la infección controlada .....	29
2.3.2. Aislamientos fúngicos.....	32
2.3.3. Primer aislamiento fúngico 2021.....	33
2.3.4. Caracterización morfológica y fenotípica .....	33
2.3.5. Hongos asociados a síntomas leves .....	34
2.3.6. Segundo aislamiento fúngico 2022.....	39
2.3.7. Identificación molecular y análisis filogenético de los hongos aislados en hojas de <i>A. mexicana</i> 45	
2.3.8. Análisis filogenético de los hongos aislados en hojas de <i>A. mexicana</i> de la temporada 2022 .....	50
2.4. DISCUSIÓN .....	55
<b>CAPÍTULO III DETERMINACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLADOS FÚNGICOS.....</b>	<b>58</b>
3.1. INTRODUCCIÓN .....	58
3.2. MATERIALES Y MÉTODO.....	59
3.2.1. Material biológico .....	59
3.2.2. Desarrollo de las pruebas de patogenicidad .....	60
3.3. RESULTADOS .....	63
3.3.1. Pruebas de patogenicidad en <i>Solanum lycopersicum</i> (jitomate).....	63
3.3.2. Pruebas de patogenicidad en <i>A. mexicana in planta e in vitro</i> .....	65
3.4. DISCUSIÓN .....	69

<b>CAPÍTULO IV LOS ALCALOIDES BENCILISOQUINOLÍNICOS EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO</b> .....	<b>75</b>
4.1. INTRODUCCIÓN .....	75
4.2. MATERIALES Y MÉTODO.....	76
4.2.1. Material biológico .....	76
4.2.2. Extracción y perfil de alcaloides mediante cromatografía en capa fina (CCF) .....	77
4.3. RESULTADOS .....	78
4.3.1. Contenido de alcaloides durante la exposición de <i>A. mexicana</i> a hongos. ....	79
4.4. DISCUSIÓN .....	87
<b>CAPÍTULO V DISCUSIÓN</b> .....	<b>90</b>
5.1. DISCUSIÓN GENERAL .....	90
5.2. CONCLUSIONES GENERALES .....	93
5.3. PERSPECTIVAS .....	94
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>96</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>115</b>

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Planta silvestre de <i>Argemone mexicana</i> .....	4
<b>Figura 1.2.</b> Vía que conduce a la formación de (S) -norcoclaurina, el intermedio central en la biosíntesis de ABI's en plantas, a partir de dos moléculas de L-Tyr.....	7
<b>Figura 1.3.</b> Vía que conduce a la formación de (S)-reticulina.....	7
<b>Figura 1.4.</b> Ramificación de la ruta para la síntesis de los alcaloides tipo protoberberina.....	8
<b>Figura 1.5.</b> Ramificación de la ruta para la biosíntesis de los alcaloides tipo Benzofenantridina.....	9
<b>Figura 1.6.</b> Contenido de alcaloides en diferentes tejidos de <i>A. mexicana</i> .....	10
<b>Figura 1.7.</b> Biosíntesis de alcaloides en plantas jóvenes de <i>A. mexicana</i> .....	10
<b>Figura 1.8.</b> Efecto de homogeneizados de <i>F. oxysporum</i> , jasmonado de metilo 100 µM (MeJa) y ácido salicílico 100 µM (SA) sobre la acumulación de sanguinarina.....	11
<b>Figura 1.9.</b> Inducción de cultivos de células de <i>A. mexicana</i> .....	12
<b>Figura 1.10.</b> Acumulación de transcritos de TyDC, BBE-2 y actina en cultivos expuestos a los diferentes tratamientos.....	13
<b>Figura 1.11.</b> (A) planta de <i>A. mexicana</i> , (B) síntomas iniciales con clorosis y manchas circulares pardas en hoja de <i>A. mexicana</i> , (C) síntomas avanzados y secamiento de la lámina foliar.....	20
<b>Figura 1.12.</b> Estrategia experimental utilizado para el desarrollo de este trabajo.....	23
<b>Figura 2.1.</b> Hojas con diferente grado de severidad ocasionado por hongos fitopatógenos.....	26
<b>Figura 2.2.</b> Estructura de los acérvulos sobre las lesiones foliares en <i>A. mexicana</i> .....	29
<b>Figura 2.3.</b> Aspecto del área foliar de <i>A. mexicana</i> sana y libre de lesiones fúngicas (A) y con lesiones necróticas causadas por infección con hongos (B).....	30
<b>Figura 2.4.</b> Lesiones foliares en <i>A. mexicana</i> observadas por MEB.....	30
<b>Figura 2.5.</b> Conidióforos con zonas fracturadas (A) y emergencia de conidios (B).....	31
<b>Figura 2.6.</b> Conidióforos formando conidios sobre hojas infectadas de <i>A. mexicana</i> (A). Conidio con estructura de la cicatriz coronaria (B).....	31
<b>Figura 2.7.</b> Aspecto de las hojas utilizadas en los diferentes ejercicios para los aislamientos de los hongos asociados.....	32
<b>Figura 2.8.</b> Morfología del aislado Am21-1.....	35
<b>Figura 2.9.</b> Morfología del aislado Am21-2.....	36

<b>Figura 2.10.</b> Morfología del aislado Am21-4.....	37
<b>Figura 2.11.</b> Morfología del aislado Am21-5.....	38
<b>Figura 2.12.</b> Morfología del aislado Am21-3.....	39
<b>Figura 2.13.</b> Morfología del aislado Am22-6.....	40
<b>Figura 2.14.</b> Colonias de Am22-7 aisladas en hojas de <i>A. mexicana</i> en 2022.....	41
<b>Figura 2.15.</b> Colonia Am22-8 aislado en hojas de <i>A. mexicana</i> en 2022.....	42
<b>Figura 2.16.</b> Características morfológicas del aislado Am22-9 aislada de hojas de <i>A. mexicana</i> .....	43
<b>Figura 2.17.</b> Características morfológicas de Am22-10 aislada de hojas de <i>A. mexicana</i> .....	44
<b>Figura 2.18.</b> Colonia de la cepa Am22-11.....	45
<b>Figura 2.19.</b> Imagen de las bandas obtenidas en gel de agarosa al 1.1% a partir de la amplificación de la región ITS 1 y 4, y TEF-1 $\alpha$ de los aislados en <i>A. mexicana</i> en la temporada 2021.....	46
<b>Figura 2.20.</b> Imagen en gel de agarosa al 1.1% de la región amplificada por PCR de aislados fúngicos en hojas de <i>A. mexicana</i> en la temporada 2022.....	46
<b>Figura 2.21.</b> Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-joining con 1000 réplicas (Bootstrap) de los marcadores concatenados ITS y EF1- $\alpha$ pertenecientes a los aislados Am21-1 y Am21-3.....	47
<b>Figura 2.22.</b> Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-joining con 1000 réplicas (Bootstrap) de los marcadores concatenados ITS y EF1- $\alpha$ perteneciente al aislado Am21-2.....	48
<b>Figura 3.1.</b> Pruebas de patogenicidad en el jitomate inoculación con <i>L. theobromae</i> , <i>C. cassiicola</i> , <i>F. solani</i> y <i>C. cladosporioides</i> .....	60
<b>Figura 3.2.</b> Prueba de patogenicidad.....	61
<b>Figura 3.3.</b> Análisis de la patogenicidad directamente en hojas <i>in planta</i> de <i>A. mexicana</i> ..	62
<b>Figura 3.4.</b> Hojas de jitomate ( <i>S. lycopersicum</i> ) inoculados con hongos que crecen en <i>A. mexicana</i> .....	63
<b>Figura 3.5.</b> Frutos postcosecha de <i>S. lycopersicum</i> inoculados con hongos que crecen en <i>A. mexicana</i> .....	64
<b>Figura 3.6</b> Frutos postcosecha de <i>S. lycopersicum</i> con lesión artificial e inoculados con hongos que crecen en <i>A. mexicana</i> . dpi: días postinoculación.....	65
<b>Figura 3.7.</b> Prueba de patogenicidad <i>in planta</i> en hojas de <i>A. mexicana</i> .....	66

<b>Figura 3.8.</b> Crecimiento micelial en hojas de <i>A. mexicana</i> expuestas a <i>C. cassiicola</i> .....	67
<b>Figura 3.9.</b> Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i> en hojas de <i>A. mexicana</i> con explantes de micelio de 5 mm después de cinco dpi.....	68
<b>Figura 3.10.</b> Prueba de patogenicidad <i>in vitro</i> en hojas de <i>A. mexicana</i> inoculadas con una suspensión de conidios de $1 \times 10^6$ después de seis dpi.....	69
<b>Figura 4.1.</b> Curvas de calibración para berberina (A) y sanguinarina (B) mediante CCF...78	
<b>Figura 4.2.</b> Presencia de alcaloides en hojas <i>in planta</i> a los 2 y 7 dpi.....	80
<b>Figura 4.3.</b> Contenido de berberina (A) y sanguinarina (B) en las hojas <i>in planta</i> de <i>A. mexicana</i> expuesto a <i>C. cassiicola</i> durante 0, 2 y 7 dpi.....	81
<b>Figura 4.4.</b> Comparación del ensayo en hojas <i>in planta</i> a los 0, 2 y 8 dpi.....	82
<b>Figura 4.5.</b> Contenido de berberina (A) y (B) sanguinarina en las hojas <i>in planta</i> de <i>A. mexicana</i> expuesto a <i>C. cassiicola</i> durante 0, 2 y 8 dpi.....	83
<b>Figura 4.6.</b> Contenido de berberina y sanguinarina en hojas <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> a los 5 DPI.....	85
<b>Figura 4.7.</b> Representación gráfica de la acumulación de berberina (A) y sanguinarina (B) en hojas <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> expuestas a hongos aislados de la misma planta.....	86
<b>Figura 4.8.</b> Efecto de <i>C. cassiicola</i> sobre hojas <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> en la inducción de ABI's.....	86
<b>Figura 4.9.</b> Acumulación de ABI's en hojas <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> al inicio y 6 dpi.....	87
<b>Figura A.1.</b> Colonia de la cepa Am23-12.....	115
<b>Figura A.2.</b> Colonia de la cepa Am23-13 ( <i>Fusarium</i> sp.).....	115
<b>Figura A.3.</b> Colonia de la cepa Am23-14.....	116
<b>Figura A.4.</b> Morfología de Am23-15 ( <i>Diaporthe</i> sp.).....	116
<b>Figura A.5.</b> Morfología de Am23-16 ( <i>Diaporthe</i> sp.).....	117
<b>Figura A.6.</b> Comparación del perfil de alcaloides en hojas <i>in planta</i> de <i>Argemone mexicana</i> expuestos a hongos.....	118
<b>Figura A.7.</b> Efecto de los hongos de <i>A. mexicana</i> en la acumulación de Abis's en la superficie foliar.....	118
<b>Figura A.8.</b> Acumulación de alcaloides en tallos de plantas después de ocho días de exposición a <i>C. cassiicola</i> .....	119
<b>Figura A.9.</b> Acumulación de alcaloides en raíces después de ocho días de exposición a <i>C. cassiicola</i> .....	119

**Figura A.10.** Acumulación de alcaloides en hojas escindidas después de seis días de observación.....119

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Identificación de los géneros de hongos aislados de hojas de <i>A. mexicana</i> .....	33
<b>Tabla 2.2.</b> Aislamiento de hongos asociados a las lesiones foliares en <i>A. mexicana</i> .....	34
<b>Tabla 2.3.</b> Hongos aislados asociados a las lesiones foliares en <i>A. mexicana</i> .....	50
<b>Tabla 4.1.</b> Patrones de cromatografía de capa fina de extractos de hojas <i>in planta</i> de <i>A. mexicana</i> expuestas a diferentes especies de hongos.....	82

## ABREVIATURAS

<b>4'OMT</b>	4'-O-metiltransferasa
<b>4-HPAA</b>	4-hidroxifenilacetaldehído
<b>4OMT</b>	4'-O-metiltransferasa
<b>6OMT</b>	Norcoclaurina 6-O-metiltransferasa
<b>ABI's</b>	Alcaloides bencilisoquinolínicos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNbc</b>	ADN bicatenario
<b>AG<sub>3</sub></b>	Ácido giberélico
<b>ATR</b>	Adenosín trifosfato
<b>BBE</b>	Enzima puente de berberina
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	Carbonato de calcio
<b>cAMP</b>	Monofosfato de adenosina cíclico
<b>CAS</b>	Canadina sintasa
<b>Cas</b>	Cassicolina
<b>CCF</b>	Cromatografía de capan fina
<b>CheSyn</b>	Queilantifolina sintasa
<b>CNMT</b>	Coclaurina N-metiltransferasa
<b>CYP719A (CAS)</b>	Canadina sintasa
<b>Cyp80B3/NMCH</b>	N-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa
<b>DBOX</b>	Dihidrobzofenantridina oxidasa
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DPI</b>	Días postinoculación
<b>EDS1</b>	Proteína de Susceptibilidad Mejorada a Enfermedades 1
<b>EDTA</b>	Acido etilendiaminotetraacético
<b>ET</b>	Etileno
<b>ETI</b>	Inmunidad activada por efectores
<b>GH16</b>	Xiloglucano transglucosilasa/hidrolasas
<b>GH3</b>	$\beta$ -glucosidasas
<b>GH43</b>	$\beta$ -xilosidasas
<b>GH5</b>	Endo- $\beta$ -1,4-celulasas (Familia de glicosilhidrolasas 5)

<b>HR</b>	Respuesta hipersensible
<b>HSP90</b>	Proteína de choque térmico 90
<b>HST</b>	Toxinas específicas del huésped
<b>ITS</b>	Espaciador transcrito interno
<b>L-DOPA</b>	L-3,4 dihidroxifenilalanina
<b>L-Tyr</b>	L-tirosina
<b>MEB</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>MeJa</b>	Jasmonato de metilo
<b>MSH</b>	N-metilestilopina 14'-hidroxilasa
<b>MYG</b>	Malta-extracto de levadura-glucosa
<b>NCS</b>	Norcoclaurina sintasa
<b>NH<sub>4</sub>OH</b>	Hidróxido de amonio
<b>NLR</b>	Receptores tipo Nod
<b>NMCH</b>	N-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa
<b>P6H</b>	Protopina 6'-hidroxilasa
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a la superficie de patógenos
<b>PBS1</b>	Proteína de resistencia a enfermedades
<b>PDA</b>	Agar de dextrosa y papa
<b>PET</b>	Politereftalato de etileno
<b>PRR</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>PTI</b>	Inmunidad activada por PAMPs
<b>RAR1</b>	Gen requerido para la resistencia Mla12
<b>RIN4</b>	Proteína 4 que Interactúa con Rpm1
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RPM1</b>	Gen mitocondrial
<b>RPS2</b>	Proteína Ribosómica S2
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
<b>SA</b>	Ácido salicílico
<b>SGT1</b>	Genes asociados a la resistencia a enfermedades
<b>SOMT</b>	Escoulerina-9-O-metiltransferasa
<b>SSU</b>	Subunidad pequeña

<b>STOX</b>	Tetrahidroprotoberberina oxidasa
<b>STS</b>	Estilopina sintasa
<b>StySyn</b>	Estilopina sintasa
<b>TEF-1<math>\alpha</math></b>	Factor de alargamiento de traducción 1- $\alpha$
<b>TNMT</b>	Tetrahidroprotoberberina-cis-N-metiltransferasa
<b>TyDC</b>	Tirosina/dopa descarboxilasa
<b>TyrAT</b>	Tirosina aminotransferasa
<b>YE</b>	Extracto de levadura

## RESUMEN

Se detectaron plantas de *Argemone mexicana* L (Papaveraceae) presentando hojas con lesiones necróticas circulares consistentes con síntomas ocasionadas por infecciones fúngicas. En lesiones avanzadas, se afectaba la superficie foliar completa y eventualmente causaba la muerte de la planta. En el presente trabajo se lograron 11 aislamientos fúngicos a partir de hojas con las lesiones descritas y que fueron denominados Am21-1 a -5 y Am22-6 a -11. Entre las características morfológicas de los cultivos axénicos, se evaluó: la forma de las colonias, coloración, tipo de micelios, conidios y esporas. Para la identificación molecular, se usaron las regiones moleculares (ITS y TEF-1 $\alpha$ ), lo que permitió la identificación de los aislamientos como: *Lasiodiplodia theobromae* (Am21-1, -3 y Am22-9), *Corynespora cassiicola* (Am21-2), *Fusarium solani* (Am21-4), el complejo *Cladosporium cladosporioides* (Am21-5 y Am22-7,-10), *Fusarium incarnatum-equiseti* (Am22-6), *Neopestalotiopsis clavispora* (Am22-8) y *Trichoderma harzianum* (Am22-11) con un porcentaje de identidad mayor a 99.5%. Para identificar al agente causal, se desarrolló un método de infección controlada en hojas, tanto *in planta* como *in vitro*. Aunque todos los aislamientos fueron capaces de inducir lesiones en frutos de jitomate, solamente *C. cassiicola* fue capaz de producir una lesión primaria, tanto *in planta* como *in vitro*, sugiriendo su naturaleza como agente causal y el carácter oportunista de las demás especies. Esto se confirmó mediante el aislamiento y la reinfección de hojas en ambos sistemas. Se observó la presencia de sanguinarina, normalmente ausente en tejidos aéreos en las hojas lesionadas. Esto ocurrió tanto en las hojas aisladas como en planta y solamente en respuesta al reto con *C. cassiicola*. Estos resultados indican que las hojas poseen la capacidad de formar sanguinarina y la activan en condiciones de infección fúngica, lo que sugiere el posible papel de este alcaloide en la interacción planta-hongo.

## ABSTRACT

Plants of *Argemone mexicana* L (Papaveraceae) were detected showing leaves with circular necrotic lesions consistent with symptoms caused by fungal infections. In advanced lesions, the entire leaf surface was affected and eventually caused the death of the plant. In the present work, 11 fungal isolates were obtained from leaves with the lesions described and were named Am21-1 to -5 and Am22-6 to-11. Among the morphological characteristics of the axenic cultures, was evaluated: colony shape, coloration, mycelium type, conidia and spores. For molecular identification, molecular regions (ITS and TEF-1 $\alpha$ ) were used, which allowed the identification of the isolates as: *Lasiodiplodia theobromae* (Am21-1, -3 and Am22-9), *Corynespora cassiicola* (Am21-2), *Fusarium solani* (Am21-4), *Cladosporium cladosporioides* complex (Am21-5 and Am22-7,-10), *Fusarium incarnatum-equiseti* (Am22-6), *Neopestalotiopsis clavispora* (Am22-8) and *Trichoderma harzianum* (Am22-11) with percent identity greater than 99.5%. To identify the causal agent, a method of controlled infection in leaves, both *in planta* and *in vitro*, was developed. Although all isolates were capable of inducing lesions in tomato fruits, just *C. cassiicola* was able to produce a primary lesion, both *in planta* and *in vitro*, suggesting its nature as a causative agent and the opportunistic nature of the other species. This was confirmed by isolation and reinfection of leaves in both systems. The presence of sanguinarine, normally absent in aerial tissues, was observed in damaged leaves. This occurred as well isolated and *in planta* leaves and just in response to challenge with *C. cassiicola*. These results indicate that leaves possess the ability to form sanguinarine and activate it under conditions of fungal infection, suggesting the possible role of this alkaloid in the plant-fungus interaction.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles susceptibles a varios tipos de estrés que incluyen desde infecciones por microorganismos, ataques de nematodos, insectos y otros herbívoros, hasta condiciones ambientales adversas. Como resultado, sufren un deterioro en su crecimiento y desarrollo. Uno de estos factores, son los fitopatógenos que pueden ocasionar enfermedades con daños devastadores en ciertas poblaciones, esto es debido a su rápida diseminación. Se estima que más del 70% de las enfermedades de las plantas se deben a hongos patógenos que, por lo general, son parásitos y que limitan el crecimiento adecuado de la planta (Mahadevakumar et al., 2021).

Para enfrentar las infecciones por microorganismos, las plantas han desarrollado mecanismos complejos de defensa que incluyen desde adecuaciones físicas hasta modificaciones metabólicas. En ambos casos, las plantas responden al estímulo que representa la infección desencadenando un proceso de señalización que resulta en la activación de los genes de defensa (Narayani & Srivastava, 2017). Una de las respuestas más importantes es la producción de metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son compuestos que, aunque se acumulan en bajas cantidades tienen efectos tóxicos. Entre estos se incluyen los terpenos, fenoles, compuestos que contienen azufre, saponinas y alcaloides (Aguirre-Becerra et al., 2021). Los alcaloides son un grupo diverso de productos naturales básicos que contienen nitrógeno. Existen más de veinte clases diferentes de alcaloides que incluyen: pirrolidinas, pirrolizidina, quinolizidina, tropanos, piperidinas, bencilisoquinolínicos entre otros.

*Argemone mexicana*, es una planta productora de alcaloides tipo bencilisoquinolínicos, siendo de los más abundantes la sanguinarina y la berberina que pertenecen a los tipos benzofenantridinas y protoberberina. Ambos alcaloides presentan propiedades antimicrobianas, además de ser utilizada como plaguicida, y en la medicina tradicional para tratar diferentes afecciones (Singh y Katare, 2020; Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013). Recientemente, se han detectado plantas con síntomas de enfermedades fúngicas y que incluyen clorosis, manchas necróticas y marchitamiento foliar. Esta enfermedad se ha denominado, para efectos de este trabajo como mancha foliar. Esta planta es susceptible a la infección por diferentes hongos como *Erysiphe cichoracearum*, *Sphaerotheca fuliginia* y *Leveillula taurica*, algunos de los cuales pueden causar diversas enfermedades como el mildiú polvoroso (Riaz et al., 2019). Otros hongos identificados en las hojas incluyen

*Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Ulocladium atrum*, *Ulocladium botrytis*, *Phoma humicola*, *Aspergillus niger* y *Curvularia ellisi* (Abdel-Hafez, 1986). No obstante, no se tienen reportes de las alteraciones en el metabolismo de los alcaloides como resultado de esta interacción. Por ello, en este trabajo se propone el desarrollo de un modelo para el estudio del metabolismo de los alcaloides en plantas de *A. mexicana* sujetas a una infección fúngica. La propuesta incluye el aislamiento e identificación de los hongos asociados a las lesiones foliares, la identificación del agente causal siguiendo los postulados de Koch, el análisis del perfil de alcaloides en plantas infectadas y el desarrollo de un sistema controlado para el estudio del papel de los alcaloides en la interacción planta-hongo.

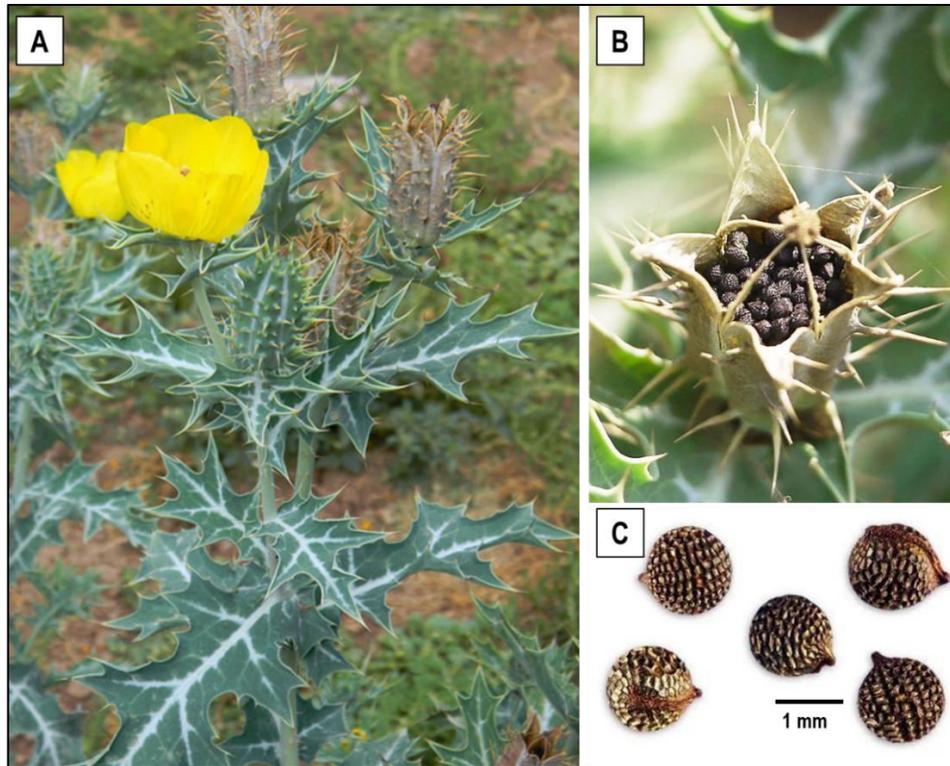
## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1. Descripción botánica y distribución de *Argemone mexicana*

*Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) es una planta silvestre, considerada como maleza, que se ha difundido ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales de todos los continentes. Esta especie es considerada nativa de la región del Caribe. En México es posible encontrarla en casi todos los estados de la República, mostrando una distribución desde el nivel del mar hasta 3000 msnm. Generalmente se asocia con sitios perturbados en selvas alta perennifolia, mediana subperennifolia, baja caducifolia y bosque de encino (Martínez, 1982). Es una hierba anual, de hasta 150 cm de altura, con una raíz principal ligeramente ramificada. El tallo es erecto, ramificado, generalmente espinoso, de color verde azulado pálido y exuda un látex amarillo cuando se corta. Los tallos frecuentemente son ramificados desde su base y moderadamente cubiertos con espinas perpendiculares o ligeramente reflejas. Las hojas son alternas, glaucas de hasta 15 cm de largo con líneas azul brillantes. Presentan un margen dentado, terminando cada diente en una delgada espina, el envés es moderadamente espinoso y con mayor cantidad de espinas que el haz. Las flores son de 4-7 cm de diámetro, solitarias, estrechamente sostenidas por una o dos brácteas, los sépalos espinosos, de 4-6 pétalos de color amarillo brillante o algunas veces amarillo pálido (**Fig. 1.1A**), obovados, presenta entre 30 y 50 estambres con filamentos amarillo-limón, anteras amarillas; ovario de 4-6 carpelos, con un estilo muy corto y no visible, el estigma púrpura de 1.5-4 mm de ancho por 1-2 mm de alto. El fruto es una cápsula espinosa oblongo a ampliamente elíptico (**Fig. 1.1B**), de 25-45 mm de largo incluyendo al estigma y de 12-20 mm de ancho con 4-6 valvas que se abren en la punta para liberar numerosas semillas, las semillas de 1.6-2 mm de largo, son de color negro pardusco, casi esféricas, cubiertas por una fina red de venas, aceitosas (**Fig. 1.1C**) (Martínez, 1982).

La planta presenta raíz pivotante y florece y fructifica durante casi todo el año, principalmente en los meses de enero a abril, pero en zonas templada florece en verano-otoño (CABI, 2021; Bosch, 2007; Martínez, 1982).



**Figura 1.1.** Planta silvestre de *Argemone mexicana*, (A) pétalos amarillos, (B) cápsula, (C) semillas. Tomado de Gardenia net, 2021.

### 1.1.1. Clasificación taxonómica

El término *Argemone* proviene del griego *Argema*, que significa catarata del ojo, y fue el nombre utilizado en el siglo I d.C. por los autores clásicos Dioscórides (40-90 d.C.) y Plinio (23-79 d.C.) para unas amapolas espinosas, supuestamente utilizadas como cura para las cataratas; el término *mexicana* se refiere al país de origen con el sufijo -ana (Parsons y Cuthbertson, 2001). Su clasificación taxonómica se ubica en el siguiente orden:

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Ranunculanae Takht. ex revelar

Orden: Ranunculales Juss. ex Bercht. Y J. Presl

Familia: Papaveraceae Juss.

Género: *Argemone* L.

Especie: *Argemone mexicana* (L.), 1753

En español se le conoce como amapolilla, chicalote, amapola montés, cardo y cardosanto (Martínez, 1979; Rzedowski, 1991). También recibe diversos nombres en idiomas indígenas de México como Chicalote, Chichilotl, chillazotl, xicólotl (nahuatl), guechinichi (lengua zapoteca, Oaxaca), k`iix-k`anlol, k`iix-saklol (lengua maya, Yucatán), shate, xaté (lengua tarasca, Michoacán), tzólich (lengua huasteca, San Luis Potosí; Martínez, 1979). En inglés se le conoce como mexican prickly-poppy, yellow prickly-poppy.

### 1.1.2. Aplicaciones de *A. mexicana*

Esta planta es considerada una maleza en plantaciones de frijol, maíz, cereales, algodón, papa, tabaco, caña de azúcar y tomate entre otros (Alemán, 2001; Holm et al., 1991; Johnson, 1997; Islam et al., 2003). No obstante, tiene usos en la medicina tradicional y tanto las hojas como los tallos se emplean como remedio para la malaria, hidropesía e ictericia. También se han reportado efectos analgésicos, antiespasmódicos, antiparasitarios y narcóticos (Singh et al., 2009, Graz et al., 2010). La planta tiene potencial en la industria farmacéutica ya que extractos de la planta han mostrado actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus*, *S. agalactiae*, *S. epidermidis* y *Escherichia coli*, así como actividad antimicótica contra *Candida albicans* (Mas et al., 2018; Alemayehu y Desalegn, 2016). Toda la planta se utiliza como infusión contra el asma, la raíz se toma en ron y coñac para el dolor de estómago. El látex del tallo se aplica a las cavidades como tratamiento para el dolor de muelas y también se utiliza como diurético (DeFilipps et al., 2004). Además, se usa en tratamientos homeopáticos (Oudhia et al., 1998), como cosmético (tratamiento de lavado con leche) (Rukangira, 2001). La especie se ha usado ancestralmente en México para tratar problemas gastrointestinales, como diurético, laxante y expectorante (Dey et al., 2008). También se emplea para enfermedades de la piel (Alagesaboopathi, 2009; Panghal et al., 2010). Más aún, estos extractos también han demostrado actividad hipoglucemiante y contra algunos tipos de cáncer (Laines-Hidalgo et al. 2022). Recientemente, revelaron que la protopina, la alocriptopina y la ( $\pm$ ) 6-acetonildihidroqueleritrina podrían ser inhibidores potenciales de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) del SARS-CoV-2 (Pandeya et al., 2020). Un uso interesante de las semillas es que se muelen y se añaden a la cerveza o té para aumentar su potencia y provocar embriaguez (Holm et al., 1977; Verdcourt y Trump, 1969).

Por otro lado, diferentes estudios han mostrado que esta planta tiene un efecto inhibidor en la germinación y crecimiento de otras especies, debido a las posibles sustancias aleloquímicas que libera y que afectan el crecimiento de otras plantas (CABI, 2021; Karikari et al., 2000). Adicionalmente, los extractos de hojas, flores y semillas se han probado contra plagas de

insectos (Chitra et al., 1997), patógenos de cultivos (Singh et al., 1993) y nematodos (Shaukat et al., 2002; Ranjana y Tabassum, 2000; Das y Sukul, 1988). Más aún, los extractos acuosos se han probado con éxito contra el piojo de la gallina tropical (Sandeep et al., 2002). Además, los extractos de las raíces pueden usarse para prevenir la ovoposición y actuar como ovicida contra *Aedes aegypti* (Warikoo y Kumar, 2014) y pueden actuar sobre el caracol *Biomphalaria glabrata*. De este modo, tienen potencial como molusquicidas para el control de algunas parasitosis (Melendez y Capriles, 2002; Von Weizsäckerl, 1995; LaFleur y Gould, 2009). También se ha cultivado por su aceite de semilla, que se utiliza para la producción de jabón y como combustible. En algunas regiones de Centroamérica se utiliza para fines religiosos (Hanelt, 2017).

Estas propiedades se relacionan con la presencia de alcaloides tipo bencilisoquinolínicos como sanguinarina y queleritrina (tipo benzofenantridinas), berberina (protoberberina) y protopina y alocriptopina (tipo protopina) (Rubio-Piña et al., 2013).

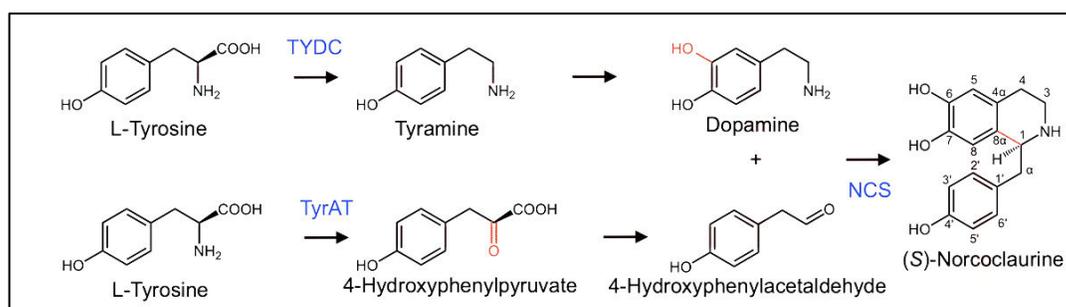
### 1.2. Alcaloides presentes en *A. mexicana*

Se han encontrado más de 20 diferentes alcaloides en *A. mexicana*, principalmente del tipo benzofenantridinas (sanguinarina, queleritrina), protoberberinas (berberina) y protopina (protopina, alocriptopina) (Vázquez-Flota et al., 2018; Rubio-Piña et al., 2013). Otros alcaloides que se han aislado incluyen isoquinolina deshidrocorydalmina, jatrorrizina, columbamina y oxiberberina (Singh et al., 2010). También se han encontrado reticulina, metilcoclaurina, criptopina, dihidrosanguinarina. Los alcaloides minoritarios aislados son quelantifolina, dihidroqueleritrina, nor-queleritrina, coptisina, nor-sanguinarina, ( $\alpha$ ;  $\beta$ )-hidroximetilestilopina, 6-acetonilsanguinarina, oxihidrastina, isocoridina, N-demetiloxisanguinarina, pancorina, (+)-argenaxina, (+)-higenamina, argemexicainas (Guízar-González et al., 2012; Rajvaidhya et al., 2012).

### 1.3. Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's)

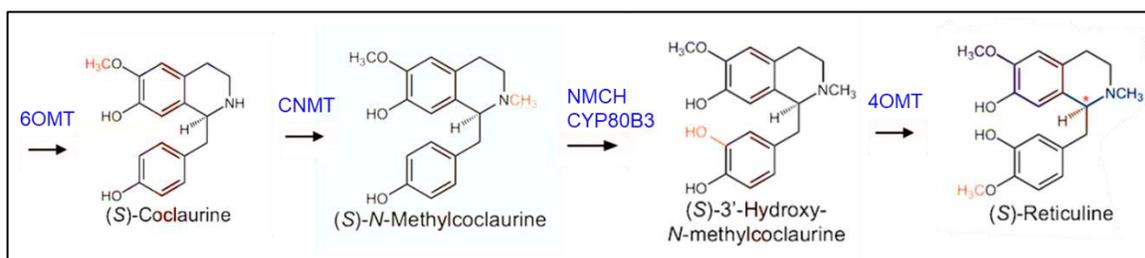
Las vías biosintéticas de diferentes ABI se han elucidado en varias especies de plantas, como *Coptis japonica* (berberina) en, sanguinarina en *Eschscholzia californica* (sanguinarina y queleritrina) y *Papaver somniferum* (morfina). Las enzimas involucradas han sido aisladas y caracterizadas (Hagel y Facchini, 2013; Sato, 2013; Morishige et al., 2010). Si bien existen particularidades asociadas a las diferentes especies, las vías biosintéticas son fundamentalmente idénticas. La ruta comienza con la condensación de dos derivados de tirosinas (**Fig. 1.2**). La tirosina se convierte en tiramina por acción de la tirosina/dopa

descarboxilasa (TYDC). Este compuesto es después hidroxilado en dopamina. Existe una vía alterna a través de la formación de L-DOPA, una tirosina hidroxilada, que después se descarboxila para formar dopamina, por la misma enzima (TYDC). Por otro lado, otra unidad de tirosina se transforma en ácido 4-hidroxifenilpirúvico por acción de la tirosina aminotransferasa (TyrAT). La dopamina y el 4-hidroxifenilacetaldehído (4-HPAA), formado por oxidación del 4-hidroxifenilpirúvico, se acoplan mediante una condensación de Pictet-Spengler catalizada por la norcoclaurina sintasa (NCS), formando el compuesto trihidroxilado S-norcoclaurina, el primer alcaloide tipo bencilisoquinolina (**Fig. 1.2**; Facchini y De Luca, 2008).



**Figura 1.2.** Vía que conduce a la formación de (S)-norcoclaurina, el intermediario central en la biosíntesis de ABI's en plantas, a partir de dos moléculas de L-Tyr. Se presentan las dos rutas propuestas para la formación de dopamina y 4-hidroxifenilacetaldehído. TyDC: Tirosina descarboxilasa, TyrAT: Tirosina aminotransferasa, NCS: Norcoclaurina sintasa. Tomado de Singh et al., (2019) con modificaciones.

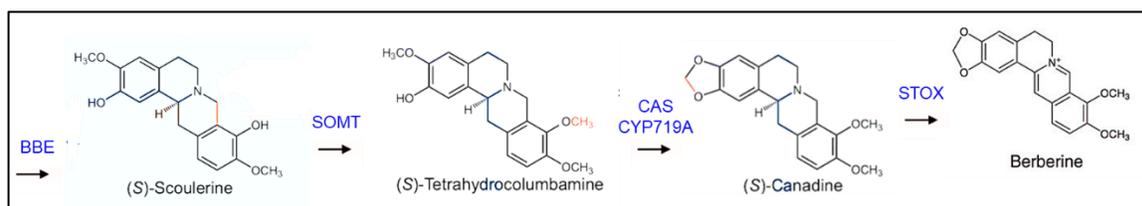
Las reacciones continúan con la conversión de la S-norcoclaurina en (S)-coclaurina por la norcoclaurina 6-O-metiltransferasa (6OMT) (**Fig. 1.3**), la S-coclaurina es transformada en S-N-metilcoclaurina, mediante la coclaurina N-metiltransferasa (CNMT), la hidroxilación de (S)-N-metilcoclaurina es catalizada por una monooxigenasa dependiente del citocromo P450 que tiene actividad de N-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa (Cyp80B3/NMCH), para formar N-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa. La reticulina se forma a partir de este compuesto por acción de la 3'-hidroxi-N-metilcoclaurina 4'-O-metiltransferasa (4'OMT) (Samanani et al., 2005).



**Figura 1.3.** Vía que conduce a la formación de (S)-reticulina, 6OMT: norcoclaurina 6-O-metiltransferasa, CNMT: coclaurina N- metiltransferasa, NMCH: N-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa, 4'OMT: 4'-O-metiltransferasa. Tomado de Singh et al., (2019) con modificaciones.

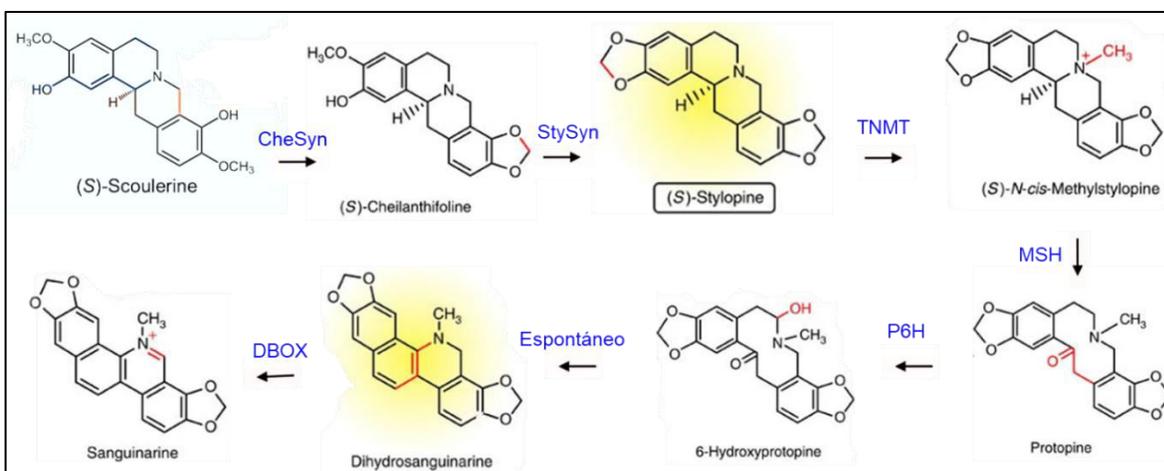
La conversión de (S)-norcoclaurina en (S)-reticulina implica una O-metilación en la posición 6, una N-metilación, una 3'-hidroxilación y una segunda 4'-O-metilación. Las dos O-metiltransferasas, norcoclaurina 6-O-metiltransferasa (6OMT) y 3'-hidroxi-N-metilcoclaurina 4'-O-metiltransferasa (4'OMT), muestran una estricta regioespecificidad. S-reticulina es el intermediario común en la formación de todos los ABI's. La formación de los ABI's más abundantes en *A. mexicana*, los tipos benzofenantridina, protoberberina y protopina, comienzan con la formación de (S)-escoulerina por la enzima puente de berberina (BBE). En este punto la ruta se bifurca para los subtipos de ABI's protoberberinas y benzofenantridinas/protopina (Facchini y De Luca, 2008).

La vía para la biosíntesis de protoberberinas inicia con la transformación de S-escoulerina a S-tetrahydrocolumbamina por la escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT). Luego S-tetrahydrocolumbamina se convierte en S-canadina por la canadina sintasa (CYP719A o CAS), (Fig. 1.4). Finalmente, la berberina se forma a partir de (S)-canadina por la (S)-tetrahidroprotoberberina oxidasa (STOX) una flavoproteína (Beaudoin y Facchini, 2014; Han et al., 2021).



**Figura 1.4.** Ramificación de la ruta para la síntesis de los alcaloides tipo protoberberina. BBE: Enzima puente de berberina, SOMT: escoulerina-9-O-metiltransferasa, CAS: canadina sintasa y STOX: tetrahidroprotoberberina oxidasa.

La formación de alcaloides de benzofenantridina, como la sanguinarina, inicia con la participación de dos enzimas dependientes del citocromo P450, (S) queilantifolina sintasa (CheSyn) y (S) estilopina sintasa (StySyn), que catalizan la formación de dos puentes metilendioxi sobre (S) escoulerina, para producir (S) estilopina (Fig. 1.5). Este compuesto es N-metilado, formando tetrahidrometilestilopina por la tetrahidroprotoberberina-cis-N-metiltransferasa (TNMT).

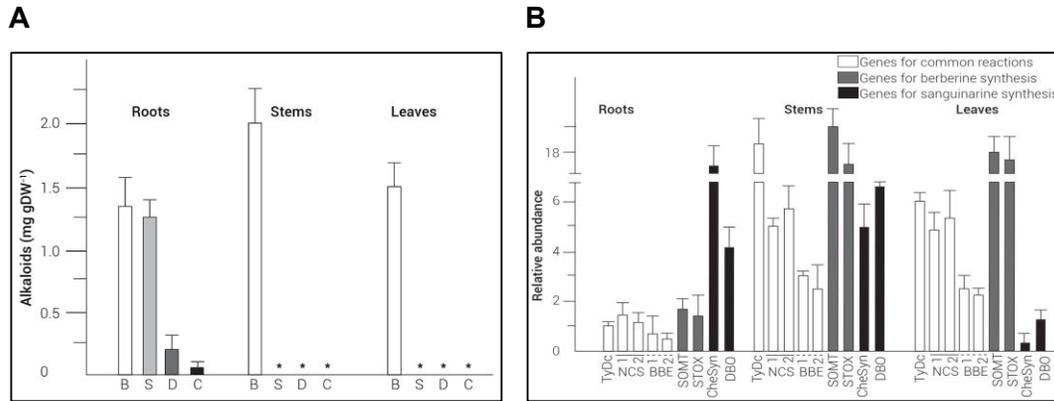


**Figura 1.5.** Ramificación de la ruta para la biosíntesis de los alcaloides tipo Benzofenantridina. CheSyn: Queilantifolina sintasa, StySyn: Estilopina sintasa, TNMT: Tetrahidroprotoberberina-cis-N-metiltransferasa. NMSH: N-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa, P6H: 6'-hidroxilasa, DBOX: Dihidrobzenofenantridina oxidasa. Modificado de Hagel y Facchini, (2012).

Los pasos posteriores son catalizados por la N-metilstilopina 14'-hidroxilasa (MSH) y la protopina 6'-hidroxilasa (P6H), formando 6-hydroxyprotopina que, de forma espontánea sufre un reordenamiento intramolecular para formar dihidrosanguinarina que por acción de la dihidrobzenofenantridina oxidasa (DBOX) forma la sanguinarina (Hagel y Facchini, 2012; Huang et al., 2020).

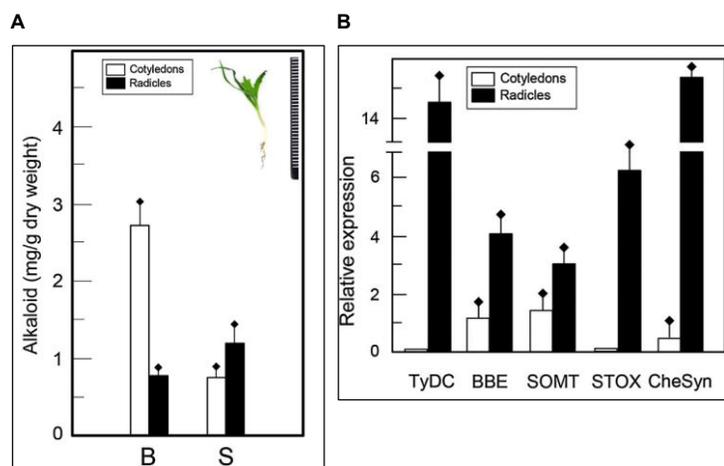
#### 1.4. Biosíntesis de alcaloides ABI's en *A. mexicana*.

En *A. mexicana* se ha demostrado que la biosíntesis de alcaloides difiere en cuanto el estadio de desarrollo de la planta (Xool-Tamayo et al., 2017; 2022; Vázquez-Flota et al., 2018). En plantas maduras se evaluó la distribución tisular de berberina y sanguinarina, junto con la de los transcritos correspondientes a genes seleccionados involucrados tanto en las reacciones biosintéticas iniciales, que son comunes para ambos alcaloides, como en las reacciones específicas finales que conducen a la formación de berberina y sanguinarina (Fig. 1.6A y B). Las raíces fueron los sitios de mayor acumulación de alcaloides a pesar de que mostraron la menor acumulación de los transcritos analizados.



**Figura 1.6.** Contenido de alcaloides en diferentes tejidos de *A. mexicana*. **(A)** Alcaloides contenidos en raíz, tallos y hojas. B, berberina; S, sanguinarina; D, dihidrosanguinarina; C, quelerritrina; \*: No detectado. **(B)** Distribución y abundancia relativa de transcripciones biosintéticas de alcaloides en tejidos de *A. mexicana*. Tomado de Vázquez-Flota et al., (2018).

Por otra parte, durante el desarrollo de plántulas e hipocótilos se analizó la distribución de berberina y sanguinarina. También se analizaron los transcritos correspondientes a genes implicados en la biosíntesis de berberina y sanguinarina. Se observó que se acumularon niveles bajos de sanguinarina en los hipocótilos (**Fig. 1.7A**). Los transcritos relacionados con la biosíntesis de sanguinarina continuaron acumulándose en los hipocótilos emergentes, así como en las radículas de plántulas y plántulas cotiledonarias, coincidiendo con la acumulación de alcaloides. Por el contrario, la berberina se encontró principalmente en partes aéreas, incluso cuando los transcritos biosintéticos se detectaron principalmente en radículas (**Fig. 1.7B**) (Xool-Tamayo et al., 2017).

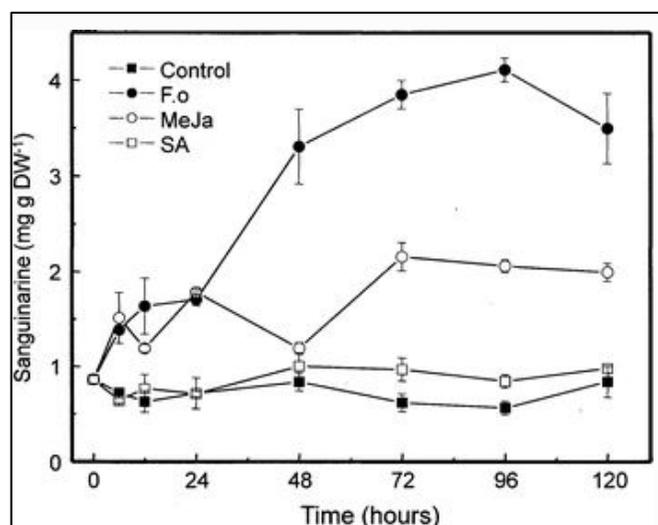


**Figura 1.7.** Biosíntesis de alcaloides en plantas jóvenes de *A. mexicana*. **(A)** Contenido de berberina (B) y sanguinarina (S) en cotiledones y radículas. **(B)** Abundancia relativa de transcritos en cotiledones y radículas. Tomado de Xool-Tamayo et al., (2017).

La distribución de alcaloides en esta especie cambia según las etapas de desarrollo. La sanguinarina no se encuentra en plantas maduras, pero se detecta en las hojas de las plántulas jóvenes, mientras que la berberina está ausente en los tejidos subterráneos de las plántulas en desarrollo (Xool-Tamayo et al., 2017).

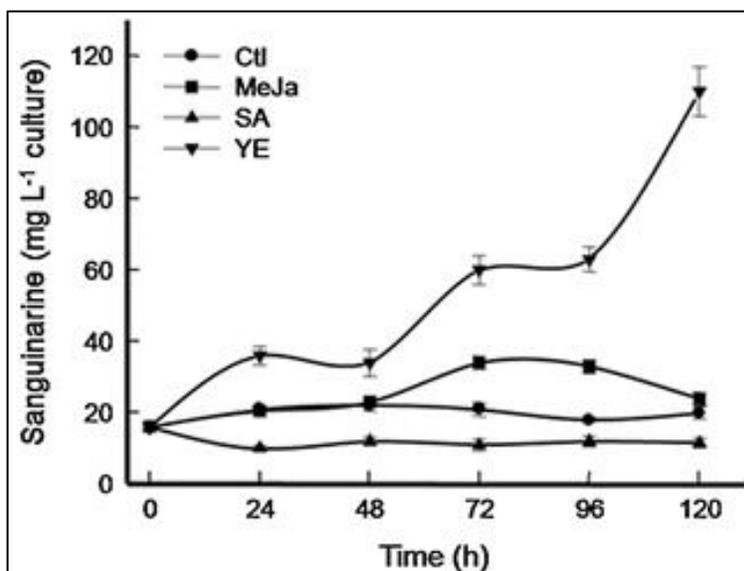
De este modo, se observa que la distribución tisular de los alcaloides no siempre coincide con la de los transcritos de los genes relacionados con su formación. Esto sugiere que la síntesis de los alcaloides no se lleva a cabo en los mismos tejidos en los que se acumulan lo que apunta hacia la participación de mecanismos de transporte para estos alcaloides. En ese sentido, recientemente, se logró el aislamiento de un transportador de la familia ABC-B, llamado AmABC-B1, con actividad para el transporte de tanto sanguinarina y berberina que opera principalmente en semilla y raíces (Loza-Muller et al., 2021).

Por otra parte, también se han realizado estudios sobre la acumulación en cultivos *in vitro*. Es interesante notar que los cultivos *in vitro*, tanto de callos como de células en suspensión, solamente se ha detectado la acumulación de sanguinarina (Monforte-González et al. 2019). El tratamiento con inductores del metabolismo secundario, como el jasmonato de metilo y homogenizados de hongos, como *Fusarium oxysporum*, pueden producir una acumulación de sanguinarina después de 96 h (**Fig. 1.8**). Los valores de sanguinarina en estos cultivos fueron de 4 mg/g, que son comparables a los encontrados en cultivos de células inducidas de *Eschscholzia californica*, *Papaver somniferum* y *Sanguinaria canadensis* (Trujillo-Villanueva et al., 2010).



**Figura 1.8.** Efecto de homogeneizados de *F. oxysporum*, jasmonado de metilo 100  $\mu$ M (MeJa) y ácido salicílico 100  $\mu$ M (SA) sobre la acumulación de sanguinarina.

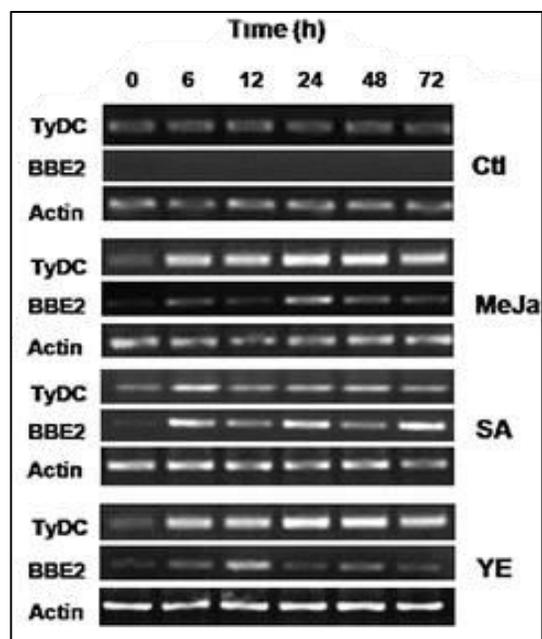
La exposición de suspensión de células de *A. mexicana* a jasmonato de metilo (MeJa) duplicó la acumulación de sanguinarina, mientras que no se observaron cambios en los cultivos tratados con ácido salicílico (SA). Por el contrario, tras la exposición a extracto de levadura (YE), la sanguinarina alcanzó  $108 \text{ mg/L}^{-1}$  de suspensión, después de 120 h (**Fig. 1.9**).



**Figura 1.9.** Inducción de cultivos de células de *A. mexicana*. Se expusieron suspensiones de 10 días a  $100 \mu\text{M}$  de jasmonato de metilo (MeJa),  $100 \mu\text{M}$  de ácido salicílico (SA),  $200 \text{ mg}$  de extracto de levadura (YE) y agua (control).

También se analizó la acumulación de los transcritos para TyDC y BBE, se encontraron algunas diferencias en los patrones, especialmente para BBE. En los tiempos cortos de exposición (6 h). En el caso de los transcritos para BBE, estos aumentan en todos los casos (**Fig. 1.10**). Cabe mencionar que la respuesta de BBE a MeJa se observó habitualmente entre 12 y 24 h después de la exposición en esta línea celular de *Argemone*, disminuyendo posteriormente (Trujillo-Villanueva et al., 2010; 2012).

El aumento en la acumulación de sanguinarina por la exposición a homogenizados fúngicos indican que la interacción de esta planta con derivados de estos microorganismos es capaz de modificar el metabolismo de los alcaloides, sugiriendo un posible papel en dicha interacción.



**Figura 1.10.** Acumulación de transcritos de TyDC, BBE-2 y actina en cultivos expuestos a los diferentes tratamientos. Los transcritos fueron detectados por RT-PCR.

### 1.5. Los hongos como patógenos de las plantas

Los hongos se dividen en tres grupos no relacionados; los hongos verdaderos (eumycota), los oomicetos y los mohos limosos. Los hongos verdaderos tienen cuatro grupos principales: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota. Los oomicetos (oomycota) tienen una composición distinta de la pared celular y zoosporas flageladas (Mahadevakumar et al., 2021). Hasta la fecha, no está claro cuántas especies de hongos existen. Una estimación conservadora, basada en la proporción de angiospermas/hongos, los coloca entre 2.2 y 3.8 millones de especies, aunque hasta ahora sólo se han registrado entre el 3.7% y el 6.4% de éstas (Hawksworth y Lücking, 2017). De ellos, alrededor de 30,000 son patógenos de plantas (Manoharachary et al., 2021).

### 1.6. Interacción planta-patógeno

Las plantas son susceptibles a infecciones causadas una variedad de microorganismos patogénicos. Dado que las plantas no tienen la capacidad de desplazarse, deben enfrentar esas agresiones en el mismo sitio en que se encuentran y, para ello, a lo largo de la evolución han desarrollado diferentes mecanismos que les permiten detectar y protegerse. La interacción planta-patógeno es un proceso coevolutivo en el que ambos participantes desarrollan mecanismos para lograr sus respectivos objetivos; por el lado el microorganismo

intenta colonizar los tejidos y aprovechar los recursos disponibles en los mismos para su propio beneficio, mientras que la planta intenta evitar que esto suceda (Jones y Dangl, 2006).

En la primera etapa de esta interacción, la célula de los tejidos vegetales debe reconocer al patógeno. Esto sucede con la participación de proteínas membranales específicas, llamadas receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estas proteínas precisamente reconocen patrones moleculares asociados a la superficie de los patógenos (PAMPs). Los PAMPs son determinantes moleculares, comunes en diferentes microorganismos, que incluyen fragmentos de pared celulares, oligosacáridos o proteínas de superficie, entre otros (Boller y Felix, 2009). El reconocimiento de los PAMPs por los PRRs ocurre por interacciones de afinidad entre ambos y activa la inmunidad basal de la planta (inmunidad activada por PAMPs ó PTI). Esta es la primera respuesta de defensa general que, eventualmente conducirá a diferentes procesos, como el reforzamiento de las paredes celulares y la producción de compuestos antimicrobianos, encaminados a evitar el daño infectivo. En sí, esta respuesta consiste en la activación de cascadas de señalización que a su vez activan la expresión de conjuntos de genes relacionados con los procesos mencionados (Chisholm et al., 2006). Como resultado, en los casos exitosos, la planta limitará la proliferación de los microorganismos, evitando la colonización de sus tejidos. No obstante, para superar esta respuesta, los microorganismos liberan compuestos, llamados efectores, que interfieren con ella o la bloquean. Los efectores pueden suprimir la PTI o redirigir el metabolismo celular a favor del patógeno. Por ejemplo, algunas bacterias inyectan efectores directamente en las células vegetales utilizando sistemas de secreción especializados (He et al., 2006). Por otro lado, el hongo *Magnaporthe oryzae*, que infecta el arroz, secreta efectores proteicos que suprimen la inmunidad en la planta, facilitando así la colonización del tejido. Los efectores microbianos actúan bloqueando los receptores de señalización de la planta, degradando moléculas de señalización o inhibiendo la expresión de genes de defensa (Giraldo y Valent, 2013).

No obstante, las plantas también han desarrollado estrategias de segunda línea para contender con los efectores intracelulares inyectados por el patógeno. La resistencia basada en genes (R-gene) intracelulares incluye la expresión de genes cuyos productos reconocen los efectores del patógeno provocando una reacción inmune más pronunciada y específica; la inmunidad activada por efectores (ETI) (Jones y Dangl, 2001). Las proteínas R presentan dominios afines a los efectores específicos del patógeno (como los dominios NLR), y al unirse a ellos, desencadenan una serie de eventos defensivos, que incluyen la producción

de especies reactivas de oxígeno, la expresión de genes adicionales de defensa, así como la respuesta hipersensible (HR) y la muerte celular programada en el sitio de infección con el fin de contener la propagación del patógeno (Bonardi y Dangl, 2012). La HR es uno de los resultados más drásticos de la ETI. Esta respuesta involucra la rápida muerte de las células adyacentes al sitio de infección, aislando de esa manera al microorganismo y limitando su acceso a los nutrientes contenidos en el tejido. En paralelo, se liberan señales químicas sistémicas para la activación de mecanismos de defensa en tejidos distantes (Coll et al., 2011). Esta muerte celular programada es un mecanismo muy complejo que requiere la activación de una cascada de señales intracelulares e involucra la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y las proteínas reguladoras, como las caspasas. De este modo, la HR cumple una función doble al evitar la propagación del patógeno y enviar señales de alerta a tejidos aun no afectados, anticipando la reacción defensiva en los tejidos aun no afectados (Mur et al., 2008).

La aparición de mecanismos de resistencia, tanto en las plantas como en los microorganismos, representa un fenómeno de coevolución ya que, la aparición de nuevos mecanismos de defensas en las plantas representa para los patógenos una presión evolutiva que actúa para seleccionar individuos con la capacidad de superarla. De este modo, constantemente ocurre a una diversificación de genes R en las plantas y de efectores en los patógenos (Stahl y Bishop, 2000). Así, en diversos sistemas, como en el formado por el trigo y la roya (*Puccinia graminis*), se han desarrollado múltiples genes R para la resistencia a diferentes cepas del hongo. Sin embargo, en *P. graminis* también se ha generado la aparición de efectores que para contrarrestar los efectos de los productos de los genes R del trigo, o que suprimen su expresión, llevando así a la aparición de nuevas cepas virulentas (Kolmer, 2005).

Una parte muy importante de la respuesta antimicrobiana en las plantas involucra la participación de mecanismos inducibles que solamente se activan como respuesta al estímulo que representa el patógeno. Existen dos mecanismos inducibles principales; la producción de metabolitos secundarios (fitoalexinas), que tienen propiedades antimicrobianas, y la síntesis de proteínas de defensa (quitinasas y glucanasas), destinadas a la degradación de las paredes celulares de los patógenos, principalmente hongos (Dixon, 2001). Este tipo de respuesta, en ocasiones genera una memoria inmune, en la cual la exposición previa a un patógeno confiere una mayor resistencia a la planta contra a futuras infecciones, tanto del mismo agente como por otros diferentes. Este preconditionamiento

implica cambios a nivel epigenético y/o bioquímico que permiten montar una respuesta más rápida y eficiente contra infecciones posteriores (Conrath, 2006).

### **1.7. Los metabolitos secundarios en el sistema defensivo de las plantas**

Las interacciones entre las plantas y los patógenos microbianos pueden resultar en varias reacciones de defensa dentro de la planta infectada. En muchos casos, esta respuesta incluye la acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. La mayoría de los metabolitos secundarios poseen características antifúngicas. Los fenólicos y flavonoides afines constituyen un grupo grande de fitoquímicos, estos compuestos están presentes en la piel de la fruta y en las hojas en altas concentraciones y participan en la defensa de las plantas contra la pigmentación, la resistencia a los rayos UV y la resistencia a las enfermedades. Los compuestos fenólicos cambian la permeabilidad celular de los patógenos y también causan deformación funcional de las proteínas de la membrana que resultan en la distracción del gradiente de pH, sistema de producción y conservación de ATP, enzimas unidas a la membrana, utilización de sustrato para ATP (Zaynab et al., 2018).

Los compuestos antimicrobianos dificultan el crecimiento de patógenos en apoplasto. Por ejemplo, las saponinas con fuertes propiedades antifúngicas, la  $\alpha$ -tomatina (saponina de tomate) activa las vías de las proteínas G monoméricas y la fosfotirosina cinasa que se une a la membrana celular seguida por el componente celular que conduce al estallido de ROS y elevación de  $Ca^{+2}$  en *F. oxysporum* (Zaynab et al., 2018)

El descubrimiento de fitoalexinas sesquiterpenoides, zealexinas en el maíz infectado con *F. graminearum* fue el resultado de la caracterización de las respuestas fisiológicas. Las zealexinas favorecieron la resistencia del maíz contra *A. flavus*, *F. graminearum* y *R. microspores* (Zaynab et al., 2018).

Los compuestos hidrófilos que incluyen alcaloides, glucosinolatos y taninos se almacenan en vacuolas o idioplastos, mientras que los lipófilos, como los aceites esenciales a base de terpenos, se pueden almacenar en membranas o cutículas tilacoides, conductos de resina y tricomas. Los alcaloides provocan alteraciones enzimáticas que afectan a procesos fisiológicos, aumentan el calcio citoplásmico, inhiben la división celular y síntesis de ADN, mecanismos de reparación por intercalación con ácidos nucleicos (Matsuura y Fett-Neto, 2017).

### 1.8. Los alcaloides en la defensa contra infecciones por patógenos

En pocos casos se ha estudiado el papel de los alcaloides en la defensa química de la planta que los produce. Estudios en pastos *Festuca* y *Lolium* infectados con *Acremonium* spp., y *Epichloe typhina* mostraron que los alcaloides lolina, peramina y ergovalina aumentaban en las infecciones con *Acremonium coenophialum*, mientras que los alcaloides peramina, lolitrem B y ergovalina aumentaron en infecciones con *E. typhina*. (Siegel et al., 1990). También en *Catharanthus roseus* inoculados con dos hongos endófitos, *Curvularia* sp. CATDLF5 y *Choanephora infundibulifera* CATDLF6, hongos que se encuentran en las hojas de la planta se encontró que el contenido de vindolina aumentaba en un 229-403% en las raíces (Pandey et al., 2016).

Por otro lado, en plantas de *A. mexicana* con síntomas de infección fúngica, que incluían manchas necróticas en las hojas, se detectó la presencia de sanguinarina en las hojas (Hernández-Hernández, 2022). La presencia de este alcaloide en las hojas es notable ya que, por lo general, no se detecta en los tejidos aéreos (Vázquez-Flota et al., 2018). Consistentemente con esto, en las hojas de plantas vecinas, pero libres de daños por hongos, no se observó la presencia del alcaloide. Notablemente, las cantidades acumuladas en las hojas dañadas fueron entre un 20 y 40 % de lo acumulado normalmente en las raíces (0.2–0.4 mg/g PS), que representa el sitio de mayor acumulación. Este aumento coincidió con la disminución en el contenido de berberina en comparación con las hojas sanas (0.150 vs 0.600 mg/g PS). Estos cambios en los contenidos de alcaloides solamente se observaron en las hojas, ya que tallos y raíces no mostraron diferencias entre plantas sanas e infectadas. Más aún, no se observaron diferencias en plantas sin síntomas de infección de la misma población que las plantas infectadas y de poblaciones distantes sanas (Hernández-Hernández, 2022). Aunque estos datos sugieren la participación de estos alcaloides en la interacción con los hongos causantes de las lesiones, esto no fue establecido en este trabajo.

Aunque existen muchos estudios sobre la actividad antimicrobiana de los alcaloides, la mayoría de éstos se refieren a posibles aplicaciones médicas o en la elaboración de agroquímicos (Laines-Hidalgo et al., 2022). La aplicación de sanguinarina en plantas de arroz, confirió protección contra ocho diferentes hongos fitopatógenos como *M. oryzae*, *F. oxysporum* y *B. cinerea*, entre otros. Estos efectos se relacionaron con los daños a la integridad de membranas de las células fúngicas y con la producción de especies de reactivas de oxígeno (Zhao et al., 2019). Adicionalmente, efectos de la sanguinarina y otras benzofenantridinas en la ruta de señalización dependientes de cAMP impiden la formación de

películas en levaduras y de micelios en hongos filamentosos (Zhong et al., 2017). No obstante, como ya se ha mencionado, el posible papel de la sanguinarina u otros alcaloides relacionados no ha sido analizada en el contexto de la propia planta que los produce.

La mayoría de los estudios de la interacción con patógenos fúngicos están enfocados en los cultivos *in vitro*. Algunos alcaloides que se producen después de la interacción de las plantas con hongos pueden tener respuestas similares en cultivos en suspensión de células vegetales después de la adición de preparaciones de inductores derivadas de patógenos al medio de cultivo (Hahn y Albersheim, 1978). Los efectos del inductor de levadura sobre la formación de alcaloides de isoquinolina se han estudiado con cultivos en suspensión, *Thalictrum rugosum* y *Eschscholzia californica*. El primer cultivo produce berberina, mientras que el último cultivo produce varios alcaloides de benzofenantridina. Por otro lado, el cultivo celular de *E. californica* produce quelirrubina y quelilutina después del tratamiento con un inductor similar aislado del extracto de levadura (Schumacher et al., 1987). Se han publicado varios informes sobre la formación de alcaloides de isoquinolina en respuesta a la interacción con diversos hongos en cultivos de células vegetales (Heinstein 1985; Cline y Coscia 1988). Esto es interesante ya que muchas plantas que los producen, como *Chelidonium majus*, *E. californica*, *M. cordata* y *P. somniferum* son susceptibles a diferentes infecciones fúngicas que causan diferentes enfermedades como mildews y tizones, entre otras (Watts et al., 2011; Camacho et al., 2018).

Evidencia adicional sobre el posible papel de los alcaloides bencilisoquinolínicos en la interacción planta hongo proviene de estudios en cultivos celulares *in vitro*. En líneas celulares de *Papaver somniferum*, la exposición a una variedad de preparaciones inductoras principalmente fúngicas resultó en la acumulación de sanguinarina. Entre más de diez especies analizadas, el homogenizado de *Botrytis* fue el más eficaz (Eilert et al., 1986). La exposición a preparaciones de *Chaetomium globosum*, *Aspergillus niveoglaucus*, *Paecilomyces lilacinus*, y *Trichoderma harzianum*, aumentó la acumulación de sanguinarina y esto coincidió con la inducción de algunas enzimas que participan en su biosíntesis de sanguinarina, como CheSyn, estilopina sintasa (STS), tetrahidroprotoberberina cis-N-metiltransferasa (TNMT), y protopina 6-hydroxilasa (P6H) (Verma et al., 2014).

Del mismo modo, berberina y sanguinarina aumentaron en cultivos de *Phellodendron Amurense* y *Coscinium fenestratum* al interactuar con *Alternaria* sp. y *Fusarium solani* (Duan et al., 2009). La producción de sanguinarina también ha incrementado al exponer cultivos *in vitro* de *Macleaya cordata* a preparaciones de *Fusarium proliferatum* (Wang et al., 2014). Como ya se mencionó, en cultivos de *A. mexicana* se ha mejorado la producción de

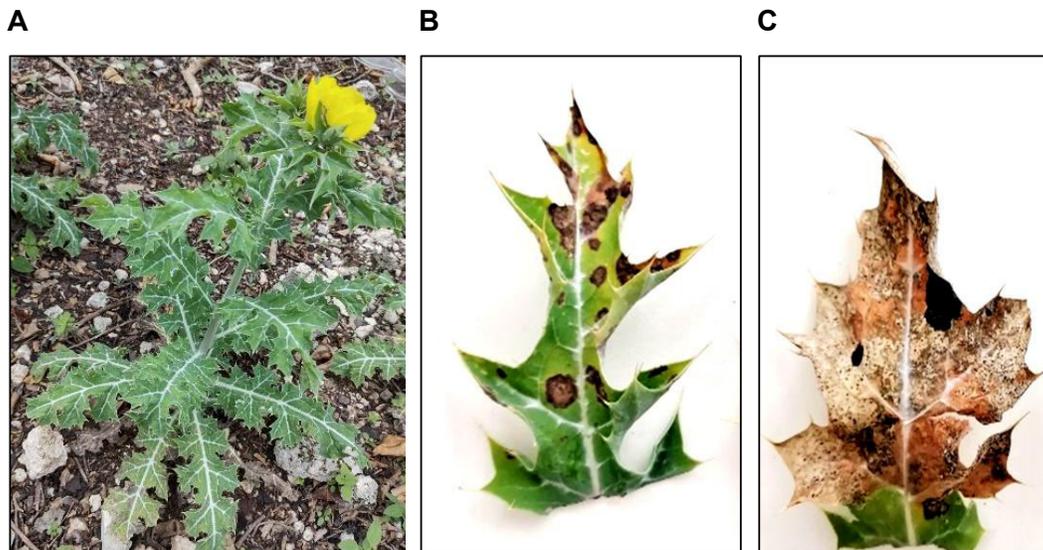
sanguinarina con homogenados de *Fusarium oxysporum* y extracto de levadura y se ha logrado identificar algunas de las enzimas que resultan afectadas por la exposición a estos agentes (Trujillo-Villanueva et al., 2010; 2012).

### **1.9. Recapitulación de los antecedentes**

De lo anterior, se desprende que, a pesar de los numerosos estudios sobre las propiedades antimicrobianas de diversos alcaloides, y de que, en cultivos celulares *in vitro* de diversas plantas, la exposición a preparaciones fúngicas dispara la producción de alcaloides, existen pocos estudios sobre el papel de los alcaloides en la interacción planta-hongo. Recientemente, se ha encontrado que plantas de *A. mexicana* son susceptibles a la infección por hongos patógenos y que esto resulta en la presencia de sanguinarina, que tiene efectos antimicóticos, en las hojas que, de manera normal no acumulan este alcaloide. Sin embargo, estos efectos no se han analizado en el contexto de una planta que los produzca.

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Aunque se asume una posible función de los alcaloides en la defensa química de las plantas que los producen, esto ha sido estudiado en muy pocas ocasiones y existen pocos reportes en la literatura sobre el papel de los alcaloides en la interacción planta-hongo. Una limitante, es la falta de sistemas de infección controlados. Recientemente, se observó que las hojas de plantas de *A. mexicana* con síntomas de infección fúngicas (lesiones circulares de color parda; **Fig. 1.11**) presentaron cambios en los patrones de acumulación de alcaloides (Hernández-Hernández, 2012). No obstante, los hongos asociados a estas lesiones no se han aislado, ni la identidad del agente causal establecido. Este trabajo propone analizar los cambios en los patrones de alcaloides ocasionados por la interacción planta-hongo, utilizando como modelo *Argemone mexicana* L. Para ello, los hongos asociados a las lesiones serán aislados e identificados y se utilizarán para el desarrollo de un sistema de infección controlado que permita contrastar diferentes condiciones de interacción planta-hongo.



**Figura 1.11.** (A) planta de *A. mexicana*, (B) síntomas iniciales con clorosis y manchas circulares pardas en hoja de *A. mexicana*, (C) síntomas avanzados y secamiento de la lámina foliar.

## JUSTIFICACIÓN

Los metabolitos secundarios en las plantas participan en diferentes interacciones de las plantas con su entorno. Entre los metabolitos secundarios, a los alcaloides se les atribuye un papel principalmente en la defensa contra herbívoros. A pesar de que diferentes estudios farmacológicos han demostrado sus efectos antimicóticos y de que en cultivos *in vitro* la adición de preparaciones obtenidas de cultivos de hongo induce la formación de alcaloides, el papel de los alcaloides en la interacción planta hongo ha sido poco estudiada. Una de las limitantes para ello es la carencia de un modelo experimental adecuado. Los recientes resultados sobre la modificación de los patrones de acumulación de alcaloides en plantas de *A. mexicana* ofrecen una oportunidad de establecer un modelo con las características deseadas.

## HIPÓTESIS

Los patrones de acumulación de alcaloides en *A. mexicana* se modificarán diferencialmente en interacciones con hongos compatibles y no compatibles.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar el metabolismo de los alcaloides en plantas de *Argemone mexicana* durante la interacción con hongos compatibles y no compatibles.

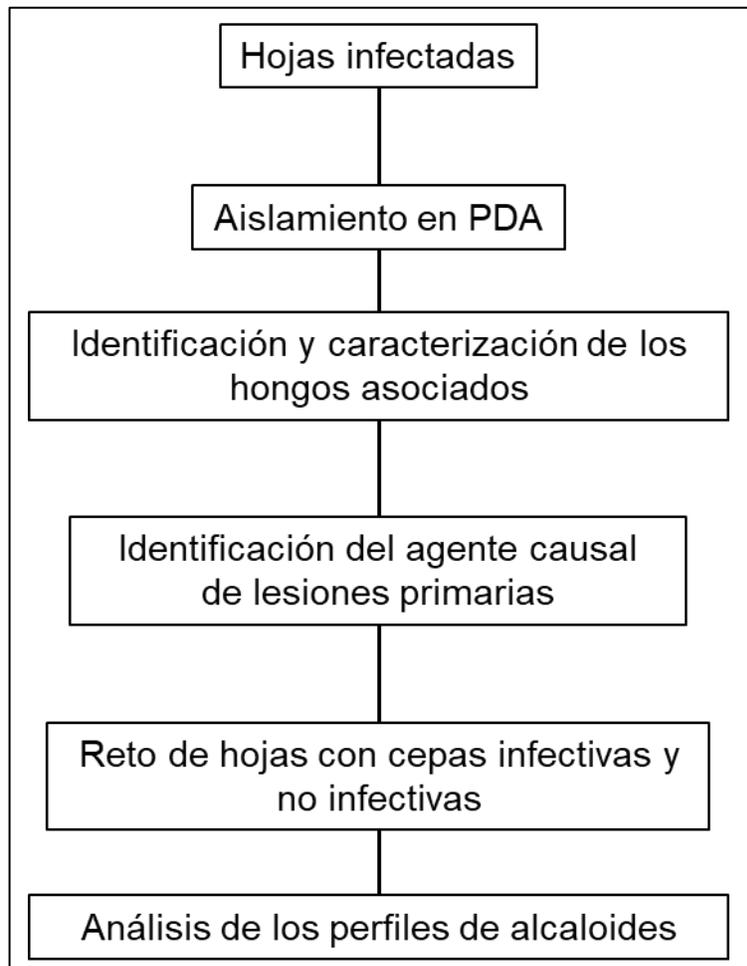
## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar los hongos asociados a las lesiones necróticas en hojas de *A. mexicana*.
- Desarrollar un sistema de infección controlado para hojas de *A. mexicana* con cepas de hongos compatibles y no compatibles.
- Analizar los patrones de acumulación de alcaloides en hojas *A. mexicana* expuestas a hongos compatibles y no compatibles.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para el cumplimiento de los objetivos, se planteó la estrategia experimental mostrada en la **Figura 1.12**.

En el primer objetivo, se propuso el aislamiento e identificación de los hongos asociados a las lesiones foliares, se colectaron hojas con lesiones necróticas y se utilizaron como fuente para el aislamiento de los hongos mediante técnicas microbiológicas convencionales. La identificación de los hongos asociados a las mismas se realizó por; 1) observación directa de las características morfológicas de aquellos hongos localizados en las lesiones; 2) características morfológicas de las colonias en cultivos axénicos, así como por observación microscópica; y 3) identificación a nivel moleculares. Para el segundo objetivo, consistió en desarrollar un sistema de infección controlado para hojas de *A. mexicana* con hongos compatibles y no compatibles, una vez identificados los hongos asociados a las lesiones, se utilizaron para retar plantas sanas de *A. mexicana* y se observaron si eran capaces de producir una lesión primaria. Aquellas especies que lo lograron, se consideraron como compatibles y se registraron los síntomas que ocasionaron. Para comprobar la naturaleza de éstos, se aislaron e identificaron a partir de los tejidos infectados. Finalmente, para el tercer objetivo, el análisis de los patrones de acumulación de alcaloides en hojas expuestas a hongos compatibles y no compatibles, se analizó el contenido de alcaloides, principalmente sanguinarina y berberina, en hojas, tallos y raíces de plantas con diferentes grados de infección fúngica.



**Figura 1.12.** Estrategia experimental utilizado para el desarrollo de este trabajo.

---

## CAPÍTULO II

### AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS ASOCIADOS A LESIONES FOLIARES EN *Argemone mexicana*

#### 2.1. INTRODUCCIÓN

Se han aislado diversos hongos en tejidos de *A. mexicana*; en Arabia Saudita se lograron identificar algunos como *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia ellisi*, *Phoma humicola*, *Ulocladium atrum* y *U. botrytis* entre otros, así como varios más a nivel de género, como *Cephalosporidium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Rhizopus* (Abdel-Hafez, 1986); en el estado norteamericano de Texas se han reportado *Cercosporidium guanicense* y varias especies del género *Deightonella*, como *D. arundinacea*, *D. papuana* y *D. torulosa* (Pollack y Matthews, 1976). No obstante, aunque algunas de estas especies son agentes causales de diferentes enfermedades como pudriciones, tizones y mildius, en ambos reportes se omitió mencionar la presencia de síntomas o lesiones en las plantas a partir de las que fueron aisladas. Infecciones fúngicas han sido descritas en algunas especies de la familia Papaveraceae, a la cual pertenece el género *Argemone*; por ejemplo, la pudrición de raíz en *Chelidonium majus* se asoció con la infección por *Fusarium oxysporum*, mientras que en *Escholtzia californica*, *Macleaya cordata* y algunas especies del género *Papaver*, hongos del género *Erysiphe*, *Dentryphion* y *Pleospora*, respectivamente, se asociaron al desarrollo de diversas enfermedades como mildius y tizones (Camacho-Tapia et al., 2018; O' Neil et al., 2000; Park et al., 2012; Watts et al., 2011).

Recientemente se reportó que plantas de *A. mexicana* en una localidad de Mérida Yucatán presentaban lesiones foliares consistentes con los síntomas de infecciones fúngicas (Hernández-Hernández, 2022), dichas lesiones eran puntos cafés en las hojas que, eventualmente se propagaron a toda la superficie foliar. Esta enfermedad se denominó *mancha foliar* (Hernández-Hernández, 2022), inicia como puntos necróticos cafés, ligeramente prominentes de 1 mm de diámetro sobre la superficie adaxial de las hojas del tercio basal-media. Poco después de su aparición (entre 2 y 4 cuatro días), las manchas se rodean de una zona necrótica de bordes irregulares de entre 6 y 10 mm. Al avanzar la infección, las lesiones cercanas se fusionan en áreas mayores, causando la sequedad de las hojas, mismas que permanecen unidas al tallo (**Fig. 2.1**). Esto ocurre en

aproximadamente 10 días después de la aparición de las primeras manchas. Las lesiones se dispersan a todas las hojas, causando la muerte de la planta en un periodo de cuatro semanas para individuos de aproximadamente 50 cm de altura (tres meses de edad). Estas lesiones pueden atravesar la lámina foliar, detectándose en la cara abaxial y pueden iniciar en zonas cercanas o distantes de la nervadura central (Hernández-Hernández, 2022; **Fig. 2.1**). Solamente las hojas, y en menor medida las cápsulas presentan estos síntomas. El análisis de alcaloides reveló cambios notables en las plantas infectadas, respecto a aquéllas libres de síntomas, principalmente por la presencia de cantidades importantes de sanguinarina en las hojas, que por lo regular no acumulan este alcaloide y una ligera disminución en el contenido de berberina. Los contenidos en tallos y raíces mostraron pocas variaciones en las plantas infectadas respecto a las aparentemente sanas (Hernández-Hernández, 2022).

No obstante, el agente causal de esta enfermedad no fue identificado. Por ello, el primer objetivo de este trabajo se enfocó en el aislamiento e identificación de los hongos asociados a las lesiones foliares con el fin de poder identificarlos y emplearlos en pruebas de patogenicidad que permitan establecer su identidad.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Hojas de *Argemone mexicana* con síntomas de necrosis se colectaron entre marzo de 2021, junio de 2022 y 2023 en una misma locación, en Mérida, Yucatán. Se colectaron hojas con diferente grado de daño (**Fig. 2.7**). Las hojas se colocaron en bolsas de polietileno herméticamente selladas y se transportaron en hielo para su procesamiento en el laboratorio. Una parte del material colectado se utilizó para la observación directa de las lesiones por microscopía óptica y electrónica de barrido mientras que otra se procesó para el aislamiento de los hongos asociados.

### **2.2.1. Observación de los hongos presentes en las lesiones foliares**

La caracterización morfológica se realizó mediante observaciones directas de las estructuras fúngicas sobre las lesiones, tanto por microscopía óptica, como por microscopía electrónica de barrido (MEB). Para la caracterización de los hongos sobre las lesiones por MEB, secciones de hojas mostrándolas se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.0) por 24 h y posteriormente se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico (25, 50, 75 y 100%) durante 30 min en cada una. Los tejidos deshidratados fueron tratados secuencialmente con acetona 50 y 100 % por 15 y 30 min,

respectivamente y se secaron con CO<sub>2</sub> en una secadora de punto crítico Sandri-780 (Tousimis Research Corporation®, Samdri-795 EE. UU). Los tejidos secos se montaron en bloques usando una cinta doble adhesiva de carbón y se recubrieron con oro por 1 min en un metalizador de muestras Dentos Vaccum/Desk II® (Moorestown, NJ). Los tejidos se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JSM 6390, Jeol®, Japón) operando a 15 Kv (Bozzola y Rusell, 2004). Se observaron las dimensiones de los macroconidios, microconidios, micelios y fiálides (Leyva-Mir et al., 2017; Pedersen et al., 2019).

### 2.2.2. Aislamiento e identificación de los hongos asociados a las lesiones foliares

Los hongos fueron identificados por sus características morfológicas sobre las lesiones y a partir de cultivos axénicos por criterios morfológicos y análisis filogenéticos (ver sección 2.2.3).



**Figura 2.1.** Hojas con diferente grado de severidad ocasionado por hongos fitopatógenos.

Para el aislamiento de los hongos, se tomaron secciones foliares que presentaban las lesiones descritas, se incubaron en placas Petri con medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) antes o después de ser desinfectadas superficialmente con etanol e hipoclorito de sodio. Se dispusieron cuatro secciones cuadradas de 1 × 1 cm con la cara adaxial sobre el medio. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente (entre 25 y 27 °C) al abrigo de la luz, observándose periódicamente hasta la formación de estructuras miceliales (**Fig. 2.7**). Una vez que se detectó la formación de micelios a partir de las lesiones, éstos se colectaron con un asa de siembra y se subcultivaron en placas de PDA suplementado con jugo V8 (39 g PDA; DIBICO, 100 mL de jugo V8 1.5 g de CaCO<sub>3</sub> 15 g agar 15 en 900 mL de agua destilada) hasta obtener cultivos axénicos.

Se observaron diversas características como: el tipo de crecimiento, color de la colonia, pigmentación de las colonias en ambos lados (anverso y reverso), tipo de micelio (plano, aéreo o aéreo algodonoso), picnidios y la textura de la superficie de la colonia (Yang et al., 1989). Para las características microscópicas de los micelios, se observaron características tales como: morfología de los conidióforos y conidios por microscopía óptica en un equipo Leica DME (Thathana et al., 2017; Ghasemi-Sardareh y Mohammadi, 2020). Para recoger y observar los micelios, se utilizó una aguja estéril y las colectas se colocaron en portaobjetos estériles previo a la tinción con azul de lactofenol (Idris et al., 2017).

La identidad de las especies asociadas a las lesiones se asignó comparando las características morfológicas y microscópicas con las descritas en Watanabe (2010) y se confirmó mediante análisis filogenéticos de segmentos de las secuencias genómicas de la región intergénica ribosomal (ITS) y del factor de elongación de la traducción 1-alfa (TEF-1a).

### **2.2.3. Análisis filogenético de los hongos aislados**

Las secuencias genómicas se determinaron a partir de fragmentos amplificados por PCR. Para ello, se extrajo el ADN genómico de los cultivos axénicos mantenidos por 72 h en agar extracto de malta-extracto de levadura-glucosa (MYG). Este medio contenía glucosa 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L y peptona 10 g/L (Pitt y Hocking, 1985).

El ADN se obtuvo de micelios que se colectaron añadiendo 1000 µL de agua destilada estéril sobre la placa de agar que se colectaron con una pipeta, se transfirieron a un tubo de microcentrífuga y se agregaron dos perlas de porcelana estériles de 5 mm (Gen Q-Bio). El tubo se mezcló por agitación en un vórtex a máxima velocidad durante 3-5 min. La mezcla se congeló a -80 °C durante 10 min, se descongeló por 3 min a 65 °C en un baño de agua, y se agitó nuevamente a máxima velocidad durante 3 min. Se tomaron 300 µL de esta suspensión y se depositaron en tubo de microcentrífuga de 2 mL, al que se le añadieron 800 µL de tampón de lisis (Tris base 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM; pH 8.0 y SDS 0.3%) y se agregaron 0.2 mL de una solución de ARNasa A (Sigma) para una concentración final de 0.2 mg/mL. La mezcla se incubó a 65 °C durante 30 min, con inversión ocasional, a temperatura ambiente y se añadieron 500 µL de cloroformo. La mezcla se agitó suavemente por inversión por 10 min, se centrifugó de nuevo por 10 min (15.682 g). Se tomó la capa acuosa superior y se transfirió a un tubo nuevo al que se le agregaron 700 µL de isopropanol. El tubo se mezcló por inversión muy suave y se incubó 10 min a -80 °C

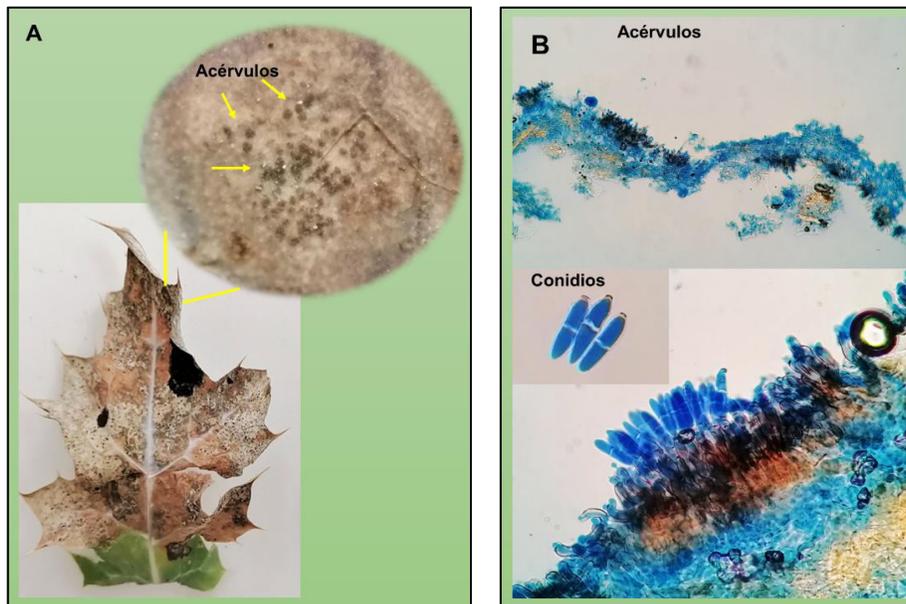
para precipitar el ADN que se recuperó por centrifugación durante 5 min (15, 682 g). Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500  $\mu$ L de etanol al 70%. La pastilla se secó y se disolvió en 50  $\mu$ L de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM pH 8.0). La integridad del ADN extraído se determinó por electroforesis en geles de agarosa 1% en buffer TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acetato, 1 mM EDTA; pH 8.6) a 90 V y se cuantificó por fluorescencia en un equipo NanoDrop (Tapia-Tussell et al., 2006).

Para la amplificación por PCR, de la región ITS se emplearon los cebadores ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para las reacciones en sentido y reversa (White et al., 1990). Para los fragmentos de TEF-1  $\alpha$ , se emplearon los cebadores Ef1- $\alpha$  983F (5' GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3') y Ef2- $\alpha$  1567R (5'ACHGTRCCRATACCACCSATCTT-3), para las reacciones en ambos sentidos (Rehner y Buckley, 2005). Las mezclas de reacción se prepararon con 1  $\mu$ L (80 ng/mL) de ADN genómico, 2.5  $\mu$ L del buffer de reacción 10X, 0.75  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 20 mM, 0.5  $\mu$ L de mezcla de dNTP 10 mM (Sigma-Aldrich), 1  $\mu$ L de cada solución de cebadores 10 mM, y 0.14  $\mu$ L (5 U/ $\mu$ L) de Taq polimerasa (Thermo-Fischer), completando el volumen a 25  $\mu$ L con agua destilada. Las condiciones para las amplificaciones fueron un paso de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión de 60, 30 y 45 seg a 95, 58 (ITS)/65(TEF-1 $\alpha$ ) y 72 °C, respectivamente, y de un ciclo de extensión final de 5 min y de enfriamiento a 10 °C (Gurjar y Kanade, 2020). Los productos de la amplificación, de entre 550 y 600 pb para ITS y TEF-1 $\alpha$ , respectivamente se visualizaron en geles de agarosa y las imágenes se registraron en un fotodocumentador. Los productos amplificados se enviaron a un servicio externo de secuenciación comercial (LANBAMA, México y Macrogen Inc., Corea). Para los análisis filogenéticos, las secuencias fueron comparadas por BLAST con la base de datos del NCBI y alineadas con el algoritmo Clustal W, incluido en el software Bioedit 6.0.6. Las accesiones seleccionadas para construir los árboles basados en los algoritmos de Neighbor Joining (NJ) se indican en la sección de resultados. Los análisis filogenéticos se realizaron con el paquete Mega X versión 10.2.4 (Kumar et al., 2016). El soporte de la topología interna de los árboles filogenéticos se realizó mediante análisis de Bootstrap con 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). La identidad de las especies de hongos se asignó por agrupación dentro de un mismo clado.

## 2.3. RESULTADOS

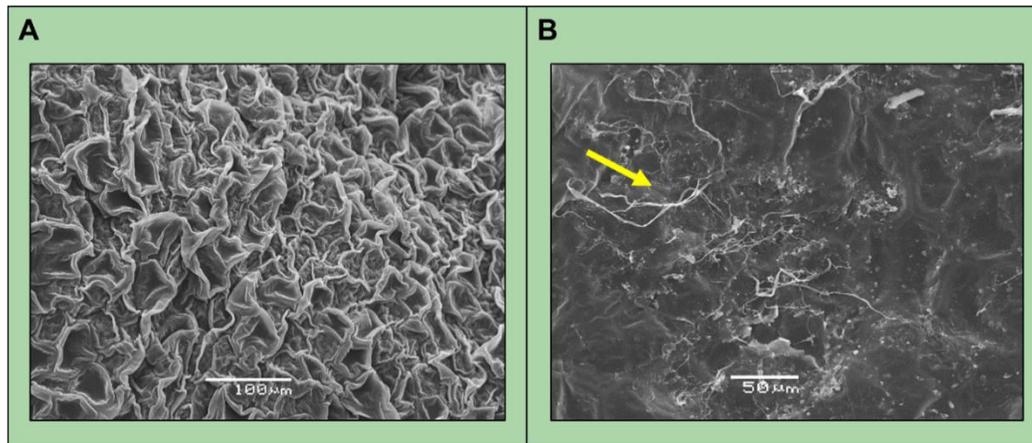
### 2.3.1. Procedimiento para la infección controlada

La observación directa de la lámina foliar con zonas avanzadas de necrosis reveló la presencia de pequeños puntos oscuros (<1.0 mm) sobre la parte adaxial (**Fig. 2.2A**). El aspecto prominente, tamaño y coloración de estas estructuras, coincide con la de los acérvulos; conjunto de componentes reproductivos presentes en algunos tipos de hongos imperfectos (Bensch et al., 2012). Para constatarlo, se tomaron secciones foliares longitudinales y se analizaron por estereomicroscopía, después de ser teñidas en fresco con azul de lactofenol. Se observó en las zonas con mayor densidad agrupaciones de conidióforos simples, tabicados de forma oval (**Fig. 2.2B**).



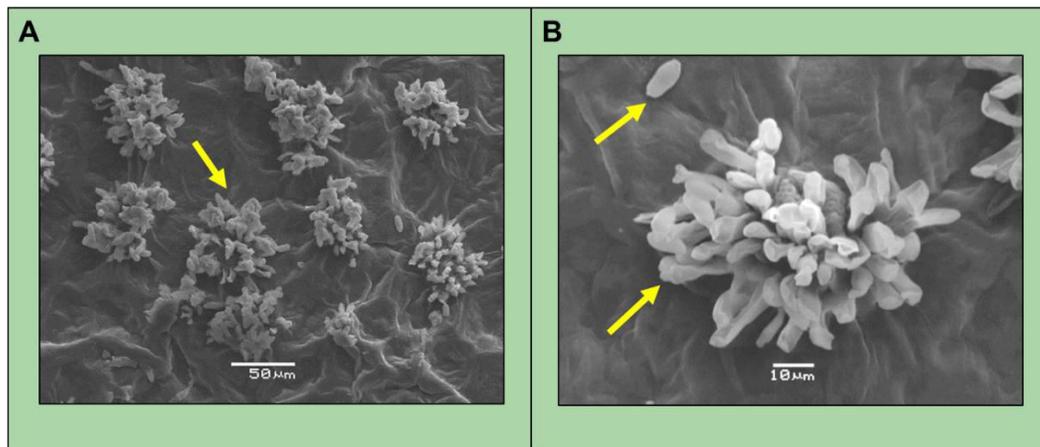
**Figura 2.2.** Estructura de los acérvulos sobre las lesiones foliares en *A. mexicana*. Se observan puntos cafés menores a 1 mm de diámetro sobre la cara adaxial (**A**), Aspecto en cortes longitudinales después de ser teñidos con azul de lactofenol (**B**).

Esto se confirmó por MEB sobre los tejidos necrosados. En los tejidos sanos se observa la superficie cubierta de ceras epicuticulares, lo que le confiere un aspecto irregular, pero continuo (**Fig. 2.3A**). Por el contrario, el tejido infectado se observa deteriorado y con presencia de micelios extendidos por toda el área necrótica (**Fig. 2.3B**).



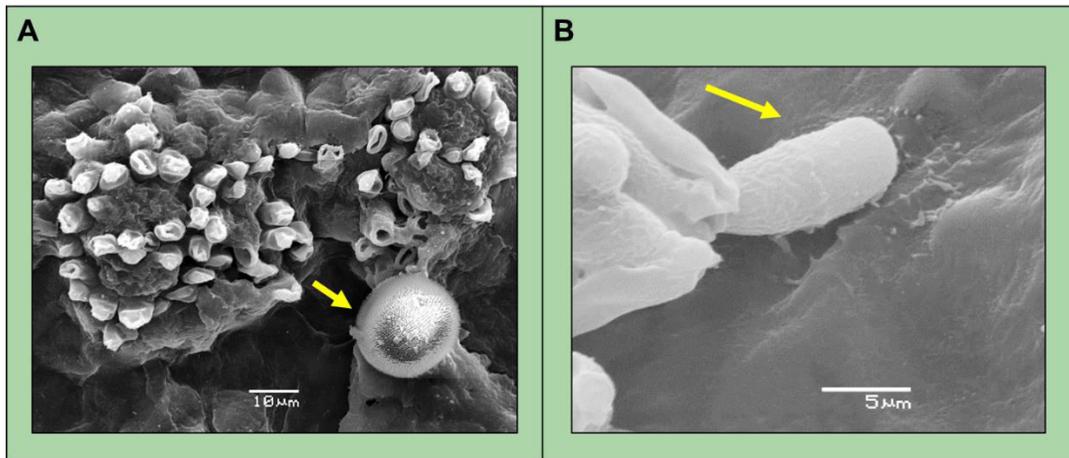
**Figura 2.3.** Aspecto del área foliar de *A. mexicana* sana y libre de lesiones fúngicas (A) y con lesiones necróticas causadas por infección con hongos (B). Las imágenes se obtuvieron por microscopía electrónica de barrido como se describe en la sección 2.3.3.

Mayores acercamientos mostraron agrupaciones de ca. 50  $\mu\text{m}$ , formadas por masas de conidióforos, que se extendían sobre toda la superficie de la hoja enferma. Estas estructuras corresponden a los acérvulos descritos (Fig. 2.4A y B).



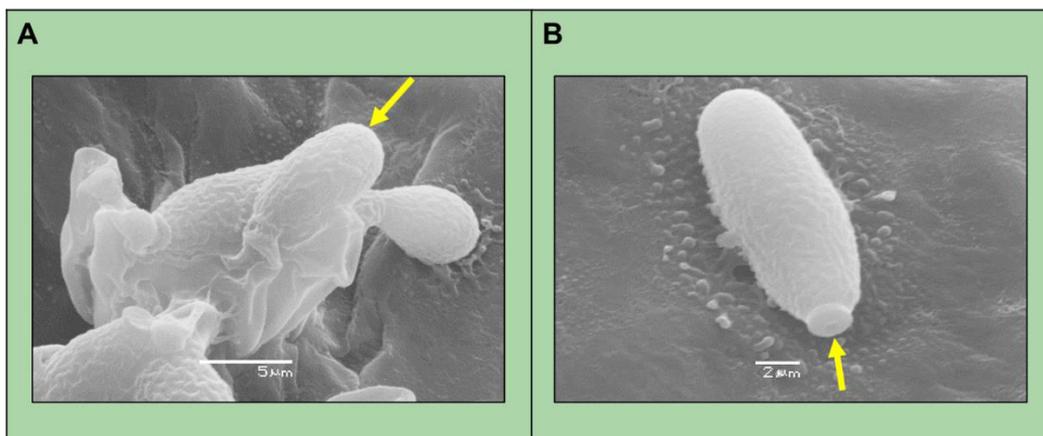
**Figura 2.4.** Lesiones foliares en *A. mexicana* observadas por MEB. Grupos de acérvulos en una zona infectada (A), con la flecha señalando un acérvulo individual. Acercamiento de un acérvulo individual (B) formado por conidióforos y con una conidia liberada, señalada con la flecha.

Mayores acercamientos mostraron zonas fracturadas en los extremos de los conidióforos con esporas emergiendo de éstas (Fig. 2.5A y B).



**Figura 2.5.** Conidióforos con zonas fracturadas (A) y emergencia de conidios (B). Las puntas de flecha indican las estructuras mencionadas.

El conidióforo emergente de aprox. 5  $\mu\text{m}$ , presentaba una textura rugosa con la parte superior redondeada de forma subglobosa elipsoide, con cicatriz de tipo coronar de 2  $\mu\text{m}$  aproximadamente (Fig. 2.6A), subglobosa elipsoide con cicatriz de tipo coronar aceptados (Fig. 2.6B), característicos del género *Cladosporium* (Bensch et al., 2012). Este hongo, de la familia Cladosporiaceae, es un saprófito muy común en diferentes materiales en descomposición que se ha asociado a algunas enfermedades como manchas foliares en diversas hortalizas, cereales, frutales y ornamentales (Nabor-Romero et al., 2018). No se detectó otro tipo de crecimiento sobre las lesiones en estas etapas de avance de las lesiones.



**Figura 2.6.** Conidióforos formando conidios sobre hojas infectadas de *A. mexicana* (A). Conidio con estructura de la cicatriz coronaria (B).

### 2.3.2. Aislamientos fúngicos

A partir de las hojas con lesiones (**Fig. 2.7**), se aislaron un total de 16 cepas fúngicas en tres ejercicios diferentes; cinco de una colecta en marzo 2021, seis en junio de 2022 y cinco en mayo de 2023. Se establecieron los cultivos axénicos y en total se identificaron nueve géneros diferentes, basados en análisis morfológicos de las colonias y de los micelios y otras estructuras.



**Figura 2.7.** Aspecto de las hojas utilizadas en los diferentes ejercicios para los aislamientos de los hongos asociados. En todos los casos, las imágenes de la izquierda y derecha corresponden a los síntomas avanzados y leves, respectivamente.

Como se indicó anteriormente, la caracterización e identificación de los hongos aislados en la temporada 2023 se discuten en los Anexos. No obstante, se menciona que en total y durante las tres temporadas, se lograron 16 aislamientos, algunos de ellos en más de una ocasión. De este modo, los géneros identificados fueron *Lasiodiplodia* (3X), *Fusarium* (3X), *Cladosporium* (3X), *Diaporthe* (2), *Corynespora*, *Neopestalotiopsis*, y *Trichoderma*.

Dos cepas aisladas no pudieron ser identificadas (Am23-12 y Am23-14). Como se observa, *Lasiodiplodia*, *Cladosporium* y *Fusarium* fueron los aislamientos más frecuentes, seguido de *Diaporthe* con dos ocasiones (**Tabla 2.1**).

**Tabla 2.1.** Identificación de los géneros de hongos aislados de hojas de *A. mexicana*.

Ejercicio	Clave	Género o ID
2021	Am21-1	<i>Lasiodiplodia</i>
	Am21-2	<i>Corynespora</i>
	Am21-3	<i>Lasiodiplodia</i>
	Am21-4	<i>Fusarium</i>
	Am21-5	<i>Cladosporium</i>
2022	Am22-6	<i>Fusarium</i>
	Am22-7	<i>Cladosporium</i>
	Am22-8	<i>Neopestalotiopsis</i>
	Am22-9	<i>Lasiodiplodia</i>
	Am22-10	<i>Cladosporium</i>
	Am22-11	<i>Trichoderma</i>
2023	Am23-12	-
	Am23-13	<i>Fusarium</i>
	Am23-14	-
	Am23-15	<i>Diaporthe</i>
	Am23-16	<i>Diaporthe</i>

### 2.3.3. Primer aislamiento fúngico 2021

Como primer criterio para asignar identidad, los cultivos axénicos fueron caracterizados por la morfología de la colonia tipo de micelio y estructuras reproductivas como se describió en la sección 2.2.3. Los cultivos en placa se muestran en la Fig. 2.8-2.12. Esta sección describe la caracterización de los primeros aislamientos, realizados en marzo de 2021 ya que estos se analizaron por su capacidad de producir una infección primaria y para modificar los patrones de alcaloides. La caracterización de los aislamientos restantes se incluye en los anexos.

### 2.3.4. Caracterización morfológica y fenotípica

Aislamiento de los hongos en hojas de *A. mexicana*. En el primer ejercicio se lograron cinco aislamientos a partir de las hojas infectadas colocadas en medio PDA (Tabla 2.2). Cuatro de estos; Am21-1, Am21-2, Am21-4 y Am21-5 fueron de hojas con síntomas leves, mientras que solamente uno; Am21-3 provino de hojas con síntomas avanzados. Ningún aislamiento se logró utilizando cámara húmeda.

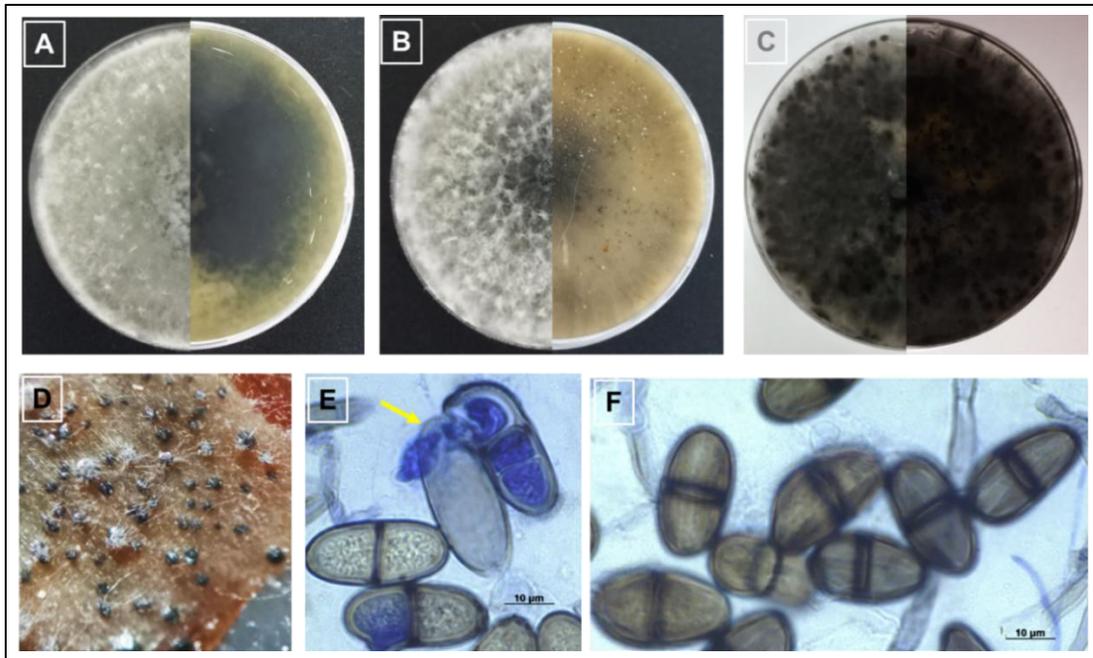
**Tabla 2.2.** Aislamiento de hongos asociados a las lesiones foliares en *A. mexicana*.

Clave	Hoja con síntomas leves* en cámara húmeda	Hoja con síntomas leves* en PDA	Hoja con síntomas avanzados* en PDA
Am21-1	-	+	-
Am21-2	-	+	-
Am21-3	-	-	+
Am21-4	-	+	-
Am21-5	-	+	-

Los signos + y – indican los casos en los que se observó o no crecimiento micelial, respectivamente. \* Ver Fig. 3.7 para el nivel de avance de los síntomas.

### 2.3.5. Hongos asociados a síntomas leves

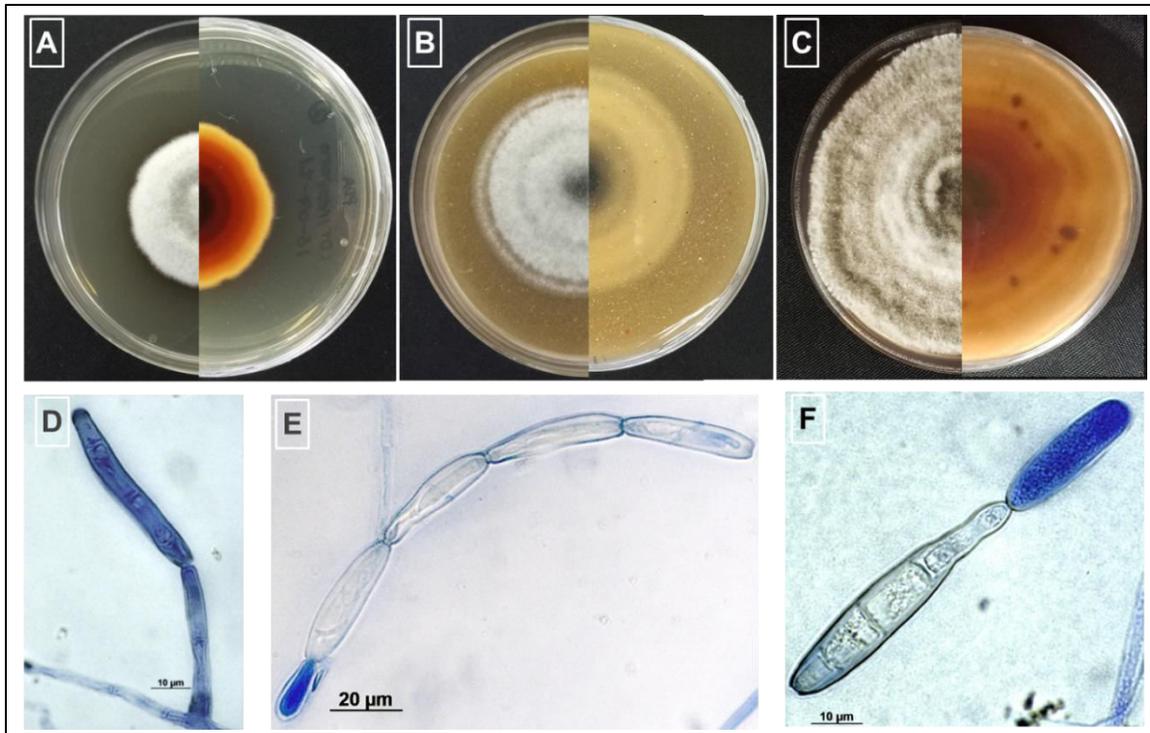
A partir del 3er día, se observó crecimiento micelial en hojas con las lesiones tempranas. Aquellos con aspectos diferentes se aislaron para establecer cultivos axénicos en PDA. El primero de estos se denominó Am21-1 que, después de tres días formó un micelio algodonoso en el cultivo axénico. El micelio era denso y de rápido crecimiento de color blanco a gris en las primeras etapas de crecimiento (**Fig. 2.8A**), y luego de 40 días se volvieron oscuras, esta colonia fue incapaz de esporular en PDA (**Fig. 2.8C**). En medios suplementado con V8 muestra un crecimiento con abundante micelio algodonoso, pero tampoco se observó esporulación (**Fig. 2.8B**). La formación de picnidios se observó después de 10 días (**Fig. 2.8D**). Los conidios inmaduros inicialmente son aseptado de forma elipsoide-ovoides (**Fig. 2.8E**). Las observaciones muestran conidios con estrías, y el tamaño de los conidios maduros indicaron que la longitud oscila entre 10-15  $\mu\text{m}$  (**Fig. 2.8F**). Con base en estas características, se asignó a *Lasiodiplodia* como el posible género para los aislamientos Am21-1 y Am21-3.



**Figura 2.8.** Morfología del aislado Am21-1. Colonia gris oscuro con micelio aéreo de siete días en PDA (A), colonia de siete días en medio suplementado con V8 (B); pigmentaciones negras en placa anverso y reverso en PDA después de 40 días (C); picnidios formados en agar-clavel después de ocho días (D); conidios inmaduros elipsoide (E); Conidios maduros septado mostrar las estrias longitudinales (F).

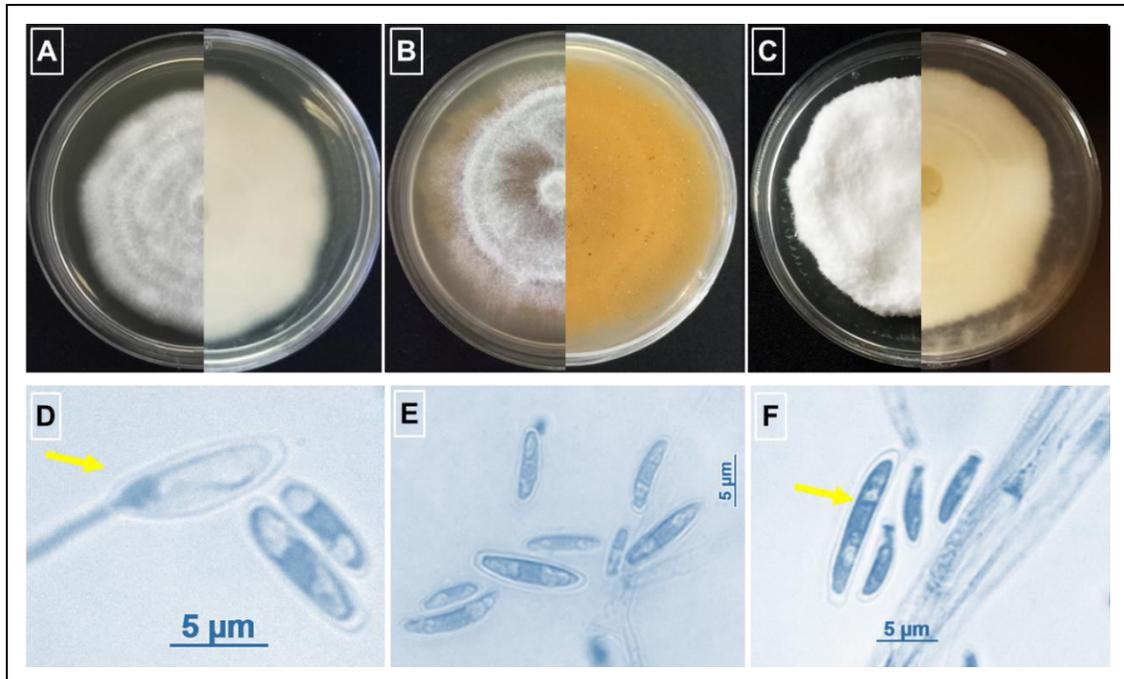
El aislado Am21-2 en medio PDA presenta micelio de color gris a los siete días, el envés de la colonia es de color magenta con bordes amarillo (Fig. 2.9A), el crecimiento en medio suplementado con V8 es de color gris tanto en el haz como en el envés (Fig. 2.9B). Después de 21 días de crecimiento en PDA, la colonia fue predominantemente gris oscuro, en el anverso se tornó rojo violeta (Fig. 2.9C).

La morfología microscópica de este aislado muestra que los conidióforos son largos, rectos o curvados (Fig. 2.9D), los conidios eran individualmente o en cadenas y contienen de dos a cinco esporas (Fig. 2.9E), la forma de los conidios es angostas en la base y ancho en el ápice, cada conidio puede presentar cuatro células o más (Fig. 2.9). Los caracteres morfológicos sugieren que se trata del género *Corynespora*.



**Figura 2.9.** Morfología del aislado Am21-2. Colonia gris oscuro con micelio de color gris en PDA y anverso (A); colonia de siete días en medio suplementado con V8 (B); colonia de 21 días en PDA (C); conidióforo (D); cadena de conidios (E); conidio con varias células (F).

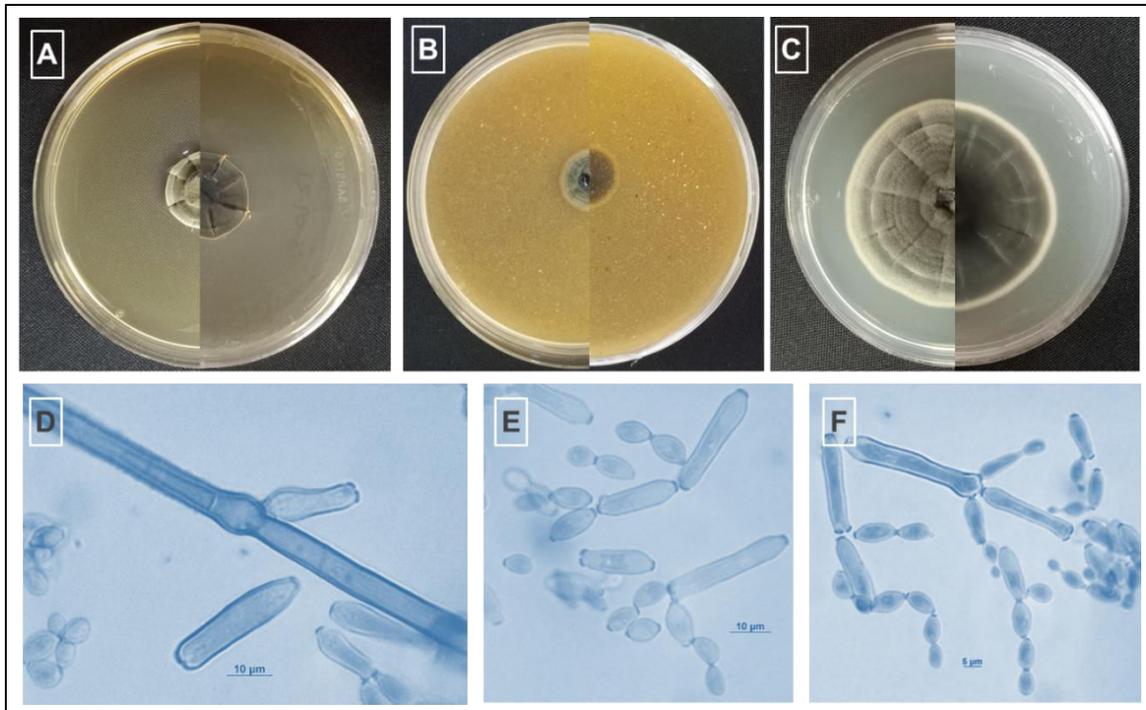
La superficie de la colonia Am21-4 se tornó de color blanco en la parte anterior y posterior a los siete días de crecimiento en PDA (Fig. 2.10A), en medio suplementado con V8, el micelio crece de forma irregular y es más oscuro respecto al que creció en PDA, la parte posterior de la colonia se tornaron de color amarillento (Fig. 2.10). A los 21 días de crecimiento en PDA, la colonia conserva su color blanco con abundante micelio algodonoso y aéreo (Fig. 2.10C). La conidiogénesis inicial es a los 21 días en PDA aprox. y emerge en la parte apical de la monofiálides no ramificada o hifas en la etapa temprana de desarrollo (Fig. 2.10D). La producción de microconidias se observó después de tres semanas. Los microconidios eran de forma ovalados a elipsoides y tienen de uno a dos septos (Fig. 2.10E). Las macroconidias son delgadas con tres septos, en los extremos ligeramente curvadas o puntiagudas y las células centrales son anchas (Fig. 2.10F). Estas características sugieren que este aislamiento corresponde al género *Fusarium*.



**Figura 2.10.** Morfología del aislado Am21-4. Crecimiento en PDA (A); crecimiento en la colonia en medio V8 (B); micelio de 21 días de crecimiento en PDA (C); formación de monofialide, (D); microconidios (E); formación de macroconidios (F).

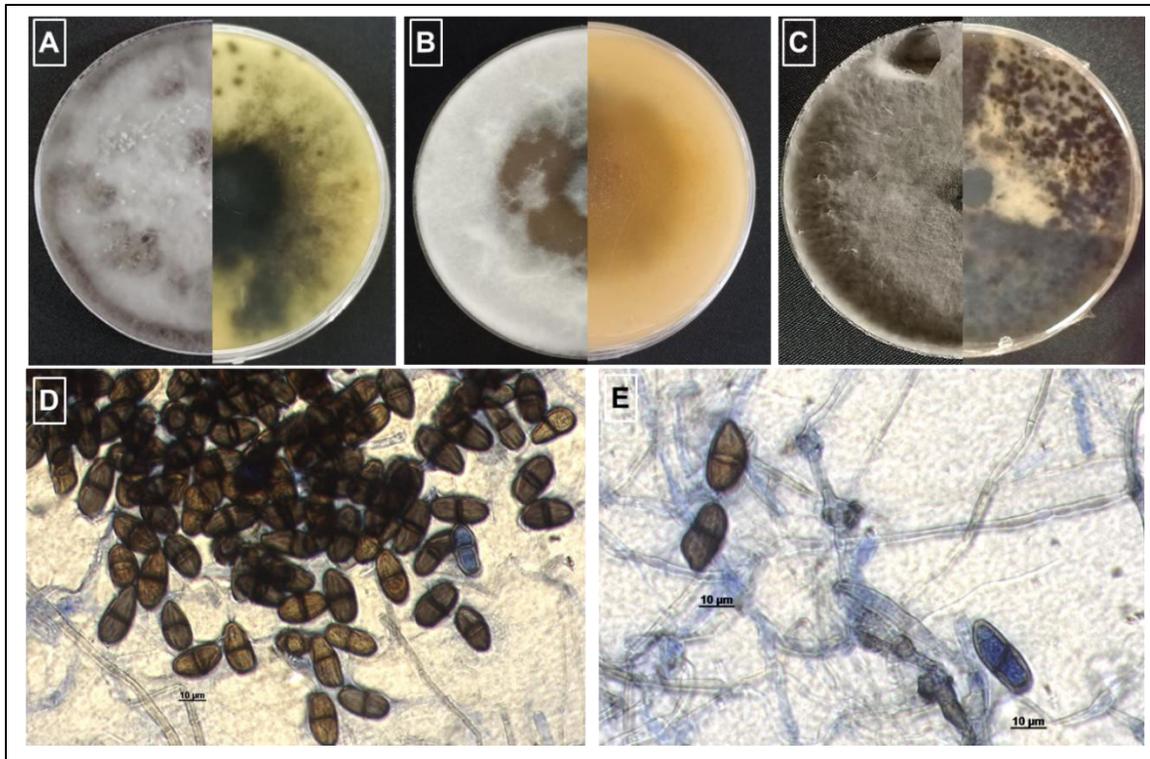
La colonia Am21-5 se caracterizó por presentar un crecimiento lento tanto en medio PDA como en V8, presenta micelio de color verde oliváceo con pliegues en el centro (**Fig. 2.11A** y **B**). La colonia es aterciopelada y el micelio es aéreo, en el reverso de la colonia era de color negro oliváceo (**Fig. 2.11C**). Los conidióforos son ramificados y surgen de hifas laterales o terminales, son erectos y septados (**Fig. 2.11D**).

Los conidios se formaron en la primera semana de crecimiento en ambos medios, y son pequeños y forman cadenas cortas y ramificadas, con hasta cuatro conidios en la parte terminal no ramificada, sin septos y exhiben una cicatriz coronada. Las formas de los conidios son ovoides o elipsoidales (**Fig. 2.11E** y **G**). Estas características sugieren que este aislamiento corresponde al género *Cladosporium*.



**Figura 2.11.** Morfología del aislado Am21-5. Crecimiento en PDA de siete días (**A**); colonia en medio V8 de siete días (**B**); colonia de 21 días en PDA (**C**); conidióforo (**D**); cadena de conidios (**E** y **F**).

De las hojas con síntomas avanzados solamente se logró el aislamiento Am21-3, la colonia en medio de PDA es moderadamente denso, inicialmente mostró un color blanquecino a gris a los 7 días, el micelio es aéreo y de rápido crecimiento uniforme (**Fig. 2.12A**). El crecimiento micelial en medio suplementado con V8 dentro de cinco a siete días después de la incubación es irregular, de color blanquecino en la parte anterior, mientras que la parte posterior es amarilla grisácea (**Fig. 2.12B**). Trascorridos 40 días aprox. en medio PDA, el color de la colonia se torna gris oscuro con abundante micelio esponjoso de tipo aéreo con crecimiento regular (**Fig. 2.12C**). La esporulación ocurre después de 40 días al igual como sucede en el aislado Am21-1, los conidios maduros son de color café oscuro y tienen un septo, son subovoides a elipsoidales, con ápices redondeados, de paredes gruesas. Los conidios jóvenes son más claros convirtiéndose a café oscuro una vez maduros con una apariencia estriada (**Fig. 2.12D** y **E**). La colonia tiene similitud a los observados en la cepa Am21-1, según las características morfológicas y apariencias se trata del género *Lasiodiplodia*.

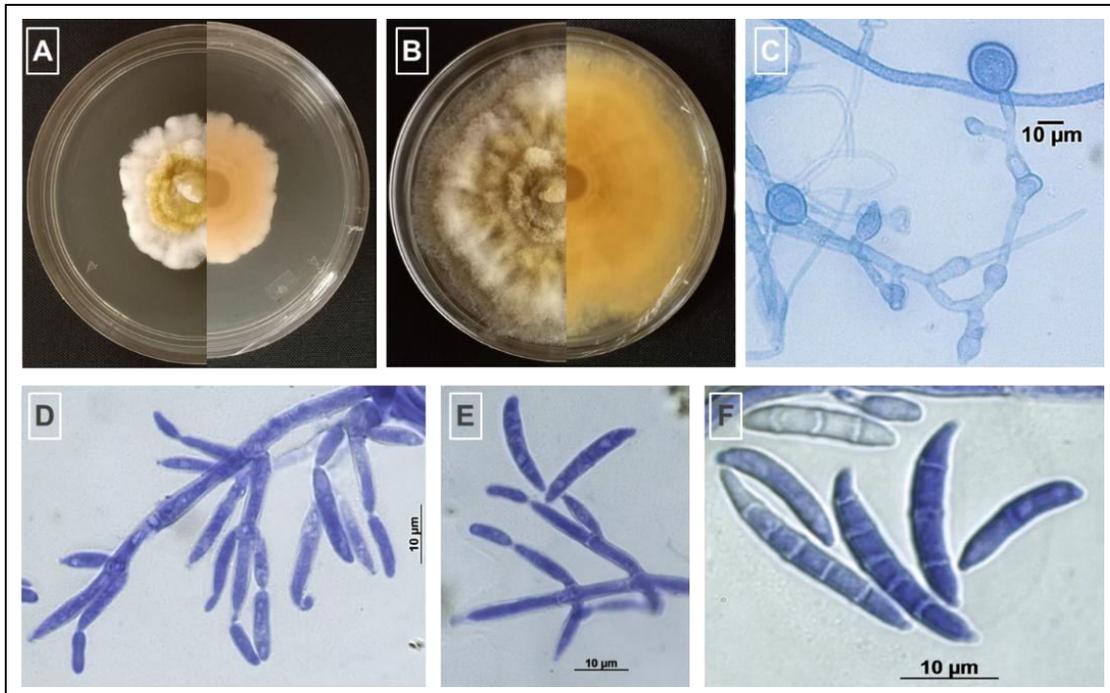


**Figura 2.12.** Morfología del aislado Am21-3. Colonia en PDA a los siete días (A); colonia de siete días en medio V8 (B); colonia en PDA después de 40 días (C); conidios maduros (D); conidios maduros e inmaduro (E).

### 2.3.6. Segundo aislamiento fúngico 2022

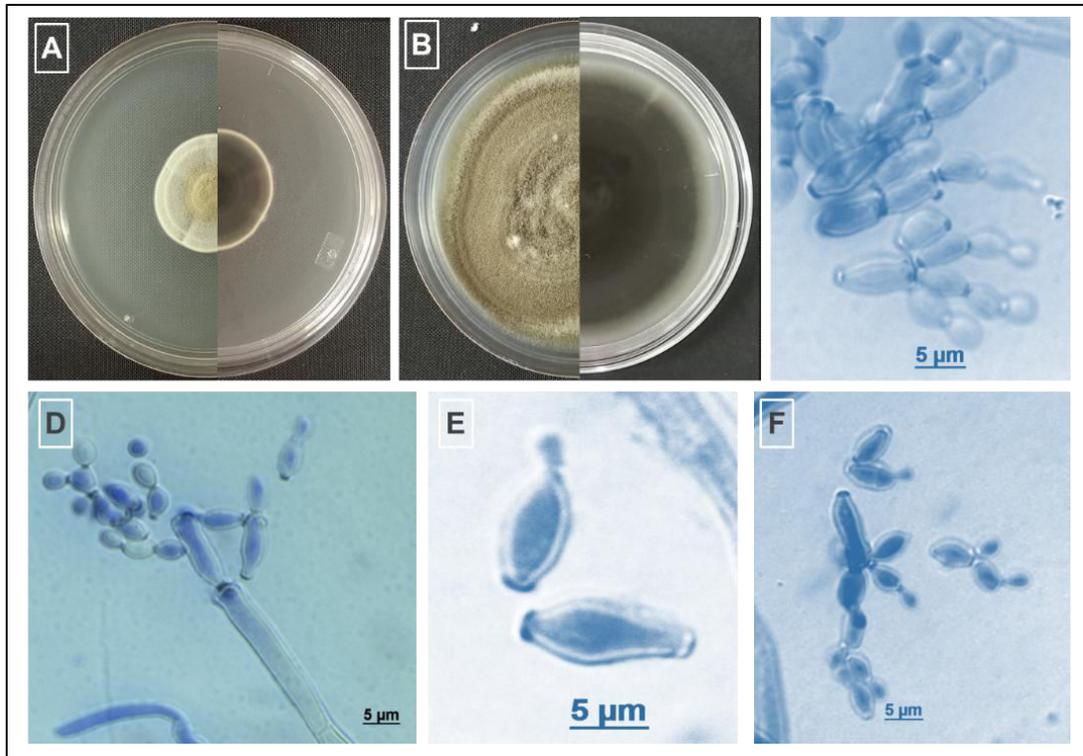
A partir del segundo aislamiento se obtuvieron seis cepas (Am22-6, Am22-7, Am22-8, Am22-9, Am22-10 y Am22-11), las características macro y microscópicas del segundo aislamiento se determinaron mediante la observación del crecimiento de la colonia únicamente en PDA. Se aislaron seis hongos.

El aislado Am22-6 después de siete días desarrolló micelio aéreo de color blanquecino con el centro amarillo claro. En el envés, el micelio es de color naranja, su crecimiento es lento y regular (**Fig. 2.13A**). Después de 21 días el micelio se torna de color gris de textura algodonoso, en el envés del micelio es de color amarillo. Su crecimiento es radial (**Fig. 2.13B**). El aislamiento produjo células basales de forma ovoides (**Fig. 2.13C**). El conidióforo es ramificado formaban a partir de monofiálides terminales (**Fig. 2.13D-E**). Los macroconidios eran ligeramente curvados, generalmente con 2-5 septos (**Fig. 2.13F**). Estas características morfológicas son similares a los que presenta *Fusarium* sp.



**Figura 2.13.** Morfología del aislado Am22-6. Colonia de *Fusarium* aislado en hojas de *A. mexicana* en 2022. Colonia de siete días creciendo en PDA (A); colonia de 21 días en PDA (B); células conidiógenas (C); fiálides y emergencia de conidios (D y E); macroconidia (F).

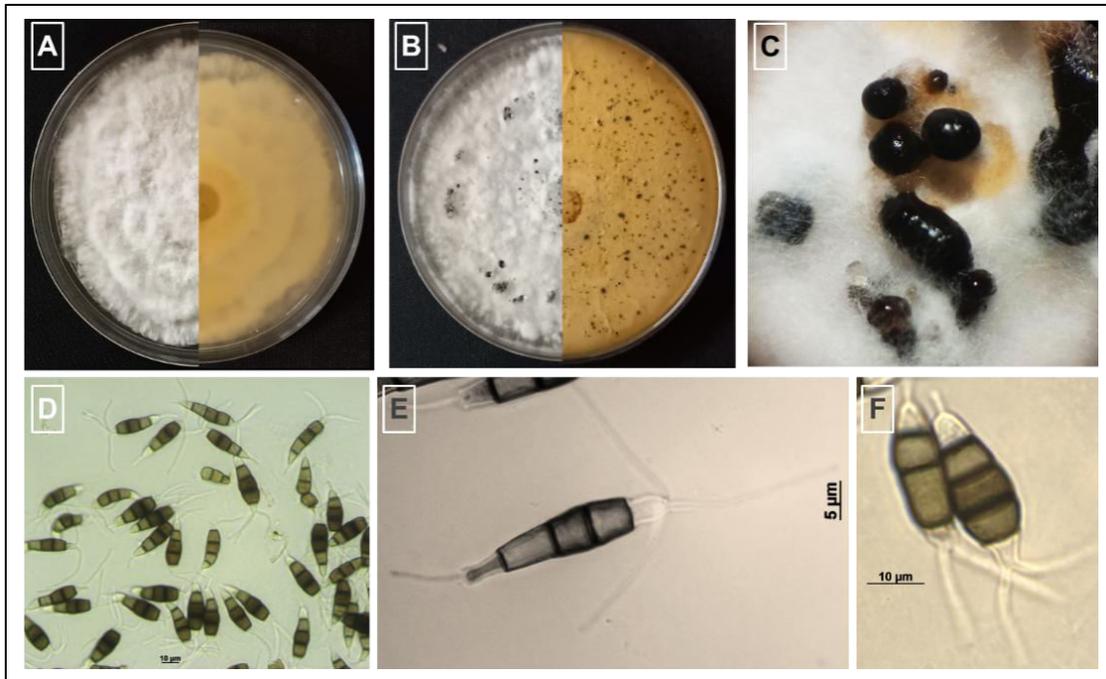
El aislado Am22-7 tiene un crecimiento lento, la parte anterior de la colonia fúngica era de color gris marrón aterciopelado a verde oliva con pliegos y la parte posterior de color negro con un margen blanco estrecho, los micelios son densos a los siete días (Fig. 2.14A). A los 21 días la colonia se torna de color marrón con abundante micelio polvoroso, la parte posterior de la colonia sigue siendo negro con los bordes blancos (Fig. 2.14B). Los conidióforos eran ramificados, esta colonia presenta conidios en grupos (Fig. 2.14C). Los conidios son numerosos en cadenas aseptadas, variables en tamaño y forma, comúnmente cilíndrico-oblongas y miden 5 µm aprox. (Fig. 2.14D y F). Además, los conidios tenían unas cicatrices de tipo coronario (Fig. 2.14E). De acuerdo con las características morfológicas, el aislado se identificó como *Cladosporium* sp.



**Figura 2.14.** Colonias de Am22-7 aisladas en hojas de *A. mexicana* en 2022. Colonia de siete días en PDA (A); colonia de 21 días en PDA (B); conidióforos y conidios (C y D); conidios sueltos (E); ramaconidio (F).

El aislado cultivados Am22-8 en PDA muestra un micelio blanco aéreo, con bordes ondulados denso con aspecto algodonoso en la parte anterior a los 7 días de crecimiento, la parte posterior de la colonia es de color crema (Fig. 2.15A). Después de 21 días la colonia mantiene el color blanco y comienza la formación de picnidios que se observan tanto en la parte anterior y posterior de la colonia (Fig. 2.15B). Se formaron conidiomas negros en la parte superficial del micelio, y contenían una masa conidial globosa y viscosa de color negro, estas estructuras estaban inmersos en el sustrato (Fig. 2.15C). Los conidios comprendían cinco células, las tres células del medio son de color marrón mientras que las células inferiores y las células superiores eran de color claro (Fig. 2.15D). Las células apicales son ramificadas con dos a tres apéndices, mientras que el apéndice basal es único, no ramificado (Fig. 2.15E-F).

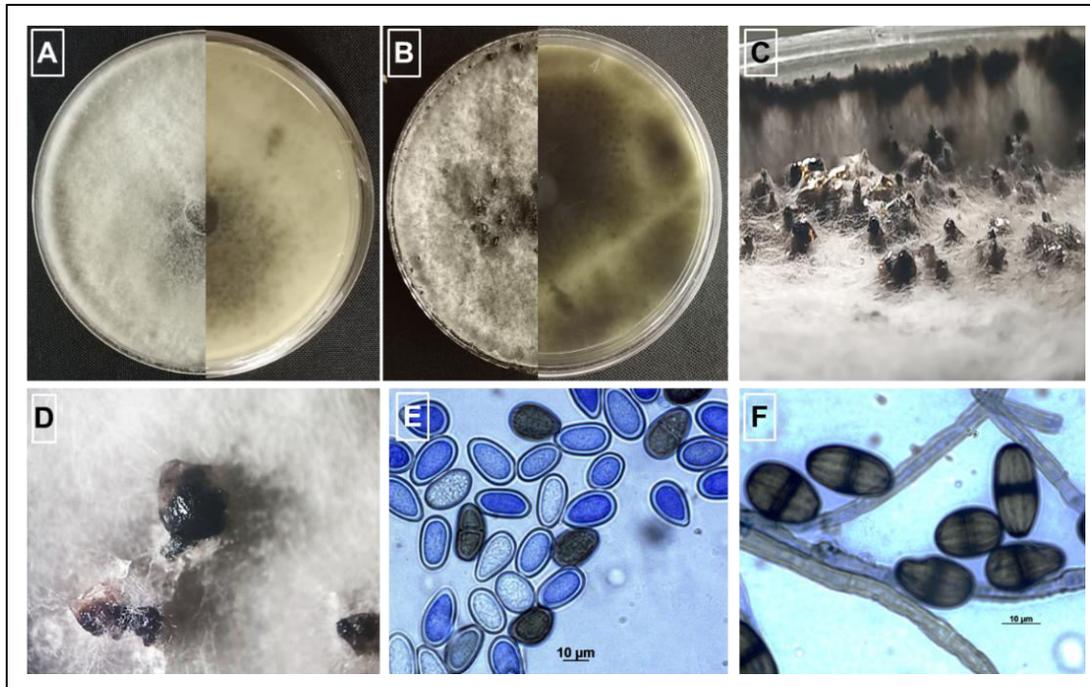
La observación microscópica de las estructuras reproductivas del aislado es similar a la descritas para el género *Neopestalotiopsis*.



**Figura 2.15.** Colonia Am22-8 aislado en hojas de *A. mexicana* en 2022. Colonia de siete días creciente en PDA (A); colonia de 21 días en PDA (B); masa conidial o conidiomata (C); colonia de conidios (D); conidios con tres apéndices apicales (E); conidios con dos apéndices apicales (F).

El aislado fúngico Am22-9 formado en medio PDA, presenta micelios lanoso esponjosos, de color gris claro en el borde y gris oscuro en el medio de la colonia, la parte posterior de la colonia tenía el centro más oscuro con los bordes más claro, todo esto después de siete días (Fig. 2.16A). A las tres semanas del crecimiento en PDA el micelio se vuelve gris oscuro con formación de picnidios, la parte posterior del micelio tiene pigmentación gris oscuro a negro (Fig. 2.16B). Los picnidios crecen en la parte superior cubierto con micelio denso de color oscuro (Fig. 2.16C-D). Los conidios inmaduros eran hialinos, cilíndricos, aseptados con contenido granular y de doble capa, unicelular (Fig. 2.16E).

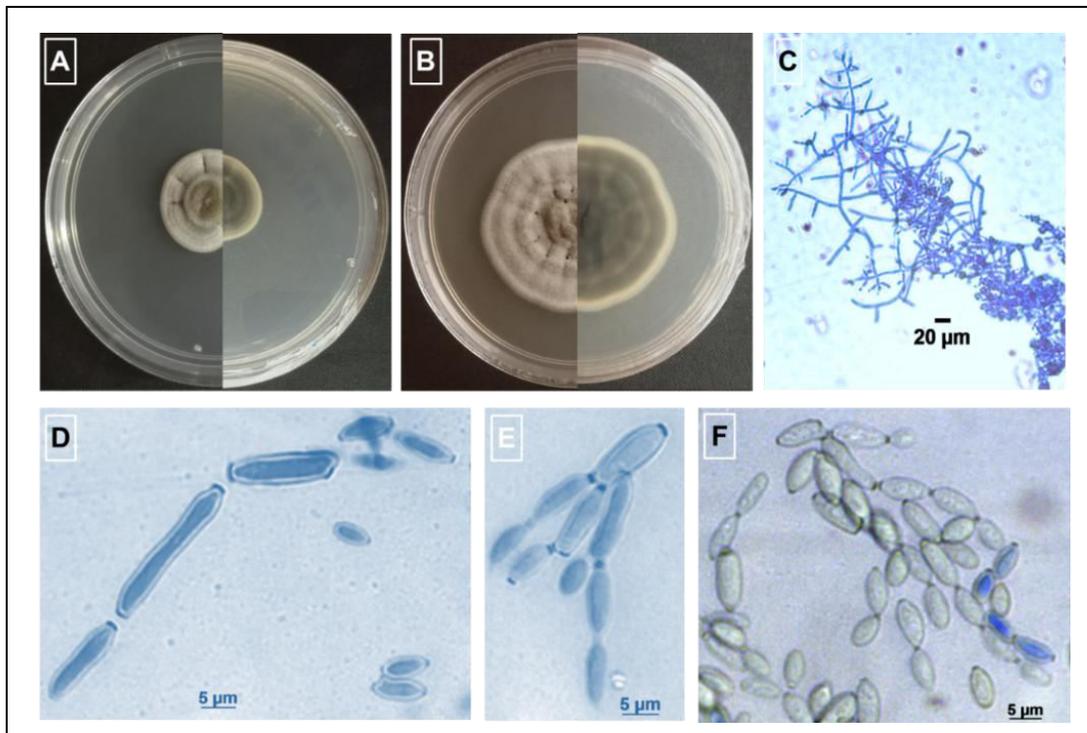
Los conidios maduros eran de forma oblonga o elipsoidales con estrías, el ápice y base redondeados, con un septo de color marrón oscuro (Fig. 2.16F). Estos criterios macroscópicos y microscópicos se asemejaron a los de *Lasiodiplodia theobromae*.



**Figura 2.16.** Características morfológicas del aislado Am22-9 aislada de hojas de *A. mexicana*. vista anterior y posterior del aislado a los siete días en PDA (**A**); apariencia de la colonia de 21 días en PDA (**B**); picnidios (**C**); conidiomata (**D**); conidios jóvenes hialino (**E**); conidio maduro con un tabique (**F**).

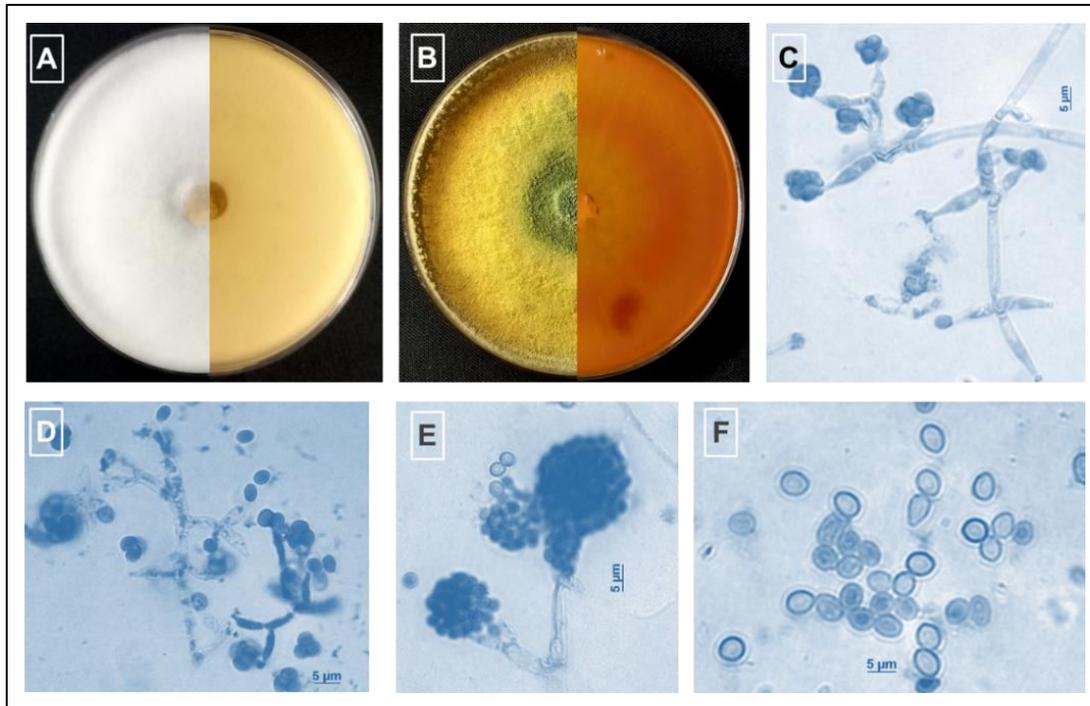
La colonia Am22-10 es plana y tiene una apariencia polvorosa y un color que va desde el olivo grisáceo hasta el verde olivo aterciopeladas, las hifas son septadas y el micelio superficial e inmerso en el medio de cultivo, presenta pliegos, la parte posterior de la colonia de color negro con bordes grises, en la **Fig. 2.17A** se puede observar el desarrollo que es lento. A los 21 días la colonia es más gris, conservando los pliegos y el borde blanco, el desarrollo sigue siendo lento (**Fig. 2.17B**). Todo esto en medio PDA. Las conidióforos y conidios están dispuestas en forma de ramas (**Fig. 2.17C**). Los conidios generalmente están dispuestos en cadenas. Pueden ser de forma elipsoidales, oblongos o esféricos (**Fig. 2.17D-F**).

Este aislado es reconocible por el color y forma de crecimiento, así como la presencia de una cicatriz de tipo coronaria, característico de *Cladosporium*.



**Figura 2.17.** Características morfológicas de Am22-10 aislada de hojas de *A. mexicana*. vista anterior y posterior del aislado a los siete días en PDA (**A**), apariencia de la colonia de 21 días en PDA (**B**), ramaconidios (**C**), conidios desprendidos (**D**), conidióforos (**E**) cadena de conidios (**F**).

El cultivo Am22-11 extendió por toda la superficie del medio, el micelio es aéreo de color blanco en la placa de PDA, esto a los siete días de crecimiento, la parte posterior del aislado es de color beige (**Fig. 2.18A**). Después de 21 días, la parte anterior de la colonia se torna de color amarillo con el centro verde y abundante esporulación, la parte posterior de la colonia es anaranjado. Se observó que la producción de conidios comienza alrededor del explante original (**Fig. 2.18B**). Las fiálides apicales en grupos, los conidióforos son ramificados a cruciformes (**Fig. 2.18C-D**). Los conidios de 2-5 fiálides reunidos en el ápice de los conidióforos, y en la punta de la rama principal tenía forma cónica unicelulares y en su mayoría menos a cinco  $\mu\text{m}$ . Los conidios son ovoides a globosos (**Fig. 2.18E-F**). Con base en estas características, se puede deducir que esta cepa pertenece a *Trichoderma*.



**Figura 2.18.** Colonia de la cepa Am22-11. colonia frontal e inversa cultivada en PDA durante 7 días (A); colonia frontal e inversa de 21 días en PDA (B); conidióforos y conidios a 100X (C); fiálidas en grupos (D); conidias agrupadas en racimos (E); conidia (F).

### 2.3.7. Identificación molecular y análisis filogenético de los hongos aislados en hojas de *A. mexicana*

Se utilizaron las regiones intergénicas ribosomales (ITS) y el factor de elongación de la traducción 1 alfa (TEF-1 $\alpha$ ) para asignar identidades de los hongos. Las secuencias se editaron en el programa BioEdit 7.7, y se alinearon y compararon mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), el árbol filogenético se construyó en MEGA 7 con un análisis de Neighbor-Joining con 1000 réplicas.

Para los ITS, los productos de PCR oscilaban entre 500 y 600 pb para las regiones de ITS1, 5.8s, e ITS4. Mientras que el tamaño de los amplicones para TEF-1 $\alpha$  están cerca de 1000 pb.

Los alineamientos y comparación con la base de datos corroboran los resultados mostrados en la **Tabla 2.1**, confirmando que la asignación de géneros fue correcta en los 11 aislados.

La comprobación de la identidad se observa en la **Fig. 2.19** que se aislaron cinco cepas, y en 2022 se aislaron otros seis microorganismos (**Fig. 2.20**). En estas figuras se aprecian las bandas obtenidas utilizando los dos marcadores, ITS y TEF-1 $\alpha$ .



**Figura 2.19.** Imagen de las bandas obtenidas en gel de agarosa al 1.1% a partir de la amplificación de la región ITS 1 y 4, y TEF-1 $\alpha$  de los aislados en *A. mexicana* en la temporada 2021: marcador de peso molecular (5Kb). Carril 1-5 con los ITS, y del 5-10 con TEF-1 $\alpha$ .



**Figura 2.20.** Imagen en gel de agarosa al 1.1% de la región amplificada por PCR de aislados fúngicos en hojas de *A. mexicana* en la temporada 2022. Marcador de peso molecular (5Kb). Carril 11-16 con los ITS 1/4, y del 17-22 con TEF-1 $\alpha$ .

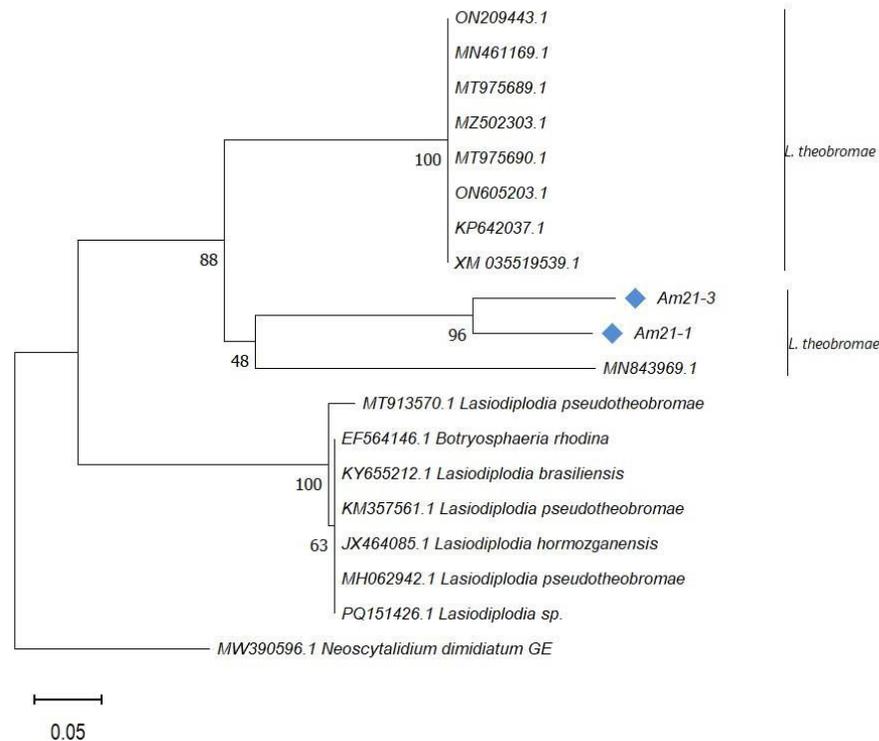
El análisis filogenético mostró que el aislado Am21-1 y Am21-3 se agrupan con muchos aislamientos de referencia de la especie *L. theobromae*, el árbol se enraizó con el grupo externo, que en este caso fue *Neoscytalidium dimidiatum*.

Después de los análisis y comparación de la secuencia de referencia, se encontró que los aislados Am21-1 y Am21-3 correspondían a *Lasiodiplodia theobromae* con una similitud del 100%.

Los conjuntos de datos combinados permitieron agrupar los aislamientos con secuencias de *Lasiodiplodia theobromae* (MN843969.1, ON209443.1, MN461169.1, MT975689.1,

MZ502303.1, MT975690.1, ON605203.1, KP642037.1, XM\_035519539.1), y aparte formo un clado de otras especies de *Lasiodiplodia* (**Fig. 2.21**).

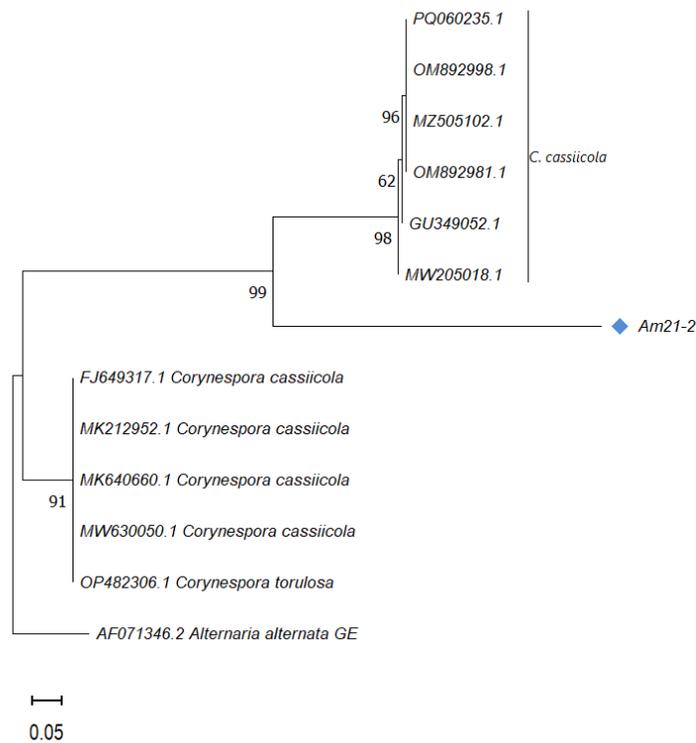
El análisis filogenético confirmó que los aislados Am21-1 y Am21-3 corresponden a *L. theobromae* de acuerdo con el árbol inferido, basado en secuencias concatenadas de los dos genes (ITS y TEF-1 $\alpha$ ).



**Figura 2.21.** Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-joining con 1000 réplicas (Bootstrap) de los marcadores concatenados ITS y EF1- $\alpha$  pertenecientes a los aislados Am21-1 y Am21-3. Se indica el valor de soporte de los grupos obtenidos. La especie *Neoscytalidium dimidiatum* se utilizó como grupo externo. Los rombos de color azul representan la secuencia analizada (◆).

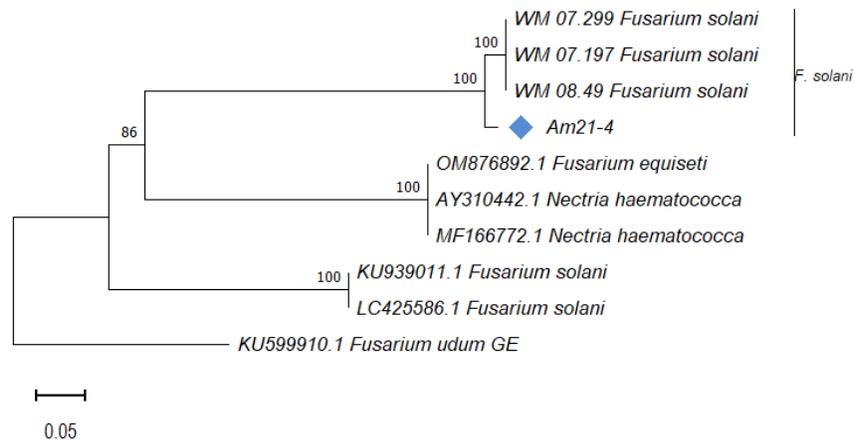
El análisis en BLAST del aislado Am21-2 dio como resultado lo agrupó junto a las accesiones PQ060235.1, OM892998.1, MZ505102.1, OM892981.1, GU349052.1, MW205018.1 de *C. cassicola* con el 100% de identidad. (**Fig. 2.22**).

Para el análisis filogenético se utilizaron once secuencias obtenidas del GenBank y se utilizó *Alternaria alternara* como soporte para anclar el árbol filogenético.



**Figura 2.22.** Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-joining con 1000 réplicas (Bootstrap) de los marcadores concatenados ITS y EF1-  $\alpha$  perteneciente al aislado Am21-2. Se indica el valor de soporte de los grupos obtenidos. La especie *Alternaria alternata* (AF071346.2) se utilizó como grupo externo. Los rombos de color azul representan la secuencia analizada (◆).

El análisis de Am21-4 permitió agruparlo con *F. solani* con 100% de identidad. En la **Figura 2.23**, se muestra el árbol filogenético resultante de este análisis. En el mismo se observa la formación de dos clados; el más cercano se formó con dos accesiones; KU93011.1 y LC425586.1, mientras que el segundo clado estuvo formado por dos subclados; uno que incluyó las accesiones OM87682.1, AY310442.1, MF166772.1 y el otro conformado por WM 07.299, WM 07.197 y WM 08-49, con los que se relacionada Am21-4. El árbol se enraizó con *Fusarium udum*.



**Figura 2.23.** Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-joining con 1000 réplicas (Bootstrap) de los marcadores concatenados ITS y EF1- $\alpha$  perteneciente al aislado Am21-3. Se indica el valor de soporte de los grupos obtenidos. La especie *Fusarium udum* se utilizó como grupo externo. Los rombos de color azul representan la secuencia analizada (◆).

Las secuencias de los ITS y EF1- $\alpha$  se agruparon en cuatro clados (**Fig. 2.24**). El primero de ellos estuvo conformado por *C. cladosporioides*, *C. tenuissimum* y *C. colombiae*. Estas tres especies demostraron estar estrechamente relacionadas entre sí, sin embargo, *C. cladosporioides* pertenece a un complejo de especies con morfología de conidióforos y conidios muy similares a las observadas, y está cerca de *C. tenuissimum* y *C. colombiae* y varias especies folícolas de *Cladosporium*.

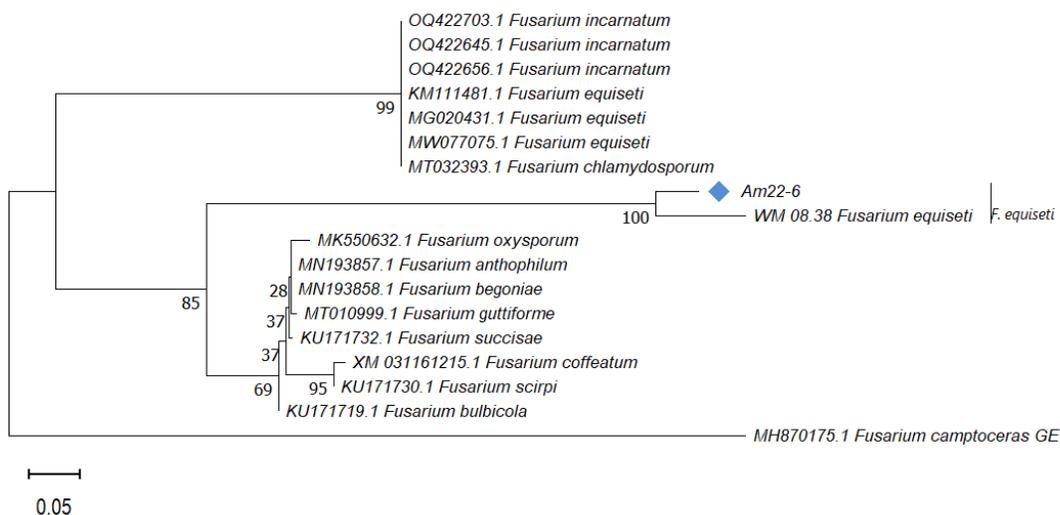
El segundo clado lo conforma únicamente especies de *C. cladosporioides* (SH1572792.1, MUCL 14192, UOA HCPF 12626CL), en el cual se encuentra agrupado el aislado Am21-5 con un valor de bootstrap del 100% de similitud con secuencias obtenidas del Gen Bank.

El tercer clado está conformado por dos subclados; el primero incluye *C. oxysporum*, mientras que el segundo subclado incluye únicamente especies de *C. cladosporioides*. Por su parte el cuarto estuvo compuesto por *C. allicinum* y *C. ramotenellum*.



Se generaron árboles filogenéticos independientes para los diferentes aislamientos (**Fig. 2.25-2.29**). El árbol correspondiente al aislado Am22-6 resultó en dos clados; el primer clado se dividió a su vez dos subclados, uno de ellos incluyó diversas especies de *Fusarium*, mientras que el segundo subclado agrupó con *F. equiseti* (WM 08.38) y secuencia del aislado Am22-6, con un soporte de 100% al este agrupamiento (**Fig. 2.25**).

Sin embargo, el segundo clado nuevamente se agrupó con especies de *F. equiseti*, *F. chlamydosporium* y *F. incarnatum*, por lo que es probable este aislado corresponda al complejo *Fusarium incarnatum-equiseti*



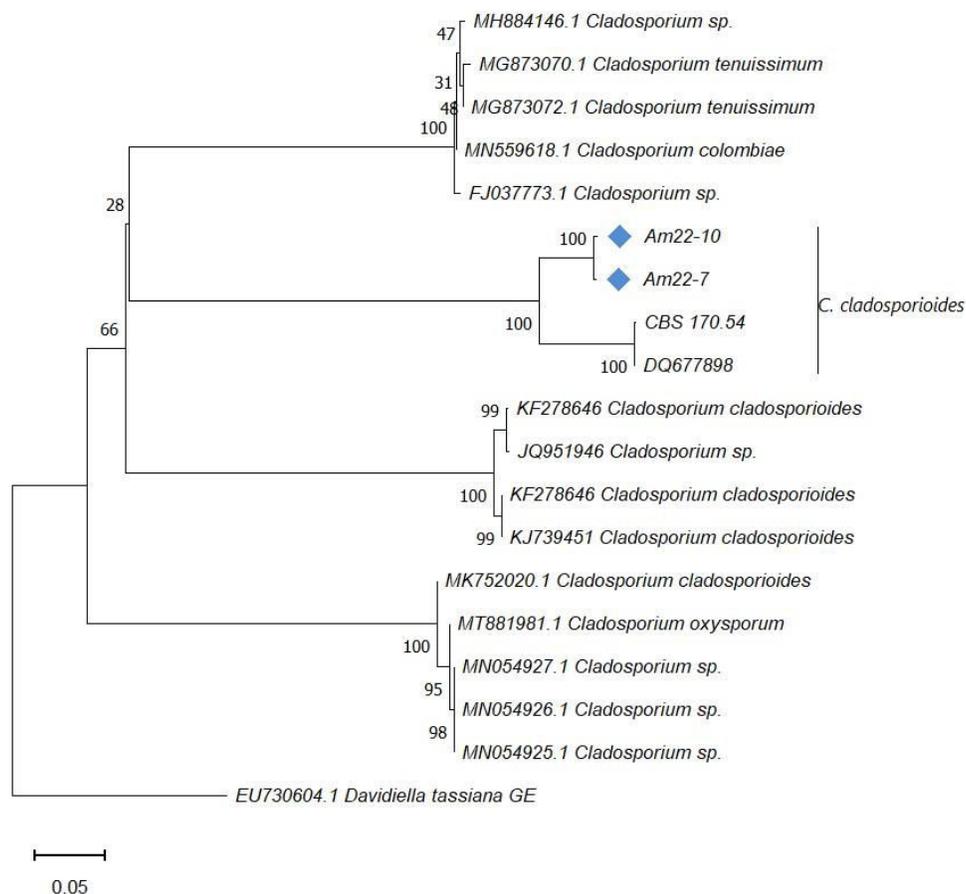
**Figura 2.25.** Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-joining con 1000 réplicas (Bootstrap) de los marcadores concatenados ITS y EF1- $\alpha$  perteneciente al aislado Am22-6. Se indica el valor de soporte de los grupos obtenidos. La especie *F. camptoceras* (MH870175) se utilizó como grupo externo. El rombo de color azul representa la secuencia analizada (◆).

El análisis filogenético de los aislados Am22-7 y Am22-10, en conjunto con 16 secuencias de *Cladosporium* del GenBank, generó un árbol por el método Neighbour Joining con cuatro clados. El primer clado se dividió en tres subclados con cinco accesiones (MK752020.1, MT881981.1, MN054927.1, MN054926.1, MN054926.1). En el segundo clado se agruparon dos subclados, el primero de ellos con las accesiones KF278646 y JQ951946, mientras que el segundo estuvo conformado por KF278646 y KJ739451.

Por su parte, el tercer clado estuvo conformado por dos subclados; uno de ellos contuvo los aislamientos Am22-7 y Am22-10. El segundo subclado incluyó las accesiones de *C. cladosporioides* CBS 170.54, DQ677898, con un soporte de bootstrap con 1000 réplicas.

Dicho resultado confirma que el aislamiento probablemente corresponda a un complejo de especies de *C. cladosporioides*, ya que la morfología de todas las cepas de referencia es bastante uniforme, lo que dificulta su identificación precisa. Además, *Cladosporium cladosporioides* está cerca de *C. tenuissimum* y de varias especies de *Cladosporium*. Ambas especies son saprobias y a menudo han sido identificadas erróneamente y confundidas (**Fig. 2.26**).

Finalmente, el clado cuatro agrupa cinco cepas pertenecientes a *Cladosporium* (MH884146.1, MG873070.1, MG873072.1, MN054926.1, FJ037773L1).



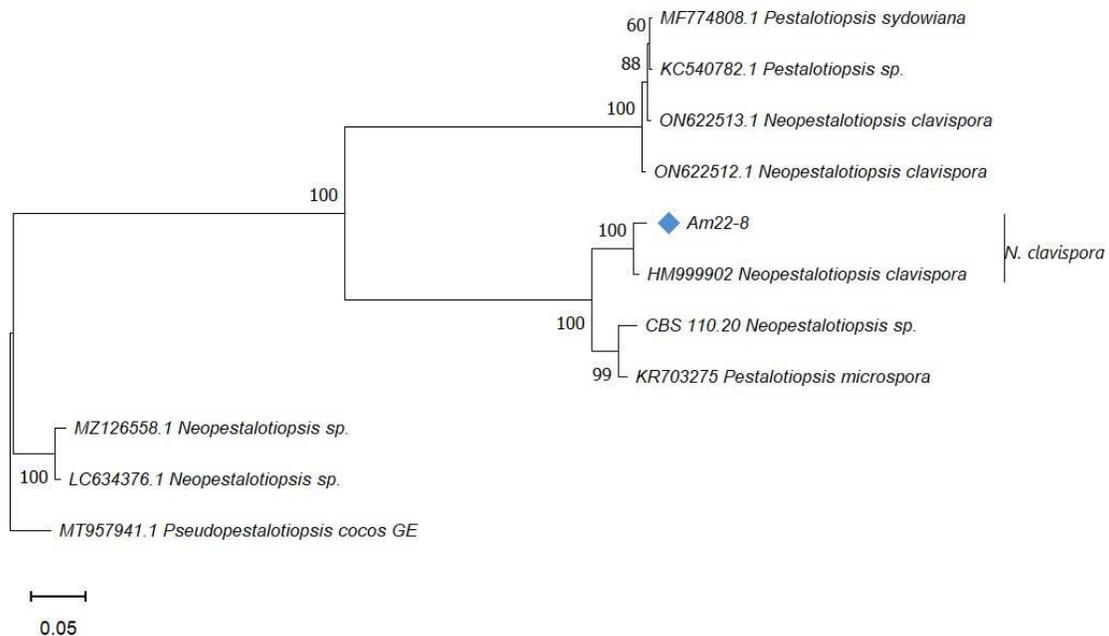
**Figura 2.26.** Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-joining con 1000 réplicas (Bootstrap) de los marcadores concatenados ITS y EF1-  $\alpha$  perteneciente a los aislados Am22-7 y Am22-10. Se indica el valor de soporte de los grupos obtenidos. La especie *D. tassiana* (EU730604.1) se utilizó como grupo externo. Los rombos de color azul representan la secuencia analizada (◆).

El análisis mostró que el aislamiento Am22-8 se encuentra relacionado con las secuencias del género *Pseudoneopestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis*, y *Pestalotiopsis*, formando así tres

clados. El primer clado agrupó dos accesiones; MZ126558.1 y LC634376.1, pertenecientes al mismo clado que incluyó *Neopestalotiopsis*.

Por su parte en el segundo clado se dividió en dos subclados; uno en que se agrupó Am22-8, junto con la accesión HM999902, sugiriendo que Am22-8 se relaciona con *N. clavispora* y apoyado con 100% de rama y 1000 réplicas de Bootstrap. El segundo subclado estuvo conformado por dos accesiones; CB 110-20 y KR703275 correspondientes a los géneros *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis* (Fig. 2.27).

El clado tres formó tres subclados en el cual se encuentran cuatro aislados pertenecientes a dos géneros; *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* (MF774808.1, KC544078.1, ON622513.1, ON622512.1). El árbol fue enraizado con *Pseudopestalotiopsis cocos* (MT957941.1).



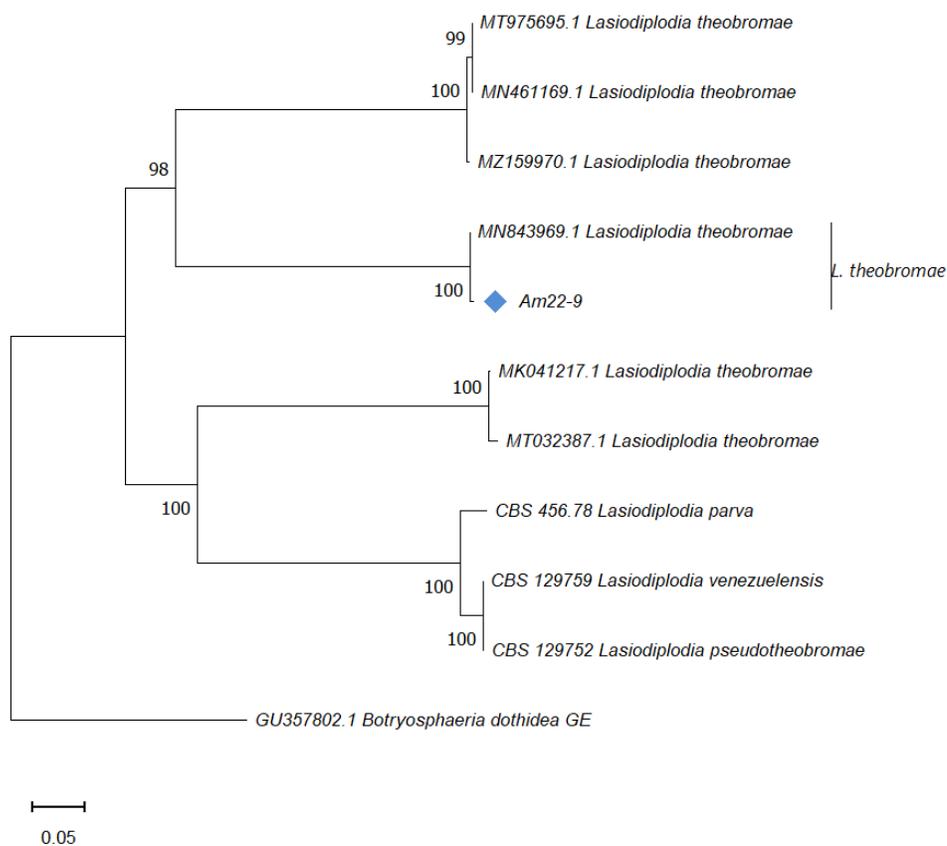
**Figura 2.27.** Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-joining con 1000 réplicas (Bootstrap) de los marcadores concatenados ITS y EF1- $\alpha$  perteneciente al aislado Am22-8. Se indica el valor de soporte de los grupos obtenidos. La especie *Pseudopestalotiopsis cocos* (MT957941.1) se utilizó como grupo externo. Los rombos de color azul representan la secuencia analizada (◆).

La comparación del alineamiento Am22-9 con las secuencias depositadas en el GenBank (NCBI) mostraron homología de 98-100% de identidad con *L. theobromae*. Esto se

corroboró mediante el análisis filogenético, donde se demostró la relación que mantienen estas especies.

Las secuencias formaron cuatro clados: el clado uno formó dos subclados con diferentes especies, en el subclado uno se agrupó *L. parva* (CBS 456.78). El subclado dos está representado por *L. venezuelensis* (CBS 129759) y *L. pseudotheobromae* (CBS 129752).

Los clados 2-4 estuvieron conformados por especies de *L. theobromae* (clado dos: MK041217.1, MT032387.1, clado tres por MN843969.1 y nuestra secuencia en estudio (Am22-9), clado cuatro; MT975695.1, MN461149.1, MZ159970.1). El grupo externo fue *Botryosphaeria dothidea* (GU357802.1) (**Fig. 2.28**).



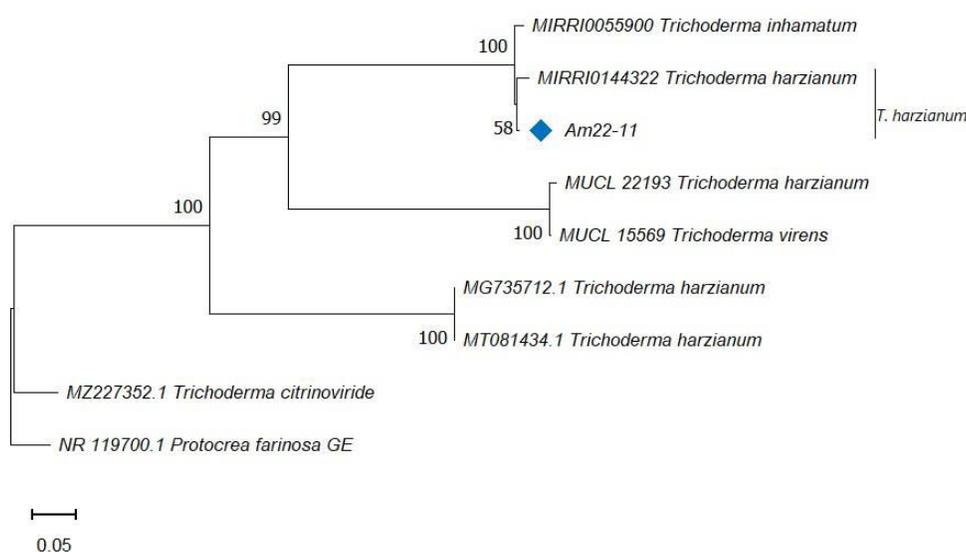
**Figura 2.28.** Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-joining con 1000 réplicas (Bootstrap) de los marcadores concatenados ITS y EF1-  $\alpha$  perteneciente al aislado Am22-9. Se indica el valor de soporte de los grupos obtenidos. La especie *Botryosphaeria dothidea* (GU357802) se utilizó como grupo externo. Los rombos de color azul representan la secuencia analizada (◆).

La comparación de las secuencias de la cepa Am22-11 con secuencias de la base de datos del NCBI con soporte de Bootstrap en las ramas indicaron una similitud del 99-100% con

seis secuencias de *Trichoderma*: *T. harzianum* (MIRRI0144322, MUCL 22193, MG735712.1, MT081434.1), *T. inhamatum* (MIRRI0055900) y *T. virens* (MUCL 15569) (**Fig. 2.29**).

El alto valor de similitud está relacionado con la estrecha relación que mantienen estas especies. Y por lo tanto estos resultados indican que estas especies son genéticamente cercanas y comparten características genotípicas y morfológicas.

Las pequeñas divergencias en el árbol pueden deberse a factores específicos en regiones o mutaciones en el genoma. En este análisis el árbol se enraizó con *Protocrea farinosa* (NR 119700.1).



**Figura 2.29.** Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-joining con 1000 réplicas (Bootstrap) de los marcadores concatenados ITS y EF1- $\alpha$  perteneciente al aislado Am22-11. Se indica el valor de soporte de los grupos obtenidos. La especie *Protocrea farinosa* (NR 119700.1) se utilizó como grupo externo. Los rombos de color azul representan la secuencia analizada (◆).

## 2.4. DISCUSIÓN

En total se lograron aislar 16 cepas fúngicas de tres colectas de plantas realizadas entre 2021 y 2023 en una misma parcela. Once de éstas, correspondientes a las primeras dos colectas, se caracterizaron e identificaron por análisis filogenéticos de las regiones ITS y TEF-1 $\alpha$ , correspondiendo a siete especies diferentes (**Tabla 2.2** y **2.3**) ya que algunas, como el complejo *C. cladosporioides* y *L. theobromae* se lograron aislar hasta en tres

ocasiones cada una; mientras que otras, como *C. cassiicola*, *F. solani*, complejo *Fusarium incarnatum-equiseti*, *N. clavispora* y *T. harzianum* (1). De estas especies; *L. theobromae* (Am21-1), *C. cassiicola*, *F. solani* y el complejo *C. cladosporioides* (Am21-5) se aislaron de hojas con síntomas leves y *L. theobromae* (Am21-3, Am22-9), complejo *Fusarium incarnatum-equiseti*, *C. cladosporioides* (Am22-7, Am22-10), *N. clavispora* y *T. Harzianum* de los síntomas avanzados (**Fig. 2.7**). *L. theobromae* y *C. cladosporioides* coincidieron en ambos casos (**Tabla 2.2 y 2.3**). De estas especies, solamente *C. cassiicola* (Dixon et al., 2009) y *F. solani* (Leslie y Summerell, 2006) se consideran como patógenos, pudiendo infectar tejidos sanos de plantas en buenas condiciones sanitarias. Dado que ambos hongos son también saprófitos y se encuentran en restos vegetales, suelos y materia en descomposición, además son patógenos que se encuentran muy dispersos en climas cálidos y húmedos. *C. cassiicola* afecta plantas ornamentales, soya, algodón, diversas hortalizas como jitomate, cebolla, etc., causando tizones, manchas foliares, tizones en tallos y pudrición de frutos, entre otras (Dixon et al., 2009). Por otro lado, *F. solani* causa principalmente pudriciones de raíz y tallos. Se considera un fitopatógeno del tejido vascular y puede ocasionar marchitez completa de la planta y lesiones en las hojas. Este hongo afecta una gran cantidad de especies agrícolas como cereales y hortalizas (Leslie y Summerell, 2006). Otras especies, como *L. theobromae* (Punithalingam, 1980) y *N. clavispora* (Shi et al., 2024), aunque se pueden comportar como patógenos, generalmente solo ocurre en condiciones de deficiencias nutricionales e hídricas o en condiciones de exceso de humedad ambiental. *L. theobromae* ocasiona pudriciones de raíz y chancros en tallos y hojas en árboles frutales (Punithalingam, 1980), mientras que *N. clavispora* ocasiona principalmente pudriciones en brotes y chancros en hojas de frutales de arándanos y macadamia y en algunas especies se climas templados, como fresa y manzana (Shi et al., 2024). Los complejos *C. cladosporioides* y *Fusarium incarnatum-equiseti*, son principalmente oportunistas saprofíticos (Bensch et al., 2012; Khuna et al., 2022). *T. harzianum* es un aislamiento interesante, ya que, aunque puede actuar como un oportunista, es un hongo del suelo que se encuentra en la rizosfera de varias hortalizas, como jitomate, pepino, y calabaza, entre otras favoreciendo el desarrollo de condiciones fitosanitarias favorables por sus efectos antibióticos y de competencia contra hongos patógenos. Más aún, este hongo es un parásito de otros hongos patogénicos como *Fusarium*, *Phyitium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotium* y se usa como agente de control biológico (Harman et al., 2004).

Diversos hongos se han aislado a partir de hojas de *A. mexicana*. Estos incluyen *Deightonella argemonensis* (Pollack y Matthews, 1976), *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Ulocladium atrum*, *U. botrytis*, *Phoma humicola*, *Aspergillus niger* y *Curvularia ellisii* (Abdel-Hafez, 1986). No obstante, estos aislamientos no se asociaron a lesiones o síntomas de alguna enfermedad infecciosa. Es interesante notar que cepas de los géneros *Cladosporium* y *Fusarium* fueron aislados tanto en las plantas analizadas en este trabajo, como en plantas colectadas en Arabia (Abdel-Hafez, 1986), sugiriendo que *A. mexicana* es un hospedero adecuado para estos hongos.

Adicionalmente, especies del género *Aspergillus*; como *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. nidulens* se han identificadas como endófitos en tejidos de *A. mexicana* (hojas, tallos y raíces) (Sheshrao et al., 2012).

En términos generales, existen pocos reportes sobre el aislamiento de hongos a partir de miembros de la familia Papaveraceae (Razaghi y Zafari, 2018). Más aún, en pocos casos, los hongos aislados se han asociado con lesiones o infecciones. Es de notar que aislamientos del género *Cladosporium* sp. y *Fusarium* (*F. equiseti*, *F. poae*) se han logrado faltan palabras aquí para conectar el renglón de diversas especies del género *Papaver* (Razaghi y Zafari, 2018), al igual que de *A. mexicana*. Por otro lado, *E. californica* y *P. somniferum* son sensibles a enfermedades como mildius, tizones y pudriciones causadas por hongos como *Dentrophyton*, *Erysiphe*, *Fusarium* y *Pleospora* que, aunque sí se han aislado de estas plantas, no se han asociado directamente con los síntomas que ocasionan (Camacho-Tapia et al., 2018; O'Neill et al., 2000; Park et al., 2012; Pastirčák y Fejér, 2011; Pastirčáková et al., 2016).

De este modo, los aislamientos e identificaciones de *L. theobromae*, complejo *C. cladosporioides*, *C. cassicola*, *F. solani*, *N. clavispora* y *T. harzianum* permiten contar con un cepario de hongos capaces de establecerse en tejidos de *A. mexicana*. Con ello, se podrán realizar pruebas de compatibilidad planta-hongo para desarrollar sistemas que permitan estudiar el posible papel de los alcaloides en estas interacciones.

## CAPÍTULO III

### DETERMINACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLADOS FÚNGICOS

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

Aunque diversas especies de hongos patógenos han sido aisladas de *A. mexicana* (Pollack y Matthews, 1976; Abdel-Hafez, 1986), su participación como agentes etiológicos en el desarrollo de enfermedades infecciosas no han sido propiamente documentado. Algunos miembros de la familia Papaveraceae, como *E. californica*, *P. atlanticum*, *P. dubium*, *P. glaucum*, *P. pseudocanescens*, *P. nudicaule*, *P. rupifragum* y *P. somniferum*, entre otros, son sujetos enfermedades fúngicas causados por *Pleospora papaverácea*, *Dendryphion penicillatum*, *F. oxysporum* f. sp. *papaveris*, *Deightoniella argemonensis* (Bailey et al., 2000; Bertetti et al., 2018).

La identidad de los hongos reaislados se confirma en función de los síntomas de la enfermedad y, cuando sea posible, secuenciando los genes apropiados. Los postulados de Koch actualizado con los criterios de Bradford Hill reconocieron que sus postulados tenían limitaciones, por tanto, no se aplican a todos los patógenos. El primer postulado es difícil de aplicar cuando la aparición del patógeno precede al desarrollo de los síntomas. Este postulado no se puede aplicar a enfermedades en las que las toxinas producidas por el patógeno ejercen su efecto en un sitio distante del sitio de multiplicación (Bhunjun et al., 2021). El segundo postulado no tiene en cuenta la presencia de portadores asintomáticos y el tercer postulado no se puede aplicar a patógenos que no pueden cultivarse en medios artificiales.

Por lo tanto, cada criterio debe aplicarse e interpretarse en función de cada situación única. Se recomienda que todos los estudios que introduzcan nuevas especies de hongos fitopatógenos incluyan datos sobre pruebas de patogenicidad y el uso del término asociado con los "síntomas de la enfermedad" de "la planta huésped". Siempre que sea posible, incluir los detalles de los síntomas de la enfermedad y una imagen de alta resolución de los síntomas para referencia futura (Bhunjun et al., 2021).

En el capítulo anterior se presentó el aislamiento y establecimiento de 11 cultivos axénicos de hongos asociados a lesiones foliares en *A. mexicana*. Todos éstos fueron identificados hasta el nivel de especie (sección 2.3.8 y 2.3.9). En este Capítulo se presenta el análisis de la capacidad infectiva de cuatro especies de hongos sobre la misma planta. Para ello, se

desarrollaron pruebas de patogenicidad en las que se vigiló el cumplimiento de los postulados de Koch exponiendo plantas sanas a los aislamientos fúngicos. Dichos postulados se basan en cuatro principios: (i) el microorganismo debe estar presente en todos los individuos enfermos, (ii) el microorganismo debe aislarse del huésped enfermo y cultivarse en un cultivo puro, (iii) la reinoculación de un huésped sano con este cultivo puro debe provocar la misma enfermedad que en el huésped original, y (iv) el microorganismo debe recuperarse del huésped enfermo (Hou et al., 2023).

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODO**

### **3.2.1. Material biológico**

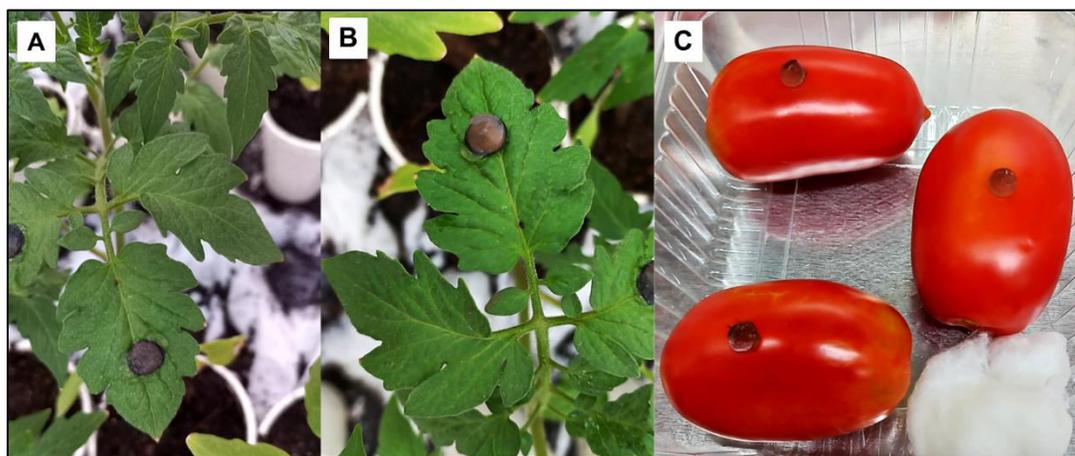
Se utilizaron plantas de *A. mexicana* germinadas de semilla, como se describe en esta sección, adicionalmente se trabajó con jitomate (*Solanum lycopersicum* v. saladette). Para el establecimiento de plantas de *A. mexicana*, se recolectaron semillas y se dejaron secar durante 4 semanas a temperatura ambiente (36 °C) antes de su germinación (Karlsson et al., 2003). Después, las semillas fueron desinfectadas inicialmente con etanol al 70% con agitación durante 30 segundos. Posteriormente, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 2% durante 15 minutos. Las semillas se lavaron cinco veces en agua estéril para eliminar el hipoclorito de sodio, después se remojaron en agua estéril a 4 °C en oscuridad durante 24 horas antes de sembrar, transcurrido ese tiempo las semillas se sembraron en placas Petri de 90×20 mm (Kwon et al., 2020), que contenía papel filtro humedecido con la solución de  $AG_3$  1000 mg/L<sup>-1</sup> (C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub>K, Sigma Chemical Co, EE. UU.). Las cajas se sellaron con Parafilm, luego, se incubaron durante dos semanas a temperatura de 25 °C en oscuridad (Karlsson et al., 2003). Después de la emergencia del hipocótilo, se trasplantaron, una plántula por bolsa de polietileno para vivero (25×15), utilizando sustrato de campo arcillo arenosa: peat moss-vermiculita fina-cal dolomita, autoclaveada (Shunshine® Mix-3) (2:2) (1.5 kg/maceta) en condiciones de crecimiento estándar de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 25 ± 2 °C para su aclimatación, con riego cada 3 días (Jain et al., 2017).

Las plantas de jitomate se adquirieron en estado de plántulas de tres semanas en vivero local y se aclimataron en las mismas condiciones que las de *A. mexicana* por cuatro semanas. Adicionalmente, se emplearon frutos maduros de jitomate, provenientes de un mercado local.

Los hongos utilizados fueron aislados de plantas de *A. mexicana* con síntomas de mancha foliar colectadas en 2021-2022 y corresponden a *C. cladosporioides*, *C. cassicola*, *F. solani*, *L. theobromae*, *N. clavispora* (sección 2.3.8). Los hongos se mantuvieron en cultivos sobre PDA y se manipularon como se describe en las secciones siguientes.

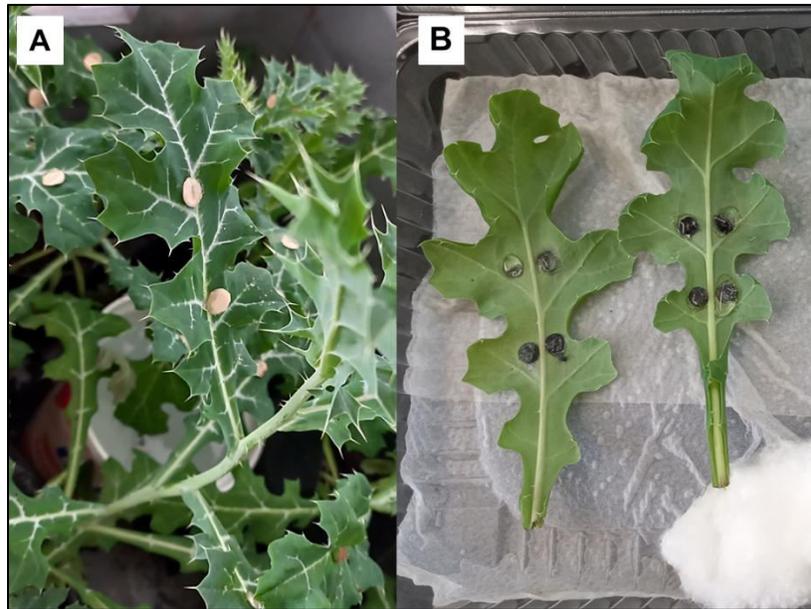
### 3.2.2. Desarrollo de las pruebas de patogenicidad

La capacidad patogénica de los hongos aislados se verificó sobre hojas y frutos de jitomate. Hojas de 60 días aprox. fueron infectados y mantenidas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  con fotoperiodo de 12/12 luz oscuridad. Las hojas fueron expuestas a un explante de micelio de 5 mm de diámetro en la parte del haz, y se siguió el desarrollo de lesiones por 7 días (**Fig. 3.1A y B**). Para los ensayos en frutos, éstos fueron infectados con un explante de micelio similar como se infectó en las hojas y mantenidos bajo las mismas condiciones. Después de los tratamientos se observó el desarrollo de la sintomatología a los siete días post inoculación (**Fig. 3.1C**).



**Figura 3.1.** Pruebas de patogenicidad en el jitomate inoculación con *L. theobromae*, *C. cassicola*, *F. solani* y *C. cladosporioides*. Hojas infectadas *in planta* (**A-B**), frutos infectados (**C**), ambos inoculados con un explante de micelio.

Las pruebas de patogenicidad en *A. mexicana* se desarrollaron sobre hojas *in planta* o escindidas y mantenidas *in vitro*. En ambos casos se usaron los discos de micelio de 5 mm diámetro. Los discos se tomaron con un sacabocado de placas de PDA con siete días de cultivo (**Fig. 3.2**). Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo para *C. cassicola*, *C. cladosporioides*, *L. theobromae*, *F. solani* y *N. clavispora*, este último solo fue incluido en ensayos *in vitro*.



**Figura 3.2.** Prueba de patogenicidad. Hojas *in planta* (A), Hojas desprendidas de las plantas (*In vitro*) con explantes de micelio en envés de la hoja (B).

**Pruebas de patogenicidad *in planta*.** La inoculación se realizó en plantas mantenidas en bolsas para vivero de 20×25 cm con una proporción de sustrato de 3:1 con tierra de campo: sustrato Sunshine Mix #3 para su acondicionamiento. Los controles fueron hojas sin algún tipo de daño y hojas con daño mecánico. Las hojas analizadas fueron de la parte media y apical. Se inocularon cuatro hojas por planta, cada hoja con dos explantes, y tres plantas por cada cepa (**Fig. 3.3A**). Después de la infección, las plantas, se mantuvieron en condiciones de alta humedad cubriéndolas con bolsas de polietileno transparente durante 48 h a 25 °C (**Fig. 3.3B**). Después de este tiempo, se retiró la cubierta y las plantas se mantuvieron en un invernadero de seguridad, con riego cada tercer día, sin saturar. Se realizaron infecciones falsas como controles inoculando plantas de la misma manera, pero con discos de PDA estéril. Se monitoreo el desarrollo de los síntomas durante siete días (Daengsuwan et al., 2020). En los casos en los que se observó la aparición de lesiones, se tomaron secciones foliares (**Fig. 3.3C**) para confirmar la presencia del agente en las mismas y cumplir con los postulados de Koch (AbdElfatah et al., 2021). Se realizaron dos réplicas diferentes con este método.



**Figura 3.3.** Análisis de la patogenicidad directamente en hojas *in planta* de *A. mexicana*. Hojas mostrando las secciones (A), acondicionamiento para el proceso de infección (B), secciones foliares con aparición de síntomas para el reaislamiento (C). Ap: apical, M: media, B: basal.

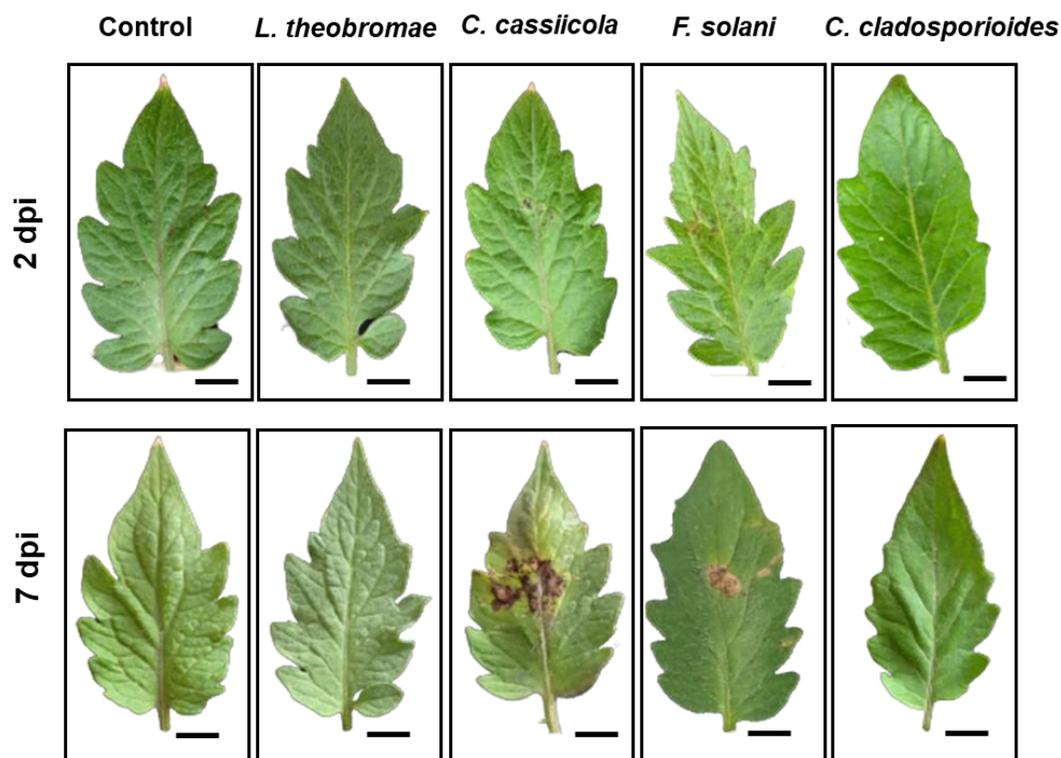
**Pruebas de patogenicidad *in vitro*.** Hojas de plantas sanas de aproximadamente 13 cm se tomaron de plantas sanas, mantenidas como se describió anteriormente. Las hojas escindidas se colocaron sobre dos capas de toallas de papel (servitoallas Vogue) estériles en una charola transparente de politereftalato de etileno (PET) con cubierta tipo bisagra de 24 × 18 × 7 cm. En cada charola se vertieron 8 mL de agua destilada estéril. Las hojas se colocaron sobre la cara adaxial y sobre la cara abaxial se colocaron cuatro discos de PDA con micelio de los hongos a ensayar, de tal manera que el micelio quedó en contacto con el tejido foliar. Dos discos de PDA se dispusieron de cada lado de la nervadura central (**Fig. 3.2B**). Se utilizaron cuatro hojas por cada caja y como controles se hicieron falsas infecciones con discos de PDA estériles. Después de la inoculación, las charolas se cerraron con Parafilm, para mantener una atmósfera de alta humedad y se mantuvieron a 25 °C en un fotoperiodo de 12 h. El experimento se repitió dos veces (ocho réplicas; Brauna-Morževska et al., 2023). Se monitoreó el desarrollo de síntomas durante siete días después de la infección.

Se utilizaron cuatro hojas por cada caja y como controles se hicieron falsas infecciones con discos de PDA estériles. Después de la inoculación, las charolas se cerraron con Parafilm, para mantener una atmósfera de alta humedad y se mantuvieron a 25 °C en un fotoperiodo de 12 h. El experimento se repitió dos veces (ocho réplicas; Brauna-Morževska et al., 2023). Se monitoreó el desarrollo de síntomas durante siete días después de la infección.

### 3.3. RESULTADOS

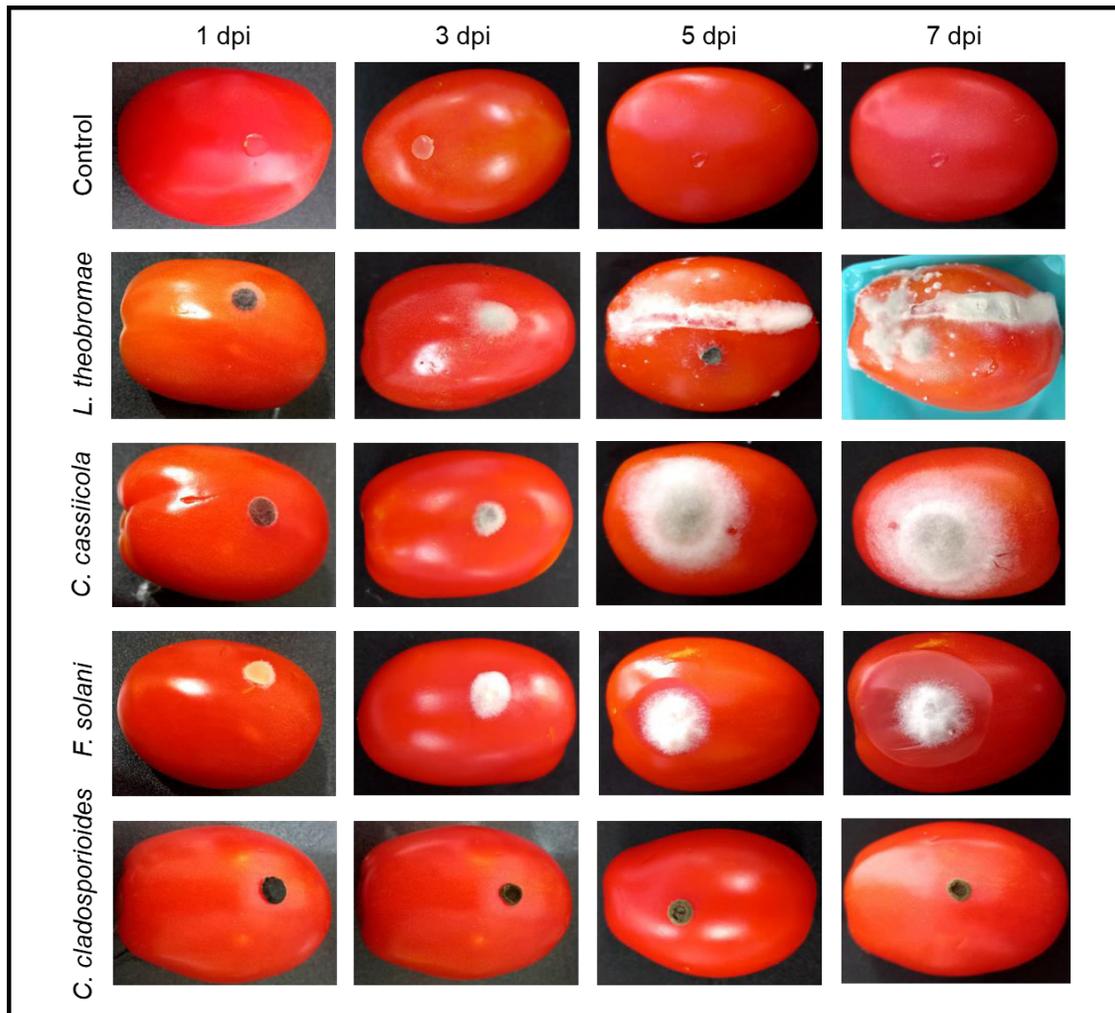
#### 3.3.1. Pruebas de patogenicidad en *Solanum lycopersicum* (jitomate)

Capacidad infectiva de los hongos aislados sobre hojas y frutos de tomate. De las especies probadas en este ensayo; complejo *C. cladosporioides*, *C. cassiicola*, *F. solani*, *L. theobromae*, solo *F. solani* y *C. cassiicola* fueron capaces de inducir una lesión en hojas después de dos días postinoculación (**Fig. 3.4**). Estas lesiones fueron manchas pardas a los dos días, después de los siete días las lesiones son más notables observándose secamiento en el área dañado, pudiéndose recuperar el hongo a partir de las lesiones. No obstante, en los ensayos sobre frutos lesionados y no lesionados (**Fig. 3.5**) tres de las especies probadas; *C. cassiicola*, *F. solani* y *L. theobromae*, los primeros síntomas del hongo se observaron al siguiente día postinoculación (dpi), éstos fueron más visibles en frutos inoculados con herida artificial e infectado con *F. solani*, mientras que en frutos sin herida e infectados con micelio los síntomas observados eran menores con las tres especies de hongos (**Fig. 3.5**).



**Figura 3.4.** Hojas de jitomate (*S. lycopersicum*) inoculados con hongos que crecen en *A. mexicana*. dpi: días postinoculación.

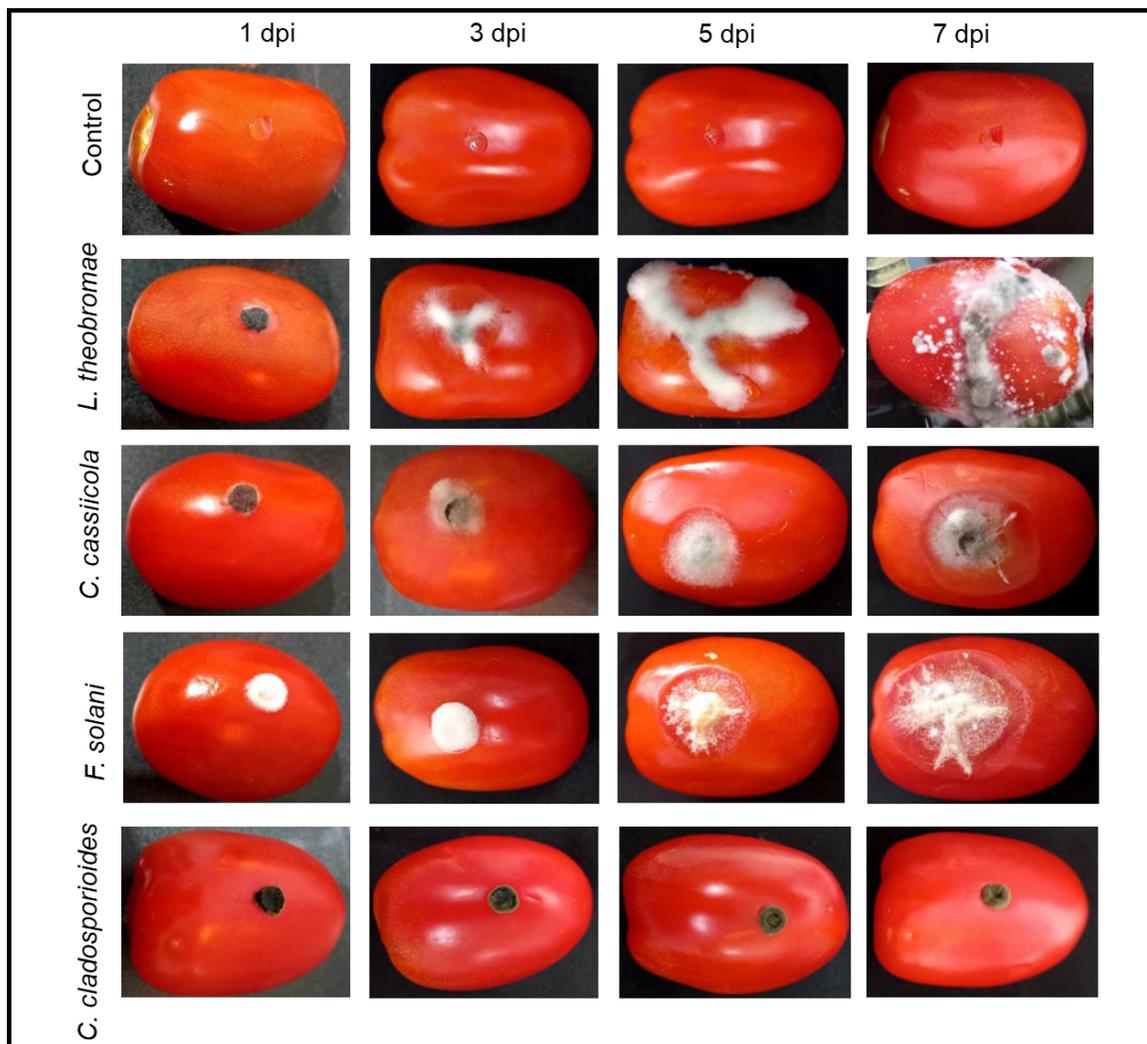
A los 3 dpi los tres aislamientos fueron patogénicos al ocasionar lesiones. En todos los casos los patógenos causaron lesiones y ablandamiento, en el caso particular de frutos lesionados e inoculados con *L. theobromae* presentaron síntomas como rajaduras o rompimiento de la epidermis. Trascurridos cinco dpi la progresión de los daños eran más evidentes tanto en frutos lesionados y no lesionados. Ciertamente los frutos infectados con *L. theobromae* tenían los daños más avanzados y produciendo abundante crecimiento micelial. Después de 7 días, los jitomates presentaron pudrición y ablandamiento, particularmente en los casos de *L. theobromae*, *C. cassicola* y *F. solani* (Fig. 3.5 y 3.6).



**Figura 3.5.** Frutos postcosecha de *S. lycopersicum* inoculados con hongos que crecen en *A. mexicana*. dpi: días postinoculación.

Además, los daños avanzaron hasta el endocarpio. Es interesante hacer notar que el complejo *C. cladosporioides* no logró proliferar sobre los frutos, aun en los casos en los que

se practicó una incisión sobre la cutícula del mismo, indicando su baja o nula capacidad infectiva, en las condiciones del ensayo.



**Figura 3.6.** Frutos postcosecha de *S. lycopersicum* con lesión artificial e inoculados con hongos que crecen en *A. mexicana*. dpi: días postinoculación.

### 3.3.2. Pruebas de patogenicidad en *A. mexicana* *in planta* e *in vitro*

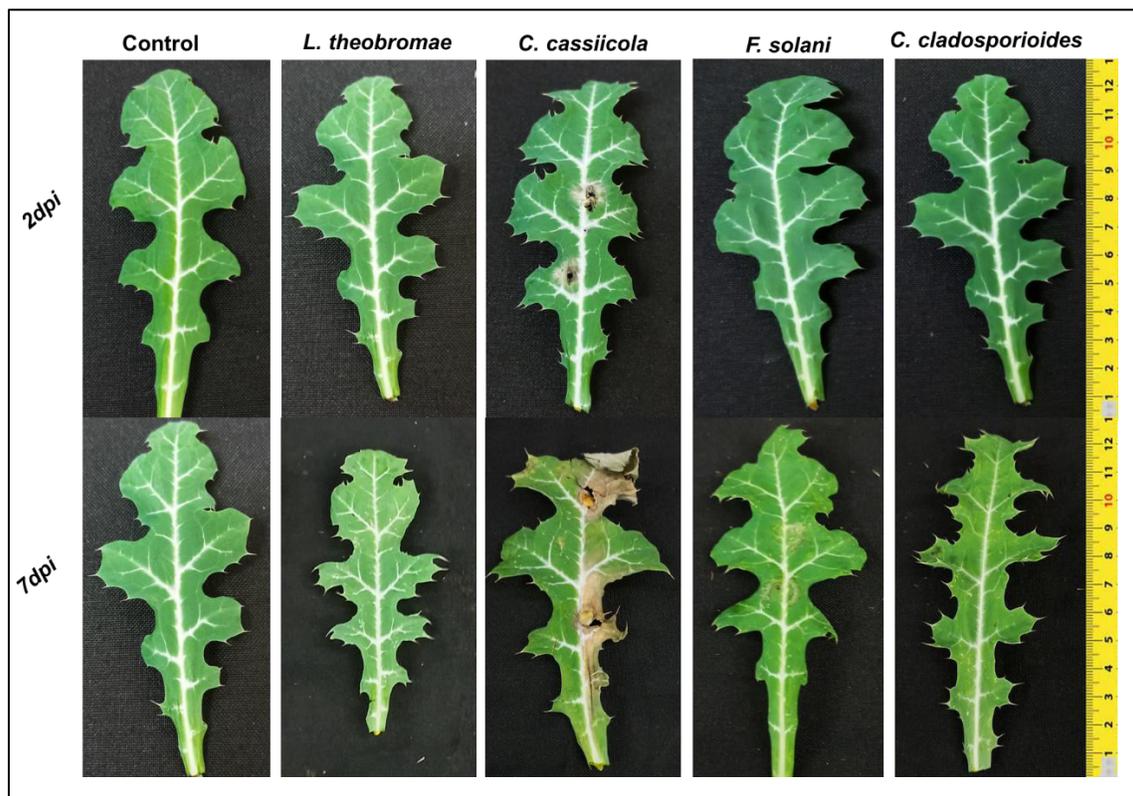
#### Pruebas de patogenicidad *in planta*

En marzo de 2022, se inocularon plantas sanas de tres meses, utilizando el método del disco de micelio (**Fig. 3.2A**). La aparición de síntomas se monitoreó durante siete días. Dichas lesiones detectadas como manchas necróticas alrededor de los discos de micelio, solamente se observó en las hojas expuestas a *C. cassicola*, después de dos días (**Fig. 3.7**). Los discos se retiraron después de siete días y se pudieron observar lesiones

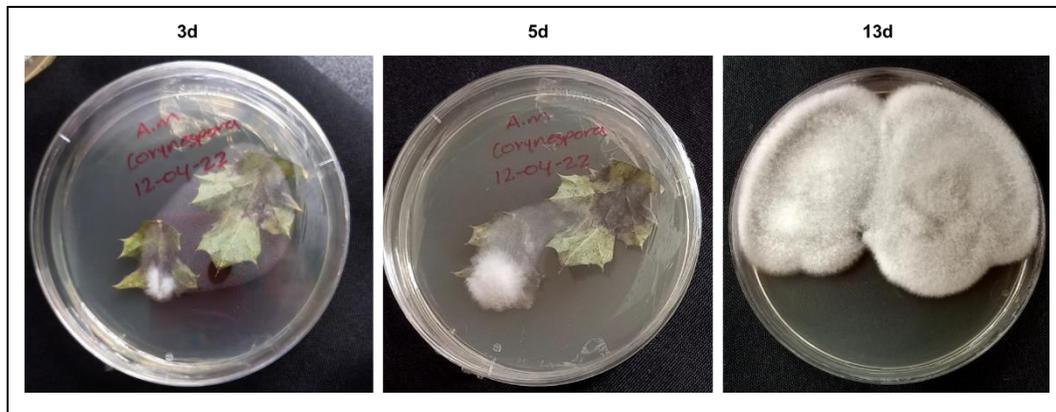
necróticas y secamiento en las zonas en las que éstos se encontraban. En estas condiciones, ninguna otra cepa produjo lesiones en las hojas (**Fig. 3.7**). Las hojas con lesiones se seccionaron y se trataron con hipoclorito de sodio y etanol antes de depositarse en placas de PDA, para el aislamiento del agente causal. Después de tres días se observó el crecimiento micelial de textura algodonoso y de color gris. Al quinto día, el micelio se expande conservando la coloración gris. El día 13, el micelio es abundante, algodonoso y de color gris oscuro (**Fig. 3.8**), consistentes con la morfología de *C. cassiicola* cuya identidad fue confirmada por secuenciación genómica de la región ITS y del TAF-1  $\alpha$  (**Fig. 2.22**).

Las pruebas de patogenicidad se realizaron de nuevo en marzo de 2023, con resultados similares, siguiendo la misma metodología. La cepa de *C. cassiicola* aislada en 2022 tiene la capacidad de actuar como agente primario en *A. mexicana*.

De las cepas aisladas en el segundo ejercicio (2022), se determinó la patogenicidad de *N. clavispورا* de manera *in vitro*. (sección siguiente).



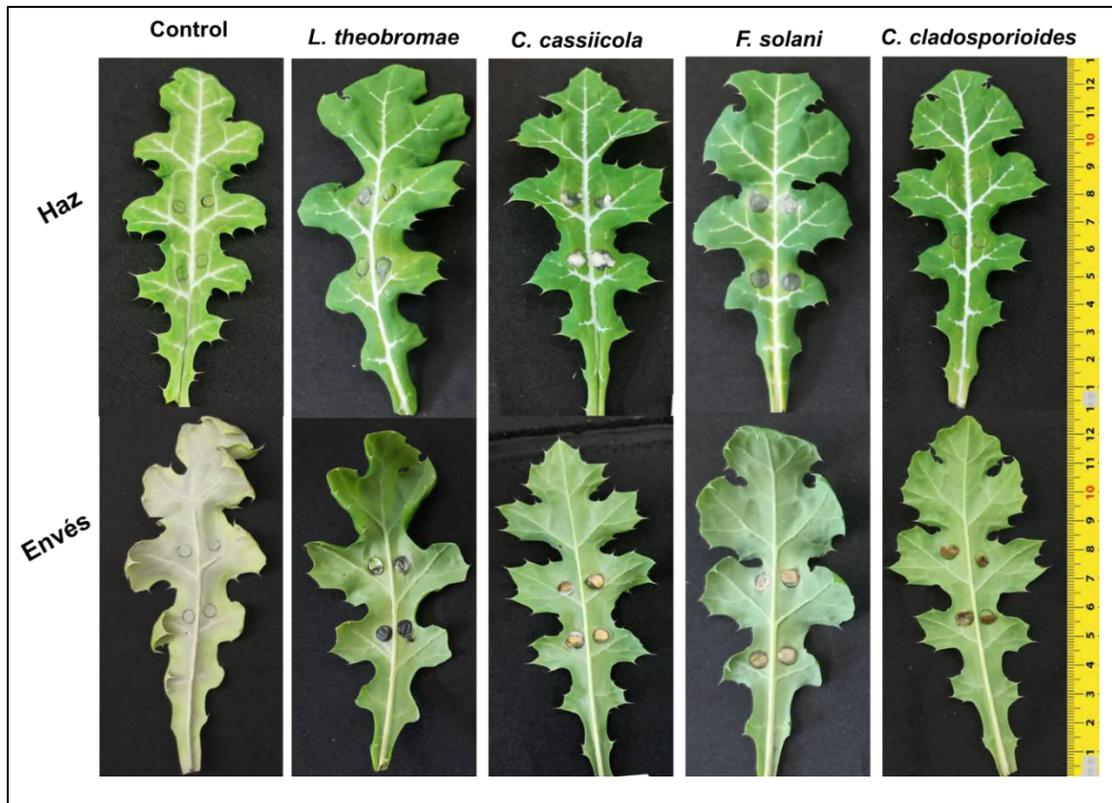
**Figura 3.7.** Prueba de patogenicidad *in planta* en hojas de *A. mexicana*.



**Figura 3.8.** Crecimiento micelial en hojas de *A. mexicana* expuestas a *C. cassiicola*. Se muestra la progresión del hongo.

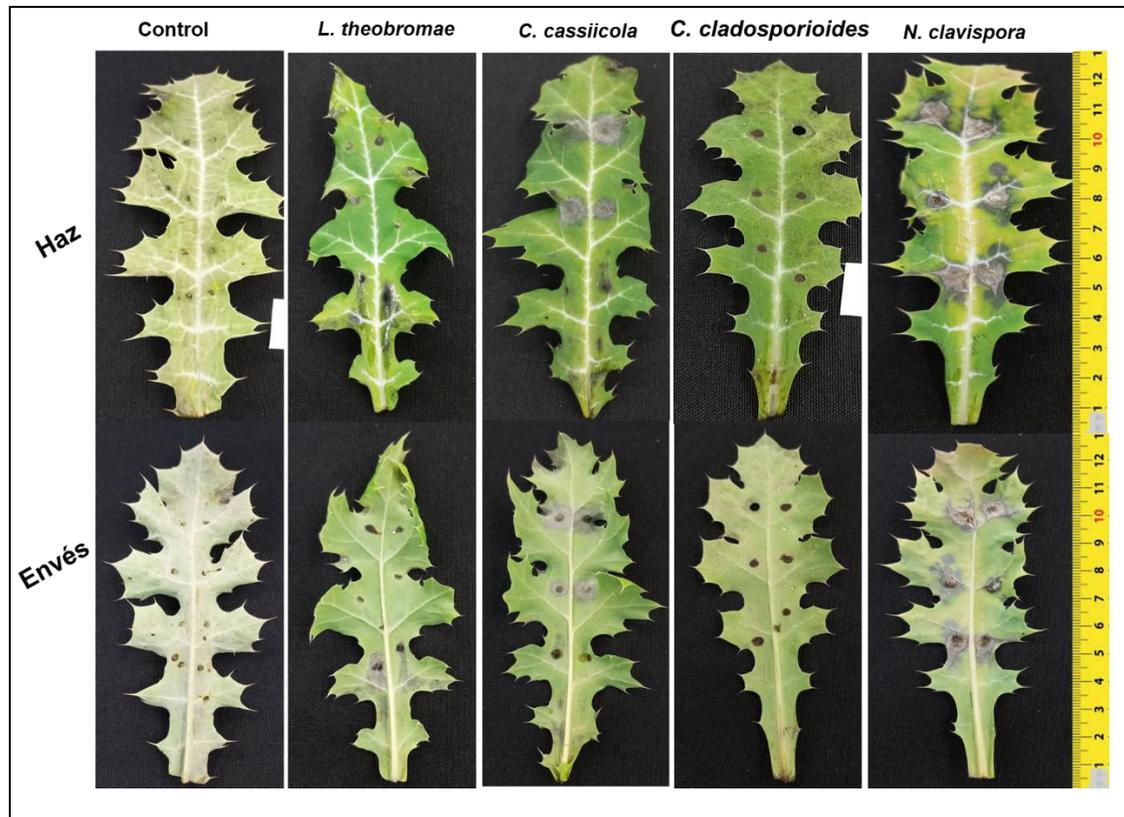
### Pruebas de patogenicidad *in vitro*

Las pruebas de patogenicidad *in vitro* se realizaron en hojas escindidas y mantenidas en cámaras húmedas hechas con charola de PET. En estos ensayos, se probaron *L. theobromae*, *C. cassiicola*, *F. solani*, complejo *C. cladosporioides*, y *N. clavispora*, estas especies de hongos y cómo inóculos se utilizaron discos de micelio y una suspensión fúngica de conidios. De nuevo, entre las especies de hongos utilizadas para la infección, *L. theobromae*, *C. cassiicola* y *F. solani* fueron exitosos en las infecciones de los tejidos ya que al quinto día de la exposición se observó la aparición de lesiones tanto en el haz como en el envés de la hoja, en los tres casos los síntomas eran necrosis en los bordes y crecimiento micelial de color grisáceo, en el caso de *C. cassiicola* el micelio era algodonado aéreo (**Fig. 3.9**). El complejo *C. cladosporioides* y el testigo no presentaron síntomas de infección fúngica.



**Figura 3.9.** Prueba de patogenicidad *in vitro* en hojas de *A. mexicana* con explantes de micelio de 5 mm después de cinco dpi.

Es interesante notar que las aplicaciones de una suspensión de conidios de  $1 \times 10^6$  de *L. theobromae*, *C. cassiicola*, complejo *C. cladosporioides* y *N. clavispota* también produjeron zonas necróticas con abundante crecimiento micelial en el haz y envés de la hoja, todo eso después del sexto día de la infección artificial. Son notorios los síntomas producidos por *N. clavispota*, ya que en este tiempo fue el que presentó áreas cloróticas más expandidas por la nervadura central. No obstante, aunque fue notable la aparición de zonas oscuras alrededor de los puntos tratados con el complejo *C. cladosporioides*, no se desarrollaron crecimiento de micelio al igual como ocurrió con el control (**Fig. 3.10**).



**Figura 3.10.** Prueba de patogenicidad *in vitro* en hojas de *A. mexicana* inoculadas con una suspensión de conidios de  $1 \times 10^6$  después de seis dpi.

### 3.4. DISCUSIÓN

De las cuatro especies analizadas por su capacidad patogénica *in planta* de jitomate; *L. theobromae*, *C. cassiicola*, *F. solani* y complejo *C. cladosporioides*, solamente *C. cassiicola* y *F. solani* fueron capaces de inducir lesiones primarias estableciendo así una relación compatible con los hongos (**Fig. 3.4**). Estas especies lograron ser ensayados tanto en hojas *in planta* como en frutos *in vitro* en (**Fig. 3.5** y **3.6**). La exposición del micelio sobre la superficie de la hoja hace que la infección sea más directa y por lo tanto se produzca la infección, el hongo puede invadir los tejidos y proliferar en éstos causando las lesiones que se observan. Sierra-Orozco et al., (2023) mencionan que *C. cassiicola* infecta a más de 530 especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, que abarcan muchos cultivos importantes, este hongo tiene hábito trófico muy amplio que incluye necrotróficos, saprófitos y endófitos. Este patógeno provoca graves pérdidas de rendimiento en el jitomate, el control de la enfermedad ha sido por métodos químicos. Además, indican que esta especie de hongo utiliza supuestos efectores necrotróficos. Se ha detectado un conjunto completo de

genes necesarios para codificar un compuesto similar a la toxina T en aislados recolectados que infectan el jitomate. Los aislados de *C. cassiicola* en jitomate no codifican el gen de casiicolina (Cas0), esto probablemente emplean otros efectores. Por su parte Barthe et al., (2007) y Dixon et al., (2012) definen a la casiicolina (cas) como una toxina necrotrófica producida y difundida por *C. cassiicola* durante la infección. Aunque se desconoce su modo de acción exacto, un estudio que utilizó un aislado de árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*) sugiere que el cas se comporta como unas toxinas específicas del huésped (HST). Hasta la fecha, se han identificado ocho isoformas de cas; Cas1 a Cas7 y Cas2.2.

En el caso de *F. solani*, se considera como una de las especies de hongos más comunes asociadas con el marchitamiento del jitomate. La enfermedad causada por *F. solani* es una complicación grave que reduce el crecimiento, el rendimiento de los frutos y la calidad amenazando la producción. Este hongo es capaz de suprimir las defensas del huésped y promover la susceptibilidad a patógenos en varios cultivos como la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) (Tahmasebi et al., 2023), la papa (*Solanum tuberosum*) (Martín-Cacheda et al., 2024), el chile (*Capsicum annuum*) (Hami et al., 2021) y el tomate Cherry (*Solanum lycopersicum*) (Awad-Allah et al., 2022) provocando importantes pérdidas económicas, ya sea en etapas previas o posteriores a la cosecha.

Por otro lado, el complejo *C. cladosporioides* y *L. theobromae* no presentaron síntomas estableciéndose una relación incompatible entre el patógeno y el hospedante (**Fig. 3.4**), Huda-Shakirah (2022) han encontrado que los hongos de Botryosphaeriaceae pueden invadir las plantas mediante colonización endofítica, por semilla infectadas, suelo contaminado e infestación por insectos. Además, *L. theobromae* se ha asociado con la muerte regresiva de *Theobromae cacao*, también es responsable de causar muerte regresiva y cancro del tallo en varias plantas, como el fresno americano (*Fraxinus americana*), los arbustos de arándanos (*Vaccinium*), la fresa (*Fragaria*), además de infectar la hoja y el tallo, sin embargo, en este trabajo no se observaron daños en las hojas de jitomate inoculadas con este hongo. En el caso del complejo *C. cladosporioides*, los resultados son diferentes a los reportados por El-Dawy et al., (2021) quienes revelaron cinco cepas de esta especie (SVUCc1, SVUCc2, SVUCc3, SVUCc4 y SVUCc5) que eran moderadamente virulentas a *Vicia faba*, la otra cepa (SVUCc6) fue hipovirulenta no significativa. Por otro lado, Torres et al., (2017) han sugerido que especies de *Cladosporium* pueden actuar como potenciales agentes de control biológico de la roya blanca (*Puccinia horiana*) y del crisantemo (*Chrysanthemum × morifolium*).

Estos resultados sugieren que estas dos especies (*F. solani* y *C. cassiicola*) son capaces de establecer una relación compatible con las hojas de *S. lycopersicum* ya que poseen los efectores necesarios para sobrepasar las defensas.

Respecto a los frutos postcosecha, nuestros resultados son comparables con lo reportado por Nieto-Angel et al., (2019), quienes encontraron que al inocular frutos de jitomate con *Colletotrichum coccodes* mediante heridas artificiales los primeros síntomas aparecen a los 3 dpi. De los cuatro aislamientos evaluados en frutos infectados artificialmente, *L. theobromae*, *C. cassiicola* y *F. solani* causaron los síntomas característicos (**Fig. 3.5-3.6**), los tres se observaron a partir del día uno después de la inoculación. Ogo-Oluwa y Liamngee (2016) han demostrado que diversos hongos están asociados con la pudrición de los frutos de jitomate almacenados. Entre ellos, *Aspergillus niger*, especies de *Fusarium* y *Botryodiplodia theobromae* (*L. theobromae*). *L. theobromae* también causa daños en otros cultivos, en hortícolas de importancia económica, como la manzana (*Malus domestica*), la uva (*Vitis vinifera*), el mango (*Mangifera indica*) y los cítricos (*Citrus sinensis*) (Wang et al. 2011; Travadon et al., 2013; Delgado-Cerrone et al., 2016; Paolinelli-Alfonso et al. 2016; Seethapathy et al., 2016). *F. solani* se ha informado que causa daños en maíz (Zainudin et al., 2011) y pudrición de raíces y tallos de *Dendrobium*. Además de dañar los frutos de jitomate almacenados, *F. solani* es patógeno de varias especies tropicales como papa, soja, guisantes y pimientos, Leslie y Summerell (2006) reportan que esta especie produce micotoxinas que son letales para la salud humana y animal. *F. solani* ha sido conocido por sintetizar compuestos como la fusalanipirona (Abraham et al., 1990), ácido fusárico (Bacon et al., 1996), moniliformina (Chelkowski et al., 1990). Como patógeno, *C. cassiicola* puede infectar plantas como el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), el jitomate (*Solanum lycopersicum*, *Lycopersicon esculentum*), el pepino (*Cucumis sativus*), el algodón (*Gossypium hirsutum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y soja (*Glycine max*) (Keevan et al., 2018). *C. cassiicola* en jitomate fue reportada en Florida en 1972 (Blazquez, 1972). La enfermedad ha sido expandida en climas tropicales/subtropicales, y en la última década, la enfermedad se ha vuelto más destructiva y cada vez más resistente al fungicida. Keevan et al., (2018) han informado que *C. cassiicola* sobrevive hasta dos años en restos de soja. Las posibles fuentes de inóculo primario podrían ser las esporas y clamidosporas dispersadas por el viento, la lluvia, cultivos y malezas que alberguen aislados de *C. cassiicola* patógenos para el tomate.

Por su parte, Ma et al., (2020) encontraron por primera vez que las lesiones hundidas en el jitomate estaban infectadas por *C. cladosporioides* según la identificación morfológica y molecular. Estos fueron confirmados mediante pruebas de patogenicidad, demostrando que *C. cladosporioides* era la causa del moho negro en los frutos del jitomate. Este es el primer informe de *C. cladosporioides* que causa moho negro en frutos. Sin embargo, estos resultados no coinciden con los nuestros, encontramos que en la prueba de patogenicidad este hongo no fue capaz de infectar los frutos postcosecha de jitomate tanto herido como no herido. La falta de infección en los frutos indica que es probable que *C. cladosporioides* sea un endófito que no infecta frutos para esta región. Aunque este aislado no fue capaz de producir síntomas, muchas especies de plantas de la region tropical son susceptibles a *C. cladosporioides* como *Pouteria campechiana* (Nabor-Romero et al., 2018), *Diospyros kaki* (Palou et al., 2015), *Satsuma mandarin* (Tashiro et al., 2013). También se ha reportado en climas fríos en cultivos de *Fragaria chiloensis* (Nam et al., 2015). Aunque estos hongos pueden infectar frutos en ausencia de heridas mediante la formación de apresorios, las estomas, el ataque de insectos, las aberturas naturales y las heridas facilitan la infección (Chethana et al., 2021). La asociación de estos hongos con diferentes tipos de frutas indica que estas especies no están especializadas en hospederos. Se pueden encontrar en cualquier lugar donde haya nutrientes disponibles y por lo tanto representar riesgos fitosanitarios.

En *A. mexicana*, se determinó la patogenicidad *in planta* e *in vitro* de los hongos; *C. cassiicola*, complejo *C. cladosporioides*, *F. solani*, *L. theobromae* y *N. clavispota* (**Figs. 3.7**). Las cuatro primeras especies lograron ser ensayados tanto *in planta* como *in vitro* (**Figs. 3.9**) En el primer caso, las hojas se trataron con discos de micelio, mientras que con la suspensión de conidios en hojas *in vitro*, *C. cassiicola*, complejo *C. cladosporioides*, *L. theobromae* y *N. clavispota* fueron analizada y tratados con una suspensión conidial de  $1 \times 10^6$  conidios/mL (**Fig. 3.10**). Se colocaron diez microlitros de suspensión de conidios en la parte superior de cada hoja. Después del secado al aire, las hojas inoculadas se sellaron en una bolsa de plástico con masking tape para mantener las condiciones de humedad favorables para la penetración del hongo en el tejido de la hoja. En el género *Argemone*, Bolay et al., (2021) realizaron pruebas de patogenicidad *in vitro* con *Erysiphe macleayae*, no obstante, este hongo tiene un rango de huéspedes más amplio dentro de las Papaveraceae (*Chelidonium*, *Glaucium*, *Macleaya*, *Meconopsis*, *Papaver* y *Chelidonium majus*), pero en condiciones naturales, *E. macleayae* sólo se ha encontrado en *Chelidonium*

y *Macleaya*. Sin embargo, la identificación de colecciones de *Erysiphe* en Papaveraceae sigue siendo complicada y requiere combinaciones de exámenes morfológicos de holomorfos y datos de secuencia, en el mejor de los casos complementados con pruebas de patogenicidad, sobre todo porque los huéspedes papaveráceos pueden estar infectados por varias especies de *Erysiphe* con morfología similar. Es importante mencionar que en nuestro estudio no se encontraron estas especies. Pero, en hojas de *A. mexicana* en condiciones naturales aislamos *L. theobromae*, *C. cassiicola*, *F. solani*, complejo *Fusarium incarnatum-equiseti*, complejo *C. cladosporioides*, *N. clavispora* y *T. harzianum*, estas especies son reportadas por primera vez en *A. mexicana*. Por su parte Pollack y Matthews (1976), demostraron que las lesiones en las hojas enfermas de *A. mexicana* eran causadas por *Deightoniella argemonensis*, las lesiones por este hongo son de color gris oscuro a negras, visible en ambas superficies de las hojas como motas diminutas o redondas a manchas irregulares de hasta 5 mm, algunas de las cuales tienen centros más claros y color marrón claro. También causa lesiones largas y oscuras en las venas. Otra especie de hongo patógeno para *A. mexicana* es *Cercosporidium guanicense*.

Por otro lado, los mecanismos de infección de *C. cassiicola* y *F. solani* han sido informados anteriormente por Sierra-Orozco et al., (2023), Abraham et al., (1990), Bacon et al., (1996), Yan et al., (2018) mencionan que *L. theobromae* tiene las funciones y factores de virulencia, como enzimas degradantes de la pared celular, efectores, proteínas secretadas y fitotoxinas, como las endo- $\beta$ -1,4-celulasas [familia de glicosilhidrolasas 5 (GH5)],  $\beta$ -glucosidasas (GH3), xiloglucano transglucosilasa/hidrolasas (GH16) y  $\beta$ -xilosidasas (GH43). Estas proteínas de la familia de las glicosilhidrolasas ayudan en la hidrólisis de enlaces glicosídicos en azúcares complejos y participan en diversas funciones, incluyendo los mecanismos de patogénesis. Zhang et al., (2019) en la vid, mencionan que interactúa con la Proteína 4 que Interactúa con Rpm1 (RIN4), con los genes de resistencia (R); gen mitocondrial (RPM1) y Proteína Ribosómica S2 (RPS2), y dos genes asociados a la resistencia a enfermedades (SGT1 y HSP90). Por el contrario, una proteína de resistencia a enfermedades (PBS1) y una Proteína de Susceptibilidad Mejorada a Enfermedades 1 (EDS1) estaban reguladas a la baja en respuesta a la infección por *L. theobromae*. HSP90, SGT1 y el gen requerido para la resistencia Mla12 (RAR1) son importantes acompañantes citosólicos de muchas proteínas R y participan en la respuesta de inmunidad innata de la planta formando un complejo de acompañantes moleculares. SGT1 y HSP90 son regulados positivamente y RAR1 es regulado negativamente en respuesta a este patógeno. Además,

mencionan que algunas vías de transducción de señales de hormonas vegetales pueden estar involucradas, incluidas las vías de señalización de auxinas, citoquininas, MeJa, SA y ET. SA participa principalmente en la defensa contra patógenos biotróficos, mientras que JA y ET suelen participar en la restricción de patógenos necrotróficos. *L. theobromae* tiene algunos mecanismos de infección únicos en comparación con otros patógenos de plantas. La señalización de auxinas suele ser una respuesta de defensa en la planta contra hongos necrotróficos, mientras que no muestra una relación obvia con los patógenos hemibiotróficos.

Finalmente, *N. clavispورا* es un hongo necrotrófico, y no ha sido reportado como patógeno de *A. mexicana*. Este hongo causa daños en *Fragaria* × *ananassa* (Mahapatra et al., 2018), *Rosa sterilis* (Shi et al., 2022), en el cardamomo (*Elettaria cardamomum*) (Biju et al., 2018). Gerardo-Lugo et al., (2020) reportan al mango (*M. indica*) con lesiones causadas por *C. clavispورا* además señalan que este hongo es patógeno de *Canthium dicoccum*, *Vigna unguiculata*, *Cocos nucifera* y *Vaccinia corymbosum*. Los síntomas que provoca este patógeno son lesiones necróticas pequeñas, marrones con anillos concéntricos (Shi et al., 2024). Los principales metabolitos fitotóxicos producidos por *N. clavispورا* son afritoxinona B, afritoxinona A y oxisporona (Xie et al., 2020).

Estos resultados revelan que *A. mexicana* es un nuevo hospedero para *C. cassicola*, *L. theobromae*, *F. solani* y *N. clavispورا* identificados por primera vez en esta especie.

## CAPÍTULO IV

### LOS ALCALOIDES BENCILISOQUINOLÍNICOS EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

*Argemone mexicana* L., produce una amplia gama de alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's), principalmente del tipo benzofenantridina, como la sanguinarina, protoberberina, y la berberina. En plantas adultas, la sanguinarina se encuentra únicamente en raíces y semillas, mientras que la berberina se distribuye en todos los tejidos (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013; Vázquez-Flota et al., 2018). No obstante, en plantas de campo infectadas con hongos de manera espontánea, la sanguinarina se puede detectar en cantidades importantes en las hojas (Hernández-Hernández, 2022). Un ensayo de aislamiento de los hongos asociados a las lesiones foliares resultó en la identificación de tres especies y un complejo; *L. theobromae* *C. cassiicola*, *F. solani* y el complejo *C. cladosporioides* (Capítulo 3).

Aunque frecuentemente se menciona que los alcaloides, como otros metabolitos secundarios forman parte del equipamiento químico de las plantas contra patógenos y herbívoros (Evans et al., 2009; Mishra et al., 2013), en pocos casos se ha demostrado su respuesta a la infección por agentes patogénicos como hongos o bacterias. No obstante, en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* simular condiciones de un ataque patógeno, como la exposición a homogeneizados de *Fusarium oxysporum*, producen un aumento en la acumulación de sanguinarina que, además, se reduce parcialmente a dihidrosanguinarina, una forma menos tóxica, sugiriendo la operación de un mecanismo de protección celular por detoxificación (Guízar-González et al., 2012; Trujillo-Villanueva et al., 2010, Hernández-Hernández, 2022). Aunque la sanguinarina, se considera una fitoalexina, por ser inducible y sus efectos tóxicos, dada su capacidad de intercalar en el ADN bicatenario, penetrar membranas e inhibir diversas enzimas que contienen grupos SH (Weiss et al., 2006), su participación en la interacción planta-hongo no ha sido analizadas en el contexto de la planta íntegra. Al disponer de un sistema controlado de infección (Cap. 3), así como una colección de cepas de hongos compatibles y no compatibles con *A. mexicana* (Cap. 2), es posible analizar los efectos de la interacción de hongos con plantas de *A. mexicana* en estos casos. Para ello, se infectaron plantas y hojas de *A. mexicana* de manera controlada

con cuatro especies aisladas a partir de las lesiones foliares. Este Capítulo presenta estos resultados.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODO**

### **4.2.1. Material biológico**

Plantas de *A. mexicana* se mantuvieron como se describió en el Capítulo III. Las plantas fueron infectadas directamente en las hojas (experimentos *in planta*), o se usaron como fuente para la obtención de hojas para ser infectadas después de ser escindidas (experimentos *in vitro*). En ambos casos, los procesos fueron como se describió en el Capítulo III.

Las cepas de hongos utilizadas fueron las mismas del Capítulo III; complejo *C. cladosporioides*, *C. cassiicola*, *F. solani* y *L. theobromae* y se mantuvieron en las condiciones descritas anteriormente.

#### **Experimentos de infección controlada *in planta***

Se realizaron los experimentos de infección *in planta* descritos en la siguiente sección. Se colectaron las hojas infectadas y la no infectadas del mismo par. Adicionalmente, se colectaron muestras de tallos y raíces a los ocho días después de la infección. En cada experimento se infectaron seis hojas por plantas y tres plantas por tratamiento (cepa de hongo) utilizando el método del disco de agar, como se describe en el Capítulo III. Los tiempos de exposición de las cepas de hongos fueron entre dos y ocho días y se utilizaron como testigos hojas de plantas antes de la infección (T0), expuestas a discos de PDA sin micelio o con una lesión similar y expuestas a los discos de agar durante la duración de los experimentos.

#### **Experimentos de infección controlada *in vitro***

Este sistema se desarrolló en cámaras húmedas construidas con contenedores de polipropileno y toallas de papel, como se muestra en el Capítulo III. Se incubaron seis hojas por caja y cada tratamiento se aplicó por triplicado. El procedimiento de infección fue como se describe en el Capítulo III. Dependiendo del experimento, las hojas se colectaron a los dos, cinco y seis días después de la infección y los controles adecuados fueron incluidos.

#### 4.2.2. Extracción y perfil de alcaloides mediante cromatografía en capa fina (CCF)

Las plantas de *A. mexicana* se separaron por tejidos (tallos, hojas y raíces) después de la exposición a micelios y suspensión de conidios de hongos, los tejidos se recolectaron a los 0, 2 y 7 días postinoculación, mientras en hojas aisladas se recolectaron a los 5 y 6 dpi.

Para la extracción de los alcaloides, se partió de tejidos liofilizados por 48 horas que se molieron en un equipo (Ika Tube Mill control), cada tejido por separado hasta obtener un polvo fino, se pesó 120 mg del polvo y se mezcló con 15 mL de metanol (MeOH), posteriormente se incubaron durante dos horas a 45 °C en oscuridad, con agitación constante (100 rpm). Después de la incubación, se tomaron 1.5 mL del extracto y se centrifugaron durante 15 minutos (1400 x g) para separar los residuos restantes. Se tomó 500 µL del extracto recuperado y se secó en una estufa de incubación (LAB INCUBATOR, Kitlab). El residuo obtenido se resuspendió en 100 µL de MeOH grado HPLC (Monforte-González et al., 2012; 2019).

El extracto se separó por cromatografía en capa fina (CCF), aplicando 1 µL del extracto en un 1 cm por encima del borde inferior de la placa F<sub>254</sub> (fase estacionaria) de gel de sílice 60 de CCF de 10 × 20 cm (largo × ancho) (Merck KGaA; Darmstadt, Alemania). Se cromatografio hasta 3 cm por debajo del borde superior. La placa con la muestra aplicada se colocó en una cámara de cristal cerrada con los disolventes mezclados (fase móvil). Para la separación de berberina se utilizó el sistema A; berberina, con *n*-butanol/agua/NH<sub>4</sub>OH (Fermont 36051) (8:1:1 v/v) y el sistema B para separar sanguinarina con los disolventes ciclohexano: etanol 94:6 y (Monforte-González et al., 2012).

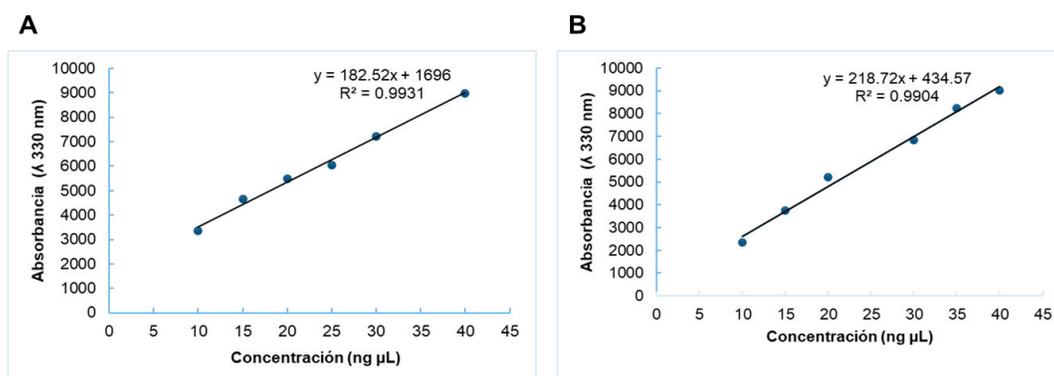
La cuantificación de los alcaloides se realizó mediante fluorescencia *in situ* en un densitómetro Camag TLC Scanner 4 (Camag, Muttenz, Suiza), controlado por el administrador de cromatografía plana WinCATS 1.4.10 (Camag). La longitud de onda de excitación se fijó en 330 nm, con un filtro de corte K400 Camag de 400 nm (Monforte-González et al., 2012).

#### Curva estándar para la cuantificación de los ABI's

Para realizar la cuantificación de los alcaloides, primero se construyó la curva de calibración de los alcaloides (**Fig. 4.1**), para ello se prepararon stocks por separados, se pesaron 10 mg de los alcaloides de sanguinarina y berberinas puras (Sigma Aldrich®) y se disolvieron en 10 ml de metanol grado HPLC para obtener una solución madre 1, de 1 mg/ml. Después se realizó una dilución en proporción 1:10, tomando 100 µl de la solución madre 1 + 900 µl

de metanol HPLC, se obtuvo una solución con una concentración de 0.1 mg/mL (0.1 µg/µL; 100 ng/µL), a la cual se denominó solución madre 2. Se usó metanol para la preparación de la solución madre de los estándares.

La composición de los alcaloides se analizaron por densitometría *in situ*. Las lecturas de las placas cromatográficas se realizaron mediante un barrido, y los productos se separaron por CCF. La asignación de las identidades de los alcaloides fue mediante la comparación de los estándares (Sigma-Aldrich®) y los valores de R<sub>f</sub> (0.27 sanguinarina y 0.25 berberina, (Sigma-Aldrich 360465), así como sus propiedades fluorescentes visualizándolos con luz UV a 365 nm utilizando una lámpara manual (Spectroline ENF-240C; Westbury, NY), los colores emitidos son rojo/naranja para sanguinarina y azul/verdoso en berberina) (Monforte-González et al., 2012 y 2019). Los disolventes utilizados fueron de grado HPLC.



**Figura 4.1.** Curvas de calibración para berberina (A) y sanguinarina (B) mediante CCF.

### Análisis estadístico

Los datos fueron procesados estadísticamente en SigmaPlot 16.0, además, se realizó un análisis de varianza no paramétrica con un nivel de significancia de 0.05 (Kruskal-Wallis) para determinar las diferencias entre los grupos experimentales. Finalmente se realizó la prueba post hoc de Dunn-Bonferroni para comparaciones múltiples para determinar las diferencias del contenido de BE y SA entre pares de muestras de los tejidos analizados.

### 4.3. RESULTADOS

Se han identificado alrededor de 25 alcaloides en los diversos tejidos de *A. mexicana* (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013). En plantas colectadas en la península de Yucatán, los patrones cromatográficos en capa fina han revelado la presencia de 19 posibles alcaloides (Escobar-Chan, 2018; Vergara-Olivares 2016; ver **Tabla 4.1**). De estos, solamente cuatro

se han identificado por criterios de espectroscopía de masas y asociado con los patrones de capa fina; berberina, dihidrosanguinarina, queleritrina y sanguinarina (Vázquez-Flota et al., 2018). La berberina se distribuye tanto en tejidos aéreos como subterráneos, mientras que los demás son exclusivos de raíces en plantas maduras (Vázquez-Flota et al., 2018).

#### **4.3.1. Contenido de alcaloides durante la exposición de *A. mexicana* a hongos.**

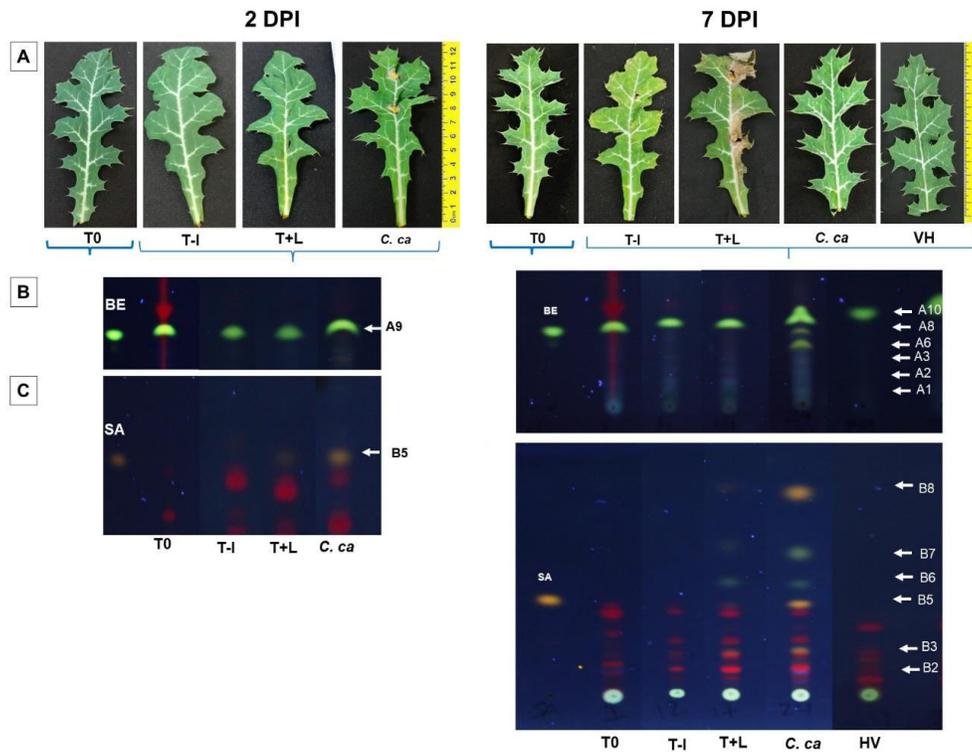
Se realizaron dos series de experimentos para evaluar los cambios en los perfiles y contenidos de alcaloides durante la exposición controlada de *A. mexicana* a los hongos aislados previamente. En la primera serie; experimentos *in planta*, se emplearon plantas íntegras cuyas hojas fueron expuestas a discos de micelio obtenidos de cultivos en PDA. En estos experimentos, se colectaron las hojas después de tiempos cortos y largos de exposición (dos y siete/ocho días; ver figura 3.2A). La segunda serie de experimentos (experimentos *in vitro*) consistió en exponer hojas aisladas a los discos miceliales y mantenerlas durante cinco/seis días en una cámara húmeda elaborada con contenedores de polipropileno (ver figura 3.2B). Con este diseño se pretende distinguir los posibles elementos locales de los sistémicos de la respuesta observada.

##### **Experimentos *in planta***

Con el fin de permitir una interacción positiva entre los hongos y las plantas expuestas a éstos; es decir la infección de los tejidos, en un primer experimento se utilizaron las cuatro cepas identificadas en el primer ejercicio de aislamiento (complejo *C. cassiicola*, *C. cladosporioides*, *F. solani*, y *L. theobromae*, ver capítulos II y III) y tiempos largos de interacción (siete días) (Ver anexos, **Fig. A6**). En este experimento, las hojas fueron lesionadas para facilitar el proceso de colonización fúngica aplicando varias punciones sobre las hojas con una aguja. Como se observó con anterioridad, solamente *C. cassiicola* fue capaz de producir una infección primaria, desarrollándose lesiones necróticas en las zonas foliares que tuvieron contacto directo con el micelio. Al analizar los perfiles cromatográficos de los extractos foliares se observó la intensificación de algunas bandas en el sistema A, con una mayor polaridad. En el sistema B, de menor polaridad, se notó la aparición de sanguinarina, detectada como una banda naranja-rojizo con Rf de 0.27 en los extractos provenientes de las hojas infectadas con este mismo hongo (Ver anexos, **Fig. A7**). Al cuantificar la berberina (separada en el sistema A), no se observaron diferencias significativas en las condiciones ensayadas, ya que los rangos se mantuvieron entre 0.6 y 1.1 mg/g PS. Por su parte, la presencia de sanguinarina sólo se pudo detectar en las hojas

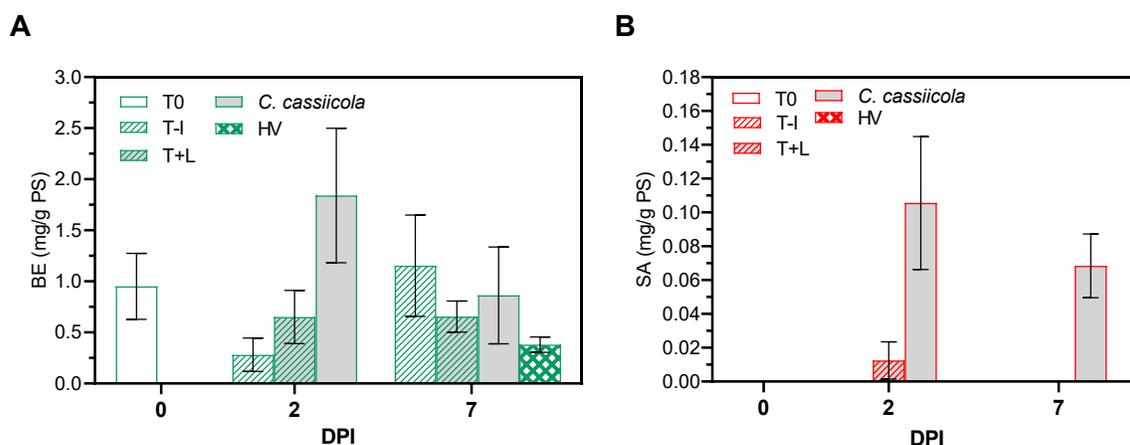
expuestas a *C. cassiicola*. Aunque en este experimento se analizaron las hojas no tratadas del mismo par, así como los tallos y las raíces, no se observaron diferencias significativas en los contenidos de ambos alcaloides (ver anexos, **Fig. A8-9**).

Con base en los resultados anteriores, se realizó un nuevo experimento en planta, analizando únicamente las hojas infectadas con *C. cassiicola*. En este nuevo experimento, la lesión mecánica, previa a la exposición al hongo, se ejecutó mediante una corta incisión superficial con un bisturí (ca. 0.5 cm y sin atravesar la lámina foliar). Los contenidos de alcaloides se analizaron en las hojas después de dos y siete días de la exposición al hongo (**Fig. 4.2**). Al cabo de los primeros dos días se observaron los primeros síntomas de la infección como una ligera clorosis en la zona de contacto con el micelio que se tornó en un área necrótica después de ocho días (**Fig. 4.2A**). De nuevo, algunas bandas incrementaron su intensidad como consecuencia de la infección, pero no se apreciaron cambios significativos en los patrones cromatográficos (**Fig.4.4B-C**).



**Figura 4.2.** Presencia de alcaloides en hojas *in planta* a los 2 y 7 dpi. Hojas expuestas a *C. cassiicola* (A). Presencia de berberina (B), presencia de sanguinarina. T0: Tiempo inicial, T-I: Testigo intacto, T+L: Testigo con daño mecánico, C. ca: *Corynespora cassiicola*.

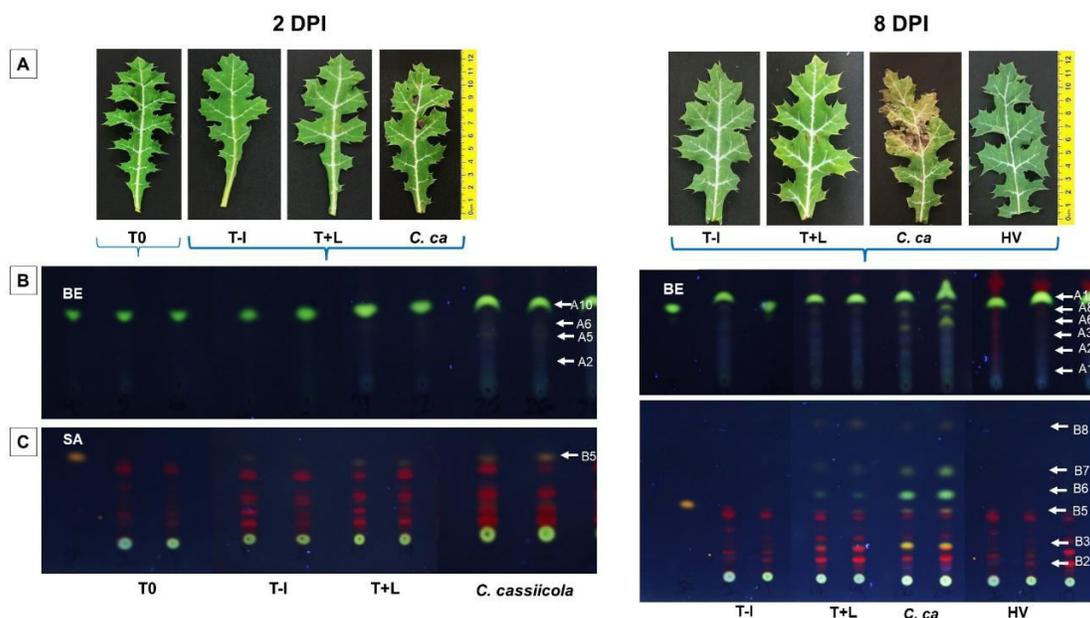
Los contenidos de berberina incrementaron de manera significativa ( $p > 0.05$ ) después de dos días, aunque regresaron a los niveles basales en tiempos mayores (siete días). De hecho, los valores de este alcaloide fueron similares en las hojas expuestas por siete días, independientemente de que hubieran sido lesionadas mecánicamente o no (**Fig. 4.3A**). Por su parte, la sanguinarina, ausente en las hojas sanas, tanto al inicio del experimento como a lo largo del mismo, se pudo detectar en valores importantes como consecuencia de la infección. Es interesante notar que, aunque en las hojas lesionadas se pudo observar la presencia de sanguinarina los valores fueron notablemente menores que en las hojas infectadas (**Fig. 4.3B**).



**Figura 4.3.** Contenido de berberina (A) y sanguinarina (B) en las hojas *in planta* de *A. mexicana* expuesto a *C. cassicola* durante 0, 2 y 7 dpi. La significancia entre muestras fue por la prueba Kruskal-Wallis/Dunn-Bonferroni ( $p < 0.05$ ). T0: Tiempo inicial, T-I: Testigo intacto, T+L: Testigo con daño mecánico, HV: Hoja vecina.

Este experimento se repitió para confirmar el efecto de la infección por *C. cassicola* sobre la acumulación de alcaloides, obteniéndose resultados similares; un aumento transitorio en el contenido de berberina, así como la aparición de sanguinarina como consecuencia de una lesión mecánica en una menor medida que la infección fúngica (**Fig. 4.4A**).

De este modo, se observa que, en las plantas de *A. mexicana* expuestas a los hongos ensayados, solamente la cepa infectiva de *C. cassicola* produjo cambios en los perfiles de alcaloides (**Tabla 4.1, Fig. 4.4B-C**).



**Figura 4.4.** Comparación del ensayo en hojas *in planta* a los 0, 2 y 8 dpi. Hojas utilizadas en el experimento (A), presencia de BE observado por CCF a los 2 y 8 dpi (B), presencia de SA (C). T0: Tiempo inicial, T-I: Testigo intacto, T+L: Testigo con daño mecánico.

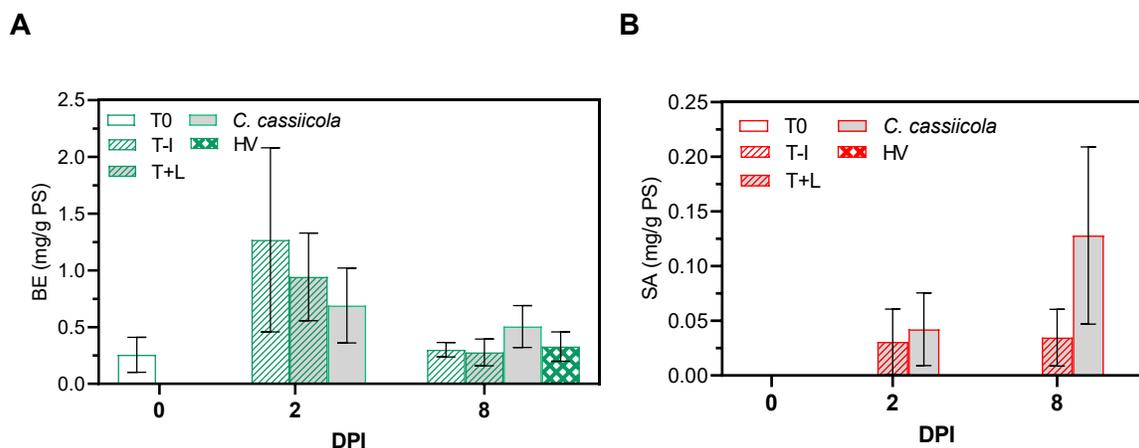
**Tabla 4.1.** Patrones de cromatografía de capa fina de extractos de hojas *in planta* de *A. mexicana* expuestas a diferentes especies de hongos.

Compuesto	Rf	Emisión*	T0	T-I	T+L	L. t	C.ca	F.s	C.cl	HV
<b>Sistema A</b>	A1	0.05	Azul pálido				X	X		
	A2	0.08	Azul intenso	X	X	X	X	X	X	
	A3	0.10	Azul intenso				X	X		
	A4	0.15	Azul pálido							
	A5	0.15	Amarillo			X	X	X	X	
	A6	0.17	Verde limón							
	A7	0.17	Azul intenso	X	X	X		X	X	
	A8	0.19	Verde limón				X	X	X	
	A9	0.20	Azul intenso				X			
	A10	0.25	Verde-azul (berberina)	X	X	X	X	X	X	X
	A11	0.19	Verde pálido							
<b>Sistema B</b>	B1	0.04	Violeta							
	B2	0.05	Azul				X			
	B3	0.15	Naranja (queleritina)							
	B4	0.19	Rubio-lino							
	B5	0.27	Naranja-rojizo (sanguinarina)				X	X		

	B6	0.35	Esmeralda							
	B7	0.48	Menta				X	X		
	B8	0.65	Amarillo intenso				X			

\*Color de la autofluorescencia emitida bajo radicación UV de 365 nm. T0: Tiempo inicial, T-I: Testigo intacto, T+L: Testigo con daño mecánico, LF: *L. theobromae*, C.ca: *C. cassicola*, FS: *F. solani*, CL: *C. cladosporioides*, HV: Hoja vecina.

No obstante, estos cambios fueron principalmente en la intensidad de las bandas con pocas modificaciones respecto a los posibles compuestos presentes. Por otro lado, los contenidos de berberina se modificaron de manera específica a la infección de manera transitoria, observándose un incremento temprano durante el proceso de infección que regresa a los niveles basales más tarde en el proceso (**Fig. 4.5A**). En cuanto a la sanguinarina, es notable su aparición en las hojas infectadas, ya que este alcaloide solamente ocurre en las partes subterráneas y semillas de las plantas maduras, aunque en etapas tempranas del desarrollo también se puede observar en los cotiledones (Xool-Tamayo et al., 2017). Es interesante observar que las lesiones por sí solas también resultaron en la presencia de este alcaloide, pero el contacto con el hongo produjo un efecto mayor y que éste fue en aumento en función del desarrollo del proceso infeccioso (**Fig. 4.5B**).



**Figura 4.5.** Contenido de berberina (A) y (B) sanguinarina en las hojas *in planta* de *A. mexicana* expuesto a *C. cassicola* durante 0, 2 y 8 dpi. La significancia entre muestras fue por la prueba Kruskal-Wallis/Dunn-Bonferroni ( $p < 0.05$ ). T0: Tiempo inicial, T-I: Testigo intacto, T+L: Testigo con daño mecánico, HV: Hoja vecina.

La presencia de la sanguinarina en las hojas infectadas podría obedecer tanto a un efecto localizado en el mismo tejido o a un efecto sistémico en el cual el alcaloide se transporte desde los tejidos subterráneos, en donde se acumula principalmente (Xool-Tamayo et al.,

2017; 2021). El transporte de alcaloides de las raíces a los tejidos aéreos en respuesta a la herbivoría ha sido descrito en plantas de tabaco y de senecio (Shitan et al., 2014) y recientemente se aisló un transportador tipo ABC-B con actividad para sanguinarina en plantas de *A. mexicana*. Si bien este transportador también opera para berberina y se expresa principalmente en semillas, también se puede observar tanto en tejidos aéreos y raíces (Loza-Müller et al., 2021).

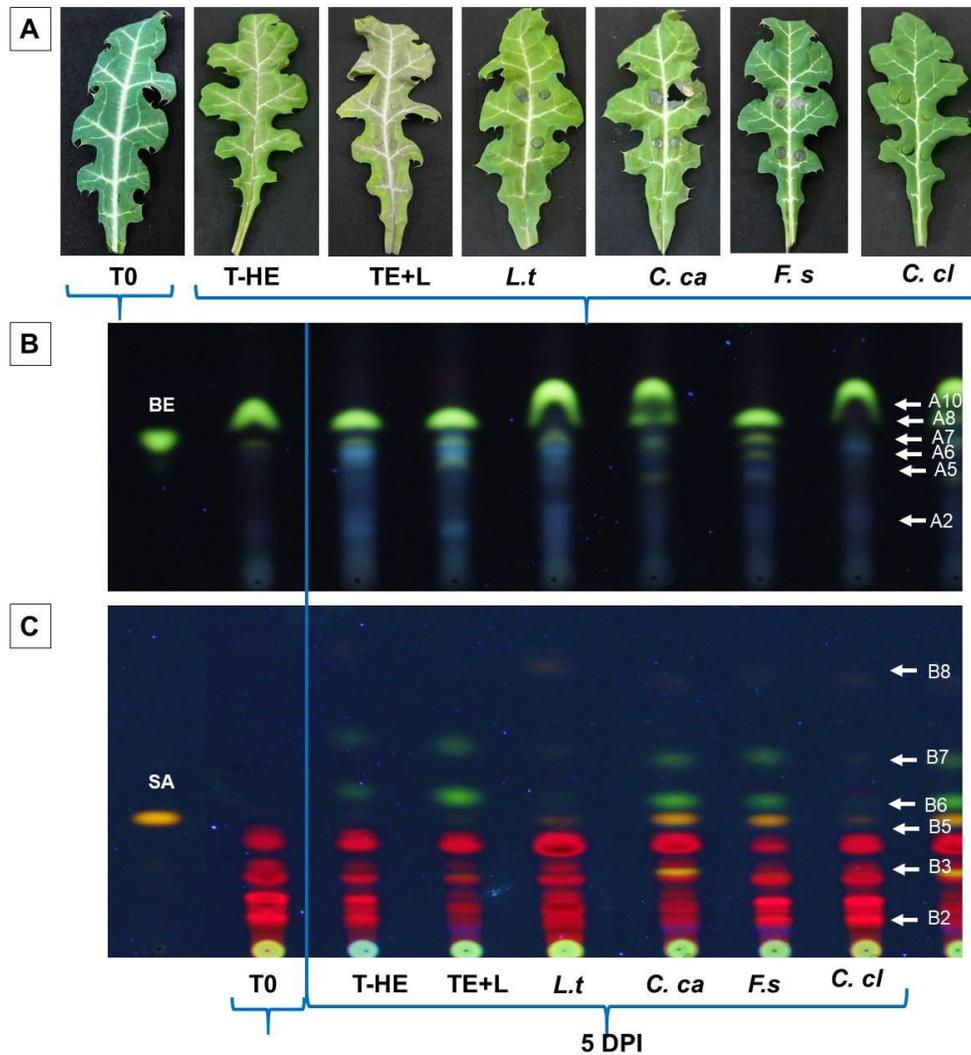
Por otro lado, en plantas maduras la sanguinarina se acumula en cantidades importante solamente en las raíces, aunque niveles trazas no cuantificables se pueden observar en hojas senescentes. No obstante, los transcritos biosintéticos pueden detectarse en cantidades importantes en hojas recién expandidas aun que éstas no acumulan el alcaloide. Esto sugiere que estos tejidos tienen el potencial biosintético necesario pero que se encuentra reprimido regularmente (Vázquez-Flota et al., 2018).

De este modo, y con el fin de establecer el origen de la sanguinarina en las hojas infectadas, se realizó una segunda serie de experimentos utilizando hojas escindidas, mantenidas en condiciones de cámara húmeda.

### **Experimentos *in vitro***

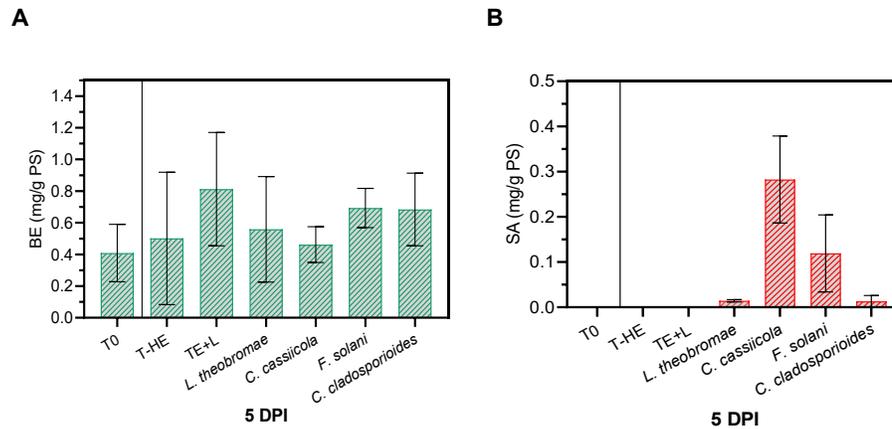
Previamente (Capítulo III) se desarrolló un sistema *in vitro* de infección controlada de hojas. En este sistema, hojas de plantas sanas se escinden y se mantienen en condiciones de cámara húmeda construidas en contenedores de polipropileno. Este sistema se utilizó para observar las respuestas locales de la hoja a la exposición a los diferentes hongos.

En un primer experimento, las hojas se expusieron a explantes de micelio (5 mm Ø) de *L. theobromae*, *C. cassiicola*, *F. solani* y el complejo *C. cladosporioides* durante cinco días. En general se observó una clorosis en todos los tratamientos aplicados, siendo más pronunciada en las zonas de contacto con los micelios en donde además se percibió el desarrollo de una ligera marchitez en las hojas expuestas al complejo *C. cladosporioides*, *F. solani* y *L. theobromae*. No obstante, la aparición de zonas necróticas sólo se pudo detectar en las hojas expuestas a *C. cassiicola* (**Fig. 4.6A**). Los perfiles cromatográficos mostraron algunas variaciones importantes respecto a los controles iniciales, tanto en las hojas dañadas, pero no expuestas, así como en las expuestas, dependiendo de la especie, pero éstas fueron principalmente en las intensidades de las bandas detectadas (**Fig. 4.6B-C**).



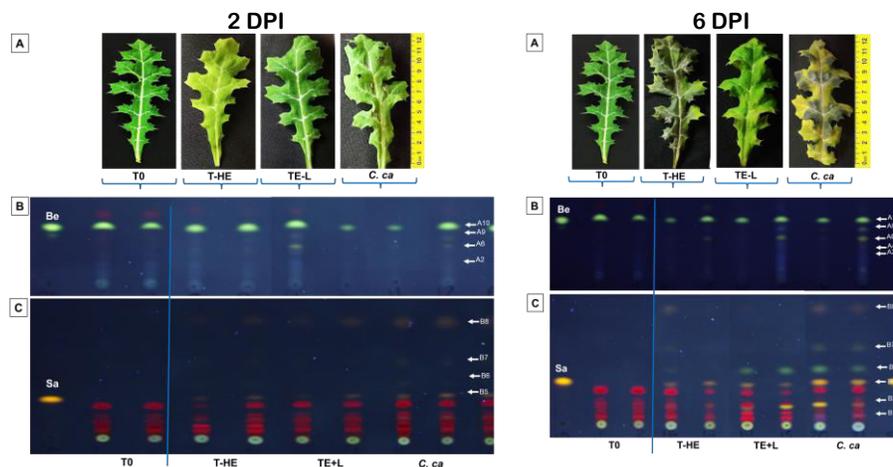
**Figura 4.6.** Contenido de berberina y sanguinarina en hojas *in vitro* de *A. mexicana* a los 5 DPI. Hojas tratadas con hongos (A), Acumulación de BE (B), acumulación de SA (C). DPI: días postinoculación. *T0*: Tiempo inicial, *T-HE*: Testigo hoja escindida, *TE+L*: Testigo escindido más daño mecánico. *L. t*: *L. theobromae*, *C. ca*: *C. cassiicola*, *F. s*: *F. solani*, *C. cl*: complejo *C. cladosporioides*.

Al cuantificar los alcaloides, se observó que la berberina no presentó variaciones significativas a lo largo del experimento respecto al valor inicial, ni como consecuencia del tiempo de incubación, ni en respuesta a los tratamientos (**Fig. 4.7A**). No obstante, y de nueva cuenta, la sanguinarina apareció en las hojas expuestas a los hongos. Si bien la mayor acumulación de sanguinarina ocurrió en las hojas tratadas con *C. cassiicola*, cantidades importantes se pudieron detectar en las expuestas a *F. solani* (**Fig. 4.7B**).

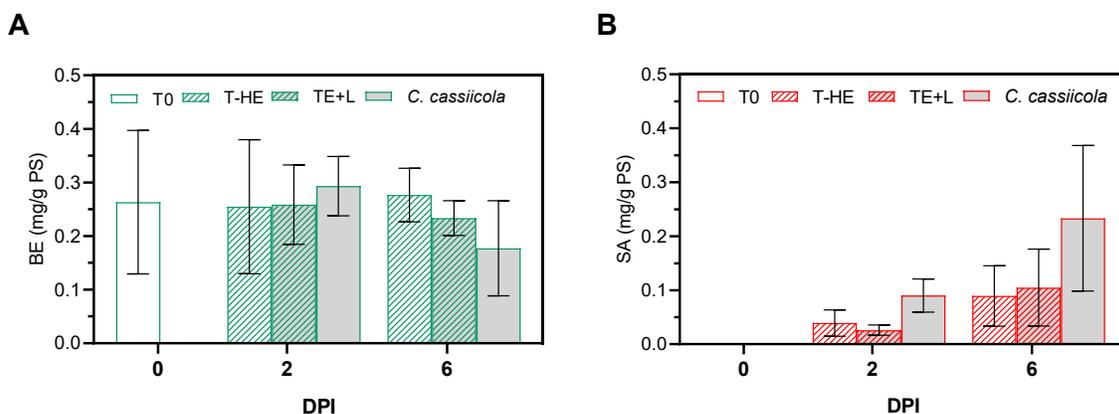


**Figura 4.7.** Representación gráfica de la acumulación de berberina (A) y sanguinarina (B) en hojas *in vitro* de *A. mexicana* expuestas a hongos aislados de la misma planta. T0: Tiempo inicial, T-HE: Testigo hoja escindida, TE+L: Testigo hoja escindido más daño mecánico. L. t: *Lasiodiplodia theobromae*. C. ca: *Corynespora cassicola*, F. s: *Fusarium solani*, C. cl: complejo *Cladosporium cladosporioides*. Los valores se representan como medias  $\pm$  desviación estándar.

En una repetición independiente, utilizando únicamente las cepas de *C. cassicola* e incluyendo un tiempo corto de exposición al hongo (dos días) se observaron resultados similares, tanto en la acumulación de berberina como de sanguinarina (**Fig. 4.8A-C**), si bien en este caso no se percibió la disminución en la acumulación de berberina en tiempos largos de exposición al hongo (**Fig. 4.9A**), como en los experimentos *in planta* y se detectó una acumulación de sanguinarina en respuesta a la escisión de la hoja y el daño mecánico (**Fig. 4.9B**).



**Figura 4.8.** Efecto de *C. cassicola* sobre hojas *in vitro* de *A. mexicana* en la inducción de ABI's. Estado de la interacción entre las hojas y el hongo al inicio y los 2 y 6 dpi (A). Cromatograma de BE (B) y Cromatograma de SA (C) observado bajo UV 254 nm (B). T0: Tiempo inicial, T-HE: Testigo hoja escindida, TE+L: Testigo hoja escindido más daño mecánico. C. ca: *Corynespora cassicola*.



**Figura 4.9.** Acumulación de ABI's en hojas *in vitro* de *A. mexicana* al inicio y 6 dpi. Berberina (A), Sanguinarina (B). 0: *Tiempo inicial*, T-HE: *Testigo hoja escindida*, TE+L: *Testigo hoja escindido más daño mecánico*. Los valores se representan como medias  $\pm$  desviación estándar.

#### 4.4. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios sobre la interacción planta-patógeno se han centrado en plantas modelo, sea por su utilidad económica como los patosistemas de *Brassica-Leptosphaeria maculans* (Pedras y Sorensen, 1998) y papa-*Pythium ultimum* (Tata et al., 2014), o su versatilidad y fácil manejo experimental como *Arabidopsis thaliana-Alternaria brassicicola* (Thomma et al., 1999), *Arabidopsis-Alternaria alternata* (Schuhegger et al., 2007). Sin embargo, la participación de los alcaloides no se ha considerado en este tipo de interacciones. Los alcaloides se encuentran en el 20% de las plantas superiores (Neelabh, 2019) y si bien algunos se consideran fitoalexinas, esto principalmente se debe a que son inducidos en cultivos celulares *in vitro* (Namdeo, 2007), con pocos ejemplos documentados de sus posibles efectos en plantas íntegras. La sanguinarina es uno de los alcaloides considerados como fitoalexinas debido a que es rápidamente acumulada en respuesta a diversos tratamientos que simulan un ataque patogénico en cultivos celulares de diferentes especies (Weiss et al., 2006), incluyendo *A. mexicana* (Trujillo-Villanueva et al., 2010; Guizar-González et al., 2012). Esta observación sugiere que la sanguinarina pudiera proporcionar una defensa química contra estos patógenos (Ali et al., 2019). La toxicidad de sanguinarina se basa principalmente en dos elementos estructurales; su comportamiento como cationes heteroaromáticos planares que se intercalan en el ADNbc, inhibiendo así tanto la transcripción como la replicación. Además, al presentar una carga positiva, se unen a superficies de membrana cargadas negativamente, y debido a su reactividad con compuestos sulfhidrilos (SH), inhiben una serie de enzimas citosólicas y de membrana, incluidas las Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasas y lipoxigenasas, e interactúan con proteínas del citoesqueleto,

principalmente tubulina (Weiss et al., 2006). De manera interesante, recientemente se observó que la infección fúngica indujo la acumulación de sanguinarina en hojas de *A. mexicana* (Hernández-Hernández, 2022), lo que sugiere su participación en la interacción en estas condiciones.

No obstante, esta planta crece de manera silvestre y no se disponen de metodologías establecidas para su mantenimiento en condiciones controladas, dificultando obtener respuestas homogéneas cuando se aplican diferentes estímulos. El aislamiento e identificación de diferentes especies de hongos asociados a lesiones necróticas foliares (Capítulo II), así como la identificación de los agentes infecciosos primarios (Capítulo III) permitió el desarrollo de métodos controlados de infección para el estudio de la posible participación de los alcaloides en interacción planta-hongo en un sistema específico; *A. mexicana-C. cassiicola*, ya que esta especie fue la única capaz de producir una lesión primaria e inducir cambios en los patrones de alcaloides en los tejidos infectados, de manera consistente.

De este modo, la exposición de hojas a diferentes especies de hongos aislados de los propios tejidos de esta planta confirmó las observaciones previas hechas en plantas silvestres infectadas de manera espontánea. En primer lugar, que las lesiones ocasionadas por el proceso infectivo producen cambios en los perfiles cromatográficos y que estos cambios ocurren de manera localizada. Solamente la cepa de *C. cassiicola* fue capaz de producir una infección primaria *in planta* (**Fig. 4.2**) y solamente en esta condición se detectaron cambios consistentes, tanto en los patrones cromatográficos, como en la acumulación de los principales alcaloides de esta planta; berberina y sanguinarina. La naturaleza localizada de esta respuesta fue ratificada en un sistema *in vitro* empleando hojas escindidas (**Fig. 4.9**), demostrando la capacidad de la hoja de producir sanguinarina, sin el aporte de tejidos externos. No obstante, no es posible descartar la participación de tejidos externos en esta respuesta ya que el principal sitio de síntesis de este alcaloide es la raíz en plantas maduras (Xool-Tamayo et al., 2017).

Es interesante notar que, la acumulación de berberina no mostró cambios notables en las condiciones de infección, si bien el daño mecánico aparentemente operó como un estímulo positivo para su acumulación en algunos casos (**Fig. 4.3 y 4.5**). En este sentido, se debe destacar que la sanguinarina, al igual que otras benzofenantridinas, presenta una mayor capacidad inhibitoria contra el crecimiento, tanto de *Candida albicans* como *Staphylococcus aureus* que la berberina. Considerando los valores de DL<sub>50</sub> registrados, la capacidad

inhibitoria de algunos de los alcaloides de *A. mexicana* se ordenaría de la siguiente manera; sanguinarina > queleritrina > quelirrubina > berberina (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013; Vázquez-Flota et al., 2018). Aunque la queleritrina se identificó como una banda amarillo limón con Rf 0.15 en los cromatogramas resueltos con el sistema B (Orozco-Nunnally, 2021; Hernández-Hernández, 2022), no pudo ser cuantificada ya que no se disponía del estándar para ello.

Los efectos transitorios en la acumulación de sanguinarina, observado tanto *in planta* como *in vitro* (Figs. 4.5B y 4.9B), coinciden con los observados en suspensiones celulares de *E. californica* expuestos a inductores de extracto de levadura. En estos cultivos, dicha respuesta transitoria estuvo relacionada con la conversión de la sanguinarina en otras bezofenantridinas, como queleritrina, macarpina, así como sus correspondientes formas dihidro (Collinge y Brodelius, 1989). Un buen número de transcritos correspondientes a las enzimas involucradas en las reacciones necesarias para estas transformaciones, como monooxigenasas dependientes del CytP<sub>450</sub>, O-metilasas y diferentes reductasas, han sido recientemente identificadas en plántulas de *A. mexicana* (Serrano-Gamboa et al., 2025), sugiriendo la operación de un mecanismo similar.

Es importante recalcar que las variaciones en la magnitud y patrones de las respuestas analizadas entre los diferentes experimentos son esperables, considerando que las plantas utilizadas provienen de la colecta de semillas de poblaciones silvestres, que no han estado sujetas a ningún tipo de selección y manejo. Además, los contenidos de alcaloides, al igual que para otros metabolitos secundarios son muy sensibles a las condiciones de medio ambiente.

De este modo, los resultados de estos experimentos constituyen un primer reporte de una respuesta a la infección fúngica que involucra la participación de alcaloides y que presenta elementos de especificidad, lo que abre perspectivas sobre los mecanismos necesarios para activar la síntesis de los alcaloides, los componentes moleculares necesarios para establecer la interacción entre ambos organismos y los aspectos para la eventual evasión de los hongos a la defensa química de la planta.

## CAPÍTULO V

### 5.1. DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo principal de este trabajo fue el análisis del metabolismo de los alcaloides en plantas de *Argemone mexicana* durante la interacción con hongos compatibles y no compatibles. Para ello, se planteó, en una primera etapa, aislar e identificar los hongos asociados a lesiones necróticas foliares en plantas silvestres, previamente descritas. Una vez logrado esto, fue necesario identificar el agente causal de las lesiones, para lo cual se requirió desarrollar un sistema de infección controlado que, además permitiera analizar los patrones de acumulación de alcaloides. Estos objetivos fueron cumplidos en su totalidad.

Se estima que los alcaloides se encuentran en cerca del 20% de las plantas superiores formando parte de los mecanismos de defensa química contra herbívoros y patógenos (Neelabh, 2019). El papel de los alcaloides como disuasivos contra insectos herbívoros se ha establecido de manera clara en varios casos, como la nicotina y pirrolizidina (Neelabh, 2019). Si bien algunos alcaloides se consideran fitoalexinas, ya que se sintetizan en respuesta a estímulos relacionados con proceso de infección patogénica, y presentan efectos antimicrobianos, esto se ha establecido principalmente en cultivos celulares *in vitro* (Asha y Prasad, 2017) y la participación de los alcaloides en el contexto *in planta* en la interacción con microorganismos no ha sido propiamente documentada.

Con este propósito, considerando que la sanguinarina es uno de los alcaloides incluidos entre la fitoalexinas (Weiss et al., 2006), y a partir de que se acumula en plantas de *A. mexicana* infectadas por hongos de manera espontánea (Hernández-Hernández, 2022), en este trabajo se procedió a aislar e identificar las especies de hongos asociados a las lesiones que producen, obtener cultivos axénicos de los mismos y determinar de entre ellos a los posibles agentes primarios (Capítulos II y III). Una vez identificados los agentes infectivos primarios, éstos fueron empleados en experimentos de infección controlada para caracterizar la respuesta relacionada con la acumulación de sanguinarina y otros cambios en los patrones de acumulación de alcaloides (Capítulo IV).

Si bien se han aislados diversas especies de hongos a partir de *A. mexicana* (Abdel-Hafez, 1986; Pollack y Matthews, 1976), no se ha establecido una relación clara entre estos hongos y el desarrollo de lesiones o la aparición de otros síntomas. Por ello, en la primera etapa de este trabajo se aislaron e identificaron diversas especies de hongos a partir de hojas

mostrando síntomas de una infección fúngica, como puntos y áreas necróticas. En total, en tres ejercicios diferentes se lograron obtener 16 cultivos axénicos que correspondieron a siete especies diferentes (Capítulo II). De éstas, ninguna había sido reportada previamente, aunque algunos miembros de los géneros *Cladosporium* y *Fusarium* ya se han identificado anteriormente. Otros hongos identificados previamente son *Cercosporidium guanicense*, *D. arundinacea*, *D. papuana* y *D. torulosa* (Pollack y Matthews, 1976), *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia ellisi*, *Phoma humicola*, *Ulocladium atrum*, *U. botrytis*, *Cephalosporidium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Rhizopus* (Abdel-Hafez, 1986).

En la segunda etapa, se estableció la identidad de los agentes infecciosos primarios mediante pruebas de patogenicidad y siguiendo los postulados de Koch (Capítulo III). Se ensayaron las cuatro especies identificadas en el primer ejercicio de aislamiento; *C. cassiicola*, el complejo *C. cladosporioides*, *F. solani* y *L. theobromae*, de éstas, solamente *C. cassiicola* produjo lesiones primarias por lo que es posible que las otras correspondan a especies oportunistas. La capacidad infectiva de *C. cassiicola* se observó tanto en hojas *in planta*, como en hojas escindidas en un sistema *in vitro*. Más aún, el reisolamiento de este hongo a partir de las lesiones primarias confirmó su naturaleza infectiva (Cap. III). Con ello, se logró el desarrollo de un sistema controlado de infección *A. mexicana*-*C. cassiicola*, siendo uno de los pocos disponibles para especies de plantas silvestres o no modelo. La disponibilidad de este modelo representa una herramienta valiosa para la realización de estudios sobre la interacción planta-hongo de manera controlada en una especie que no sólo es diferente a los modelos tradicionales, sino que corresponde a una planta productora de alcaloides. Por ello, en la tercera etapa, el mismo modelo de infección controlada, tanto *in planta* como *in vitro* se utilizó para analizar las modificaciones en los perfiles de alcaloides (Cap. IV). De nuevo se probaron las cepas de *C. cassiicola*, el complejo *C. cladosporioides*, *F. solani* y *L. theobromae* aisladas en el primer ejercicio. De manera consistente, solamente *C. cassiicola* produjo las lesiones típicas de un proceso infectivo, tanto *in planta* como *in vitro* siendo además el único caso en el que se observó la acumulación de sanguinarina en las hojas (Cap. IV). Si bien las magnitudes de la respuesta fueron variables entre los diferentes experimentos, la presencia de sanguinarina en las hojas fue una respuesta consistente en distintas repeticiones independientes. No se observaron variaciones en los perfiles de alcaloides en hojas vecinas (sistémicas) a las hojas infectadas ni en raíces o tallos, sugiriendo un efecto localizado. Esto es de resaltar, ya que la sanguinarina no se acumula normalmente en los tejidos aéreos de plantas maduras y su principal sitio de síntesis y acumulación corresponde a las raíces, a pesar de que los transcritos

correspondientes a las enzimas involucradas en la formación de este alcaloide se pueden detectar en niveles considerables en las hojas (Vázquez-Flota et al., 2018). Este tipo de distribución sugiere que este tejido posee el potencial sintético necesario para la sanguinarina y la posible existencia de mecanismos de control post transcripcionales (Vázquez-Flota et al., 2018; Serrano-Gamboa et al., 2025). Este tipo de efecto no se observó sobre la acumulación de berberina, el otro alcaloide mayoritario en esta planta, lo que apoya la posibilidad de un efecto específico sobre la biosíntesis y/o acumulación de sanguinarina a la infección de *C. cassicola*. Aunque la acumulación de sanguinarina como respuesta a la infección de este hongo presentó elementos de una respuesta local, ya también ocurrió en hojas escindidas, no se puede descartar el aporte de otros tejidos distantes, considerando la existencia de mecanismos de transporte a larga distancia para los alcaloides en *A. mexicana* (Loza-Muller et al., 2021).

Los alcaloides de *A. mexicana* pertenecen al grupo de los bencilisoquinolínicos, muchos de los cuales tienen propiedades farmacológicas. En particular, la sanguinarina y la berberina tienen diversos efectos, incluyendo actividades antimicrobianas y citotóxicas (Hagel y Facchini, 2013). Estos efectos principalmente se han documentado en un contexto diferente a la función que puedan tener en la planta, sin embargo, sugieren que ambos alcaloides pueden cumplir esas tareas. Más aún, en cultivos *in vitro*, tanto la sanguinarina como la berberina se acumulan en respuesta a diferentes tratamientos de inducción (Dittrich y Kutchan, 1991). La acumulación inducible de alcaloides representa una estrategia eficaz para proteger los tejidos de los patógenos, siempre y cuando los contenidos alcancen niveles no tóxicos. La protección provista por los alcaloides justificaría el costo energético de su formación que equilibraría los costos de este proceso (Angelova et al., 2010). El trasfondo de la inducción de la biosíntesis de alcaloides en respuesta a la infección por patógenos se ha investigado raramente en plantas y tejidos de plantas no modelos.

Recientemente, la accesibilidad de las metodologías masivas, como la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica ha acelerado el descubrimiento de nuevos genes relacionados con el metabolismo secundario, incluyendo de los ABI's (Hagel y Facchini, 2013). Como metabolitos secundarios, los ABI's no parecen esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, sin embargo, podrían desempeñar un papel clave en la defensa de las plantas contra herbívoros y patógenos. Irónicamente, se sabe mucho más sobre la farmacología de los ABI's y se han dedicado relativamente pocos estudios a determinar sus funciones ecofisiológicas y metabólicas en la interacción planta-patógeno.

## 5.2. CONCLUSIONES GENERALES

Como conclusiones de este trabajo se pueden mencionar las siguientes:

Se estableció un cepario con 16 cultivos axénicos de hongos aislados de hojas de *A. mexicana*. cinco especies y dos complejos fueron identificadas en total; *C. cassiicola*, *F. solani*, *L. theobromae*, *N. clavispورا*, *T. harzianum*, así como los complejos *C. cladosporioides* y *Fusarium incarnatum-equiseti*. Entre ellos, *L. theobromae* y el complejo *C. cladosporioides* y se aislaron en tres ocasiones diferentes y ambos estuvieron asociados tanto a lesiones leves y avanzadas. Las demás cepas se aislaron en una sola ocasión y, de éstas, *C. cassiicola*, *F. solani* provinieron de hojas con síntomas leves, mientras que el complejo *Fusarium incarnatum-equiseti*, *N. clavispورا* y *T. harzianum* de los síntomas avanzados. De todas las especies identificadas, solamente *C. cassiicola* (Dixon et al., 2009) y *F. solani* (Leslie y Summerell, 2006) se consideran como patógenos pudiendo colonizar tejidos de plantas sanas. Aunque se establecieron cinco cultivos axénicos a partir de aislamientos adicionales, dos de estos (Am2023-12 y -14) no pudieron ser caracterizados y tres de ellos se identificaron putativamente como miembros del género *Fusarium* (Am23-13) y *Diaporthe* (Am23-15, -16) únicamente por patrones morfológicos.

Se realizaron pruebas de patogenicidad siguiendo los postulados de Koch para cinco de las especies identificadas; *C. cassiicola*, el complejo *C. cladosporioides*, *L. theobromae*, *F. solani*, y *N. clavispورا*. Las primeras tres se ensayaron utilizando discos de micelio y suspensiones de conidios, mientras que *F. solani* y *N. clavispورا* solamente se ensayaron como discos de micelio y suspensiones de conidios, respectivamente. Solamente *C. cassiicola* fue capaz de producir lesiones primarias de manera consistente, tanto en los ensayos con discos de micelio como con las suspensiones de conidios. No obstante, en los ensayos *in vitro* se observaron zonas cloróticas y con un ligero marchitamiento alrededor de las zonas de contacto al micelio, pero no con la suspensión de conidios, de *L. theobromae* y *F. solani*. De este modo, de las especies ensayadas, solamente *C. cassiicola* y *N. clavispورا* se pueden considerar patógenos primarios.

La colonización exitosa de hongos patógenos a las hojas de *A. mexicana* induce la acumulación de sanguinarina, de manera significativa. Este efecto no se observó para la acumulación de la berberina, que sí mostró ser sensible al daño mecánico. Los efectos de la interacción positiva entre *C. cassiicola* y *A. mexicana* presentan elementos de especificidad y, si bien se observó un efecto positivo al daño mecánico, la presencia del

hongo es necesaria para aumentar la respuesta. Adicionalmente, esta respuesta puede ocurrir completamente de manera local, ya que las hojas aisladas y expuestas al hongo son capaces de acumular el alcaloide, si bien no puede descartarse el aporte de tejidos externos.

De este modo, este trabajo representa uno de los primeros en establecer un modelo para la caracterización del posible papel de los alcaloides en la interacción planta-patógeno.

### **5.3. PERSPECTIVAS**

El establecimiento de un patosistema *A. mexicana-C. cassiicola* representa un modelo conveniente para profundizar en el estudio del posible papel de los alcaloides en la interacción planta-hongo.

La disponibilidad de este sistema permitirá identificar los genes claves, tanto para activación del proceso de biosíntesis de los alcaloides, así como los pasos que controlan y limitan la acumulación de la sanguinarina en los tejidos aéreos.

Por otra parte, los componente y eventos requeridos para la señalización bioquímica que permite percibir la presencia del hongo por la planta pueden ser analizados con el fin de identificar los posibles efectores fúngicos y los receptores con los que interactúan durante el proceso de colonización.

Adicionalmente, si bien la acumulación de sanguinarina puede ocurrir de manera localizada en las hojas infectadas, ésta podría tener diferentes orígenes, desde síntesis de novo a partir de los compuestos primarios, la redirección de intermediarios comunes para la formación de berberina u otros alcaloides presentes en la hoja, o el transporte de tejidos distantes. Existe evidencia que apoya, en diferente medida estas tres posibilidades ya que se han detectado algunos de los transcritos involucrados en la biosíntesis de sanguinarina en los tejidos aéreos, así como de enzimas bifuncionales que pueden participar en la síntesis de ambos alcaloides (Vázquez-Flota et al., 2018). También se tiene evidencia de un activo proceso de transporte de alcaloides en esta planta (Loza-Muller et al., 2021).

Finalmente, resta por establecer la identidad de las cepas aisladas restantes, así como la capacidad infectiva de las demás especies identificadas. En este aspecto, la exposición de tejidos infectados con *C. cassiicola* a alguna de las especies catalogadas como oportunistas podría potenciar los efectos sobre la sanguinarina, o bien, alterar los patrones cualitativos de alcaloides.

La disponibilidad de las herramientas metodológicas generadas en este trabajo permitirá abordar estos temas en una planta no domesticada ni sometida a manejo agrícola, lo que podría representar una situación más apegada a la respuesta elemental de las plantas al reto por patógenos en condiciones naturales.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- AbdElfatah, H. A. S., Sallam, N. M., Mohamed, M. S., & Bagy, H. M. K. (2021). *Curvularia lunata* as new causal pathogen of tomato early blight disease in Egypt. *Molecular Biology Reports*, 48, 3001-3006.
- Abdel-Hafez, S. I. I. (1986). Leaf surface fungi of *Argemone mexicana* growing in Saudi Arabia. *Cryptogamie, Mycologie*, 6(1), 69-78.
- Abraham, W. R., Knoch, I. & Witte, L. (1990). Biosynthesis of the terpenoid polyketide fusalanipyrone. *Phytochemistry*, 29: 2877-2878.
- Aguirre-Becerra, H., Vázquez-Hernández, M. C., Saenz de la O, D., Alvarado-Mariana, A., Guevara-González, R. G., García-Trejo, J. J., & Feregrino-Pérez, A. A. (2021). Role of Stress and Defense in Plant Secondary Metabolites Production. *Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications*, 151-195.
- Alagesaboopathi, C. (2009). Ethnomedicinal plants and their utilization by villagers in Kumaragiri hills of Salem district of Tamilnadu, India. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 6(3). 222-227.
- Alemán, F. (2001). Common bean response to tillage intensity and weed control strategies. *Agronomy Journal*, 93 (3): 556-563.
- Alemayehu, K., & Desalegn, T. (2016). Antibiotic effects of *Argemone mexicana* (Papaveraceae) against field crops and pathogens causing mastitis in dairy cattle in three districts of Amhara region Ethiopia. *Journal Adv Biol Biotech*, 5(1), 1-9.
- Ali, A. H., Abdelrahman, M., & El-Sayed, M. A. (2019). Alkaloid role in plant defense response to growth and stress. *Bioactive Molecules in Plant defense: Signaling in Growth and Stress*, 145-158.
- Angelova, S., Buchheim, M., Frowitter, D., Schierhorn, A., & Roos, W. (2010). Overproduction of alkaloid phytoalexins in *California poppy* cells is associated with the co-expression of biosynthetic and stress-protective enzymes. *Molecular Plant*, 3(5), 927-939.
- Awad-Allah, E. F., Shams, A. H., Helaly, A. A., & Ragheb, E. I. (2022). Effective applications of *Trichoderma* spp. as biofertilizers and biocontrol agents mitigate tomato *Fusarium* wilt disease. *Agriculture*, 12(11), 1950.

- Bacon, C. W., Porter, J. K., Norred, W. P. & Leslie, J. F. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4039-4043.
- Bailey, B. A., Apel-Birkhold, P. C., O'Neill, N. R., Plaskowitz, J., Alavi, S., Jennings, J. C., & Anderson, J. A. (2000). Evaluation of infection processes and resulting disease caused by *Dendryphion penicillatum* and *Pleospora papaveracea* on *Papaver somniferum*. *Phytopathology*, 90(7), 699-709.
- Barthe, P., Pujade-Renaud, V., Breton, F., Gargani, D., Thai, R., Roumestand, C., & De Lamotte, F. (2007). Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. *Journal of Molecular Biology*, 367(1), 89-101.
- Beaudoin, G. A., & Facchini, P. J. (2014). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, 240, 19-32.
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2012). The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, 72, 1-401. DOI: 10.3114/sim0003.
- Bertetti, D., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2018). Susceptibility of some Papaveraceae plants to *Fusarium oxysporum* f. sp. *papaveris*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 125, 103-108.
- Bhunjun, C. S., Phillips, A. J., Jayawardena, R. S., Promputtha, I., & Hyde, K. D. (2021). Importance of molecular data to identify fungal plant pathogens and guidelines for pathogenicity testing based on Koch's postulates. *Pathogens*, 10(9), 1096.
- Biju, C. N., Peeran, M. F., & Gowri, R. (2018). Identification and characterization of *Neopestalotiopsis clavispora* associated with leaf blight of small cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). *Journal of Phytopathology*, 166(7-8), 532-546.
- Blazquez, C. H. (1972). Target spot of tomato. *Plant Disease Reporter*, 56(3), 243-245.
- Bolay, A., Braun, U., Takamatsu, S., Clerc, P., & Götz, M. (2021). New species, new records and first sequence data of powdery mildews (*Erysiphaceae*) from Europe with special emphasis on Switzerland. *Austrian Journal Mycol*, 28, 131-160.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 379-406.

- Bonardi, V., & Dangl, J. L. (2012). How complex are intracellular immune receptor signaling complexes?. *Frontiers in Plant Science*, 3, 237.
- Bosch, C. H. (2007). *Argemone mexicana* L. Record from Protabase. Schmelzer, G. H; Gurib-Fakim, A. PROTA (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands.
- Bozzola, J. J.; & Russell, D. L. 2004. Electron Microscopy. Principles and techniques for biologists. *Jones and Bartlett Publishers*, pp. 16-63, 332-356.
- Brauna-Morževska, E., Stoddard, F. L., Bankina, B., Kaņeps, J., Bimšteine, G., Petrova, I., Neusa-Luca, I., Roga, A., & Fridmanis, D. (2023). Evaluation of pathogenicity of *Botrytis* species isolated from different legumes. *Frontiers in plant science*, 14, 1069126.
- CABI. (2021). *Argemone mexicana* Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/6878>. [Acceso 01 de enero 2021].
- Camacho-Tapia, M., Sánchez-Soto, V., Correia, K. C., Pastirčáková, K., & Tovar-Pedraza, J. M. (2018). Powdery mildew of California poppy caused by *Erysiphe eschscholziae* in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(3), 461-466.
- Chelkowski, J., Zawadzki, M., Zajkowski, P., Logrieco, A. & Bottalico, A. (1990). Moniliformin production by *Fusarium* species. *Mycotoxin Research* 6: 41-45.
- Chethana, K. T., Jayawardena, R. S., Chen, Y. J., Konta, S., Tibpromma, S., Abeywickrama, P. D., Gomdola, D., Balasuriya, A., Xu, J., Lumyong, M., & Hyde K. D. (2021). Diversity and function of appressoria. *Pathogens*, 10(6), 746.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803-814.
- Chitra, K. C., Rao, S. J., & Rao, P. K. (1997). Efficacy of plant extracts for controlling cotton aphid (*Aphis gossypii*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 67(3), 134-135.
- Cline, S. D., & Coscia, C. J. (1988). Stimulation of sanguinarine production by combined fungal elicitation and hormonal deprivation in cell suspension cultures of *Papaver bracteatum*. *Plant Physiology*, 86(1), 161-165.

- Coll, N. S., Epple, P., & Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation*, 18(8), 1247-1256.
- Collinge, M. A., & Brodelius, P. E. (1989). Dynamics of benzophenanthridine alkaloid production in suspension cultures of *Eschscholtzia californica* after treatment with a yeast elicitor. *Phytochemistry*, 28(4), 1101-1104.
- Conrath, U. (2006). Systemic acquired resistance. *Plant signaling & behavior*, 1(4), 179-184.
- Daengsuwan, W., Wonglom, P., & Sunpapao, A. (2020). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing spadix rot in *Anthurium andraeanum*. *Journal of Phytopathology*, 168(2), 129-133.
- Das, S., & Sukul, N. C. (1988). Nematicidal effect of the oil from the seeds of *Argemone mexicana*. *Environment and Ecology*, 6(1), 194-197.
- DeFilipps, R. A., Maina, S. L., & Crepin, J. (2004). Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana). Washington, DC: Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. 215-224.
- Delgado-Cerrone, L., Mondino-Hintz, P., & Alaniz-Ferro, S. (2016). *Botryosphaeriaceae* species associated with stem canker, die-back and fruit rot on apple in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*. 146(3):637–655.
- Dey, N., Das, K., & Rai, Y. (2008). *Argemone mexicana*: A multicentric double blind Homoeopathic Pathogenetic Trial (Drug Proving) carried out by CCRH. *Indian Journal of Research in Homoeopathy*, 2(1), 13-18.
- Dittrich, H., & Kutchan, T. M. (1991). Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(22), 9969-9973.
- Dixon, L. J., Schlub, R. L., Pernezny, K., & Datnoff, L. E. (2009). Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, 99(9), 1015-1027. DOI: 10.1094/PHYTO-99-9-1015.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-847.

- Duan, L. I., Liwei, G., & Hong, Y. (2009). Isolation and identification of producing endophytic fungi of berberine from the plant *Phellodendron amurense*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 22(007).
- Eilert, U., Kurz, W., & Constabel, F. (1985). Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. *Journal of Plant Physiology*, 119(1), 65-76.
- El-Dawy, E. G. A. E. M., Gherbawy, Y. A., & Hussein, M. A. (2021). Morphological, molecular characterization, plant pathogenicity and biocontrol of *Cladosporium* complex groups associated with faba beans. *Scientific Reports*, 11(1), 14183.
- Evans, W. C., 2009. Alkaloids in pharmacopoeial and related drugs of biological origin. Trease and Evans Pharmacognosy. *Elsevier*, pp. 353-415.
- Facchini, P. J., & De Luca, V. (2008). Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *The Plant Journal*, 54(4), 763-784.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Gardenia net. (2021). <https://www.gardenia.net/plant/argemone-mexicana>
- Gerardo-Lugo, S. S., Tovar-Pedraza, J. M., Maharachchikumbura, S. S., Apodaca-Sánchez, M. A., Correia, K. C., Saucedo-Acosta, C. P., Camacho-Tapia, Hyde, M., K. D., Marraiki, N., Elgorban, A. M., & Beltrán-Peña, H. (2020). Characterization of *Neopestalotiopsis* species associated with mango grey leaf spot disease in Sinaloa, Mexico. *Pathogens*, 9(10), 788.
- Ghasemi-Sardareh, R., & Mohammadi, H. (2020). Characterization and pathogenicity of fungal trunk pathogens associated with declining of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) trees in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 102(4), 1159-1171.
- Giraldo, M. C., & Valent, B. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 800-814.
- Graz, B., Willcox, M. L., Diakite, C., Falquet, J., Dackuo, F., Sidibe, O., Giani, S., & Diallo, D. (2010). *Argemone mexicana* decoction versus artesunate-amodiaquine for the

- management of malaria in Mali: policy and public-health implications. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(1), 33-41.
- Guízar-González, C., Trujillo-Villanueva, K., Monforte-González, M., & Vázquez-Flota, F. (2012). Sanguinarine and dihydrosanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* (L) cell suspension cultures exposed to yeast extract. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(1), 19-22.
- Gurjar, G., & Kanade, M. (2020). Analysis of phytopathogenic fungi isolated from some important crop plants using morpho-molecular tools-Foldscope and ITS region sequencing. *Mycological Progress*, 19(12), 1475-1493.
- Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2013). Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, 54(5), 647-672.
- Hahn, M. G., & Albersheim, P. (1978). Host-pathogen interactions: XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. *Plant Physiology*, 62(1), 107-111.
- Hami, A., Rasool, R. S., Khan, N. A., Mansoor, S., Mir, M. A., Ahmed, N., & Masoodi, K. Z. (2021). Morpho-molecular identification and first report of *Fusarium equiseti* in causing chilli wilt from Kashmir (Northern Himalayas). *Scientific Reports*, 11(1), 3610.
- Han, Y., Xiang, Y., Shi, Y., Tang, X., Pan, L., Gao, J., Bi, R., & Lai, X. (2021). Pharmacokinetics and pharmacological activities of berberine in diabetes mellitus treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021(1), 9987097.
- Hanelt, P. (2017). Mansfeld's World Database of Agricultural and Horticultural Crops. Mansfeld's World Database of Agricultural and Horticultural Crops. <http://mansfeld.ipkgatersleben.de/apex/f?p=185:3:0::NO> [Acceso 01 de enero 2021].
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56.
- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum*, 5(4), 5-4.

- He, P., Shan, L., Lin, N. C., Martin, G. B., Kemmerling, B., Nürnberger, T., & Sheen, J. (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell*, 125(3), 563-575.
- Heinstein, P. F. (1985). Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cell suspension cultures. *Journal of Natural Products*, 48(1), 1-9.
- Hernández-Hernández, E. A. (2022). Análisis de la acumulación de alcaloides em *Argemone mexicana* L. en condición de estrés biótico. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México. pp. 153.
- Holm, L. G., Plucknett, D. L., Pancho, J. V., & Herberg, J. P. (1991). The world's worst weeds. Distribution and biology. *Systematics and Geography of Plants*, 223-236.
- Holm, L. G., Plucknett, D.L., Pancho, J. V., & Herberger, J. P. (1977). The world's worst weeds. Distribution and biology. University press of Hawaii.
- Hou, D., Lian, T., Guo, G., Gong, H., Wu, C., Han, P., Wu, G., Han, P., Weng, S., & He, J. (2023). Integration of microbiome and Koch's postulates to reveal multiple bacterial pathogens of whitish muscle syndrome in mud crab, *Scylla paramamosain*. *Microbiome*, 11(1), 155.
- Houbraken, J., Visagie, C. M., & Frisvad, J. C. (2021). Recommendations to prevent taxonomic misidentification of genome-sequenced fungal strains. *Microbiology Resource Announcements*, 10(48), e01074-20.
- Huang, P., Sun, M., & Zeng, J. (2020). Low-molecular compounds of latex-bearing plants and their biosynthesis. *Advances in Botanical Research*, 93, 99-118.
- Huda-Shakirah, A. R., Mohamed Nor, N. M. I., Zakaria, L., Leong, Y. H., & Mohd, M. H. (2022). *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. *Scientific Reports*, 12(1), 8966.
- Idris, M. A., Sadiq, S. B., Abubakar, A. W., Kutama, A. S., Sufi, D. A., & Shuaibu, T. (2017). Isolation and identification of Phytopathogenic fungi responsible for Kolanuts (*Kola acuminata*) rot in Jimeta modern market, Yola Adamawa state Nigeria. *International Journal of Applied Research*, 3(3), 272-274.
- Islam, M., Ruhul-Amin, A. S. M., & Sarker, S. K. (2003). Bangladesh. In: Pallewatta N, Reaser JK, Gutierrez AT. eds. Invasive alien species in South-Southeast Asia:

- national reports & directory of resources. Cape Town: *Global Invasive Species Programme*, 7-20.
- Jain, N., Bhargava, A., Pareek, V., Sayeed Akhtar, M., & Panwar, J. (2017). Does seed size and surface anatomy play role in combating phytotoxicity of nanoparticles?. *Ecotoxicology*, *26*, 238-249.
- Johnson, F. A. (1997). Role of Extension in Row-crop IPM. University of Florida Cooperative Extension Service, *Institute of Food and Agriculture Sciences*, EDIS.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323-329.
- Karikari, S. K., Bagai, C., & Segwagwe, A. (2000). Allelopathic activity of five Botswana weed species on *Bambara groundnut* [*Vigna subterranea* (L.) Verdc] and sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Crop Research* (Hisar), *20*(3):397-406.
- Karlsson, L. M., Tamado, T., & Milberg, P. E. R. (2003). Seed dormancy pattern of the annuals *Argemone ochroleuca* and *A. mexicana* (Papaveraceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, *198*(4), 329-339.
- Keevan, J., MacKenzie, L. G. S., Katia V. X., & Gary, E. V. (2018). A review of *Corynespora cassiicola* and its increasing relevance to tomato in Florida. *Plant Health Progress*, *19*(4), 303-309.
- Khuna, S., Kumla, J., Thitla, T., Nuangmek, W., Lumyong, S., & Suwannarach, N. (2022). Morphology, molecular identification, and pathogenicity of two novel *Fusarium* species associated with postharvest fruit rot of cucurbits in northern Thailand. *Journal of Fungi*, *8*(11), 1135.
- Kolmer, J. A. (2005). Tracking wheat rust on a continental scale. *Current Opinion in Plant Biology*, *8*(4), 441-449.
- Kumar, A., Sharma, D., Tiwari, A., Jaiswal, J. P., Singh, N. K., & Sood, S. (2016). Genotyping-by-sequencing analysis for determining population structure of finger millet germplasm of diverse origins. *The Plant Genome*, *9*(2), plantgenome2015-07.
- Kwon, H. J., Shin, S. L., Kim, Y. R., & Kim, S. Y. (2020). Effects of temperature, gibberellic acid, and KNO<sub>3</sub> treatments on seed germination of the wild plant *Maesa japonica*. *Seed Science and Technology*, *48*(1), 65-72.

- LaFleur, M., & Gould, L. (2009). Feeding outside the forest: the importance of crop raiding and an invasive weed in the diet of gallery forest ring-tailed lemurs (*Lemur catta*) following a cyclone at the Beza Mahafaly Special Reserve, Madagascar. *Folia Primatologica*, 80(3), 233-246.
- Laines-Hidalgo, J. I., Muñoz-Sánchez, J. A., Loza-Müller, L., & Vázquez-Flota, F. (2022). An update of the sanguinarine and benzophenanthridine alkaloids' biosynthesis and their applications. *Molecules*, 27(4), 1378.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. Tygerberg, South Africa: W.F.O. Marasas, Pomec Unit, Medical Research Council. P. 250. DOI: 10.1002/9780470278376.
- Leyva-Mir, S. G., Vega-Portillo, H. E., Villaseñor-Mir, H. E., Tlapal-Bolaños, B., Vargas-Hernández, M., Camacho-Tapia, M., & Tovar-Pedraza, J. M. (2017). Characterization of *Fusarium* species causing root rot of wheat in the Bajío, Mexico. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 33(2), 142-151.
- Loza-Muller, L., Shitan, N., Yamada, Y., & Vázquez-Flota, F. (2021). AmABCB1, an alkaloid transporter from seeds of *Argemone mexicana* L (Papaveraceae). *Planta*, 254(6), 122.
- Ma, M., de Silva, D. D., & Taylor, P. W. (2020). Black mould of post-harvest tomato (*Solanum lycopersicum*) caused by *Cladosporium cladosporioides* in Australia. *Australasian Plant Disease Notes*, 15, 1-4.
- Mahadevakumar, S., & Sridhar, K. R. (2021). Diversity of Pathogenic Fungi in Agricultural Crops. *Soil and Microbes in Tropical Ecosystems*, 101-149.
- Mahapatra, S., Banerjee, J., Kumar, K., Pramanik, S., Pramanik, K., Islam, S., & Das, S. (2018). Leaf spot and fruit rot of strawberry caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Indo-Gangetic plains of India. *Indian Phytopathology*, 71, 279-283.
- Manoharachary, C., & Deshaboina, N. (2021). Biodiversity, taxonomy and plant disease diagnostics of plant pathogenic fungi from India. *Indian Phytopathology*, 74, 413–423.

- Martín-Cacheda, L., Röder, G., & Abdala-Roberts, L. (2024). Test of Specificity in Signalling between Potato Plants in Response to Infection by *Fusarium Solani* and *Phytophthora Infestans*. *Journal of Chemical Ecology*. 1-11.
- Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 1220 p.
- Martínez, O. E. (1982). Flora de Veracruz, Papaveraceae, Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México. fascículo 22, pp.
- Mas, D., Martínez, Y., Bullaín, M., Betancur, C., & Ruiz, C. (2018). Secondary metabolites and *in vitro* antimicrobial activity of roots of Cuban *Argemone mexicana* Linn. *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 4(6), 46-51.
- Matsuura, H.N., & Fett-Neto A.G. (2017). Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. *Plant Toxins*. 2(7) 1-15.
- Melendez, P. A., & Capriles, V. A. (2002). Molluscicidal activity of plants from Puerto Rico. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 96(2), 209-218.
- Mishra, S., Triptahi, V., Singh, S., Phukan, U. J., Gupta, M. M., Shanker, K., & Shukla, R. K. (2013). Wound induced transcriptional regulation of benzylisoquinoline pathway and characterization of wound inducible PsWRKY transcription factor from *Papaver somniferum*. *PLoS One*, 8(1), e52784.
- Monforte-González, M., Serrano-Gamboa, J. G., Guízar-González, C., Miranda Ham, M. L., & Vázquez-Flota, F. A. (2019). Alkaloid synthesis is coupled to shoot morphogenesis in *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) *in vitro* cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(6), 695-701.
- Morishige, T., Tamakoshi, M., Takemura, T., & Sato, F. (2010). Molecular characterization of O-methyltransferases involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 86(7), 757-768.
- Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., & Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. *Journal of Experimental Botany*, 59(3), 501-520.

- Nabor-Romero, O., Silva-Valenzuela, M., Rojas-Martínez, R. I., & Garza-García, R. (2018). First report of *Cladosporium cladosporioides*, a fungus that causes rot in zapote mante fruits in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(2), 356-362.
- Neelabh. (2019). Alkaloid. In: Vonk, J., Shackelford, T. (eds) *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer, Cham.
- Nam, M. H., Park, M. S., Kim, H. S., Kim, T. I., & Kim, H. G. (2015). *Cladosporium cladosporioides* and *C. tenuissimum* cause blossom blight in strawberry in Korea. *Mycobiology*, 43(3), 354-359.
- Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 69-79.
- Narayani, M., & Srivastava, S. (2017). Elicitation: a stimulation of stress *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry Reviews*, 16(6), 1227-1252.
- Nieto-Angel, D., Almaraz-Sánchez, A., Ayala-Escobar, V., Orozco-Santos, M., & Lara-Viveros, F. M. (2019). Primer reporte de *Colletotrichum coccodes* en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(3), 195-200.
- Ogo-Oluwa, A. & Liamngee, K. (2016). "Evaluation of bitter leaf (*Vernonia amygdalina*) extract in the inhibition of fungi causing post-harvest rot of tomato fruits in Makurdi, Benue State, Nigeria", *Der Pharmacia Lettre*, 3(11), pp. 69-73.
- O'Neill, N. R., Jennings, J. C., Bailey, B. A., & Farr, D. F. (2000). *Dendryphion penicillatum* and *Pleospora papaveracea*, destructive seedborne pathogens and potential mycoherbicides for *Papaver somniferum*. *Phytopathology*, 90(7), 691-698.
- Orozco-Nunnally, D. A., Pruet, J., Rios-Ibarra, C. P., Bocangel Gamarra, E. L., Lefeber, T., & Najdeska, T. (2021). Characterizing the cytotoxic effects and several antimicrobial phytocompounds of *Argemone mexicana*. *Plos one*, 16(4), e0249704.
- Oudhia, P., Joshi, B. S., & Kosta, V. K. (1998). The possibilities of preparing homeopathic drugs from the obnoxious weed of Chhattisgarh. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*, 13(1/2), 53-57.

- Palou, L., Montesinos-Herrero, C., Tarazona, I., Besada, C., & Taberner, V. (2015). Incidence and etiology of postharvest fungal diseases of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Rojo Brillante) in Spain. *Plant Disease*, 99(10), 1416-1425.
- Pandey, S. S., Singh, S., Babu, C. V., Shanker, K., Srivastava, N. K., Shukla, A. K., & Kalra, A. (2016). Fungal endophytes of *Catharanthus roseus* enhance vindoline content by modulating structural and regulatory genes related to terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Scientific Reports*, 6(1), 1-14.
- Pandeya, K. B., Ganeshpurkar, A., & Mishra, M. K. (2020). Natural RNA Dependent RNA Polymerase Inhibitors: Molecular Docking Studies of Some Biologically Active Alkaloids of *Argemone mexicana*. *Medical Hypotheses*, 144, 109905.
- Panghal, M., Arya, V., Yadav, S., Kumar, S., & Yadav, J. P. (2010). Indigenous knowledge of medicinal plants used by Saperas community of Khetawas, Jhajjar District, Haryana, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 6(1), 1-11.
- Park, M. J., Cho, S. E., Piątek, M., & Shin, H. D. (2012). First report of powdery mildew caused by *Erysiphe macleayae* on *Macleaya microcarpa* in Poland. *Plant Disease*, 96(9), 1376-1376.
- Paolinelli-Alfonso, M., Villalobos-Escobedo, J. M., Rolshausen, P., Herrera-Estrella, A., Galindo-Sanchez, C., Lopez-Hernandez, J. F., & Hernandez-Martinez, R. (2016). Global transcriptional analysis suggests *Lasiodiplodia theobromae* pathogenicity factors involved in modulation of grapevine defensive response. *BMC Genomics*. 17(1):615
- Parsons, W. T., & Cuthbertson, E. G. (2001). Noxious Weeds of Australia. CSIRO Publishing, second edition. Australia. P. 534-550.
- Pastirčák, M., & Fejér, J. (2011). A preliminary survey of fungi on opium poppy in Slovakia. *Acta Horticulturae*. 1036, 157-162.
- Pastirčáková, K., Jankovics, T., Komáromi, J., Pintye, A., & Pastirčák, M. (2016). Genetic diversity and host range of powdery mildews on Papaveraceae. *Mycological Progress*, 15, 1-18.

- Pedersen, D., Fiore, C., Arechavala, A., Paniccia, L., & Occhionero, M. (2019). Microscopía electrónica de *Histoplasma capsulatum* aislado de un paciente con histoplasmosis diseminada. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(3), 284-285.
- Pedras, M. S. C., & Sorensen, J. L. (1998). Phytoalexin accumulation and antifungal compounds from the crucifer wasabi. *Phytochemistry*, 49(7), 1959-1965.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1985). Interfaces among genera related to *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologia*, 77(5), 810-824.
- Pollack, F. G., & Matthews, F. D. (1976). *Deightoniella argemonensis*, a new fungus on Mexican pricklepoppy, associated with *Cercosporidium guanicense*. *Mycologia*, 68(5), 1093-1097.
- Punithalingam, E. (1980). Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. Review paper. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, UK.
- Rajvaidhya, S., Nagori, B. P., Singh, G. K., Dubey, B. K., Desai, P. & Jain, S. (2012). A review on *Argemone mexicana* Linn-an Indian medicinal plant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Fesearch*, 3(8), 2494.
- Ranjana, S., & Tabassum, B. (2000). Aqueous weeds extract: an ecohealthy approach for nematode management. *Current Nematology*, 11(1/2), 29-33.
- Razaghi, P., & Zafari, D. (2018). Characterization of fungi causing lesion blight on *Papaver dubium* in Iran. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111, 437-455.
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia*, 97(1), 84-98.
- Riaz, M., Khan, S. N., Ayub, G., Tahir, A., & Khalid, U. (2019). Distribution of powdery mildew in field and waste land weeds in urban and sub-urban areas of Central Punjab. *Mycopath*, 17(2): 43-48.
- Rubio-Piña, J., & Vázquez-Flota, F. (2013). Pharmaceutical applications of the benzyloisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana* L. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(17), 2200-2207.

- Rukangira, E. (2001). The African herbal industry: constraints and challenges. *Erboristeria Domani*, 1, 1-23.
- Rzedowski, J. (1991). Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta botánica mexicana*, (14), 3-21.
- Samanani, N., Park, S. U., & Facchini, P. J. (2005). Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. *The Plant Cell*, 17(3), 915-926.
- Sandeep, K., Singh, S. K., Baslas, R. K., Ghildiyal, J. C., & Saxena, A. K. (2002). Lousicidal properties of few aqueous plant extracts. *Indian Veterinary Journal*, 79(11), 1136-1140.
- Sato, F. (2013). Improved production of plant isoquinoline alkaloids by metabolic engineering. *Advances in Botanical Research*, 68, 163-181.
- Schumacher, H. M., Gundlach, H., Fiedler, F., & Zenk, M. H. (1987). Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Reports*, 6(6), 410-413.
- Seethapathy, P., Gurudevan, T., Subramanian, K. S., & Kuppusamy, P. (2016). Bacterial antagonists and hexanal-induced systemic resistance of mango fruits against *Lasiodiplodia theobromae* causing stem-end rot. *Journal of Plant Interactions*, 11(1), 158-166.
- Shaukat, S. S., Siddiqui, I. A., Khan, G. H., & Zaki, M. J. (2002). Nematicidal and allelopathic potential of *Argemone mexicana*, a tropical weed. *Plant and Soil*, 245(2), 239-247.
- Sheshrao, D. U., Devidas, K. T., & Gyananath, G. (2012). preliminary screening of endophytic fungi from *tridax procumbens* linn. and *Argemone mexicana* linn. for their antimicrobial activity. *International Journal of Current Research*, 4(02), pp.093-096.
- Shi, J., Li, B., Wang, S., Zhang, W., Shang, M., Wang, Y., & Liu, B. (2024). Occurrence of *Neopestalotiopsis clavispورا* Causing Apple Leaf Spot in China. *Agronomy*, 14(8), 1658.
- Shi, T., Pan, T., & Guo, M. (2022). First isolation and identification of *Neopestalotiopsis clavispورا* causing postharvest rot of *Rosa sterilis* and its control with methyl jasmonate and calcium chloride. *Horticulturae*, 8(3), 190.

- Shitan, N., Kato, K., & Shoji, T. (2014). Alkaloid transporters in plants. *Plant Biotechnology*, 31(5), 453-463.
- Schuhegger, R., Rauhut, T., & Glawischnig, E. (2007). Regulatory variability of camalexin biosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 164(5), 636-644.
- Siegel, M. R., Latch, G. C. M., Bush, L. P., Fannin, F. F., Rowan, D. D., Tapper, B. A., Bacon, C. W & Johnson, M. C. (1990). Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of Chemical Ecology*, 16(12), 3301-3315.
- Sierra-Orozco, E., Sandoya, G., Lee, S., Vallad, G., & Hutton, S. (2023). Need for disease resistance breeding against *Corynespora cassiicola* in crops. *Frontiers in Agronomy*, 5, 1275906.
- Singh, A., Menéndez-Perdomo, I. M., & Facchini, P. J. (2019). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy: an update. *Phytochemistry Reviews*, 18(6), 1457-1482.
- Singh, B., & Katare, A. K. (2020). Botanical Sources, Chemistry Aspects and Biological Functions of Berberine: An Updated Critical Review. *Botanical Leads for Drug Discovery*, 421-462.
- Singh, H. N. P., Prasad, M. M., & Sinha, K. K. (1993). Efficacy of leaf extracts of some medicinal plants against disease development in banana. *Letters in Applied Microbiology*, 17(6), 269-271.
- Singh, S. K., Pandey, V. D., Singh, A., & Singh, C. (2009). Antibacterial activity of seed extracts of *Argemone mexicana* L. on some pathogenic bacterial strains. *African Journal of Biotechnology*, 8(24).
- Singh, S., Singh, T. D., Singh, V. P., & Pandey, V. B. (2010). Quaternary alkaloids of *Argemone mexicana*. *Pharmaceutical Biology*, 48(2), 158-160.
- Stahl, E. A., & Bishop, J. G. (2000). Plant-pathogen arms races at the molecular level. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 299-304.
- Tahmasebi, A., Roach, T., Shin, S. Y., & Lee, C. W. (2023). *Fusarium solani* infection disrupts metabolism during the germination of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1225426.

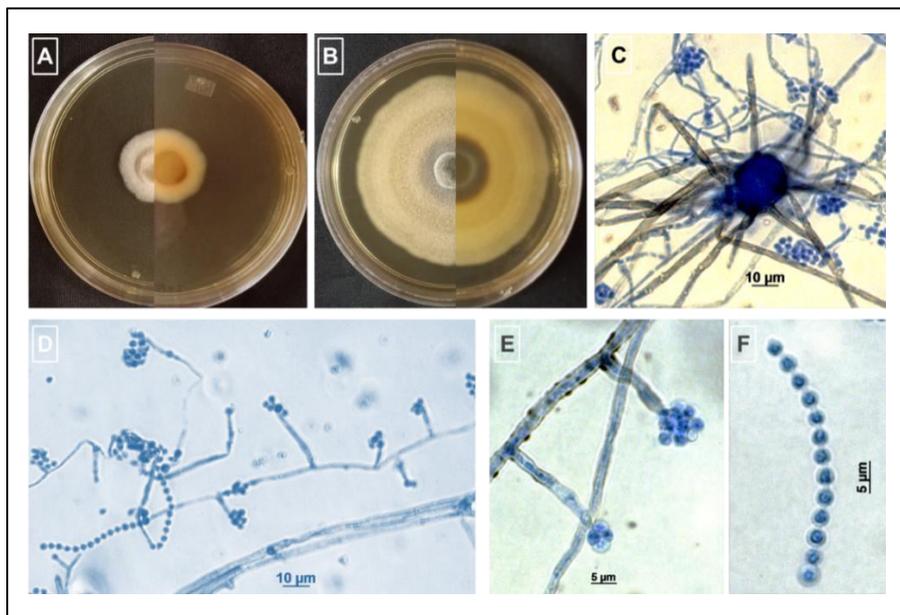
- Tapia-Tussell, R., Lappe, P., Ulloa, M., Quijano-Ramayo, A., Cáceres-Farfán, M., Larqué-Saavedra, A., & Perez-Brito, D. (2006). A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology*, 33, 67-70.
- Tashiro, N., Noguchi, M., Ide, Y., & Kuchiki, F. (2013). Sooty spot caused by *Cladosporium cladosporioides* in postharvest *Satsuma mandarin* grown in heated greenhouses. *Journal of General Plant Pathology*, 79(2), 158–161.
- Tata, A., Perez, C. J., Hamid, T. S., Bayfield, M. A., & Ifa, D. R. (2014). Analysis of metabolic changes in plant pathosystems by imprint imaging DESI-MS. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 26(4), 641-648.
- Thathana, M. G., Murage, H., Abia, A. L. K., & Pillay, M. (2017). Morphological characterization and determination of aflatoxin-production potentials of *Aspergillus flavus* isolated from maize and soil in Kenya. *Agriculture*, 7(10), 80.
- Thomma, B. P., Nelissen, I., Eggermont, K., & Broekaert, W. F. (1999). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal*, 19(2), 163-171.
- Torres, D. E., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Guevara-Fefer, P., Márquez-Guzmán, G. J., & Pérez-Martínez, C. (2017). *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. *PLoS one*, 12(1), e0170782.
- Travadon, R., Rolshausen, P. E., Gubler, W. D., Cadle-Davidson, L., & Baumgartner, K. (2013). Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* spp. to wood infection by fungal trunk pathogens. *Plant Disease*. 97(12):1529–1536.
- Trujillo-Villanueva, K., Rubio-Piña, J., Monforte-González, M., & Vázquez-Flota, F. (2010). *Fusarium oxysporum* homogenates and jasmonate induce limited sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. *Biotechnology Letters*, 32(7), 1005-1009.
- Trujillo-Villanueva, K., Rubio-Piña, J., Monforte-González, M., Ramírez-Benítez, E., & Vázquez-Flota, F. (2012). The sequential exposure to jasmonate, salicylic acid and

- yeast extract promotes sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. *Biotechnology Letters*, 34(2), 379-385.
- Vázquez-Flota, F., Rubio-Piña, J., Xool-Tamayo, J., Vergara-Olivares, M., Tamayo-Ordoñez, Y., Monforte-González, M., Guízar-González, C., & Mirón-López, G. (2018). Tissue distribution of transcripts involved in biosynthesis of benzyloquinoline alkaloid in mature plants of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(1), 13-21.
- Verdcourt, B., & Trump, E.C. (1969). Common poisonous plants of East Africa. Common poisonous plants of East Africa. 254 pp.
- Verma, P., Khan, S. A., Mathur, A. K., Ghosh, S., Shanker, K., & Kalra, A. (2014). Improved sanguinarine production via biotic and abiotic elicitations and precursor feeding in cell suspensions of latex-less variety of *Papaver somniferum* with their gene expression studies and upscaling in bioreactor. *Protoplasma*, 251(6), 1359-1371.
- Von Weizsäckerl, P. (1995). The yield of weeds. ILEIA Newsletter, 11(3), 6-7.
- Wang, F., Zhao, L., Li, G., Huang, J., Hsiang, T. (2011). Identification and characterization of *Botryosphaeria* spp. causing gummosis of peach trees in Hubei Province, Central China. *Plant Disease*. 95(11):1378–1384.
- Wang, X. J., Min, C. L., Ge, M., & Zuo, R. H. (2014). An endophytic sanguinarine-producing fungus from *Macleaya cordata*, *Fusarium proliferatum* BLH51. *Current Microbiology*, 68(3), 336-341.
- Warikoo, R., & Kumar, S. (2014). Oviposition altering and ovicidal efficacy of root extracts of *Argemone mexicana* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2(4), 11-17.
- Watanabe, T., Wang, G., Taki, K., Ohashi, Y., Kimura, M., & Asakawa, S. (2010). Vertical changes in bacterial and archaeal communities with soil depth in Japanese paddy fields. *Soil Science and Plant Nutrition*, 56(5), 705-715.
- Watts, S. M., Dodson, C. D., & Reichman, O. J. (2011). The roots of defense: plant resistance and tolerance to belowground herbivory. *PLoS One*, 6(4), e18463.

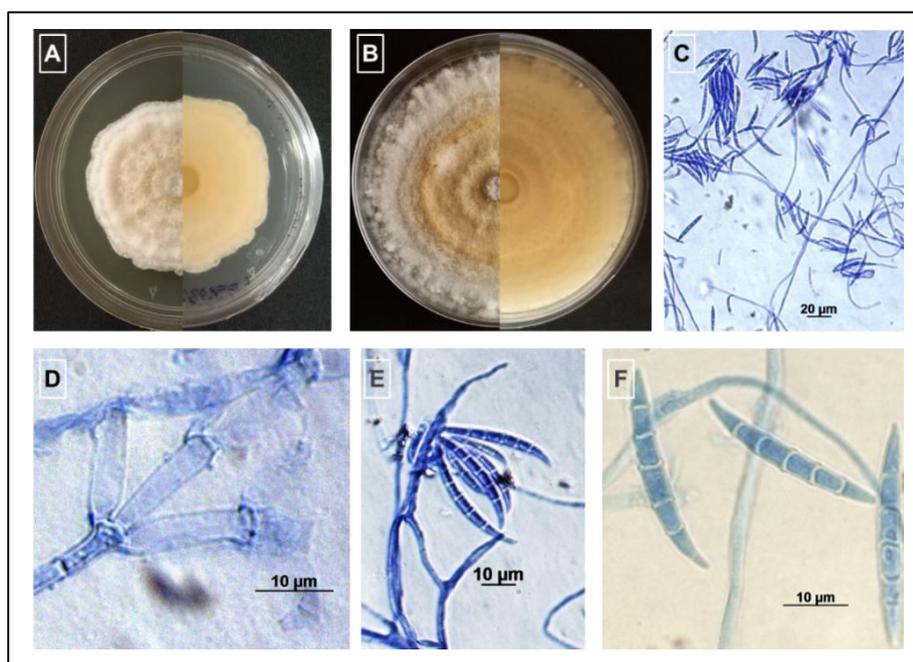
- Weiss, D., Baumert, A., Vogel, M., & Roos, W. (2006). Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant, Cell & Environment*, 29(2), 291-302.
- White, T. J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to methods and applications/Academic Press, Inc.* 315-322.
- Xie, J., Wei, J. G., Wang, K. W., Luo, J., Wu, Y. J., Luo, J. T., & Wu, Y. J., Luo, J. T., Yang, X. H., Yang, X. B. (2020). Three phytotoxins produced by *Neopestalotiopsis clavispora*, the causal agent of ring spot on *Kadsura coccinea*. *Microbiological Research*, 238, 126531.
- Xool-Tamayo, J. F., Monforte-González, M., Rubio-Piña, J., Mirón-López, G., & Vázquez-Flota, F. (2017). Early developmental onset of alkaloid biosynthesis in Mexican poppy (*Argemone mexicana* L) Papaveraceae. *Phytochemistry Letters*, 20, 300-305.
- Xool-Tamayo, J., Tamayo-Ordoñez, Y., Monforte-González, M., Muñoz-Sánchez, J. A., & Vázquez-Flota, F. (2021). Alkaloid biosynthesis in the early stages of the germination of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Plants*, 10(10), 2226.
- Yan, J. Y., Zhao, W. S., Chen, Z., Xing, Q. K., Zhang, W., Chethana, K. T., Xue, M. F., Xu, J. P., Phillips, A. J. L., Wang, Y., Liu, J. H., Zhou, Liu, M., Y., Jayawardena, R. S., I. S., Manawasinghe, Huang, J. B., Qiao, G. H., Fu, C. Y., Guo, F. F., Dissanayake, A. J., Peng, Y. L., Hyde, K. D., Li, X. H., & Li, X. H. (2018). Comparative genome and transcriptome analyses reveal adaptations to opportunistic infections in woody plant degrading pathogens of Botryosphaeriaceae. *DNA Research*, 25(1), 87-102.
- Yang, X. B., Snow, J. P., & Berggren, G. T. (1989). Morphogenesis of microsclerotia and sasakii-type sclerotia in *Rhizoctonia solani*, anastomosis group 1, intraspecific groups IA and IB. *Mycological Research*, 93(4), 429-434.
- Zainudin, N. A. I. M., Sidique, S. N. M., Johari, N. A., Razak, A. A., & Salleh, B. (2011). Isolation and Identification of *Fusarium* Species Associated with *Fusarium* Ear Rot Disease of Corn. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34(2).
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., & Bahadar, K. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 124, 198-202.

- Zhang, W., Yan, J., Li, X., Xing, Q., Chethana, K. T., & Zhao, W. (2019). Transcriptional response of grapevine to infection with the fungal pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. *Scientific reports*, 9(1), 5387.
- Zhao, Z. M., Shang, X. F., Lawoe, R. K., Liu, Y. Q., Zhou, R., Sun, Y., Yin-fang, Y., Jun-Cai, L., Guan-Zhou Y., & Yang, C. J. (2019). Anti-phytopathogenic activity and the possible mechanisms of action of isoquinoline alkaloid sanguinarine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 159, 51-58

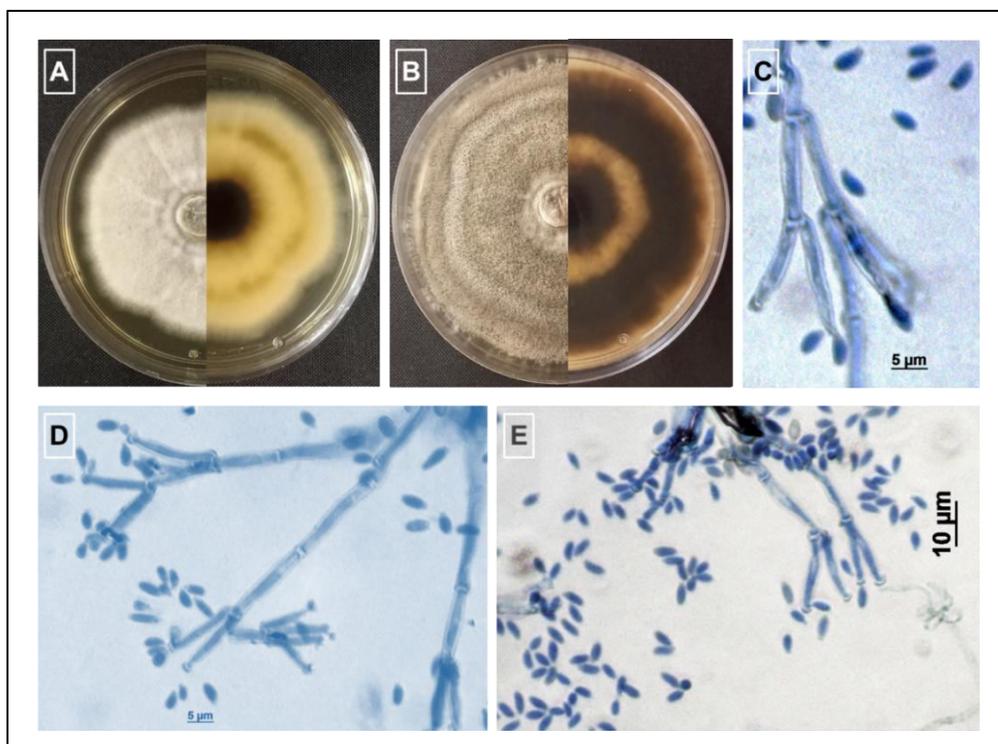
## ANEXOS



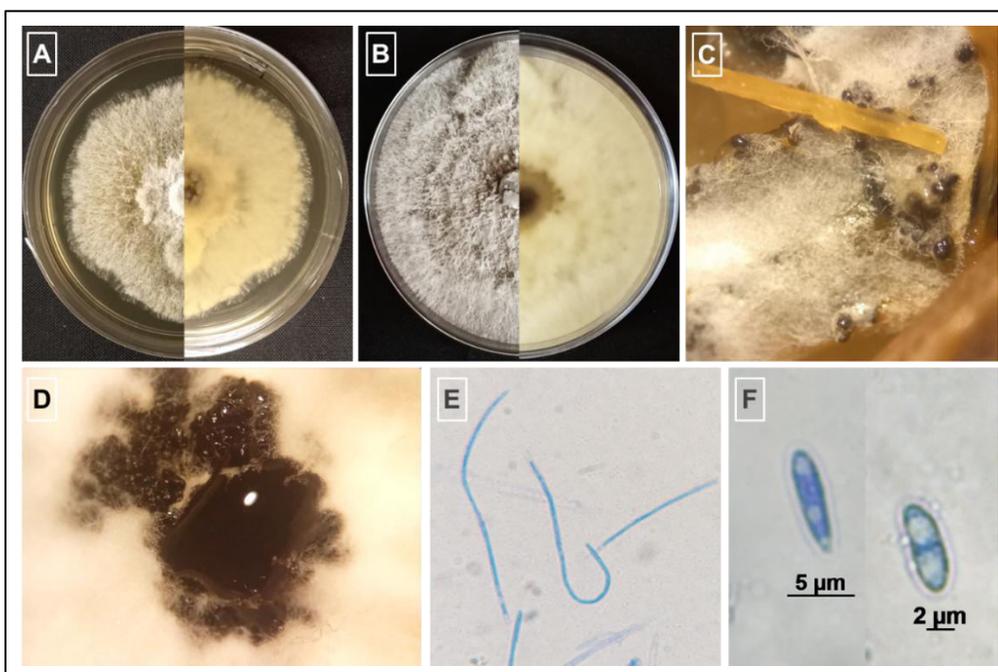
**Figura A.1.** Colonia de la cepa Am23-12. Vista frontal e inversa cultivada en PDA durante 7 días (A), colonia frontal e inversa de 21 días en PDA (B), micelio (C), conidios (D), conidias agrupadas en racimos (E), conidio en cadenas (F).



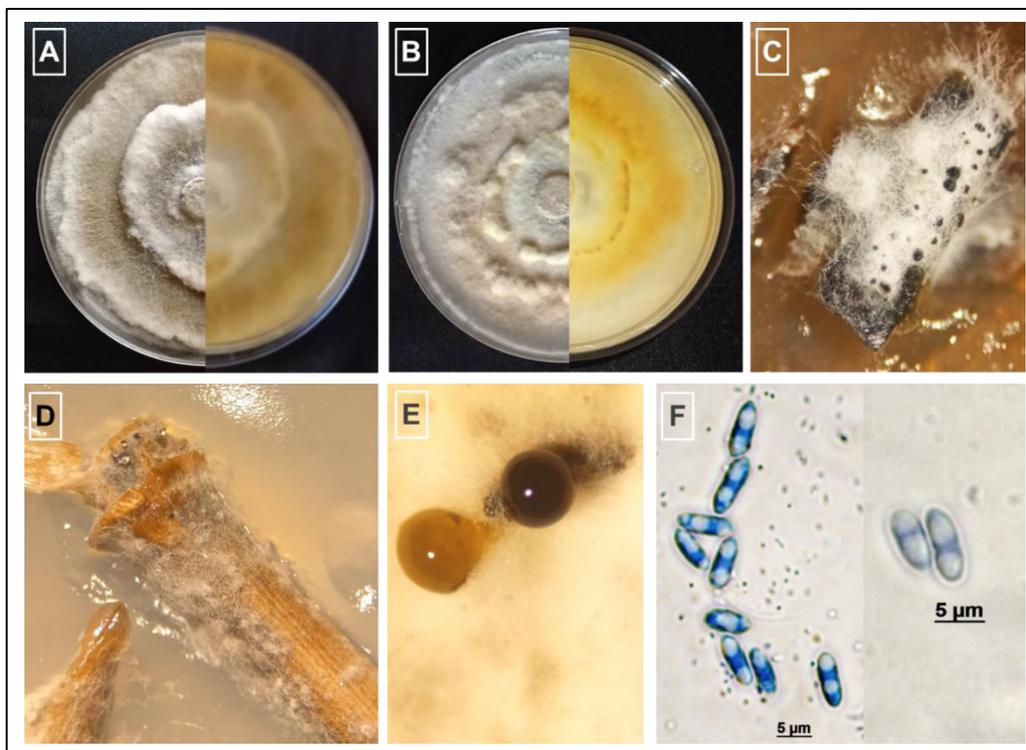
**Figura A.2.** Colonia de la cepa Am23-13 (*Fusarium* sp.). Cultivos y morfología de Am23-13 (*Fusarium* sp.). Apariencia de la colonia cultivado durante siete días en PDA (A), apariencia de la colonia cultivado durante 21 días en PDA (B), grupo de macroconidios (C y F), conidióforos ramificados (D), conidias formadas sobre conidióforos que surgen de hifas (E).



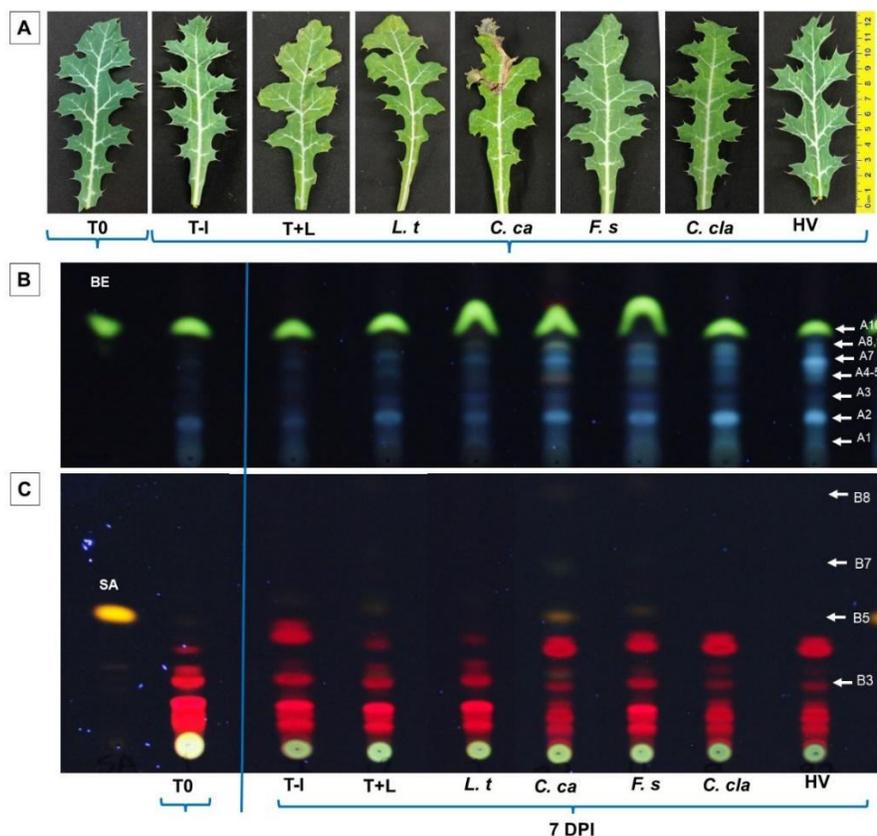
**Figura A.3.** Colonia de la cepa Am23-14. Vista frontal e inversa cultivada en PDA durante 7 días (A), colonia frontal e inversa de 21 días en PDA (B), fiálide (C), cadena conidial (D), conidias sueltas (E).



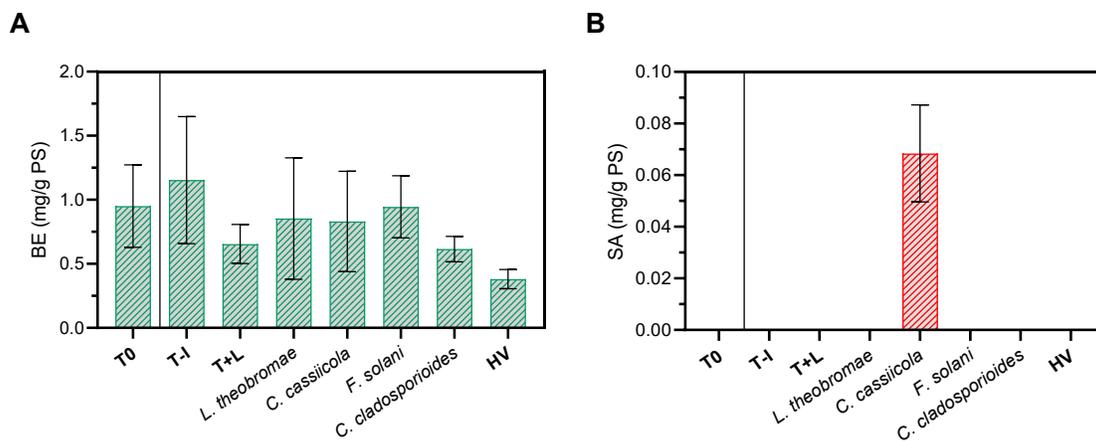
**Figura A.4.** Morfología de Am23-15 (*Diaporthe* sp.). Vista superior e inferior de la colonia en PDA durante siete días (A), Vista superior e inferior de la colonia en PDA durante 21 días (B), picnidios en agar-clavel (C), conidiomas esporulando en agar-clavel. (D),  $\beta$ -conidia (E),  $\alpha$ -conidios (F).



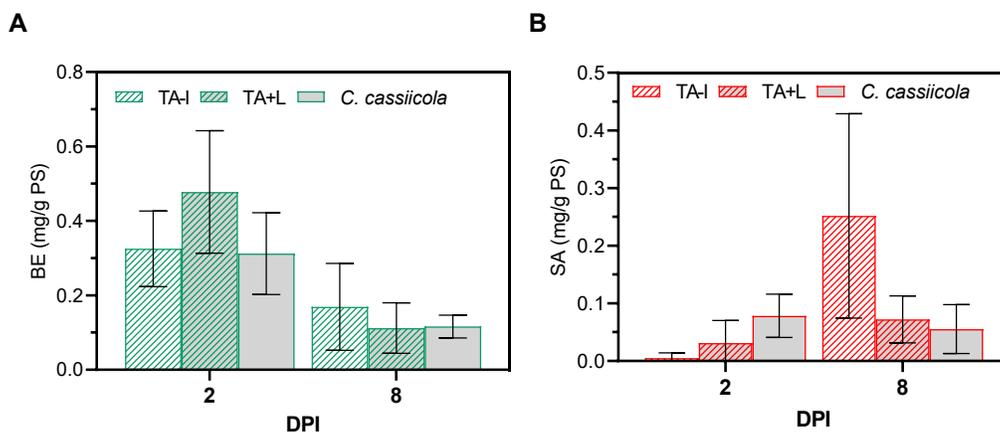
**Figura A.5.** Morfología de Am23-16 (*Diaporthe* sp.). Vista superior e inferior de la colonia en PDA durante siete días (A), Vista superior e inferior de la colonia en PDA durante 21 días (B), picnidios en agar-clavel (C), Conidiomas (D-E),  $\alpha$ -conidios (E).



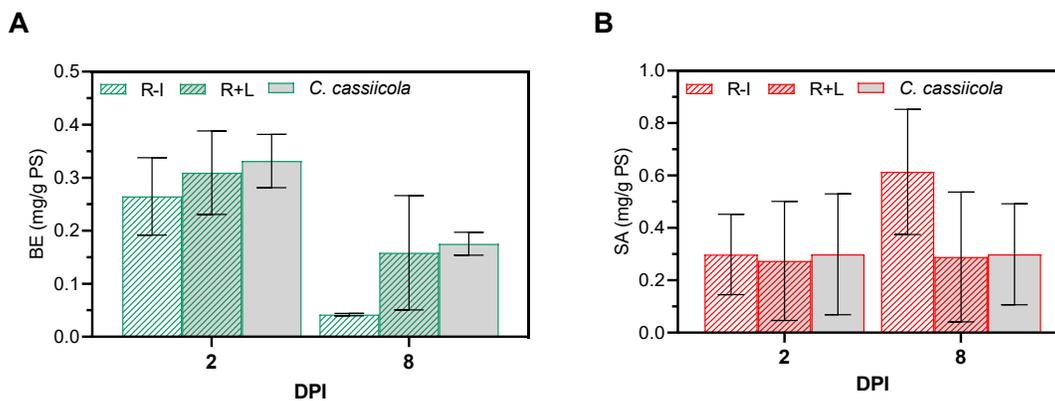
**Figura A.6.** Comparación del perfil de alcaloides en hojas *in planta* de *Argemone mexicana* expuestas a hongos. Hojas expuestas a hongos (A), Sistema de solventes para berberina (B), n-butanol: agua: hidróxido de amonio (8:1:1) y sanguinarina, ciclohexano:etanol (94:6) (C). T0: Tiempo inicial, T-I: Testigo intacto, T+L: Testigo con daño mecánico, L. t: *Lasiodiplodia theobromae*. C. ca: *Corynespora cassiicola*, F. s: *Fusarium solani*, C. cl: *Cladosporium cladosporioides*, HV: Hoja vecina.



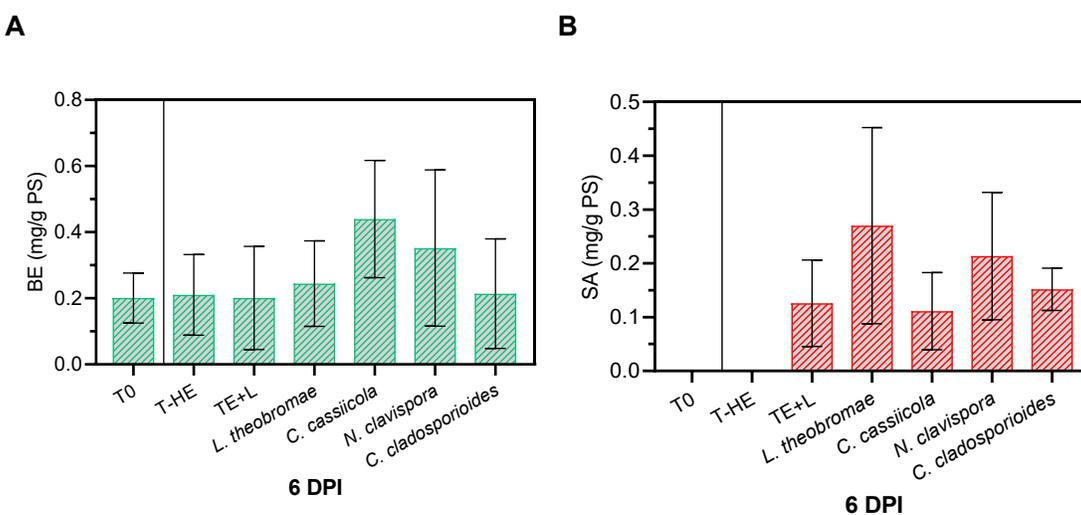
**Figura A.7.** Efecto de los hongos de *A. mexicana* en la acumulación de Abis's en la superficie foliar. Cuantificación de berberina (A), sanguinarina (B). Se utilizaron plantas generadas a partir de semillas. Se incluyeron tres tipos de controles en el estudio: (T0) las plantas controles al inicio del experimento, (T-I) plantas intactas a los 7 dpi, (T+L) control con daño mecánico a los 7 dpi y las expuestas a los diferentes hongos.



**Figura A.8.** Acumulación de alcaloides en tallos de plantas después de ocho días de exposición a *C. cassiicola*. Berberina (A), sanguinarina (B).



**Figura A.9.** Acumulación de alcaloides en raíces de plantas después de ocho días de exposición a *C. cassiicola*. Berberina (A), sanguinarina (B).



**Figura A.10.** Acumulación de alcaloides en hojas escindidas después de seis días de observación. Berberina (A), sanguinarina (B).