



# “Pigmentos oscuros de *Cladosporium fulvum* Raza 2 CIDEFI 300, agente causal del moho de la hoja de tomate”

Cesar G. Lucentini<sup>1</sup>; Gabriela Petroselli<sup>2</sup>; Rosa Erra-Balsells<sup>2</sup>; María I. Troncozo<sup>3</sup>; Mario E. E. Franco<sup>1</sup>; Rocío Medina<sup>1</sup>; Cristina Rollán<sup>1</sup>; Pedro A. Balatti<sup>1,3</sup>; Mario C. N. Saparrat



CIHIDECAR  
CONICET

  
Facultad de Ciencias  
Naturales y Museo

INFIVE  
  
CONICET  
UNLP

  
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



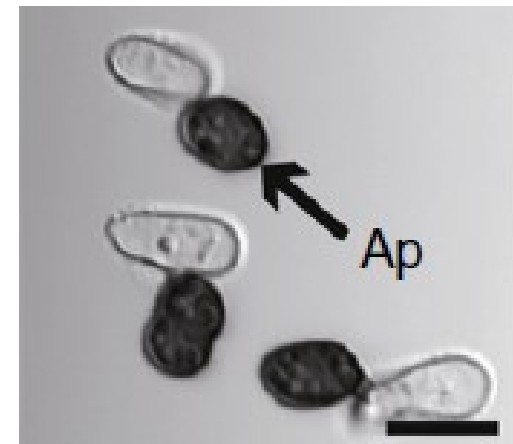
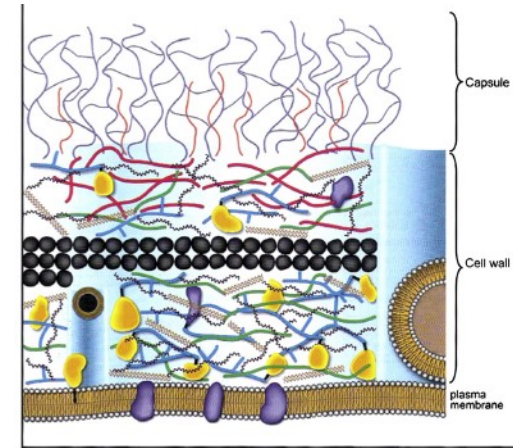
Lima, 2017.

# ¿Qué son los pigmentos oscuros o melaninas?

- Son pigmentos ampliamente distribuido, en hongos se conocen desde 1960.
- Color oscuro, negro o marrón.
- Son polímeros complejos que se forman por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos o indólicos.
- Son moléculas con alto peso molecular, estables, insolubles en agua y solventes orgánicos, amorfas, con carga negativa, resistentes al ataque con ácidos pero susceptibles a la degradación con bases fuertes.
- La identificación precisa de su estructura química, es compleja.

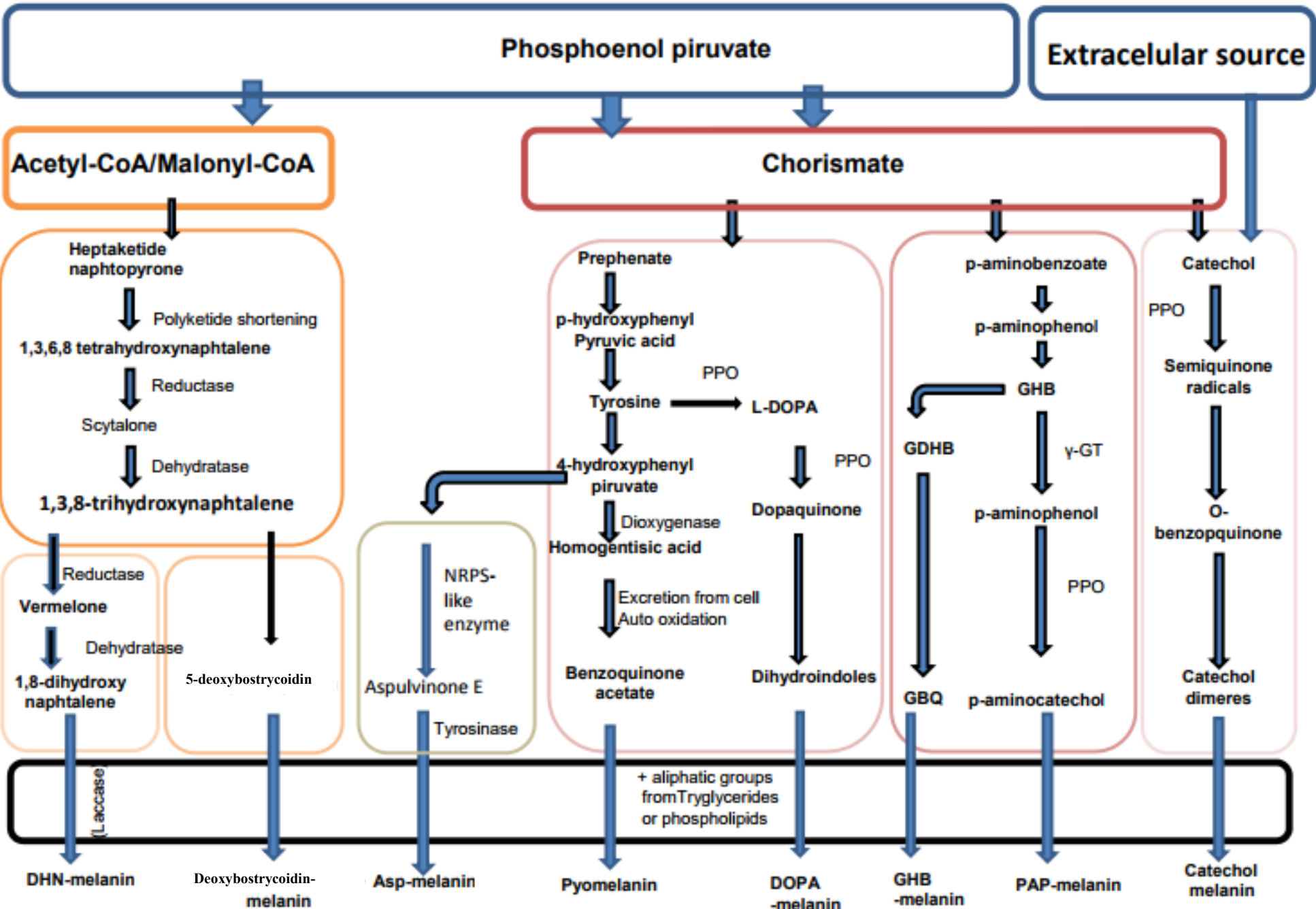
# Roles de las melaninas

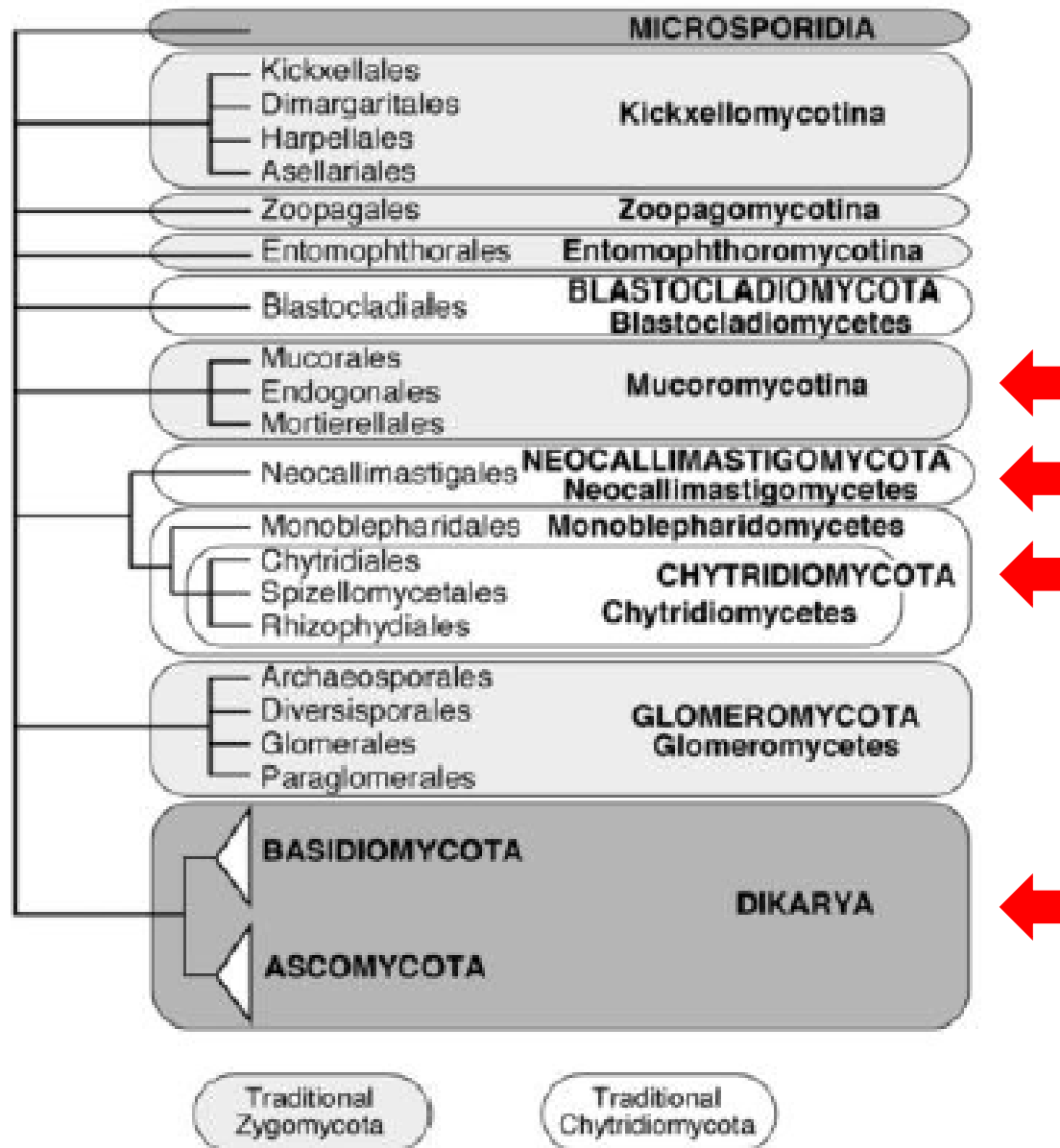
- Las funciones de las melaninas resultan de sus propiedades físicas y químicas.
- Estas propiedades están condicionadas por la estructura química y su organización a nivel molecular, supramolecular, así como por la capacidad de las mismas para formar agregados con proteínas o polisacáridos.
- ✓ Resistencia a estreses ambientales:
  - radiación
  - pérdida de agua
  - temperatura
  - moléculas orgánicas o inorgánicas
- ✓ Patogénesis y virulencia:
  - protección frente a enzimas hidrolíticas
  - apresorio
- ✓ Morfogénesis.
- ✓ Transducción de energía.




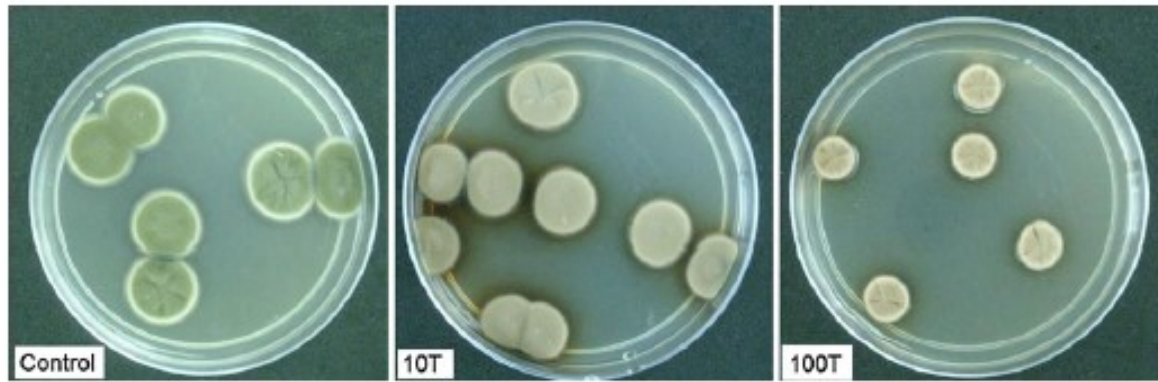
- Detección de pigmentos oscuros en hongos pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos, sus características y rol biológico.
- Análisis de los tipos de melaninas fúngicas y su mecanismo de síntesis.



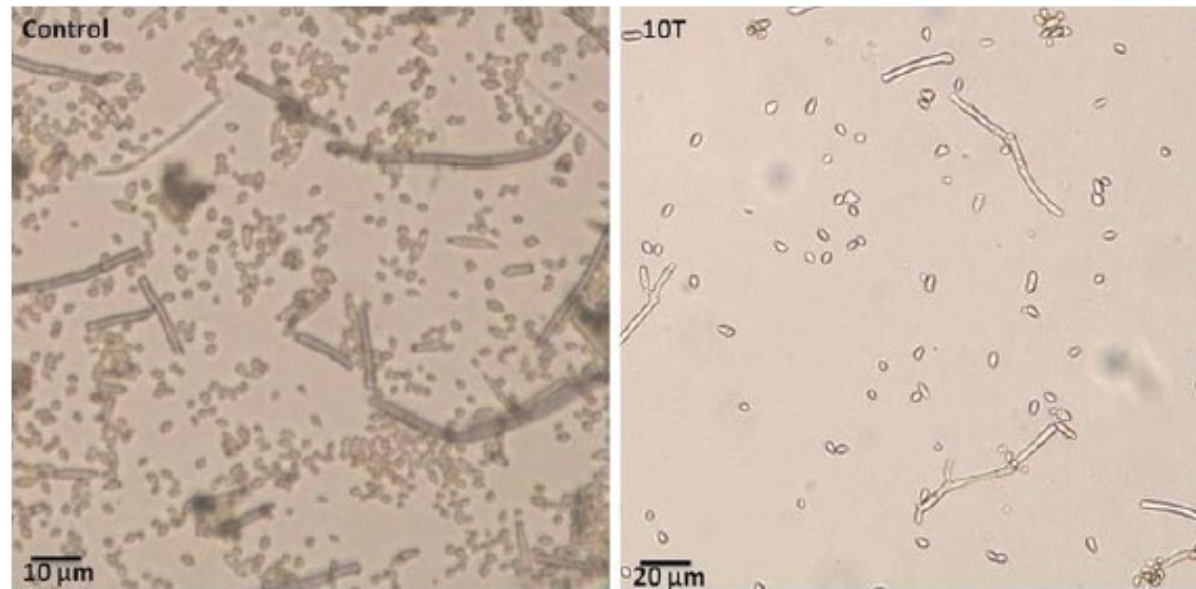
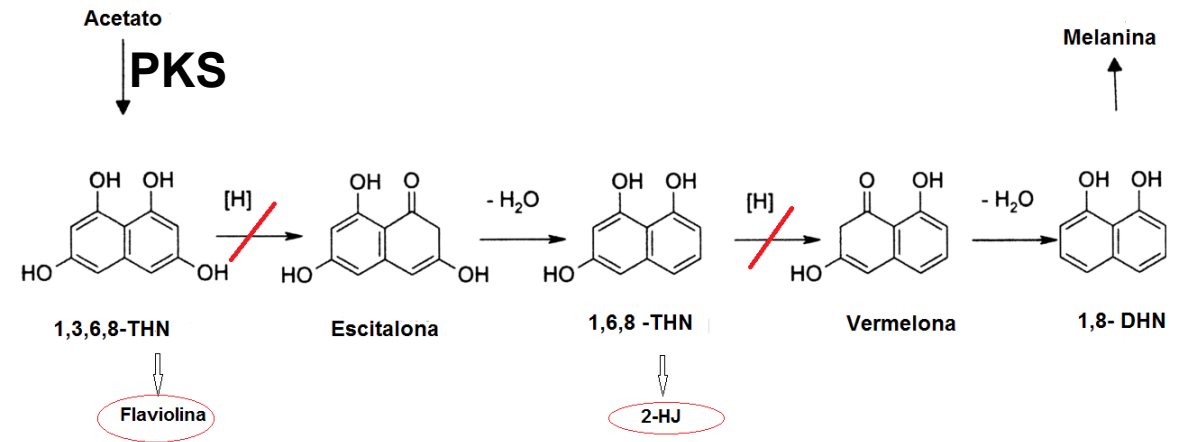





Taxa*	Melanin type	Localization	Putative role
<i>Agaricus bisporus</i> <sup>b</sup> (Agaricaceae)	GHB-	Basidiospore wall	?
	PAP-	?	?
	DOPA-	?	?
	Catechol-	?	?
<i>Aspergillus terreus</i> <sup>a</sup> (Trichocomaceae)	Asp-	Conidia	Tolerance to UV radiation and acidic environments and defense from predation by amoeba
	DHN-	Culture broth	
<i>Auricularia auricula</i> <sup>b</sup> (Auriculariaceae)	Pheomelanin	Fruiting bodies	?
	DHN-	Fruiting bodies	?
	Eumelanin-type	Extracellular medium	?
<i>Bipolaris sorokiniana</i> <sup>a</sup> (Pleosporaceae)	DHN-	Wall in hyphae and conidia	Development, fitness and survival
<i>Cenococcum geophilum</i> <sup>a</sup> (Gloniaceae, Mytilinidiales)	DHN-	Hyphae wall	Tolerance to water stress
 <i>Cladosporium cladosporioides</i> <sup>a</sup> (Cladosporiaceae)	DHN-melanin like compounds	Wall in hyphae and conidia	Tolerance to stresses imposed by fungicides or the environment
<i>Cryptococcus neoformans</i> <sup>b</sup> (Tremellaceae)	DOPA- (eumelanin)	Extracellular vesicles and cell wall	Pathogenicity. Virulence factor. Protection against host defence systems (immune effector cells, phagocytosis and oxidative injury)
<i>Fusarium graminearum</i> <sup>a</sup> (Nectriaceae)	5-Deoxybostrycoidin-	Perithecial wall	Tolerance to UV radiation and reactive oxygen species
<i>Metarhizium anisopliae</i> <sup>a</sup> (Clavicipitaceae)	DHN-	?	Virulence factor. Hydrophobic attraction, water absorption, adhesion, conidia germination and tolerance to water and oxidative stress

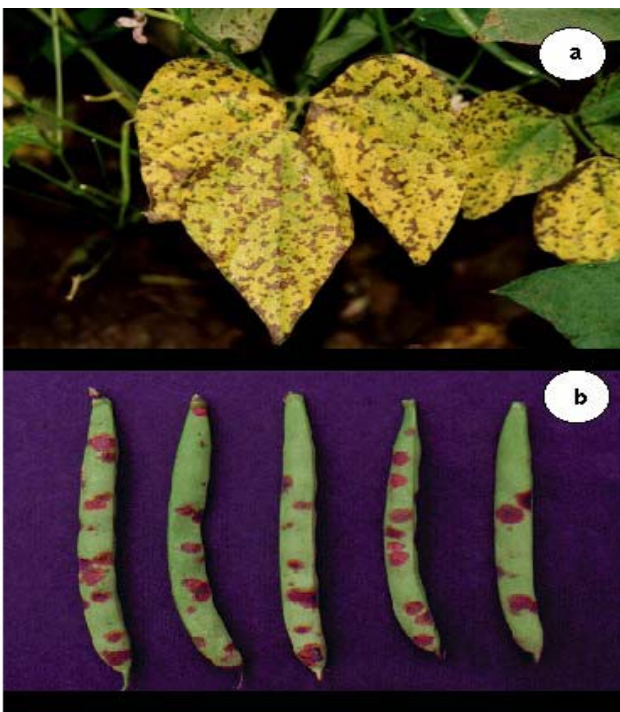


**Fig. 3** Colonies of *C. cladosporioides* LPSC no. 1088 grown on PDA in absence (Control) and presence of 10 and 100 ppm of tricyclazole (T) for a 7 days period

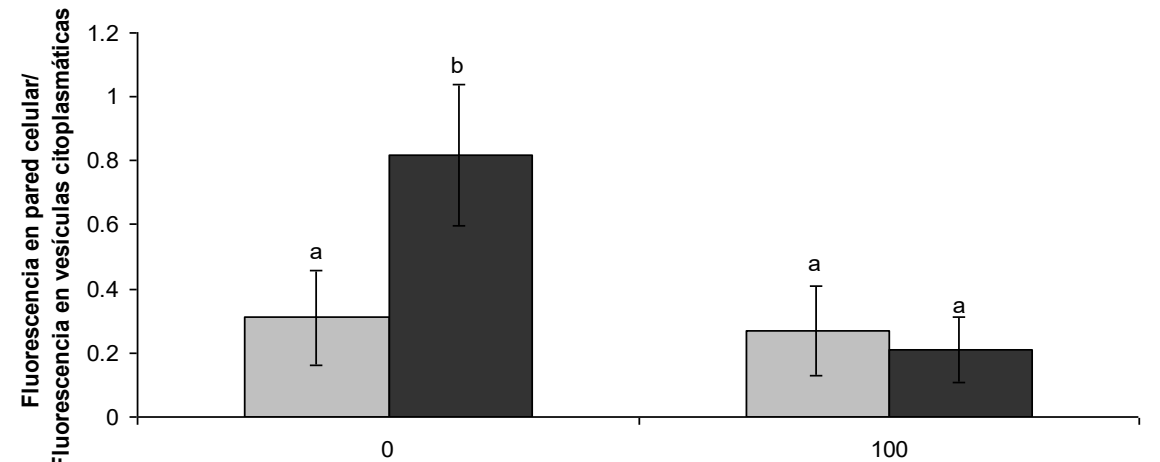
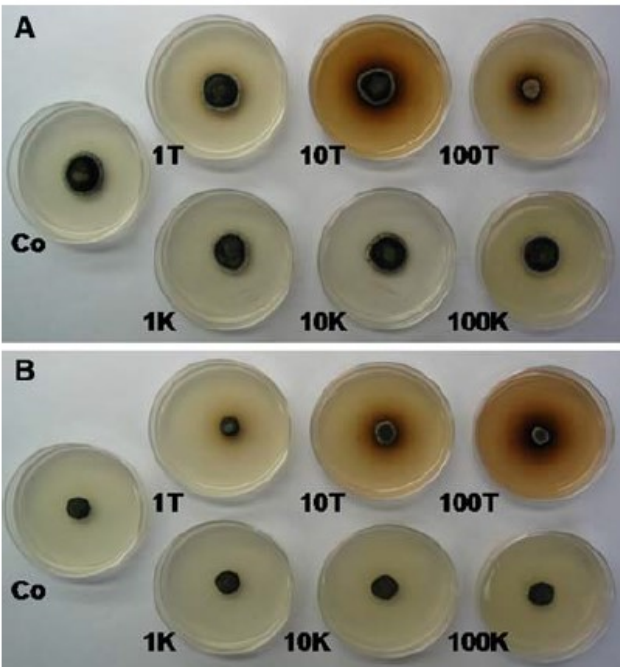
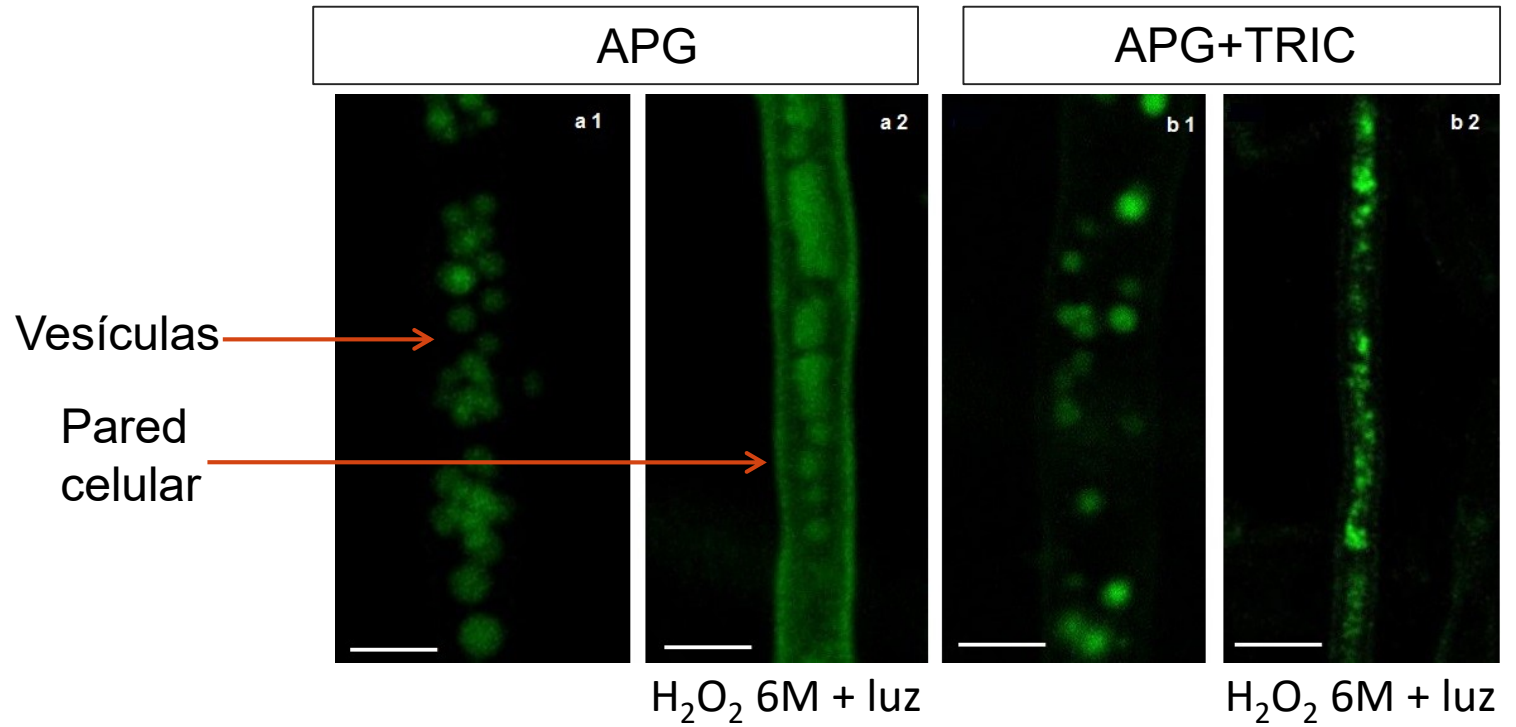


**Fig. 5** Mycelia and conidia of *C. cladosporioides* LPSC no. 1088 grown on PDA in absence (Control) and presence of 10 ppm of tricyclazole (10 T) for a 7 days period

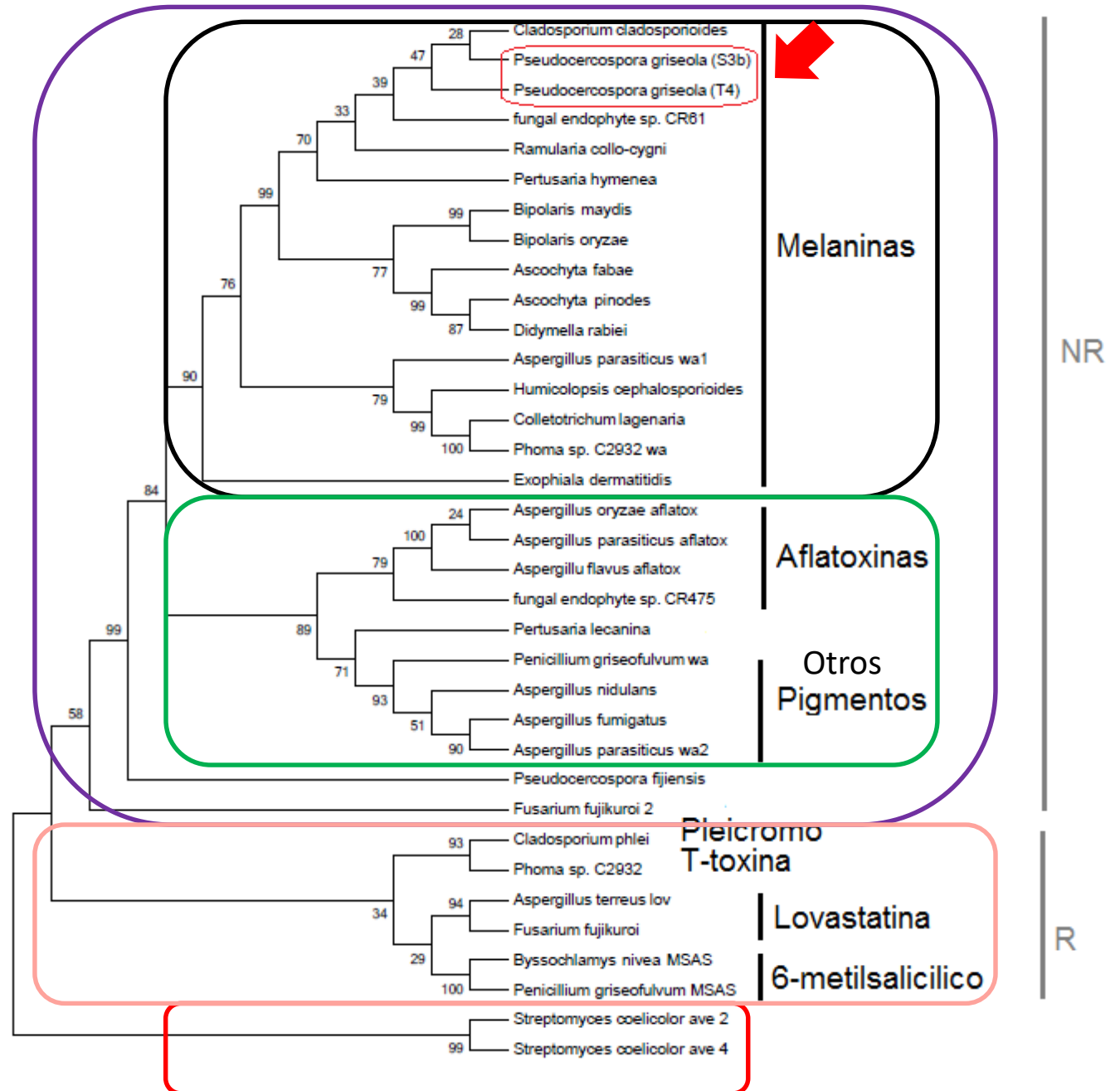
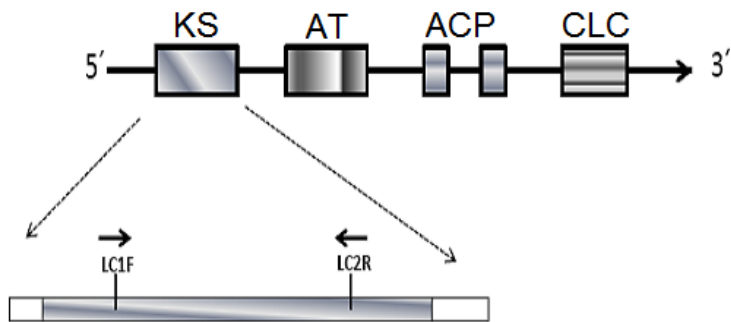
<i>Monilinia laxa</i> <sup>a</sup> (Sclerotiniaceae)	DHN-	All structures differentiated	Pathogenicity. Sporogenesis. Survival. Tolerance to environmental stresses and autolysis
<i>Mucor</i> spp. <sup>d</sup> (Mucorales)	?	Outer wall of sporangiospores	?
<i>Neocallimastix</i> sp. <sup>e</sup> Isolate MC-2 (Neocallimastigaceae)	?	Wall of mature resistant sporangia	Survival
<i>Ophiocordyceps sinensis</i> <sup>a</sup> (Ophiocordycipitaceae)	DOPA-	Fermentation broth of submerged cultures	?
<i>Penicillium chrysogenum</i> <sup>a</sup> (Trichocomaceae)	Pyomelanin	Extracellular medium	Survival under nutrient and water stress
 <i>Pseudocercospora griseola</i> <sup>a</sup> (Mycosphaerellaceae)	DHN-	Wall in hyphae and conidia	Morphogenesis
<i>Sporothrix schenckii</i> <sup>a</sup> (Ophiostomataceae)	DHN-	Constitutively in conidial and yeast cells	Virulence related to infection and against phagocytosis
	DOPA- (eumelanin)  Pyomelanin	Wall of conidia, yeast cells, and hyphae if L-DOPA is available during fungal growth  Extracellular medium if L-tyrosine is available during fungal growth	Virulence related to infection and against phagocytosis. Protection against antifungal drugs  Quencher of oxidative stress. Protection against antifungal drugs
<i>Synchytrium endobioticum</i> <sup>c</sup> (Synchytriaceae, Chytridiales)	Allomelanin like compounds ?	Resting spores	Survival



# Microscopía confocal.



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





Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

***“Los Polimorfismos en los avr de Cladosporium fulvum afectan la virulencia y el control de la cladosporiosis en el tomate con la resistencia sistémica inducida y adquirida”***

**Becario doctoral Ing. Agr. Lucentini, Cesar Gustavo.**

**Director: Dr. Balatti, Pedro. Profesor Titular de Fitopatología Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP. Investigador Principal CICBA**

**Codirector: Saparrat, Mario C. N. Profesor Adjunto Microbiología Agrícola Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP. Investigador Independiente CONICET**

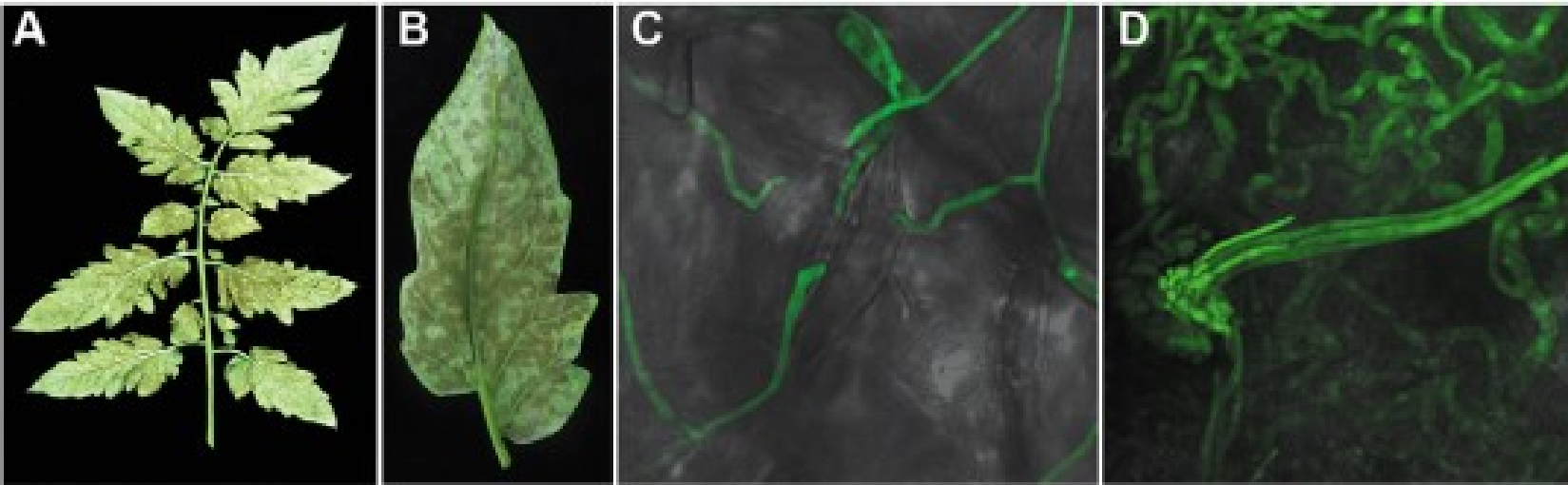


Ascomycota

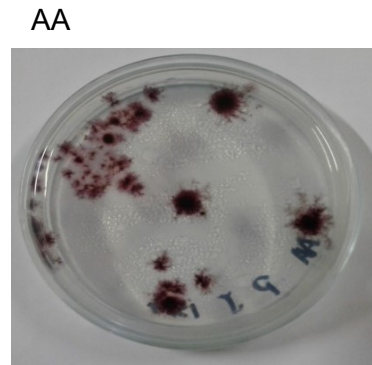
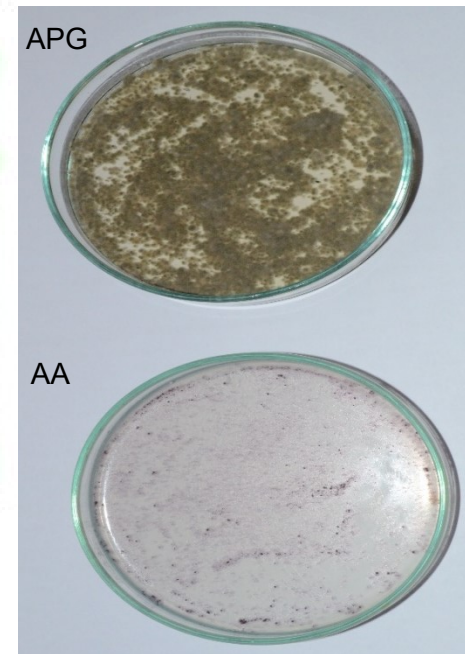
Capnodiales

Mycosphaerellaceae

*Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous (*Cladosporium fulvum* Cooke)



de Wit et al. 2012. PLoS Genet 8(11): e1003088.



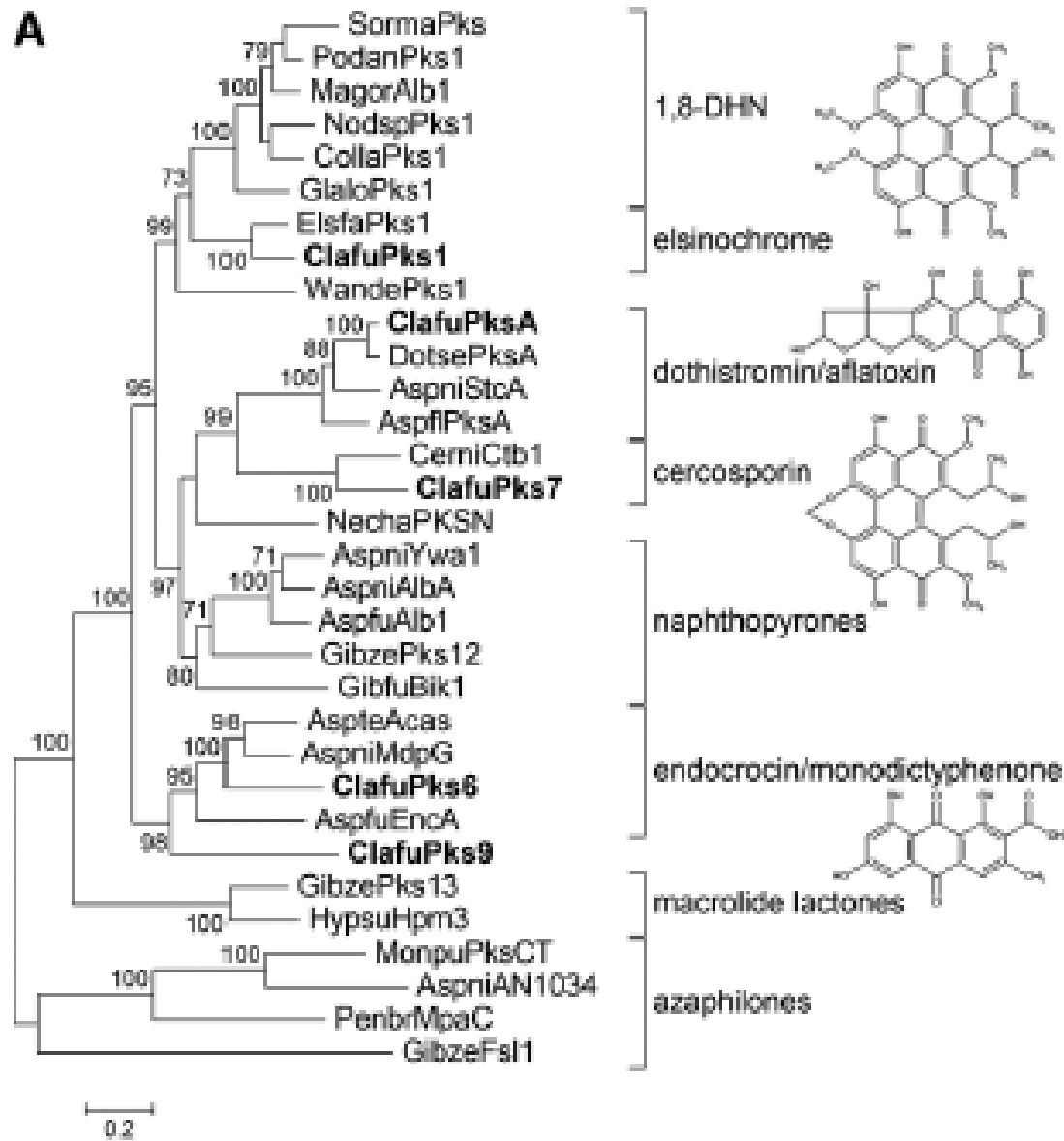
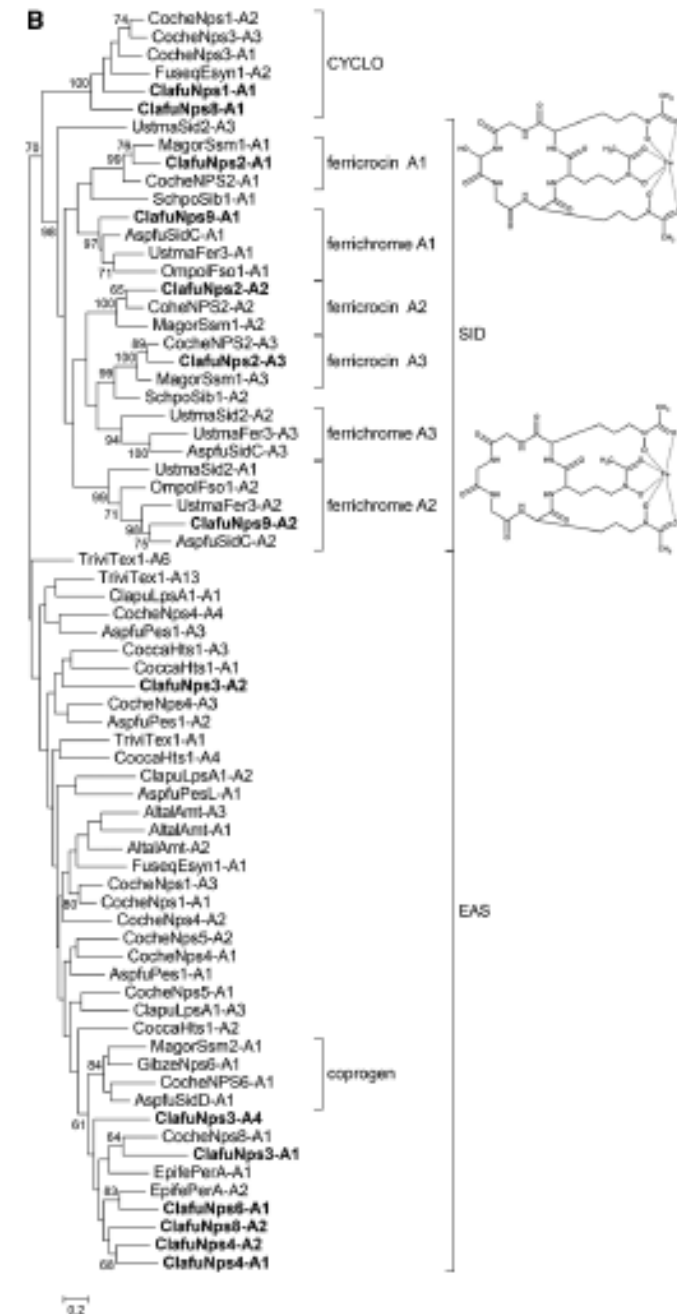
Tomate fresco	Sup. (ha)
NOA	5500 (250 inv)
NEA	800 (inv)
Cinturón de Bs As	1400 (inv y campo)
Mar del Plata	1200 (inv y campo)
Mendoza	1200
Patagonia	200

Producción: 691.383 t (FAO, 2015)(70.000 t Bs As, 360.000 t Corr) Sup: 10.300 ha

Tomate industria	Sup (ha)
Cuyo	4500
Río Negro	1500
NOA	1500

Producción: 355.000 t  
Sup: 7500 ha



**A****B**

is needed to confirm its requirement in cladofulvin production, but attempts to disrupt this gene have been unsuccessful so far.

*PKS1* belongs to a gene cluster homologous to the elsinochrome gene cluster in *E. fawcettii*. All genes except *OXR1* are located within the gene cluster present in *C. fulvum*. The complete elsinochrome biosynthetic pathway has yet to be fully elucidated and there is no function assigned to the hypothetical protein encoded by *OXR1* [43]. It is likely that *C. fulvum* is able to produce elsinochrome or a highly similar compound. Despite its expression in PDB, LC-MS analysis did not detect such a compound. It is possible that the method used to extract SMs was not adapted to the isolation of this type of compound, although this is unlikely because the procedure did extract cladofulvin, which has a chemical structure similar to that of elsinochrome. Functional analysis of *PKS1* will elucidate whether it is responsible for the biosynthesis of an elsinochrome-like compound. Surprisingly, the genome of *C. fulvum* does not contain any gene that belongs to the 1,8-DHN-melanin PKS clade, which suggests that *C. fulvum* is not able to produce DHN-melanin, although it might produce melanin from tyrosine through the DOPA pathway [52]. Alternatively, it was found that a PKS involved in DHN-melanin production in *A. niger* is also responsible for the biosynthesis of several naphtho- $\gamma$ -pyrones [53]. Similarly, *Pks1* could be responsible for the production of elsinochrome and/or DHN-melanin in *C. fulvum*.

### Secondary metabolism and biotrophic growth of *Cladosporium fulvum*

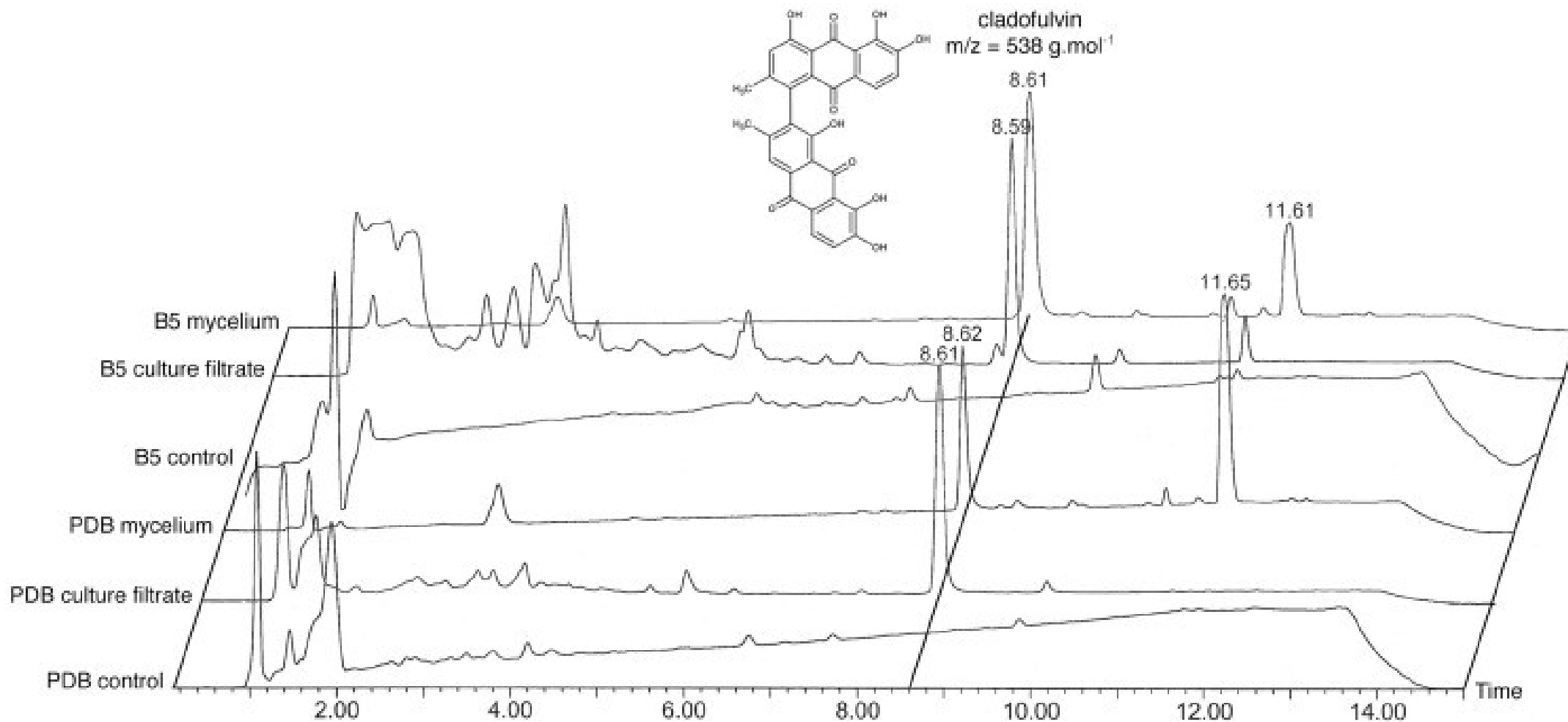
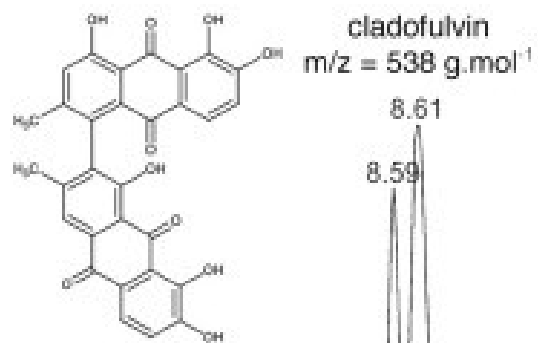
Comparative genomics analyses of necrotrophic and biotrophic fungi suggested that a biotrophic lifestyle is associated with loss of SM genes [2,6]. Indeed, *Blumeria graminis* and *Tuber melanosporum*,

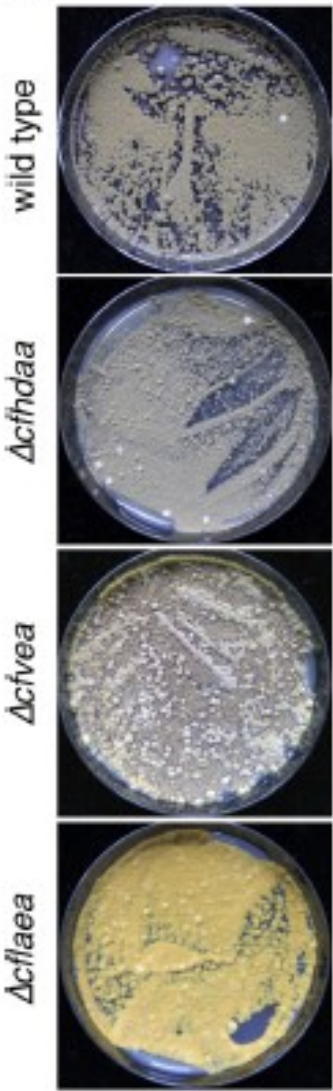
even lower during colonization of tomato, including expression of *PKS6*. This gene is highly expressed again when the fungus starts to produce conidiophores and sporulates on the leaf surface. Induction of gene expression at this stage suggests a role for the corresponding SM in survival of the fungus outside its host plant. In accordance with the expression data, only one major compound could be detected and no phytotoxic activity could be observed for SM extracts. Altogether, these data suggest that most SM biosynthetic pathways in *C. fulvum* are cryptic and that low expression and down-regulation of SM gene clusters during infection of its host might be novel mechanisms associated with fungal biotrophy. In addition, pseudogenization appears to have inactivated several core genes and the dothistromin pathway in *C. fulvum* [12,41]. Likely, *C. fulvum*'s cryptic SM pathways are induced at specific stages of its lifecycle outside its host when the fungus has to survive on the leaf surface or as a saprophyte on dead tissues. Further research is required to determine which environmental or growth conditions can activate these cryptic pathways.

### Supporting Information

**File S1 Supporting information.** Fig. S1. Domain organization of *Cladosporium fulvum* polyketide synthases and non-ribosomal peptide synthetases. Fig. S2. Phylogenetic analysis of *Cladosporium fulvum* PKS and hybrid PKS-NRPS enzymes. Fig. S3. Locus organization of polyketide synthase and hybrid genes in the *Cladosporium fulvum* genome. Fig. S4. Locus organization of non-ribosomal peptide synthetase genes in the *Cladosporium fulvum* genome. Fig. S5. Localization of secondary metabolism genes on chromosomes of *Cladosporium fulvum*. Fig. S6. Expression profile of *Cladosporium fulvum* secondary metabolism functional core genes.

La biantraquinona cladofulvina, es un homodímero compuesto de dos restos nataloe-emodina unidos por un enlace aril-arilo, y es el único SM detectable producido por *Passalora fulva* (*Cladosporium fulvum*) durante el crecimiento en medios artificiales.





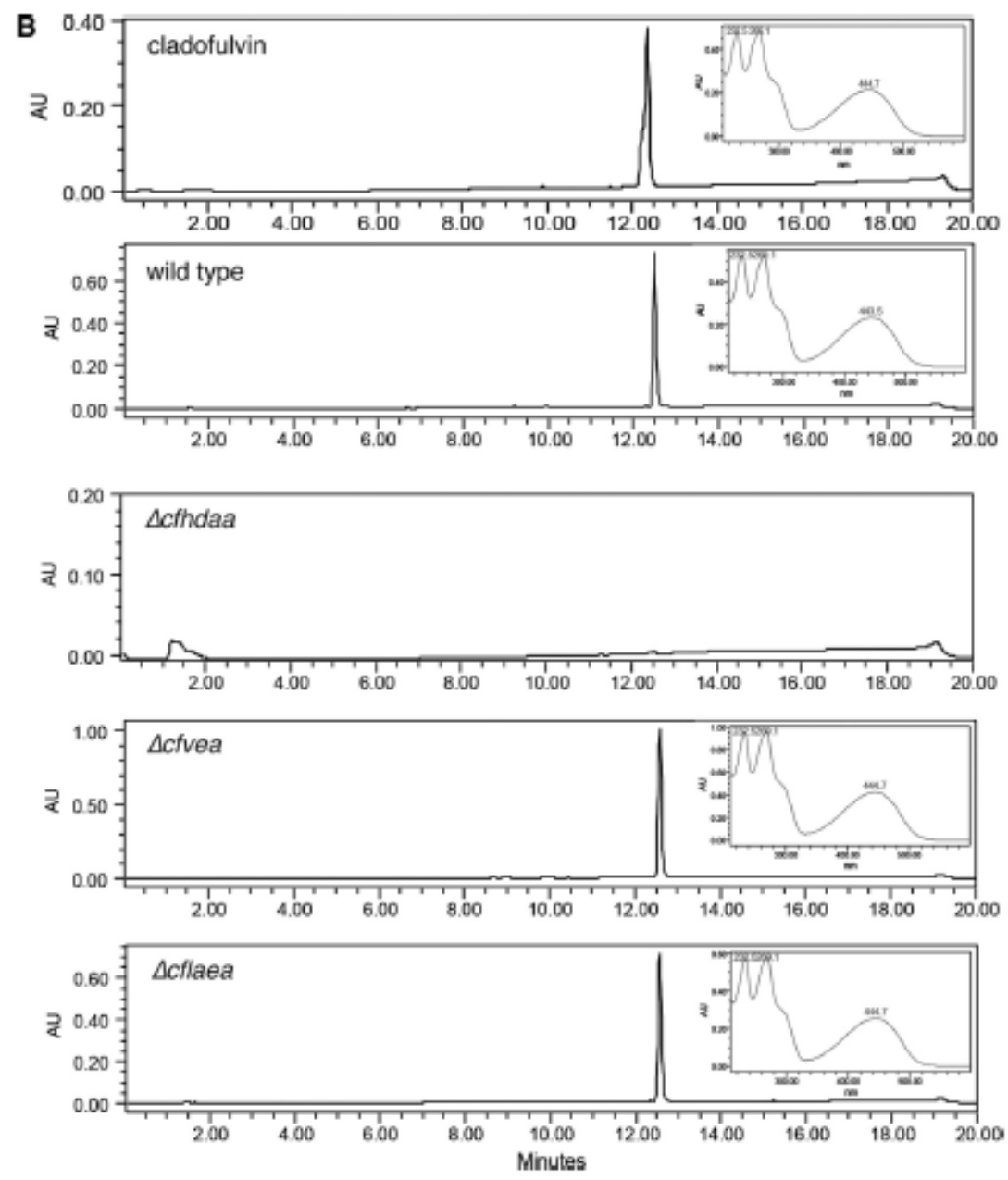
**Eliminación** de genes específicos que codifican reguladores globales de síntesis de Metabolitos 2<sup>da</sup>rios.

Reguladores

**HdaA:** deacetilasa de histonas. **Inductor de cladofulvina !!!!**

**VeA:** receptor de luz. Rol en discusión.

**LaeA:** enzima modificadora de cromatina. **Represor de cladofulvina**



Cladofulvina protege a los conidios contra la luz UV y el estrés por baja temperatura.



Rol del pigmento en la supervivencia del hongo frente al estrés abiótico.

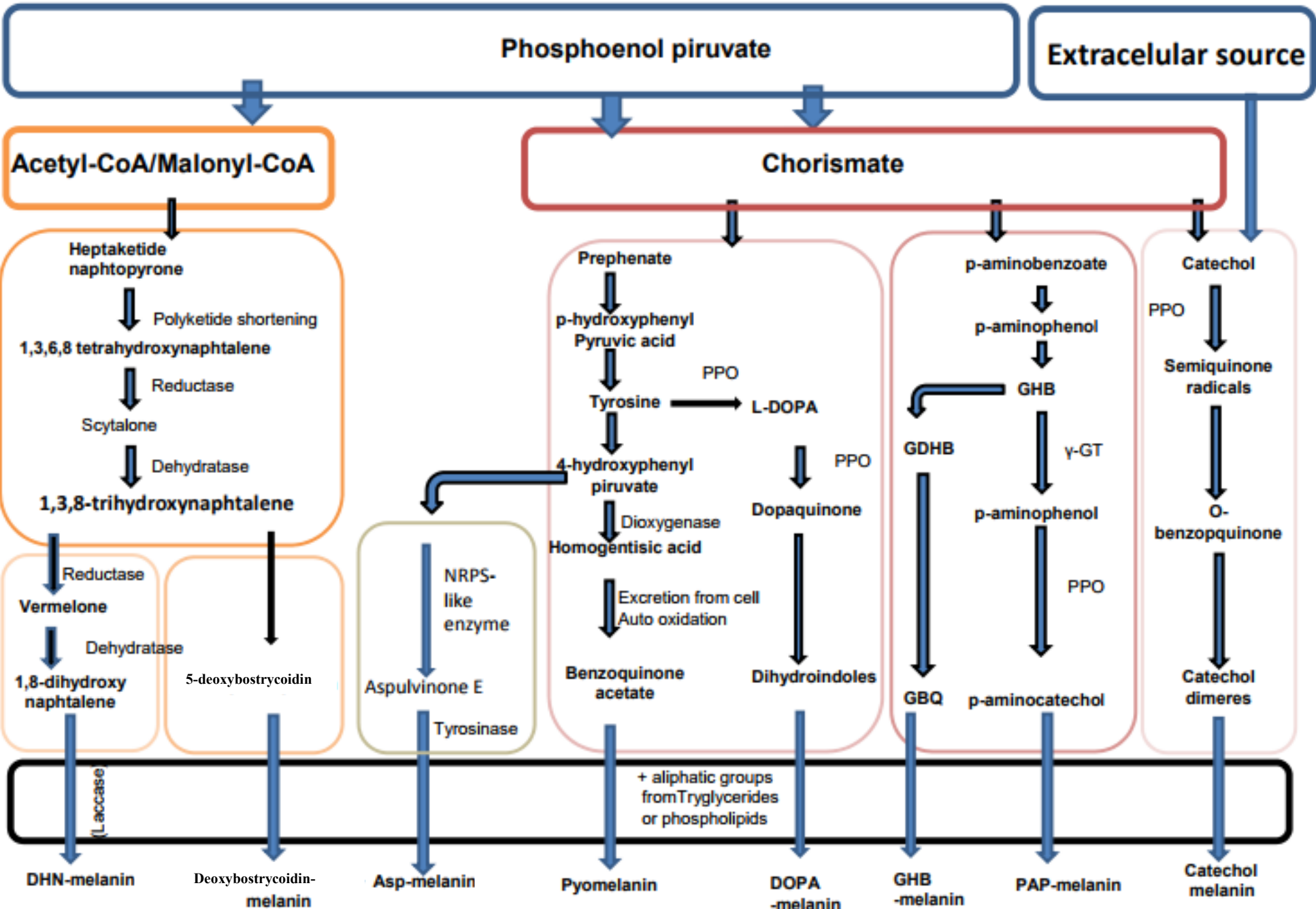


<b>Aislamiento</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Localidad*</b>	<b>Tipo de producción</b>
CIDEFI 300	Elpida	Los Hornos	Convencional bajo cubierta
CIDEFI 301	Elpida	Abasto	Orgánico bajo cubierta
CIDEFI 305	Colibrí	Arana	Convencional bajo cubierta
CIDEFI 307	Elpida	Corrientes	Convencional bajo cubierta
CIDEFI 308	Elpida	Los Hornos	Convencional bajo cubierta
CIDEFI 309	Elpida	Arana	Convencional bajo cubierta
CIDEFI 318	Elpida	Etcheverry	Convencional bajo cubierta
CIDEFI320	Keitor	Corrientes	Convencional bajo cubierta
CIDEFI 325	Elpida	Gorina	Convencional bajo cubierta
CIDEFI 326	Pantano	Abasto	Orgánico bajo cubierta
CIDEFI 327	Banano	Abasto	Orgánico bajo cubierta
CIDEFI 329	Banano	Abasto	Orgánico bajo cubierta
CIDEFI 330	Elpida	Los Hornos	Convencional bajo cubierta
CIDEFI 331	Elpida	Mar del Plata	Convencional bajo cubierta
CIDEFI 332	Elpida	Abasto	Orgánico bajo cubierta

**Aislamientos de *Cladosporium fulvum* estudiados.**\*Provincia de Buenos Aires (Argentina).

# Objetivo

Conocer la vía de síntesis de la melanina en el agente causante del moho de la hoja de tomate, *Cladosporium fulvum*.

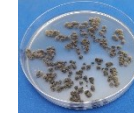


Tratamiento químico	Mecanismo de acción
Control (APG)	-
+ <b>Ácido kójico (5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona)</b>	<u>inhibidor</u> de tirosinasas involucradas en la síntesis de la <u>DOPA-melanina</u> mediante la quelación del ion cobre de estas enzimas.
+ <b>Triciclazole (5-metil-1,2,4-triazol (3,4) benzotiazol)</b>	<u>inhibidor</u> de reductasas involucradas en la síntesis de <u>DHN-melanina</u> .
+ <b>Sulcotriona (2-(2-cloro-4-metilbenzil)-ciclohexano-1,3-diona)</b>	<u>inhibidor</u> de 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasas. síntesis de <u>piomelaninas</u> .
+ <b>Dopa (dihidroxifenilalanina)</b>	<u>inductor</u> de <u>melanización</u>
+ <b>L-Tirosina</b>	<u>inductor</u> de <u>melanización</u> .
+ <b>Acido kójico + L-Tirosina</b>	?
+ <b>Sulcotriona + L-Tirosina</b>	?

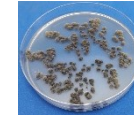
# Tratamiento químico

# Resultados

**Control (APG)**

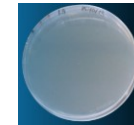


**+ Ácido kójico (5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona) 100 ppm**



**+ Triciclazole (5-metil-1,2,4-triazol (3,4) benzotiazol)**

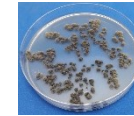
**100 ppm**



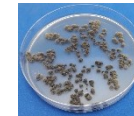
**50 ppm**



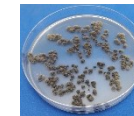
**+ Sulcotriona 100 ppm**



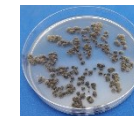
**+ L-Dopa 1mM**



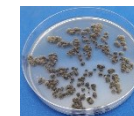
**+ L-Tirosina 10 mM**

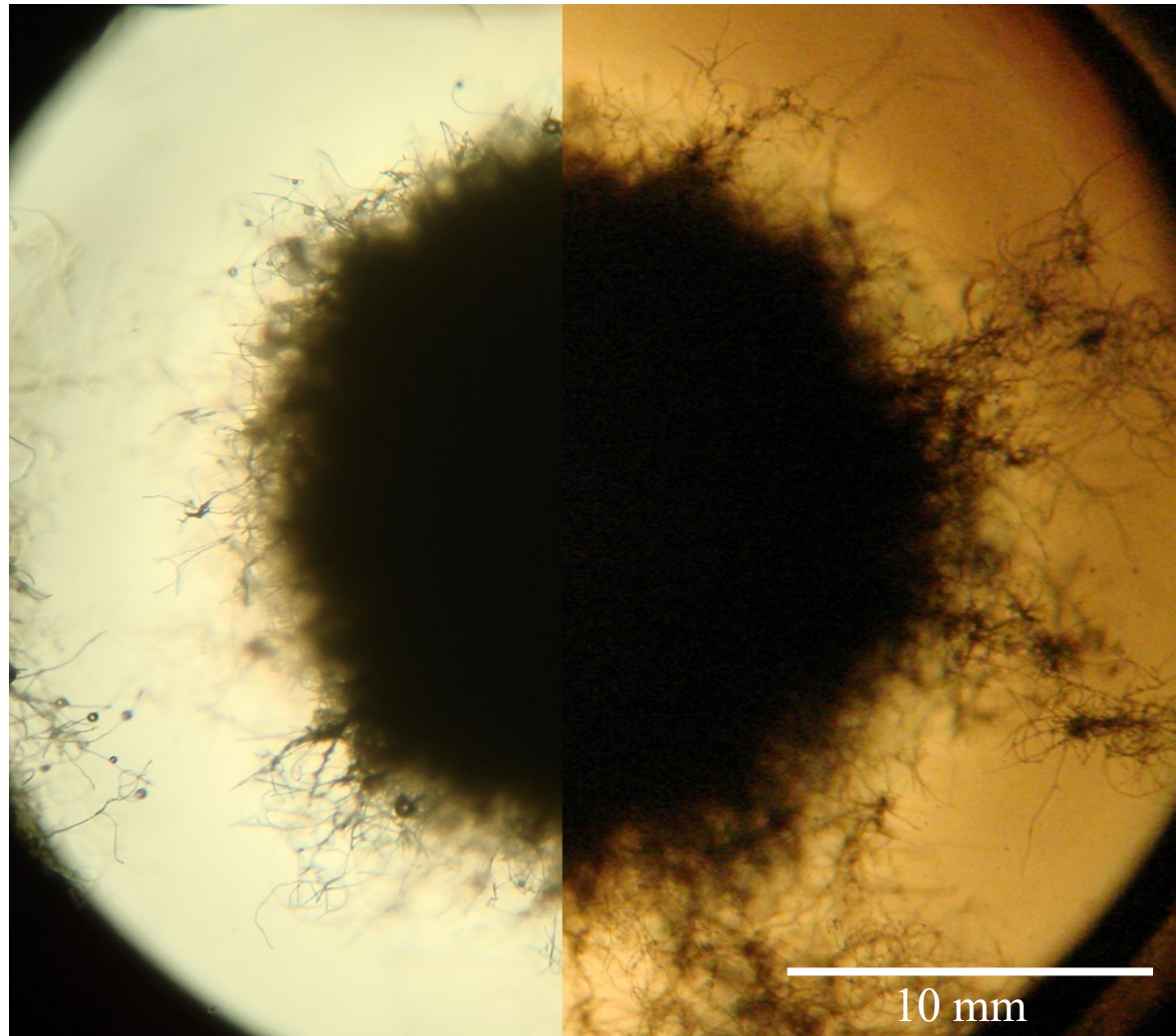


**+ Acido kójico + L-Tirosina**



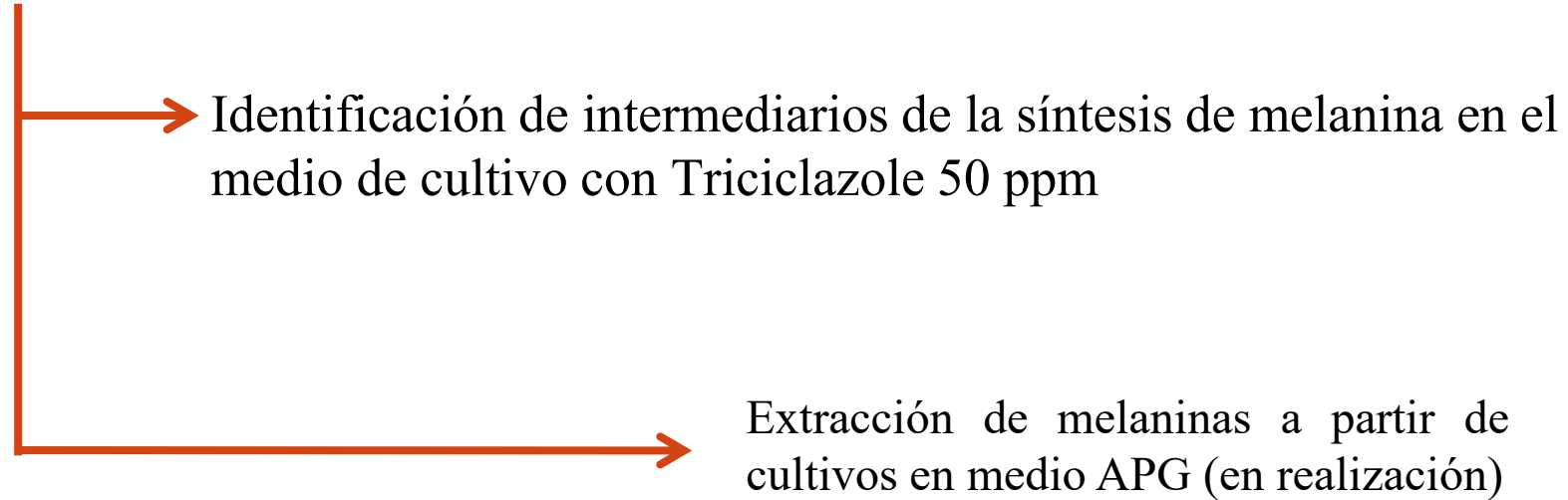
**+ Sulcotriona + L-Tirosina**





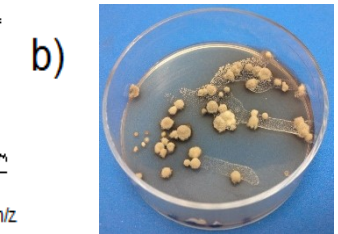
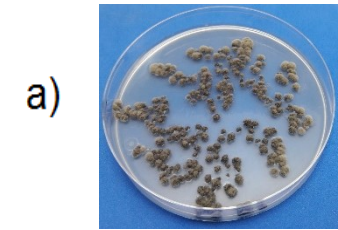
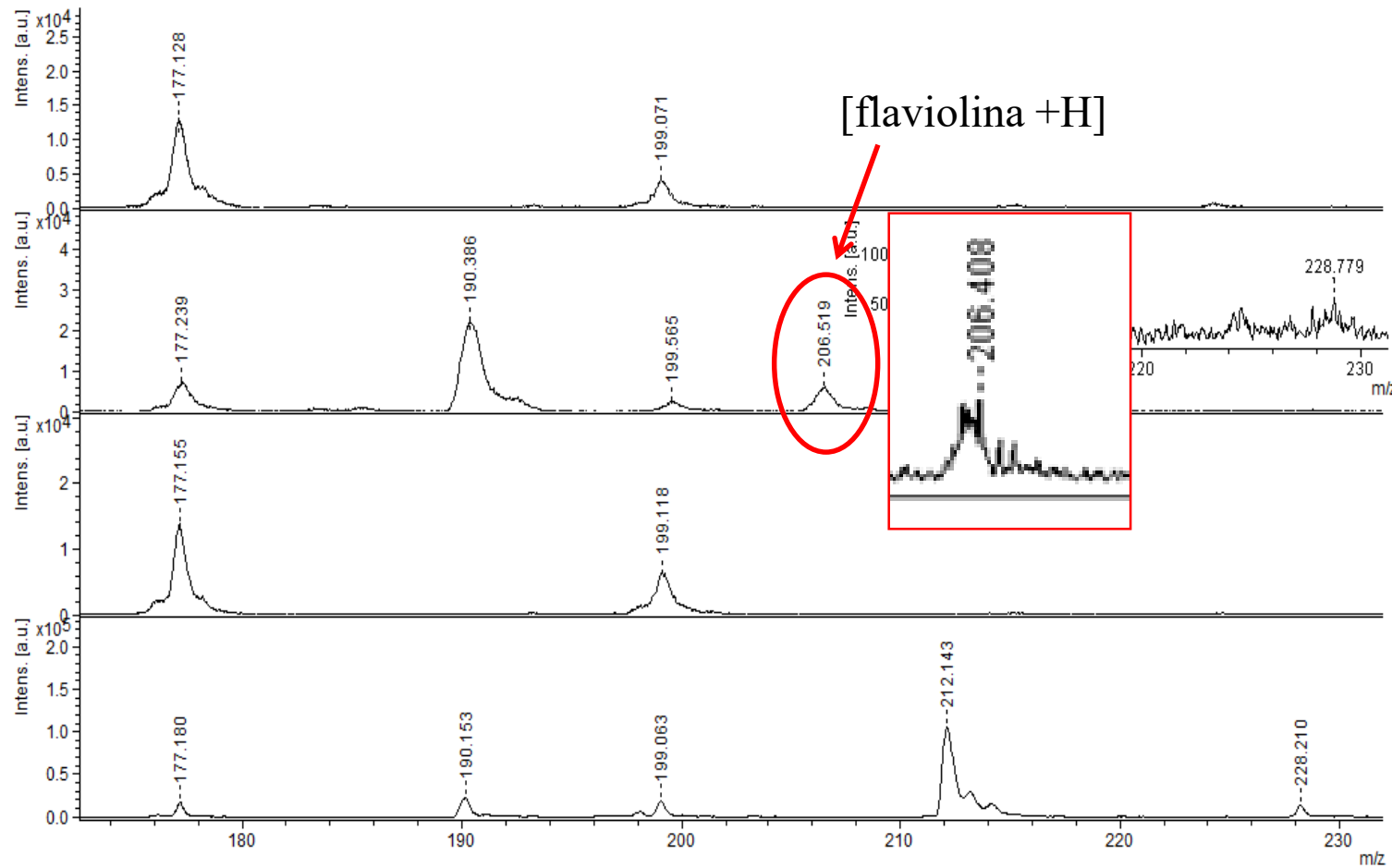
Vista reversa de una sección de colonia del aislamiento CIDEFI 300 desarrollada sobre medio APG (control; izquierda) y en presencia de Triciclazole 50 ppm (derecha).

## Estrategia de estudio



- UV-visible
- Fluorescencia
- RPE
- FTIR
- Carga de fenoles libres
- Actividad antioxidante y quelante

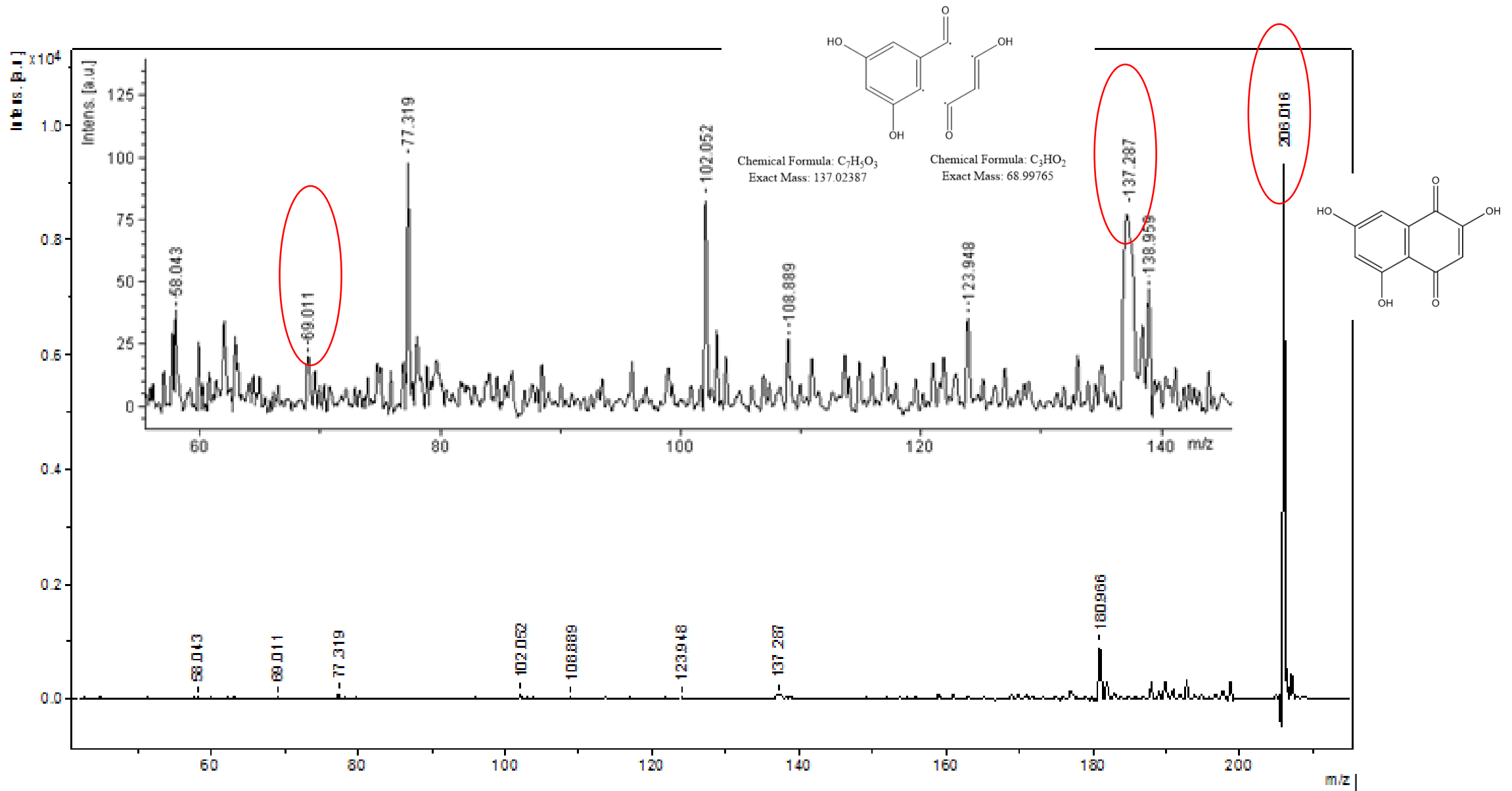
# Espectrometría de masas desorción/ionización de la matriz asistida por láser (UV-MALDI MS)



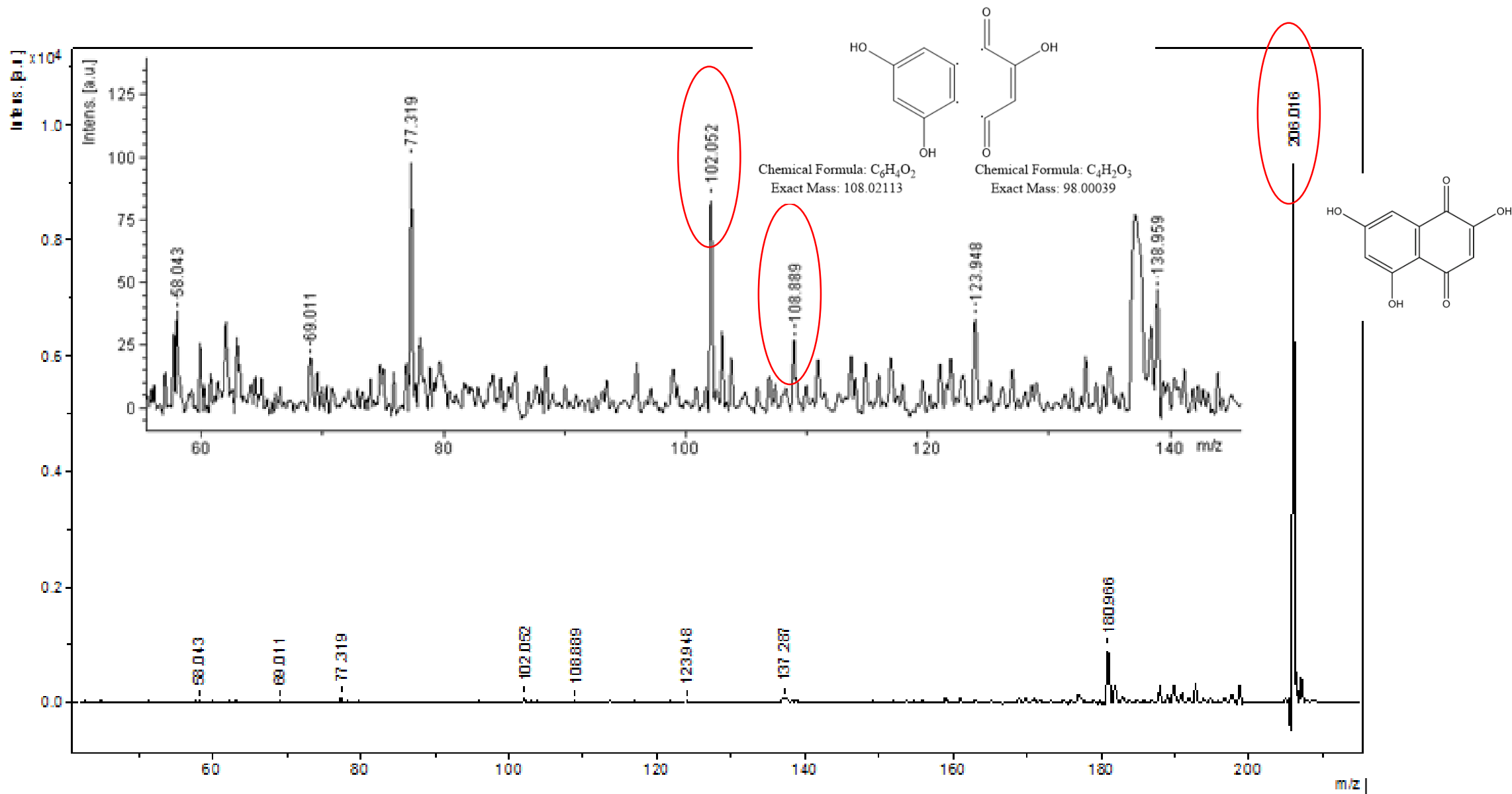
c) AG (matriz)

d) TRIC.

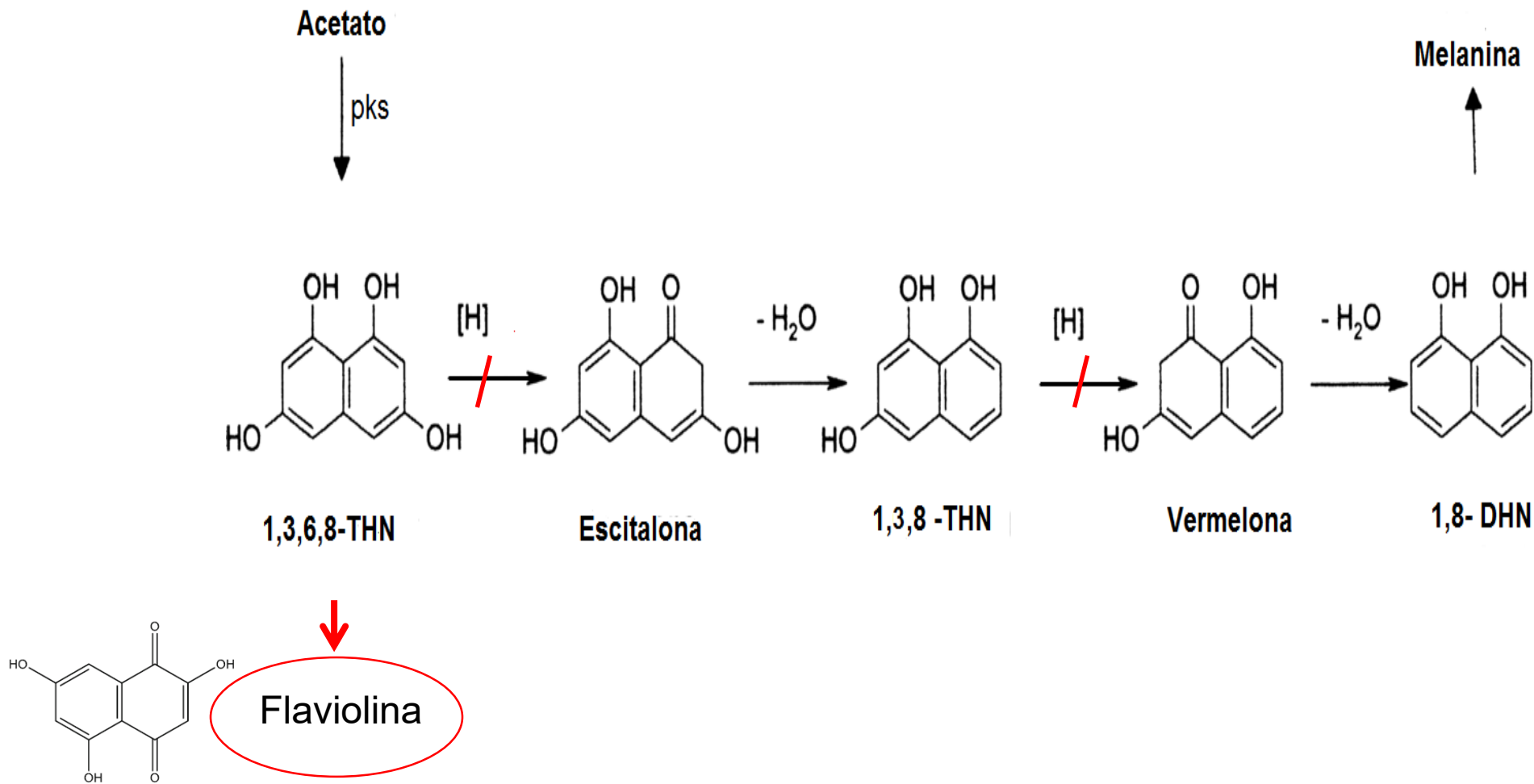
a) APG control; b) APG + TRIC, c) AG (matriz); d) TRIC.



**Fig S1.** MALDI- MS/MS spectrum of the signal at  $m/z$  206 obtained from ethylacetate extract corresponding to culture of 21 days old of the fungus grown on PDA supplemented with 100 ppm tricyclazole 24 h (see Fig. 2b). Inset: zoom between  $m/z$  region 55 and 145. Precursor ion,  $m/z$  206 [ $M^+$ , C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>]; fragments observed:  $m/z$  180, [ $M^+$ -26; C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>];  $m/z$  137 [ $M^+$ -69; C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>];  $m/z$  108 [ $M^+$ -98; C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>] and  $m/z$  69 [ $M^+$ -137; C<sub>3</sub>HO<sub>2</sub>].



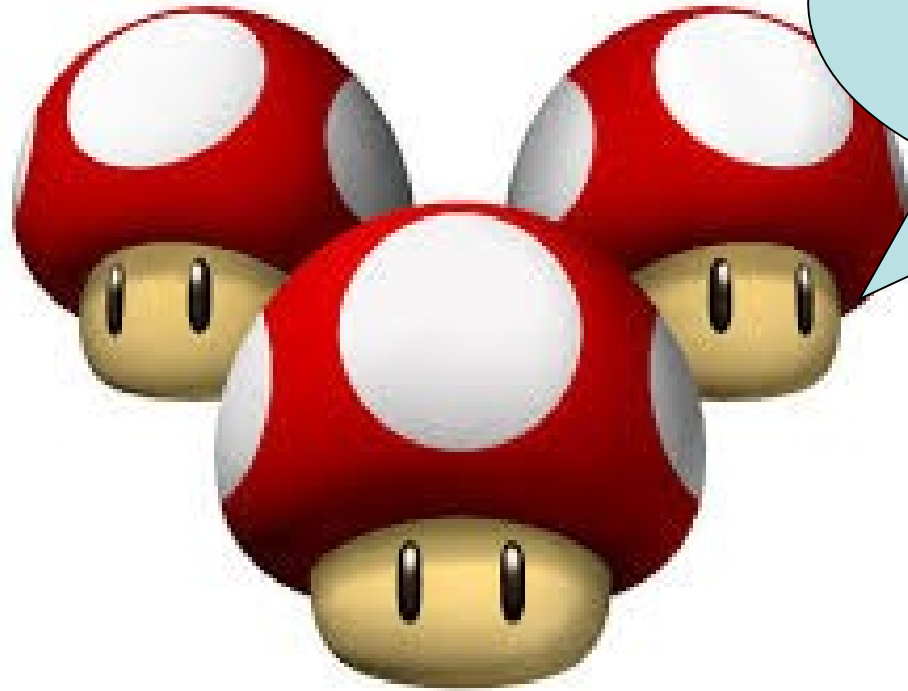
**Fig S1.** MALDI- MS/MS spectrum of the signal at  $m/z$  206 obtained from ethylacetate extract corresponding to culture of 21 days old of the fungus grown on PDA supplemented with 100 ppm tricyclazole 24 h (see Fig. 2b). Inset: zoom between  $m/z$  region 55 and 145. Precursor ion,  $m/z$  206 [ $M^+$ ,  $C_{10}H_6O_5$ ]; fragments observed:  $m/z$  180, [ $M^+$ -26;  $C_8H_4O_3$ ];  $m/z$  137 [ $M^+$ -69;  $C_7H_3O_3$ ];  $m/z$  108 [ $M^+$ -98;  $C_6H_4O_2$ ] and  $m/z$  69 [ $M^+$ -137;  $C_3HO_2$ ].



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

## CONCLUSIONES

- La identificación de flaviolina, un producto de autooxidación del 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno, un intermediario clave en la síntesis de melanina-DHN, solo en el medio extracelular de los cultivos agarizados del aislamiento CIDEFI 300 (Raza 2) suplementado con triciclazole 50 ppm comparado a cultivos control en medio APG sugieren la existencia de una ruta de síntesis de melanina involucrando dihidroxinaftalenos en *Cladosporium fulvum*.
- Esta información podría contribuir al desarrollo de nuevos fungicidas para controlar a este agente causante del moho de la hoja de tomate, una enfermedad presente en el cinturón hortícola platense (Argentina), a través del bloqueo de la síntesis de melanina DHN.



Gracias por su  
atención !!!!



([masaparrat@yahoo.com.ar](mailto:masaparrat@yahoo.com.ar))



Asociación Micológica  
Carlos Spegazzini



### **Asociación Civil - Personería Jurídica Resolución 335A-2010**

La Asociación tiene sede en Argentina y nuclea micólogos que realizan sus estudios sobre hongos principalmente en el Cono Sur Sudamericano.

**Actualmente somos 160 socios, vamos que podés ser el número 161!!!!!! Y así seguimos avanzando ...**

Para Asociarse a la AMCS , los interesados deben completar la ficha de inscripción (disponible al pie de <http://amcspegazzini.weebly.com>) y enviarla por correo electrónico a [amcspegazzini@gmail.com](mailto:amcspegazzini@gmail.com).



INICIO

INSTITUCIONAL

GRADO

POSGRADO

INVESTIGACIÓN

EXTENSIÓN

MUSEO



Secretaría de Postgrado

Carrera del Doctorado

Cursos y Actividades

Defensas de tesis

Maestría

Especializaciones

Posgrado > Cursos y Actividades > Actividades de postgrado a realizarse en la FCNyM



## Actividad de postgrado

A realizarse en la Facultad de Ciencias Naturales y Museo

### ¿POR QUÉ LOS HONGOS NEGROS? BIOLOGÍA DE LA PIGMENTACIÓN FÚNGICA: UN ENFOQUE FUNCIONAL

Dictado por:  
Saparrat, Mario Carlos Nazareno

Fecha: Del 06-11-2017 hasta 10-11-2017.

Horario: 9:00 a 11:00 y 12:00 a 16:00

Evaluación: Con Evaluación Final

Modalidad: presencial

Duración: 45 horas.

Cupo de teoría: 15 alumnos.

Cupo de práctica: 15 alumnos.

Arancel para alumnos internos: \$ 1125

Arancel para alumnos externos: \$ 1575

Otra información:

Curso de Postgrado dirigido a: micólogos, biólogos en general, ingenieros agrónomos, químicos orgánicos, médicos, bioquímicos, veterinarios.

La inscripción a nuestros cursos se realiza completando y enviando a [cursospostgrado@fcnym.unlp.edu.ar](mailto:cursospostgrado@fcnym.unlp.edu.ar) la Planilla de Inscripción descargable desde [AQUI](#)

El "arancel interno" se aplica a alumnos de la Carrera del Doctorado, Docentes y Graduados de la FCNyM.

Si usa el contacto presente en esta página, recuerde incorporar el nombre del curso por el que solicita información.

## Documentos

- Lineamientos para realizar propuestas de Cursos de Postgrado a desarrollarse en FCNyM
- Como llegar a FCNyM UNLP

## Enlaces

- Biblioteca Florentino Ameghino - FCNyM
- Webmail