

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Análisis proteómico de *Fusarium verticillioides* expuesto a la fracción antifúngica de *Jacquinia macrocarpa*

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

M. C. Daniel Fernando Valenzuela Cota

Hermosillo, Sonora

Enero de 2021

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Análisis proteómico y evaluación genómica de *Fusarium verticillioides* expuesto a la fracción antifúngica de *Jacquinia macrocarpa*

M. C. Daniel Fernando Valenzuela Cota



Dra. Ema Carina Rosas Burgos
Director de la tesis



Dra. Maribel Plascencia Jatomea
Miembro del comité de tesis



Dra. Oliviert Martínez Cruz
Miembro del comité de tesis

HERNANDEZ
GARCIA
FRANCISCA -
77503529S

Firmado digitalmente
por HERNANDEZ
GARCIA FRANCISCA -
77503529S
Fecha: 2021.01.26
08:30:54 +01'00'

Dra. Francisca Hernández García
Miembro del comité de tesis



Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui
Miembro del comité de tesis

Hermosillo, Sonora.

Enero de 2021

Hermosillo, Sonora a Enero de 2021.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada Análisis proteómico de *Fusarium verticillioides* expuesto a la fracción antifúngica de *Jacquinia macrocarpa*, en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de Doctor en Ciencias, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

A T E N T A M E N T E



LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA



M. C. Daniel Fernando Valenzuela Cota

AGRADECIMIENTO

A la Universidad de Sonora por permitirme desarrollar mi curiosidad científica durante estos cuatro años, así como a cada uno de los maestros que brindaron sus conocimientos, consejos y experiencias para seguir adelante día con día.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo por la beca proporcionada para realizar el estudio de posgrado.

Agradezco infinitamente a la Dra. Ema Carina Rosas Burgos por permitirme ser su estudiante. No tengo palabras para describir todo lo agradecido que estoy con usted. Siempre le estaré muy agradecido. Para usted mi cariño y admiración.

Al Proyecto CONACYT INFR-2015-01-251744- Infraestructura a cargo del Dr. José Ángel Huerta Ocampo. Gracias por su paciencia, y por tener siempre la mejor disposición y actitud para ayudar a realizar mi trabajo experimental. De verdad, muchas gracias por todo su apoyo.

A todos y a cada uno de los miembros de mi comité. Dra. Maribel Plascencia, Dra. Oliviert Martínez, Dra. Paqui, Dr. Cinco, gracias por su disposición, sus palabras y consejos durante los seminarios. Gracias por su ayuda y ser mis guías durante todo este tiempo. Sé que no fui el mejor alumno, pero siempre traté de dar lo mejor de mí.

A mi novia, Marlene Cota. Sin duda alguna uno de los pilares más importantes en mi vida. Gracias por todo tu apoyo y por siempre estar a mi lado. Te amo.

A todos y a cada uno de mis compañeros de laboratorio, Joel, Carolina, Daniela. Gracias por sus palabras, consejos y hacer cada día en el laboratorio divertido y ameno. A mis compañeros de generación, Raquel, Fátima, Lili, Mariela, Iván, Encinas. Les deseo el mejor de los éxitos. Al team zabrotes, Martha, Gerardo, Carolina, Alejandra, Elena. Por compartirme su amistad y su apoyo durante mi estancia en el CIAD.

DEDICATORIA

A mi familia

A mis padres, Fernando y María Isabel, por brindarme su cariño en todo momento. Por su apoyo incondicional a pesar de la distancia. Sin ustedes no sería la persona que soy. Los amo

A mis hermanos, Alejandro, Arturo y Guadalupe. Los quiero mucho. Siempre estaré para ustedes.

“A la cima no se llega superando a los demás, sino superándose a sí mismo”

CONTENIDO

CONTENIDO.....	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
INTRODUCCIÓN	1
REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	3
Contaminación del Maíz.....	3
<i>Fusarium verticillioides</i>	4
Control del desarrollo de <i>Fusarium verticillioides</i>	6
Alternativas al Uso de Antifúngicos Químico-Sintéticos.....	7
<i>Jacquinia macrocarpa</i>	9
Mecanismos de Acción de Antifúngicos Químico-Sintéticos.....	13
Respuesta Proteómica a Antifúngicos	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	18
Objetivo General	18
Objetivos Particulares	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Obtención de la Fracción Antifúngica de <i>Jacquinia macrocarpa</i>	19
Preparación de Extractos de Plantas.....	19
Cálculo de la Concentración Inhibitoria 50 (IC ₅₀)	19
Preparación del cultivo y Condiciones de Crecimiento	20
Extracción de Proteínas	20
Electroforesis bidimensional (2-DE).....	21
Análisis de Imagen.....	22
Digestión en gel y cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS)	22
Identificación y clasificación de proteínas	23
Análisis Estadístico	24
Determinación de la IC ₅₀	25
Identificación y clasificación de Proteínas Expresadas Diferencialmente	29
Proteínas del metabolismo de los aminoácidos	34
Proteínas del Metabolismo de los Carbohidratos	36
Proteínas de Plegamiento y Estabilización Proteica.....	38

Proteínas de Degradación de Proteica	39
Proteínas de Transporte	40
Proteínas de Respuesta al Estrés Oxidativo.....	41
Otras Proteínas.....	41
CONCLUSIONES.....	44
RECOMENDACIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	A) Microconidios de <i>Fusarium verticillioides</i> . B) Cultivo de <i>F. verticillioides</i> en Agar Papa Dextrosa C) Infección de <i>F. verticillioides</i> en Maíz.....	6
2	Mecanismos de acción de diferentes antifúngicos.....	8
3	Planta de <i>Jacquinia macrocarpa</i> (San Juanico).....	8
4	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium verticillioides</i> expuesto a la fracción antifúngica de <i>Jacquinia macrocarpa</i>	21
5	Crecimiento de la hifa de <i>F. verticillioides</i> en presencia y ausencia de la fracción de <i>Jacquinia macrocarpa</i>	22
6	Gel de electroforesis 2D de proteínas extraídas de <i>F. verticillioides</i> en presencia y ausencia de la fracción de <i>Jacquinia macrocarpa</i>	25
7	Clasificación funcional de proteínas diferencialmente acumuladas en <i>Fusarium verticillioides</i> expuesto a la fracción antifúngica de <i>Jacquinia macrocarpa</i>	29
8	Resumen de los efectos del extracto butanólico de <i>Jacquinia macrocarpa</i> sobre el perfil proteico de <i>Fusarium verticillioides</i> .	38

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Actividad antifúngica de extractos de plantas.....	12
2	Clasificación de antifúngicos por su sitio de acción en el hongo.....	14
3	Identificación de proteínas diferencialmente acumuladas de <i>F. verticillioides</i> expuesto al extracto butanólico de <i>Jacquinia macrocarpa</i>	26

RESUMEN

Fusarium verticillioides es un agente causante de la deterioración del maíz y su contaminación por micotoxinas. La aplicación indiscriminada de compuestos antifúngicos químico-sintéticos para el control de la infección por este hongo en el maíz, implica la generación y acumulación de residuos tóxicos, así como el desarrollo de cepas resistentes a los fungicidas. *Jacquinia macrocarpa* es una planta nativa del noroeste de México que tiene potencial inhibitorio contra *F. verticillioides*. Estudios previos muestran que la exposición a la fracción butanólica de *J. macrocarpa*, causan retraso y atrofia en el crecimiento micelial, sin embargo, el mecanismo para este hecho no está del todo claro. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue elucidar los cambios en la acumulación de proteínas en *F. verticillioides* expuesto a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*. Se realizó un enfoque de proteómica basada en gel 2DE utilizando tres repeticiones biológicas por condición. La electroforesis realizada a las proteínas extraídas de *F. verticillioides* expuesto a la fracción antifúngica, detectó más de 500 puntos reproducibles, 38 fueron acumulados diferencialmente por al menos dos veces (Anova $p < 0.05$), de las cuales 17 proteínas aumentaron su acumulación, mientras que 21 disminuyeron. Las proteínas identificadas están involucradas en el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, así como al transporte, degradación, plegamiento y estabilización de proteínas, respuesta al estrés oxidativo y actividades diversas. En general, las proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos aumentaron en abundancia, lo que sugiere una alta demanda de energía en el hongo. En contraste, las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, las proteasas y las proteínas críticas para el correcto plegamiento y estabilización proteica durante el estrés, disminuyeron su acumulación, sugiriendo que tales mecanismos son el objetivo de los compuestos responsables del efecto inhibitorio de la fracción butanólica. Los resultados obtenidos son de gran importancia para la elucidación del mecanismo de acción de la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*.

INTRODUCCIÓN

Fusarium verticillioides es un agente causante de la descomposición de la raíz, la podredumbre del tallo, la podredumbre de la mazorca y la contaminación por micotoxinas en el maíz (*Zea mays* L.) (Murillo-Williams y Munkvold, 2008). La aplicación indiscriminada de compuestos antifúngicos químico-sintéticos para el control de la infección por *F. verticillioides* en el maíz, implica la generación y acumulación de residuos tóxicos, así como el desarrollo de cepas resistentes a los fungicidas (Abdel-Monaim y col., 2011). Los extractos de plantas pueden ser una alternativa adecuada para el control de hongos, ya que son biodegradables, no fitotóxicos y muestran la misma capacidad inhibitoria que los antifúngicos químicos sintéticos (Bajpai y col., 2008; Tagne y col., 2013).

Los extractos de plantas de varias especies pertenecientes al género *Jacquinia* han mostrado capacidad antifúngica, un ejemplo de ello es la fracción butanólica de *Jacquinia macrocarpa*, la cual ha mostrado actividad antifúngica contra los fitopatógenos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasitiucs* y *Fusarium verticillioides* causando un retraso en el crecimiento de las hifas e inhibiendo la germinación de esporas (Valenzuela-Cota y col., 2014). Los mecanismos del efecto inhibitorio de la fracción butanólica de *J. macrocarpa* no se conocen bien. La investigación ha demostrado que el extracto daña las paredes celulares de las esporas y las hifas y que los compuestos responsables de tales daños son fitoesteroles como el γ -sitosterol y triterpenos como el betulinol (Valenzuela-Cota y col., 2019), determinados por cromatografía de gases/tiempo cuadrupolo- espectrometría de masas de vuelo.

Se ha demostrado que el enfoque proteómico comparativo es una herramienta de alto valor para obtener información sobre las respuestas de hongos fitopatógenos contra antifúngicos sintéticos, así como extractos de plantas que contienen compuestos bioactivos con actividad antifúngica (Hou y col., 2013; Sun y col., 2014; Fialho y col., 2016; Chen y col., 2018; Pandey y col., 2018; Li y col., 2019). Por otro lado, el análisis genómico también se puede utilizar para analizar el comportamiento de diferentes hongos en condiciones de estrés.

Por lo anterior, este estudio hace uso del enfoque proteómico basado en gel de dos dimensiones (2-DE) para caracterizar los cambios en la abundancia de proteínas en *F. verticillioides* expuestos a la fracción butanólica de *J. macrocarpa*, para comprender mejor el mecanismo de acción para la inhibición fúngica de este extracto de planta.

REVISION BIBLIOGRÁFICA

Cultivo del Maíz

La planta del maíz (*Zea mays* L.) es nativa de México que actualmente se utiliza principalmente para la alimentación en humanos y ganado en todo el mundo, además de aprovecharse sus derivados industrialmente (ASERCA, 2012). En México, el consumo de maíz generalmente es en forma de tortilla, donde se estima que aproximadamente el 90 % de la población lo considera como un alimento de primera necesidad (Cruz y Verdelet, 2007). Por lo anterior, México se considera uno de los principales consumidores de maíz en el mundo. La producción del 2020, considerando los ciclos agrícolas primavera-verano y otoño-invierno, tanto cultivo de riego como de temporal, fue de 21'885,170 toneladas (SIAP, 2021). Lo anterior representa un descenso de 5.1 % con respecto al ciclo agrícola 2018. Entre los principales estados productores de maíz, destacan Jalisco, Michoacán, México, Guanajuato y Chihuahua, donde se concentra más del 30 % de la producción nacional, obteniendo un rendimiento promedio de 3.4 ton por hectárea (SIAP, 2020). La disminución de la producción puede ser influenciado principalmente por el clima (el maíz requiere una temperatura de 15 a 30 °C para su crecimiento) y los nutrientes, que son importantes para el crecimiento de la planta (Roveda, 2007). Además, los hongos fitopatógenos también contribuyen a la disminución de la producción porque causen grandes pérdidas durante el cultivo, siendo el género *Fusarium* uno de los hongos más importantes (Roncero y col., 2003).

Contaminación del Maíz

En los últimos años, las infecciones y enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en el maíz durante su cultivo han ido en aumento, provocando pérdidas económicas en la agricultura y en la industria alimentaria (Kumar y col., 2016; Aqueveque y col., 2017). Entre los diferentes hongos que afectan al maíz durante su cultivo, se encuentran los hongos del género *Phytium*, *Botryodiploia*, *Gibberella* y *Fusarium* como los principales en la pudrición del tallo. Los

principales hongos en la pudrición de la mazorca son los del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, reportando pérdidas que oscilan entre el 5 % al 20 % de la producción mundial y más de 300 metabolitos que son tóxicos para seres vivos (Galvano y col., 2001; Taba, 2004). Además, si se considera la presencia de otras plagas y enfermedades, o factores abióticos, entre ellos la temperatura y el volumen, la calidad del grano disminuye aún más (Moreno y González, 2011).

Las especies de *Fusarium* causan importantes pérdidas económicas debido a que provocan una gran variedad de enfermedades en diversos cultivos en todo el mundo (Villa-Martínez y col., 2015). En México, la especie *Fusarium oxysporum* causa pérdidas del 10 % al 50 % del cultivo de papa, y no hay condiciones ambientales descritas que limiten su desarrollo (Senasica, 2012). Otras especies, como *Fusarium solani*, se ha reportado en la marchitez del chile, siendo uno de los principales agentes causantes de este padecimiento desde los años sesenta (Jiménez y col., 2009). Por su parte, *Fusarium verticillioides*, ha captado la atención debido a la amplia distribución, especialmente en zonas tropicales y subtropicales, además de su gran resistencia y capacidad toxigénica (De la Torre y col., 2014). *F. verticillioides* es productor de toxinas, llamadas fumonisinas, que afectan la salud humana y animal, causando cáncer de esófago y defectos en el tubo neural en recién nacidos, y en animales, leuco encefalomalacia equina y edema pulmonar porcina (Logrieco y col., 1990; Li y col., 2001; Rico-Sole, 2012).

Fusarium verticillioides

Fusarium verticillioides es hongo ascomiceto que pertenece a la subdivisión Deuteromycota, en donde se incluyen hongos a los que no se les ha reportado una fase sexual o en muy escasas ocasiones (Deacon, 1997). *F. verticillioides* se clasifican dentro de esta última categoría porque puede presentar una fase sexual la cual se denomina teleomorfo, pero muy pocas veces se encuentra en la naturaleza y es difícil observar *in vitro*. El apareamiento sucede entre colonia de diferentes grupos. Cuando se reproduce asexualmente (el estado anamorfo), se producen muchas microconidias (Figura 1A).

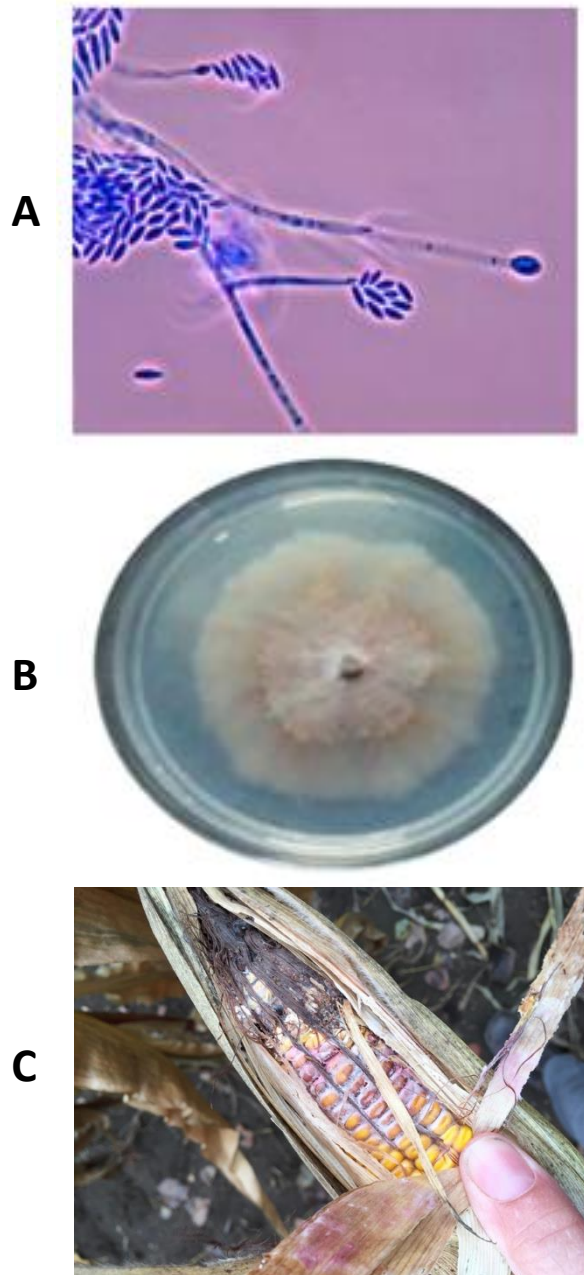


Figura. 1. A) Microconidios de *Fusarium verticillioides* (CDC, 1978). B) Cultivo de *F. verticillioides* en Agar Papa Dextrosa C) Infección de *F. verticillioides* en Maíz (Alltech, 2019).

tiene forma de pie (Warham y col. 1996). Las características morfológicas coloniales de *F. verticillioides* puede variar dependiendo del medio de cultivo en que crece, por ejemplo, en agar papa dextrosa el micelio es algodonoso en el cultivo, frecuentemente de tinte rosa, púrpura o amarillo (Figura 1B; de la Torre-Hernández y col. 2014). Los macroconidios son de pared delgada con una célula basal en forma de pie y una célula apical alargada.

F. verticillioides genera pérdida de calidad en las semillas de maíz, así como la pudrición y muerte de las plántulas infectadas (Villa-Martínez y col., 2015). Puede ingresar al maíz sistemáticamente desde las semillas, o a través de heridas provocadas por insectos, la infección de este patógeno se caracteriza por la decoloración de color blanco a lavanda en granos de maíz (Figura 1C); producción de fumonisina B1 y fumonisina B2 durante la invasión en el maíz y durante su crecimiento saprófito (Bacon y col., 2001). Lo anterior, representa uno de los problemas fitosanitarios más importantes a nivel mundial, ya que *F. verticillioides* es uno de los hongos con mayor reporte de incidencia en la contaminación de maíz (de la Torre-Hernández, 2014). Entre las metodologías más empleadas para el control de *F. verticillioides* está la aplicación de fungicidas en la semilla de maíz, proporcionándole la protección desde que se lleva a cabo la siembra hasta las primeras etapas de desarrollo en las plántulas (Alezones y Gonzales, 2009).

Control del desarrollo de *Fusarium verticillioides*

Por muchos años, una gran variedad de diferentes compuestos químicos sintéticos se ha utilizado para inhibir a hongos fitopatógenos (Jiménez-Reyes, 2019). Para evitar la presencia de *F. verticillioides* durante el cultivo o en el almacenamiento del maíz, se utilizan antifúngicos sistémicos como los benzimidazoles (Agrios, 2005). Dentro de los fungicidas del grupo de los benzimidazoles se encuentra el benomilo y el carbendazim, que son los fungicidas más efectivos en el desarrollo de diferentes tipos de hongos fitopatógenos (Llorent-Martínez y col., 2012). Se sabe que ambos actúan en la mitosis y la división celular en hongos, teniendo efectos inhibitorios en la

polimerización de la tubulina a los microtúbulos, provocando una serie de fallos en el montaje de los microtúbulos al huso, provoca la alteración cromosómica en la placa metafásica y pérdida de cromátidas (Koo y col., 2009). Otros fungicidas utilizados contra el desarrollo de *F. verticillioides* son los de grupo de los triazoles y equinocandinas, los cuales actúan inhibiendo la enzima 14 α -lanosterol desmetilasa, previniendo la formación de zimosterol, el cual es un precursor del ergosterol e inhibiendo la síntesis de β -glucano, respectivamente (Figura 2). Ambos grupos, provocan que la membrana pierda integridad y el crecimiento fúngico sea limitado (Marí y col., 2013).

Si bien, los fungicidas antes mencionados tienen un alto efecto de inhibición sobre los hongos fitopatógenos, suelen generar residuos que son tóxicos para los seres vivos, además promueven la aparición de cepas resistentes (Al-Hatmi y col., 2016). Por ello, al desarrollar fármacos nuevos, se debe tener en cuenta su estructura y la relación con su función para poder asegurar la muerte del hongo sin provocar graves daños al organismo hospedero, en este caso el maíz (Gregorí, 2005). Además, si bien estos fungicidas tienen un efecto positivo en la inhibición del crecimiento del hongo, estudios demuestran que el control en la producción de toxinas no es tan eficiente como parece, ya que, en algunas condiciones, se induce la síntesis de micotoxinas (Mamza y col., 2008; Edwards y Godley, 2010).

Alternativas al Uso de Antifúngicos Químico-Sintéticos

Los compuestos naturales, tales como el extracto de planta, ya sea como compuestos puros o como extractos estandarizados, proporcionan oportunidades ilimitadas para el control del crecimiento microbiano debido a su diversidad química (Roselló y col., 2015). Además, dichos compuestos presentan baja fitotoxicidad y una alta biodegradabilidad (Talibi, 2012). Por esto, una gran cantidad de plantas se utilizan para diferentes áreas de la salud humana, tales como la medicina tradicional, alimentos funcionales, etcétera (Sloan, 2007). Así mismo, recientes estudios han mostrado que la actividad

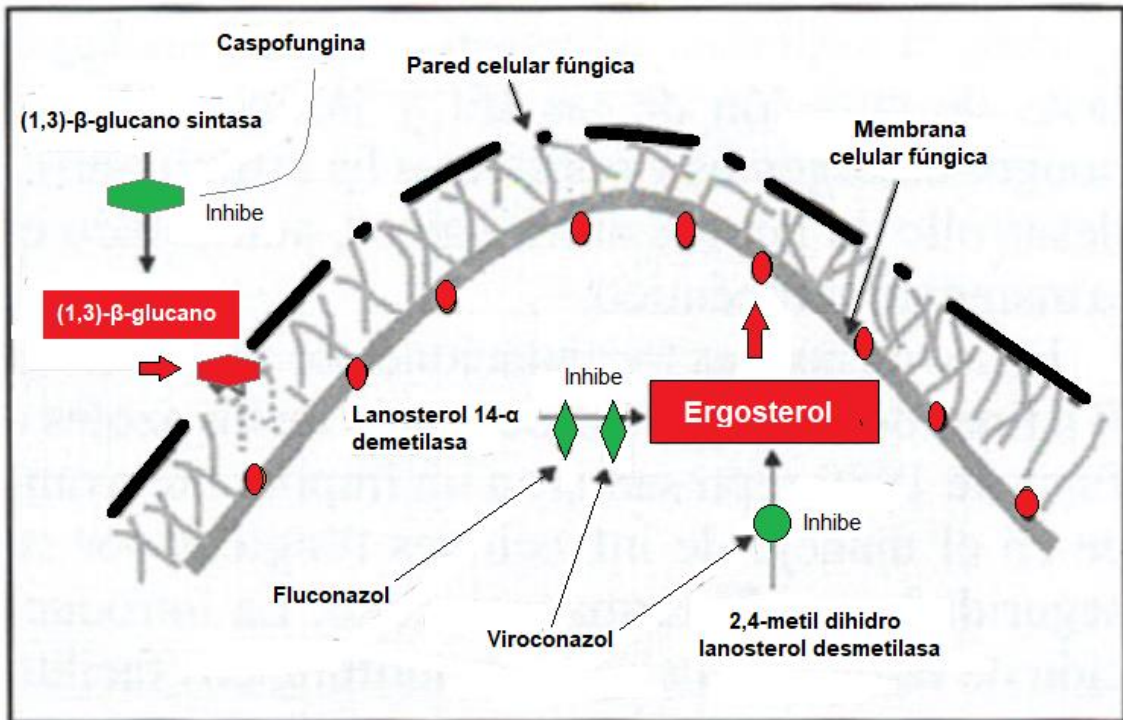


Figura. 2. Mecanismos de acción de diferentes antifúngicos. Adaptado de Bidart (2004).

antimicrobiana de plantas medicinales se atribuye a la presencia y actividad sinérgica de los diferentes compuestos bioactivos (Manilal y col., 2015).

Existen una gran variedad de estudios de plantas con actividad antifúngica, que abordan desde el retardo de la germinación de la espora y el crecimiento micelial hasta la inhibición por completo del desarrollo fúngico (Tabla 1). Suárez-Jimenez y col. (2007), observaron que los extractos metanólicos de *Baccharis glutinosa* y *Larrea tridentata* tienen una alta inhibición sobre la germinación de la espora *F. verticillioides*. Además, un estudio realizado por Rosas-Burgos y col. (2009), mostraron que el extracto de *B. glutinosa* particionado con acetato de etilo inhibió por completo el crecimiento de *F. verticillioides*, mientras que para *A. parasiticus* y *A. flavus*, la inhibición fue del 70 %. Lo anterior, demuestra que realmente existen compuestos de plantas que pueden inhibir el desarrollo de diferentes hongos fitopatógenos, por lo que dichos compuestos pueden ser tomados en cuenta como antifúngicos potenciales.

Jacquinia macrocarpa

Jacquinia macrocarpa, una planta nativa del noroeste de México, que pertenece a la familia Theophrastaceae y es utilizada en la medicina tradicional en grupos étnicos en el noroeste de México, preparando té de las flores de la planta para fortalecer el corazón (Moreno-Salazar y col., 2008; Frías-Escalante y col., 2015). Es un arbusto o árbol de hoja perenne, corteza de color gris liza y de tronco y tallos gruesos. Las hojas son estrechas y puntiagudas, con bordes oscuros y de color verde (Figura 3).

Se ha demostrado que una fracción butanólica obtenida de un extracto metanólico de *J. macrocarpa* tiene la capacidad de inhibir a hongos fitopatógenos del maíz como *A. flavus*, *A. parasiticus* y *F. verticillioides* (Valenzuela-Cota y col. 2014). Los compuestos presentes en la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* incluyen una gran variedad de sustancias o compuestos con diferentes estructuras, destacando γ -sitosterol, β -sitosterol, estigmasterol y betulinol, como los causantes del efecto antifúngico (Valenzuela-Cota y col., 2019). La actividad antimicrobiana de estos compuestos ya ha sido demostrada, por lo que se

Tabla 1. Actividad antifúngica de extractos de plantas

Especie de planta	Nombre común	Microorganismo	Resultado	Autor
<i>Parastrephia quadrangularis</i>	Tola o tola'	<i>Fusarium verticillioides</i>	Daño en la pared y membrana celular	Di Ciaccio y col. (2018)
<i>Momordica charantia</i>	Melón amargo	<i>Fusarium solani</i>	Inhibición del crecimiento micelial	Wang y col. (2016)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Aloe vera</i> y <i>Allium sativum</i>	Paloduz, sábila y ajo	<i>F. guttiforme</i>	Inhibición del crecimiento micelial	Sales y col. (2015)
<i>Jacquinia macrocarpa</i>	San Juanico	<i>Fusarium verticillioides</i>	Retardo en la germinación de la espora y crecimiento micelial	Valenzuela-Cota y col. (2014)
<i>Bacharis glutinosa</i>	Batamote	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Aspergillus flavus</i> y <i>A. parasiticus</i>	Inhibición del crecimiento radial	Rosas-Burgos y col. (2009)
<i>Azardiachta indica</i> , <i>Artemissia annua</i> , <i>Rheum emodi</i> y <i>Eucalyptus globulus</i>	Nimbo de la india, artemisa dulce, ruibarbo el Himalaya y eucalipto	<i>Fusarium solani</i>	Inhibición el crecimiento radial	Joseph y col. (2008)
<i>Allium sativum</i> y <i>Curcuma longa</i>	Ajo y cúrcuma	<i>Camellia sinensis</i>	Inhibición en la germinación de esporas	Saha y col. (2005)



Figura 3. Planta de *Jacquinia macrocarpa* (San Juanico)

deduce que los mecanismos de acción antifúngica pueden ser varios. La fracción antifúngica obtenida de esta planta ha demostrado inhibir la enzima β -1,3 glucanasa, responsable del del ensamblaje del glucano en la pared celular, así como por tener actividad quitinasa, lo que trae consigo que se produzcan malformaciones en las esporas e hifas del hongo (Buitimea-Cantúa, 2013). Lo anterior, sugiere que los compuestos del extracto inhibieron primeramente a la actividad β -1,3 glucanasa, afectando la síntesis de β -1,3 glucano, causando una pared celular defectuosa y, por consiguiente, los extractos pudieron llegar a la quitina a través de dichos defectos e hidrolizarla, causando el retraso en el crecimiento de *F. verticillioides*. También se ha reportado que la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* puede promover la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno e inhibir la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa fúngica (Valenzuela-Cota y col., 2019). Sin embargo, aún se requieren de más estudios que ayuden a establecer con más precisión y certidumbre los mecanismos involucrados en la capacidad antifúngica de extractos acuosos y de extractos obtenidos a partir de solventes.

El mecanismo bioquímico de acción de la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* no está bien definido aún, la comprensión de dicho mecanismo no sólo es útil para la creación de nuevos plaguicidas, sino que es útil para la correcta aplicación del fungicida en el campo (Cobb, 2000).

Análisis Proteómico

En los últimos años, el análisis proteómico ha demostrado ser un potente método para estudiar las variaciones en los perfiles de expresión de proteínas en respuesta al medio ambiente en donde se encuentra los microorganismos, como bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Texeira y col., 2005). Al igual que la genómica y la transcriptómica, la proteómica ha evolucionado para incorporar técnicas de alto rendimiento y protocolos que permiten un análisis más rápido de un gran número de proteínas (Washburn y col., 2001).

La proteómica puede definirse como la ciencia encargada de diferentes herramientas de biología molecular, bioquímica y bioinformática para el análisis

de la estructura, función e interacciones de las proteínas de una unidad biológica (Graves y Haystead, 2002). El análisis proteómico, involucra la extracción y purificación de las proteínas, seguido de la separación de estas, ya sea por métodos donde se utilicen geles o métodos libres de geles. Posteriormente, las proteínas (péptidos) son analizados por espectrometría de masas para finalizar con un análisis bioinformático que permite la identificación la de proteína de interés (Ruiz y col., 2016).

En la actualidad existen muchos estudios donde se utilizan estos tipos de herramientas. Sin embargo, la mayoría son enfocados a hongos patógenos en humanos (Vödisch y col., 2009; Hoehamer y col., 2010; Kniemeyer y col., 2011; Sorgo y col., 2011; Gautam, y col., 2016; Amarsaikhan, 2017). Dichos estudios contribuyen, por un lado, con un análisis de cuáles podrían ser los sitios claves o dianas de acción por parte de los fungicidas que se pretendan desarrollar y así inhibir el desarrollo del hongo. Por otro lado, contribuyen con la identificación de genes/proteínas que pudieran activarse/sintetizarse para lograr convertirse en una cepa resistente al fungicida en cuestión (Van Der Linden y col., 2013).

Mecanismos de Acción de Antifúngicos Químico-Sintéticos

Es sabido que antifúngicos utilizados comercialmente emplean un mecanismo de acción en particular (Tabla 2). Por ejemplo, carbendazim impide el desarrollo de las hifas y el crecimiento micelial por la intervención de la biosíntesis del ADN cuando se lleva a cabo la mitosis, lo que ha proporcionado un excelente control en el desarrollo de una gran variedad de hongos. Sin embargo, en los últimos años se ha reportado la resistencia a carbendazim en poblaciones de hongos, incluido algunos del género *Fusarium* (Hou y col., 2013). Por otro lado, los compuestos azólicos son los que se utilizan principalmente para tratar infecciones por algunas especies de *Aspergillus*, estos compuestos inhiben la enzima lanosterol 14 α -desmetilasa, una enzima clave en la producción de ergosterol, el cual es forma parte esencial de la membrana celular en hongos. Al igual que el carbendazim, en algunos países se han reportado cepas de *Aspergillus* resistentes a los fungicidas azólicos (Patterson y Strek, 2014). Lo anterior,

Tabla 2. Clasificación de antifúngicos por su sitio de acción en el hongo.

	Familia/antifúngico	Mecanismo de acción	Espectro de actividad
Interactuando con la membrana	<ul style="list-style-type: none"> • Polienos <ul style="list-style-type: none"> ○ Nistatina ○ Anfotericina B 	<ul style="list-style-type: none"> • Formación de poros por unión al ergosterol 	<i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. nidulans</i>),
	<ul style="list-style-type: none"> • Azoles <ul style="list-style-type: none"> ○ Imidazoles ○ Triazoles 	<ul style="list-style-type: none"> • Impide de síntesis de ergosterol por inactivación de la enzima lanosterol - α-dimetilasa 	<i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Candida</i> spp., <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> y
	<ul style="list-style-type: none"> • Alilaminas <ul style="list-style-type: none"> ○ Terbinafina 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición del ergosterol por la inactivación de la enzima escualeno epoxidasa 	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Interactuando con la pared celular	<ul style="list-style-type: none"> • Lipopéptidos <ul style="list-style-type: none"> ○ Equinocandinas ○ Triterpenos glicosilados 	Inhibición de la síntesis de glucanos por la inhibición de la enzima 1,3 β -glucano sintasa	<i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Coccidioides immitis</i> y <i>Blastomyces dermatitidis</i>
Interactuando en el núcleo	<ul style="list-style-type: none"> • Antimetabolitos <ul style="list-style-type: none"> ○ Fluocitosina o 5-fluorocitosina • Agentes misceláneos • Griseofulvin 	<ul style="list-style-type: none"> • Impide la síntesis de proteína por la incorporación de 5-fluoroacil al ARN • Inhibición de la mitosis por la destrucción del huso mitótico 	<i>Cándida albicans</i> y <i>Cryptococcus neoformans</i> . Algunas cepas de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> son sensibles

Respuesta Proteómica a Antifúngicos

La resistencia involucra un gran número de estrategias por parte del hongo, como la activación de genes y síntesis de proteínas durante la interacción con el antifúngico (Liu y col., 2010; Shishodia y col., 2019). Gautman y col. (2016), expusieron a *Aspergillus fumigatus* con itraconazol e identificaron 54 proteínas expresadas diferencialmente, las cuales estaban involucradas en el metabolismo del carbono, ciclo de Krebs, glucólisis y estrés celular. Algunas de las proteínas identificadas son nucleótido fosfato cinasa, proteína de choque térmico 70, AspF22 y malato deshidrogenasa. Se reporta que estas enzimas, interactúan con la calcineurina, una proteína que es dependiente de calcio, que posee un papel importante para controlar la morfología celular y la virulencia en hongos (Stie y Fox, 2008).

También, Hou y col. (2013), observaron e identificaron la acumulación de 38 proteínas cuantitativamente diferentes en *Fusarium graminearum* cuando fue expuesto al fungicida JS399-19. Estas proteínas están involucradas en el metabolismo energético, síntesis y transporte de proteínas y DNA, indicando que dicho antifúngico afecta las proteínas relacionadas con los procesos fisiológicos. Una de las proteínas identificadas, es piruvato cinasa, donde se detectó una disminución en cuanto a su acumulación, por lo que se sugiere que existe una inhibición o una actividad de la glicólisis y ciclo de Krebs menor a las condiciones normales. Esto debido a que piruvato cinasa cataliza el paso final de la glucólisis, la conversión de fosfofenolpiruvato a piruvato, en donde se genera una molécula de ATP, por lo que la ausencia o la disminución de esta enzima, produce una disminución en la energía. Fenilalanil-ARNt sintetasa, es otra enzima identificada, la cual participa en el proceso de traducción de la proteína. La baja cantidad de esta enzima podría inhibir la síntesis de proteínas o provocar que la traducción se lleve a cabo de forma incorrecta (Roy y col., 2006). Con base en lo anterior, se demuestra que cada fungicida afecta el proteoma con un camino en común. Algunos de estos antifúngicos pueden tener diferentes objetivos, pero afectan ampliamente las diferentes vías metabólicas, teniendo como finalidad la detención o daño del ciclo celular (Perfect, 2018).

Chen y col. (2018) analizaron proteómicamente el efecto los compuestos principales del extracto de Cúrcuma sobre *F. graminearum*, identificando 46 proteínas involucradas en el metabolismo energético, síntesis de ARNt y en el metabolismo de la glucosa, demostrando que compuestos con actividad antifúngica pueden actuar sinérgicamente y afectar diferentes vías metabólicas que son de importancia para el correcto funcionamiento del microorganismo.

Por lo que se menciona anteriormente, el análisis proteómico ha servido para estudiar los cambios de los perfiles de expresión de las proteínas y los genes que se activan o suprimen en determinados microorganismos cuando son expuestos a determinadas condiciones (Wolters y col., 2001). Lo anterior facilita la identificación del mecanismo de acción de fármacos, permitiendo elucidar los principales objetivos de la actividad antifúngica, ya que ambas herramientas pueden proporcionar información importante sobre la patogenicidad y los factores de virulencia de algún microorganismo en particular, información que puede ser usada para diagnosticar enfermedades y estrategias que prevengan la protección de cultivos (González-Fernández, 2012).

Basado en lo anterior, el objetivo de este estudio es determinar los cambios en la abundancia de las proteínas en *Fusarium verticillioides* expuesto a la fracción antifúngica de *Jacquinia macrocarpa*. Los resultados obtenidos serán importantes para elucidar un posible mecanismo de acción e identificar proteínas relacionadas con la adaptación al antifúngico.

HIPÓTESIS

La exposición de *Fusarium verticillioides* a la fracción antifúngica de *Jacquinia macrocarpa*, ocasiona alteraciones en el metabolismo fúngico provocando una disminución en la síntesis de proteínas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar las alteraciones y adaptaciones metabólicas de *Fusarium verticillioides* después de ser expuesto a la fracción butanólica de *Jacquinia macrocarpa*, por medio de los cambios en la acumulación de proteínas, mediante un enfoque proteómico.

Objetivos Particulares

1. Calcular la IC₅₀ del extracto butanólico de *Jacquinia macrocarpa* sobre *Fusarium verticillioides*.
2. Obtener el perfil electroforético de las proteínas extraídas de *F. verticillioides* tratado y no tratado con el extracto butanólico de *J. macrocarpa*.
3. Estimar la masa molecular experimental y punto isoeléctrico de las proteínas separadas electroforéticamente.
4. Establecer los cambios en la acumulación de proteínas en *Fusarium verticillioides* ocasionado por la fracción antifúngica mediante electroforesis bidimensional y HPLC-MS/MS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la Fracción Antifúngica de *Jacquinia macrocarpa*

Las partes aéreas de la planta *Jacquinia macrocarpa* fueron recolectadas en el rancho “El Chaparral”, localizado en la ciudad de Guaymas, Sonora, México. Ubicado al suroeste del Estado de Sonora, específicamente en las coordenadas geográficas 28°20'07.5" N, 111°08'52.4" W. La especie de planta fue identificada en el herbario del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), en Hermosillo, Sonora, México. Luego de la identificación, la planta fue secada en un cuarto a temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C) por 15 días y pulverizadas usando el equipo KRUPS GX4110 Spice Grinder.

Preparación de Extractos de Plantas

La fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, se obtuvo por extracción con solventes de acuerdo con Valenzuela-Cota y col. (2014). Se mezclaron 60 g de polvo de las partes aéreas de *J. macrocarpa* con 1 L de metanol al 70 %, se agitó durante una hora y se almacenó por 72 horas en la oscuridad. Posteriormente, el extracto se filtró en papel Whatman # 1 y después a través de un filtro de vidrio microporoso. El extracto metanólico se evaporó hasta sequedad a 40 °C utilizando el equipo Labconco Rotary Evaporator (Kansas City, MO) para luego ser resuspendido en agua y separado por partición secuencial con hexano, acetato de etilo y butanol. El extracto butanólico se usó para los diferentes análisis ya que este tuvo el mayor efecto antifúngico en el desarrollo del *F. verticillioides*.

Cálculo de la Concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀)

En Placa de Petri conteniendo medio agar Czapek se adicionó fracción butanólica de *J. macrocarpa* a las concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5 y cero µg/mL. Se inoculó en el centro de la placa con una suspensión de 1×10^6 esporas de *F. verticillioides* / mL y se incubó a una temperatura de 25 °C, hasta que el crecimiento radial del hongo en la placa control (conteniendo únicamente agar Czapek) alcanzó el borde de la placa. Los radios de las colonias se midieron

con una regla cada 24 h y con la lectura de los radios de las colonias al final del experimento, se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento radial usando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición radial (\%)} = \frac{R_c}{R} \times 100$$

Donde R, es el valor del radio de la colonia control Czapek y R_c el valor del radio de la colonia con las diferentes concentraciones del extracto de *J. macrocarpa* (Plascencia-Jatomea y col., 2003).

Para calcular la concentración del extracto que causa la inhibición del 50 % del crecimiento radial (IC₅₀), los porcentajes de inhibición causado por cada concentración fueron sometidos a un análisis probit. El experimento fue realizado por triplicado (Suárez-Jiménez y col., 2007).

Preparación del cultivo y Condiciones de Crecimiento

F. verticillioides (Sacc) Nirenberg (Sin. *Fusarium moniliforme* J. Sheld, anamorfo (ATCC 52539)) se inoculó en agar Czapek y se incubó a 25 °C durante 7 días. Las esporas se resuspendieron en Tween 80 al 0.1 % y se contaron en una cámara de Neubauer para obtener una concentración de 1 x 10⁶ esporas / mL, misma que fue utilizada en las diferentes determinaciones. Posteriormente, las esporas se transfirieron a un matraz Erlenmeyer que contenía medio caldo Czapek adicionado con la MIC₅₀ (202.12 µg/mL) de extracto butanólico de *J. macrocarpa* y se incubó durante 7 días a 25 °C. Como control, se utilizó caldo Czapek inoculado con esporas de *F. verticillioides*, pero sin el tratamiento. Para cada muestra se realizaron 3 triplicados biológicos independientes.

Extracción de Proteínas

Los micelios fúngicos se transfirieron de matraces Erlenmeyer a botellas de centrífuga de boca ancha de 500 mL (Nalgene, Rochester, NY, EE. UU.) y se centrifugaron a 10,000 x g durante 15 min. Los sobrenadantes se desecharon, las biomásas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C. Se

llevaron a cabo tres réplicas biológicas y se procesaron como muestras independientes. Las proteínas solubles totales de los hongos se extrajeron como lo indican Huerta-Ocampo y col. (2014) con algunas modificaciones. El micelio congelado se suspendió en tampón de extracción (Tris 40 mM pH 8.0, polivinilpolipirrolidona al 1 % y PMSF 2 mM) y se sonicó tres veces durante 30 segundos a una amplitud del procesador ultrasónico GE-505 al 30 % (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, EE. UU.). La solución micelial se centrifugó a 20,000 x g durante 20 minutos a 4 °C (Sorvall Lynx 4000, Thermo Scientific, San José, CA, EE. UU.), se descartó el sedimento, el sobrenadante fue recogido y mezclado con 20 % de ácido tricloroacético en acetona fría y fue almacenado durante la noche a -20 °C. El precipitado de proteína bruto resultante se centrifugó tres veces; los gránulos se lavaron sucesivamente dos veces con acetona fría y una vez con acetona al 80 % (v / v). Los gránulos lavados se disolvieron en tampón de rehidratación constituido por urea 8 M, CHAPS al 2 %, DTT 20 mM y azul de bromofenol al 0.002 %. La proteína disuelta se limpió con el kit de limpieza 2D ReadyPrep™ (Bio-Rad, Hércules, CA, EE. UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los gránulos de proteína resultantes del procedimiento de limpieza se suspendieron en tampón de rehidratación y se determinó la concentración de proteína empleando el ensayo de Bradford (Bradford, 1976) usando albúmina de suero bovino como estándar.

Electroforesis bidimensional (2-DE)

Las proteínas extraídas del micelio fúngico fueron sometidas a una electroforesis bidimensional (2-DE) de la siguiente forma: 500 µg de proteínas solubles totales de cada muestra se mezclaron con buffer IPG al 1 % (pH 3-10, Bio-Rad). Las muestras se cargaron en tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 24 cm a pH 3-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.), mediante rehidratación pasiva a temperatura ambiente durante 16 h. El enfoque isoeléctrico (IEF) se realizó a 20 °C con un sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare) en las condiciones reportadas por Dufoo-Hurtado y col. (2015), 1 h a 300 V, 2 h a 500 V, 2 h a 1000 V, y 3 h a 4000 V, 5 h a 8000 V, y 10 h a 8000 V. Después de IEF, las tiras de IPG se equilibraron dos veces durante 15 minutos en buffer de equilibrio (Urea 6 M, glicerol al 30 %, SDS al 2 %, tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,8), a 50 rpm, la

primera vez contiene 1 % de DTT y la segunda que contiene 2.5 % de yodoacetamida en lugar de DTT. Después del equilibrio, las tiras se colocaron directamente sobre geles de poliacrilamida-SDS al 13 %. La separación se realizó utilizando la unidad de electroforesis Ettan Daltsix (GE Healthcare) a corriente constante (200 V) por 1 h y los geles 2-DE se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (Candiano y col., 2004).

Análisis de Imagen

Después de desteñir los geles 2-DE, se escanearon a una resolución de 100 μm en un generador de imágenes biomoleculares Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) y el análisis de imágenes se realizó con el software ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (GE Healthcare). La masa molecular experimental y la pI de cada punto de proteína se estimaron mediante comparación con los estándares de peso molecular de proteína y mediante la migración de puntos de proteína en las tiras de gradiente lineal de IPG, respectivamente. Las manchas de proteínas se consideraron acumuladas diferencialmente cuando sus volúmenes normalizados mostraron un cambio de Fold ≥ 2 (del doble o más) cuando se compararon el control y el tratamiento por triplicado. Se establecieron los cambios significativos utilizando ANOVA ($p < 0.05$).

Digestión en gel y cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS)

Las manchas de proteína acumuladas diferencialmente se extirparon de los geles, se redujeron con DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 25 mM seguido de alquilación de proteínas con yodoacetamida 55 mM. La digestión de proteínas se llevó a cabo durante la noche a 37 °C con tripsina de grado de secuenciación (Promega, Madison, WI, EE. UU.). La separación por LC de los péptidos se realizó por triplicado mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento utilizando el sistema LC 1290 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), equipado con una columna analítica ZORBAX 300SB-C8 (5 μm 9.2.1 mm 9 150 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), equilibrada con acetonitrilo al 1 % (ACN) y ácido fórmico al 0,1 % (FA) que se mantuvo a 35 °C.

Los péptidos se separaron usando un flujo de 400 IL/min y las siguientes condiciones cromatográficas: 1 minuto con 99 % de A (H₂O con 0.1 % de FA) y 1 % de B (ACN con 0.1 % de FA); seguido de un gradiente lineal hasta alcanzar el 70 % de B en 15 min y un gradiente final de 1 min hasta alcanzar el 1 % de B; con un período de equilibrio de 3 min (1 % B) entre cada ejecución. Los péptidos eluidos de la columna se ionizaron por electropulverización con una fuente de ionización Dual AJS ESI (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), aplicando 3.5 kV y se analizaron por espectrometría de masas en tándem a través de un análisis dependiente de los datos en el tiempo del cuadrupolo de masa exacta, en un sistema 6530 LC/MS de vuelo (Q-TOF) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) funcionando en modo positivo. Los datos se adquirieron en modo automático MS/MS, el rango de masa en modo MS fue de 400–2000 m/z (3 espectros/s) y en modo MS/MS de 50 a 2000 m/z (1 espectro/s), con un máximo de 5 precursores por ciclo.

Identificación y clasificación de proteínas

Los datos de espectrometría de masas se buscaron en una base de datos interna creada con el subconjunto *F. verticillioides* de la base de datos de proteínas RefSeq (20553 secuencias, mayo de 2019). La identificación de proteínas se realizó utilizando el servidor Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (tecnologías Agilent). La tripsina se seleccionó como proteasa permitiendo una escisión perdida. La tolerancia al error de masa para los iones progenitores y fragmentos se ajustó a 20 ppm y 0.1 Da, respectivamente. La carbamidometil cisteína se seleccionó como una modificación fija, mientras que la oxidación de metionina se ajustó como modificación variable. Las puntuaciones individuales de iones peptídicos ≥ 12 y la intensidad pico puntuada (SPI) ≥ 60 se consideraron coincidencias de péptidos adecuadas, mientras que una puntuación de proteínas ≥ 25 y al menos dos péptidos fueron necesarios para la identificación segura de proteínas. Las proteínas identificadas se agruparon en diferentes categorías funcionales según los datos de Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>). Las proteínas con múltiples isoformas probables se consideraron como una sola proteína.

Análisis Estadístico

Se analizaron los resultados del crecimiento radial mediante un análisis de varianza (ANOVA), comparando los promedios de las repeticiones de cada tratamiento durante cada 24 horas mediante la prueba de comparación de media de Tukey ($p < 0.05$). Se utilizó el programa JMP y todos los análisis se hicieron por triplicado

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la IC₅₀

La concentración que mostró el 50 % de la inhibición de *F. verticillioides* en agar Czapek fue de 202.12 µg/mL. La menor concentración utilizada (62.5 µg/mL) inhibió en 20.4 % del crecimiento radial, mientras que la mayor concentración evaluada (1000 µg/mL) inhibió el crecimiento radial un 85.45 % (Figura 4). Al evaluar las primeras 24 h, no se observó crecimiento micelial de *F. verticillioides* cuando este se encontraba bajo tratamiento salvo en la concentración de 62.5 µg/mL. A partir de las 48 h el crecimiento del hongo comenzó a ser observado y las concentraciones evaluadas presentaron diferencias significativas entre sí, manteniendo prácticamente el mismo porcentaje de inhibición hasta las 96 h.

Fimbres-López y col. (2016), observaron que el extracto crudo de *Krameria erecta* tuvo un efecto bajo en la inhibición del crecimiento radial cuando expusieron al *F. verticilliodes* a 500 y 1000 mg/mL del extracto crudo. Lo anterior, sugiere que los compuestos de extraídos de la fracción de *K. erecta* favorecen el crecimiento del hongo, ya que se ha reportado que algunos compuestos aleloquímicos tiene un efecto estimulante en algunas fases del crecimiento de los hongos (Montes-Belmont y García-Luna, 1997; Velázquez-Gurrola y col. 2006). Lo anterior puede descartarse en nuestro estudio, ya que los compuestos presentes en la fracción butanólica de *J. macrocarpa* tiene un efecto negativo en el crecimiento de *F. verticillioides*.

Las observaciones en el microscopio mostraron el desarrollo de hifas atrofiadas o deformes cuando *F. verticillioides* se encontraba expuesto a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, comparado con un desarrollo de hifas normal en los cultivos control (Figura 5). Este tipo crecimiento puede sugerir daños en diferentes estructuras de vital importancia para el *F. verticillioides*, siendo una de ellas la pared celular. Buitimea-Cantúa y col. (2013), observaron que la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* tiene actividad quitinasa y actúa como inhibidor competitivo de la β-1,3-glucanasa, lo que ocasiona una pared celular defectuosa, provocando una inestabilidad osmótica.

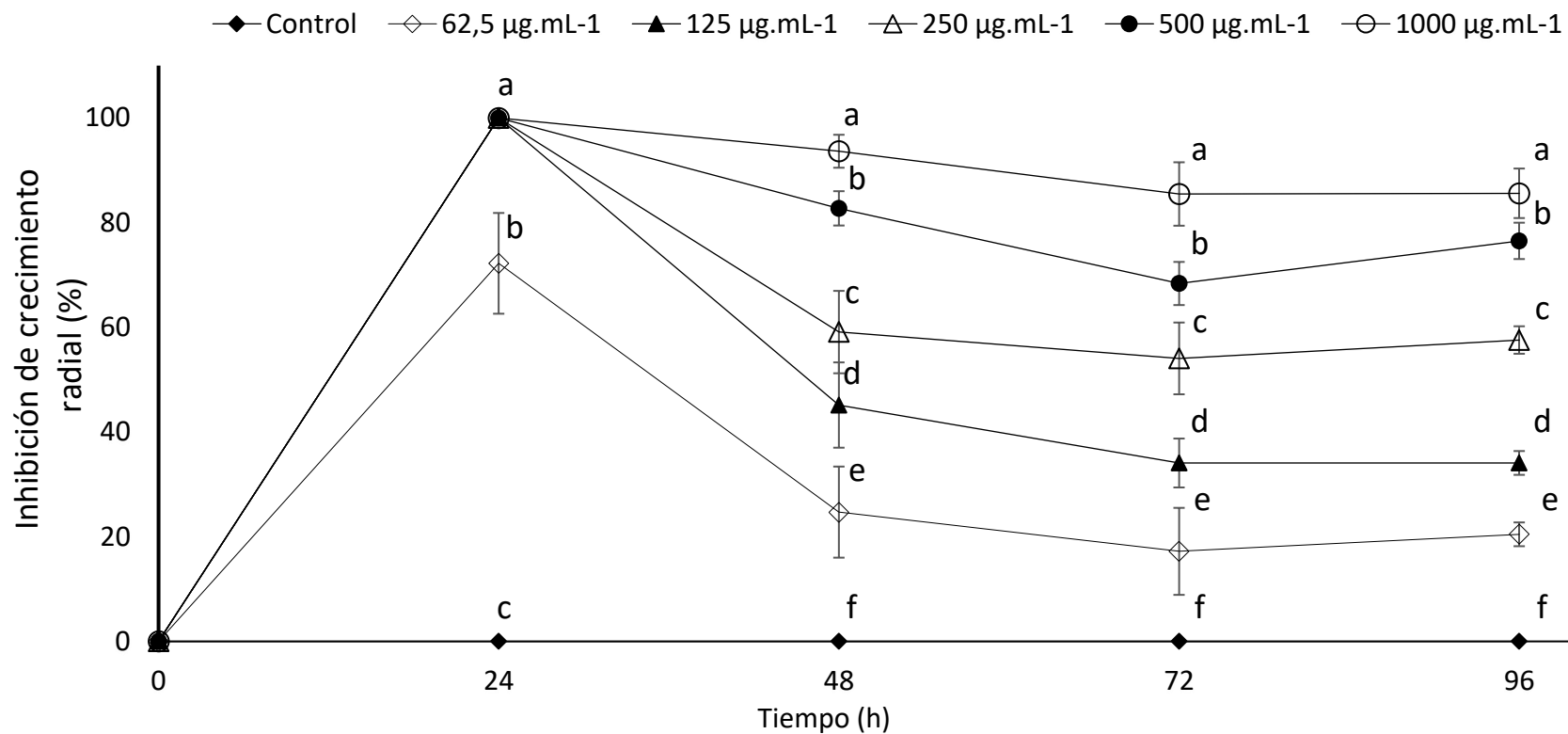


Figura 4. Inhibición del crecimiento radial (%) de *Fusarium verticillioides* expuesto a diferentes concentraciones de la fracción antifúngica de *Jacquinia macrocarpa*. Diferentes letras en cada tiempo de lectura indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

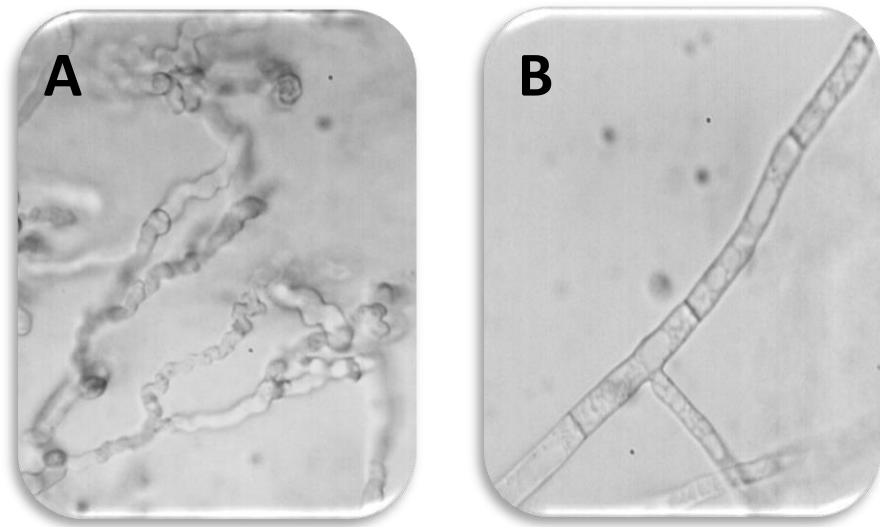


Figura 5. A) Crecimiento de la hifa de *Fusarium verticillioides* expuesto a la IC₅₀ de la fracción antifúngica de *Jacquinia macrocarpa*. B) Crecimiento de la hifa de *F. verticillioides* sin exponerse a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*.

Por otro lado, el crecimiento anormal de las hifas podría sugerir un efecto sobre los microtúbulos, ya sea inhibiendo la polimerización o dañando su estructura, lo que ocasionaría una inestabilidad de Spitzenkörper, provocando alteración en el crecimiento micelial. Spitzenkörper es una estructura que se encuentra en las hifas de algunos hongos que sirve como centro de organización de crecimiento y morfogénesis. Riquelme y col. (2000), observaron que en hifas de *Neurospora crassa*, con tráfico microtubular deteriorado, o con hifas tratadas con inhibidores de microtúbulos, Spitzenkörper mostró una trayectoria errática, lo que dio lugar a una morfología de la hifa distorsionada. Esto sugiere que el citoesqueleto microtubular es importante para el mantenimiento y la posición de Spitzenkörper en la zona apical de la hifa. Como se sabe, las hifas son estructuras celulares que se alargan y ramifican durante su crecimiento a través de mecanismos citoplasmáticos como son el transporte polarizado de vesículas secretoras que se dirigen al ápice de la hifa, fusionándose con la membrana celular, proporcionando las enzimas necesarias para la síntesis de pared celular y la expansión de la membrana (Harris, 2006).

Además, en la zona apical existen un conjunto de vesículas, conocido como Spitzenkörper, que permiten que se mantenga un alto nivel de polaridad, y que se promueva una respuesta a factores ambientales o perturbaciones provenientes del exterior, como podrían ser los compuestos antifúngicos (Riquelme y col., 2014). Spitzenkörper coordina la dirección del crecimiento apical de la hifa como un mecanismo de respuesta al medio en donde se está desarrollando el hongo (Robertson y col., 2011). La función de Spitzenkörper pudiera ser la de servir como un sitio de acumulación de vesículas para la formación de la pared y como un punto de partida para que dichas vesículas se fusionen con la membrana celular produciendo nueva pared celular promoviendo el crecimiento micelial (Bartnicki-García, 1990).

Electroforesis Bidimensional de Proteínas

La electroforesis bidimensional del perfil de la proteína total de *F. verticillioides* en presencia de 202.12 µg/mL de la fracción de *J. macrocarpa*, fue establecida. Se detectaron más de 500 puntos de proteína en geles 2-DE teñidos de azul de Coomassie y 55 proteínas diferencialmente expresadas, de las cuales 38 puntos se identificaron satisfactoriamente (Figura. 6) (Tabla 3), 17 se acumularon, mientras que 21 disminuyeron su acumulación. En su mayoría, las manchas de proteínas están distribuidas entre los pesos moleculares de 25 y 75 kDa y en un rango de pH de 5-8. Todos los puntos de proteínas se identificaron con éxito mediante LC-MS/MS utilizando el subconjunto *F. verticillioides* de la base de datos de proteínas RefSeq y el software Spectrum Mill.

Chen y col. (2018) observaron resultados similares al exponer a *F. graminearum* al extracto alcohólico de *Curcuma longa*. En su investigación, detectaron un total de 2021 manchas de proteínas de las cuales, cuarenta y seis proteínas fueron diferencialmente expresadas, mismas que se encontraban en un punto isoeléctrico entre 4-7. Por otro lado, Yiping y col. (2013), expusieron a *F. graminearum* al fungicida JS399-19 y detectaron más de 1200 proteínas, las cuales oscilaban en un rango de masa molecular de 40 a 100 kDa y a un pH de 5 a 7. De los más de 1200 manchas de proteínas detectadas, treinta y seis proteínas fueron diferencialmente expresadas.

Identificación y clasificación de Proteínas Expresadas Diferencialmente

Las 38 proteínas identificadas se muestran en la Tabla 3, mientras que la clasificación de acuerdo con su funcionalidad puede observarse en la Figura 7. Las proteínas se agruparon, usando la base de datos de Gen Ontology, en

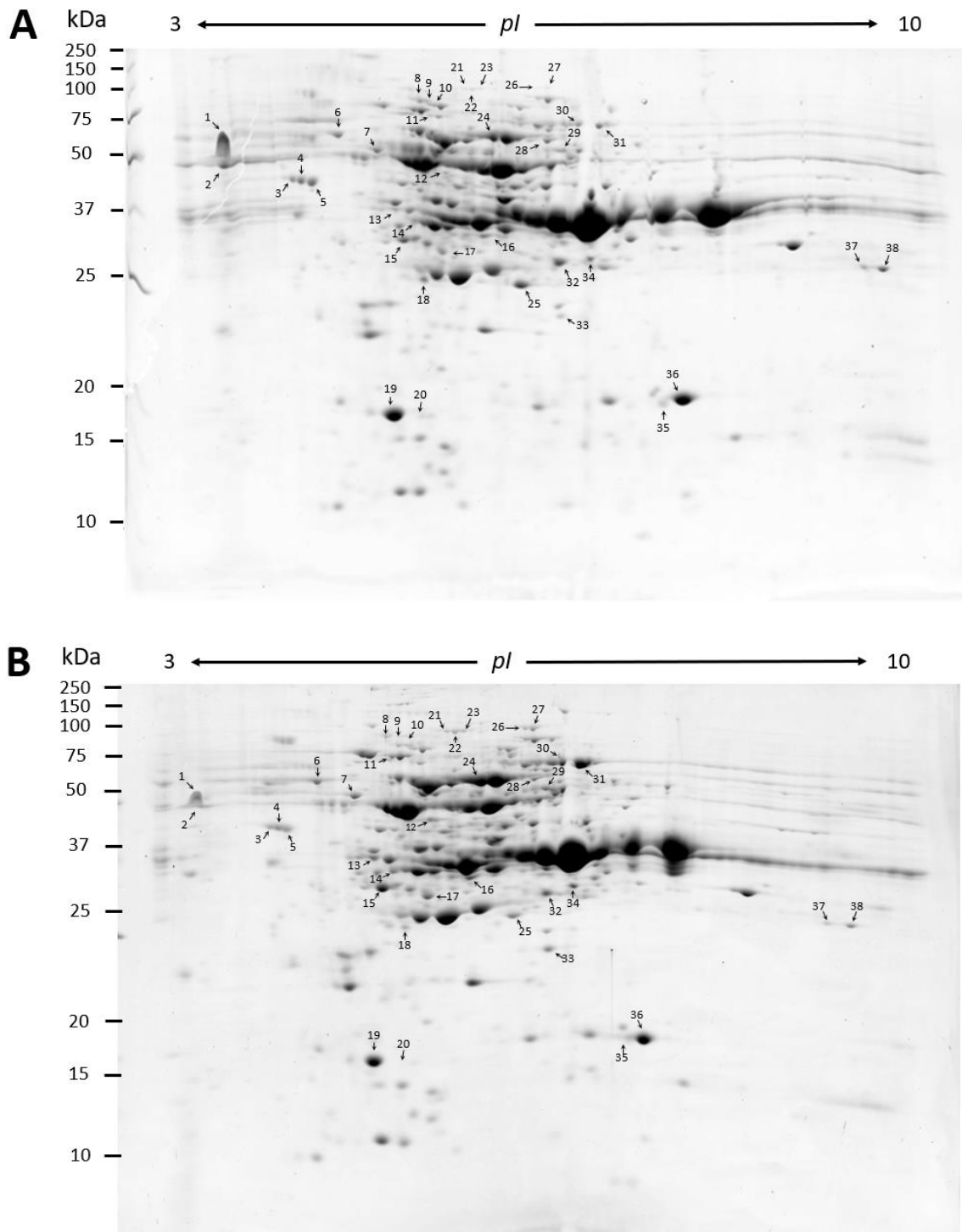


Figura 6. Representación de electroforesis bidimensional del perfil de proteína total de *Fusarium verticillioides* bajo la condición control (A) y expuesto a la IC₅₀ de la fracción butanólica de *Jacquinia macrocarpa* (B).

Tabla 3. Identificación de proteínas diferencialmente acumuladas de *F. verticillioides* expuesto al extracto butanólico de *Jacquinia macrocarpa*

No. Spot. ^(a)	Proteína ^(b)	Número de acceso ^(c)	PM/pl Exp. ^(d)	PM/pl Teor. ^(e)	PM/SC ^(f)	Score ^(g)	FC ^(h)
1	NADP-especifica glutamato deshidrogenada	XP_018754252	63.5/3.45	48.9/5.75	3/8%	39.33	0.38
12	Argininosuccinato sintasa	XP_018758679	46.1/5.45	47.2/5.29	5/13%	61.93	2.52
18	(Glutamina amidotransferasa) *	XP_018752219	25.3/5.25	24.4/5.08	4/24%	59.97	0.43
21	3-isopropilmalato deshidratasa	XP_018748458	106.2/5.62	85.5/5.48	3/5%	35.37	2.81
22	3-isopropilmalate deshidratasa	XP_018748458	105.1/5.69	85.5/5.48	13/21%	155.3	2.61
23	3-isopropilmalate deshidratasa	XP_018748458	103.7/5.76	85.5/5.48	15/22%	220.41	2.71
28	Cistationina beta-sintasa	XP_018750773	60.22/6.35	56/5.95	10/25%	152.5	0.49
10	Proteína Hsp70	XP_018751449	84.3/5.35	73.2/5.68	6/13%	74.53	0.48
11	Proteína Hsp70	XP_018751449	76.5/5.31	73.2/5.68	3/6%	34.69	0.49
32	(Proteína Hsp 30-) *	XP_018743991	27.7/6.48	24.2/6.01	8/44%	110.32	0.47
35	Peptidil cis-trans isomerasa mitocondrial	XP_018742514	18.5/7.37	24.3/9.58	2/12%	94.54	2.43
36	Peptidil cis-trans isomerasa mitocondrial	XP_018742514	18.9/7.57	24.3/9.58	7/36%	94.54	0.42
3	Proteasa vacuolar A	XP_018759035	45.1/4.08	42.9/4.68	4/10%	38.96	0.45
4	Proteasa vacuolar A	XP_018759035	44.2/4.16	42.9/4.68	3/10%	46.39	0.45
5	Proteasa vacuolar A	XP_018759035	43.4/4.25	42.9/4.68	3/21%	66.79	0.44
7	(Serina carboxipeptidasa*	XP_018762116	52.3/4.71	57.8/5.2	2/6%	25.02	0.48
8	(Dipeptidil aminopeptidasa/acilaminoacil peptidasa) *	XP_018742493	87.5/5.22	71.7/5.16	8/26%	154.23	0.40
9	(Dipeptidil aminopeptidasa/acilaminoacil peptidasa) *	XP_018742493	85.9/5.31	71.7/5.16	11/23%	139.97	0.47
33	Proteína nuclear GTP GSP1/Ran	XP_018743901	23.3/6.49	24.8/6.92	2/9%	85.11	2.35
37	Porina proteica de la membrana externa mitocondrial	XP_018746309	27.1/9.21	29/8.8	10/43%	149.35	0.49
38	Porina proteica de la membrana externa mitocondrial	XP_018746309	26.9/9.38	29/8.8	11/40%	149.35	0.40
2	Fosfoglicerato cinasa	XP_018757237	45.1/3.46	56.7/8.85	10/23%	156.86	0.21
13	(Transaldolasa)*	XP_018756532	37.1/5.01	33.2/4.97	10/34%	53.4	2.11
24	Piruvato descarboxilasa	XP_018749901	61.4/5.88	63.2/5.72	7/14%	96.15	2.10
26	Aconitato hidratasa mitocondrial	XP_018759992	89.21/6.28	85.7/6.2	5/7%	64.58	2.05
27	Aconitato hidratasa mitocondrial	XP_018759992	87.5/6.36	85.7/6.2	13/18%	178.97	2.06
29	Dihidrolipoil deshidrogenasa	XP_018749920	55.68/6.51	54.4/6.7	10/27%	139.25	2.42
30	Piruvato cinasa	XP_018760785	70.4/6.64	60.3/6.35	12/28%	237.5	2.58
31	Piruvato cinasa	XP_018760785	69.1/6.83	60.3/6.35	14/31%	237.5	3.16

34	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa		XP_018749661	27.1/6.86	36.9/6.39	5/20%	73.8	0.35
6	Proteína disulfuro isomerasa		XP_018744207	63.6/4.49	55.3/4.74	14/36%	193.91	0.45
19	Oxidorreductasa (PRX 5)		XP_018745113	17.5/4.99	18.3/5.18	6/37%	76.62	0.49
20	Peroxirredoxina		XP_018743179	17.6/5.32	20.5/8.8	2/16%	24.1	0.48
25	Peroxidasa		XP_018760767	24.58/6.14	25.6/5.85	7/38%	103.33	0.49
14	Pirofosfatasa inorgánica		XP_018743465	34.6/5.18	45.4/7.81	6/19%	35.75	3.36
15	(Metiltransferasa dependiente Clase I) *	SAM-	XP_018759741	31.3/5.08	34.3/5.09	9/39%	135.27	2.38
16	Proteína NMT1		XP_018756775	32.2/5.64	38.3/5.72	8/24%	123.89	2.08
17	(Metiltransferasa dependiente Clase I) *	SAM-	XP_018742582	29.8/5.42	30.9/5.55	4/17%	85.43	2.20

-
- Número de mancha que se indica en la figura 6.
 - Nombres de las proteínas. Los nombres entre paréntesis representan la anotación de proteínas obtenidas después de la búsqueda BLASTP de proteínas hipotéticas contra la proteína de la base de datos del nrNCBI. PRX 5, peroxirredoxina 5; SAM, S-adenosil-1-metionina; NMT1, *N*-miristoiltransferasa 1.
 - Números de acceso según el subconjunto de *F. verticillioides* de la base de datos de proteínas RefSeq.
 - Masa experimental (Exp.) y punto isoeléctrico (pI) de manchas proteicas identificadas.
 - Masa teórica (teórica) y punto isoeléctrico (pI) de proteínas identificadas en la base de datos NCBI nr.
 - PM, número de péptidos emparejados; SC, cobertura de secuencia de proteínas.
 - Puntuación de proteína Spectrum Mill después de la búsqueda en la base de datos. Las puntuaciones de > 25 son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).
 - FC, cambio de veces expresado como la relación del % de volumen entre el control (*F. verticillioides*) y el estrés (*F. verticillioides* expuesto al extracto butanólico de *J. macrocarpa*).

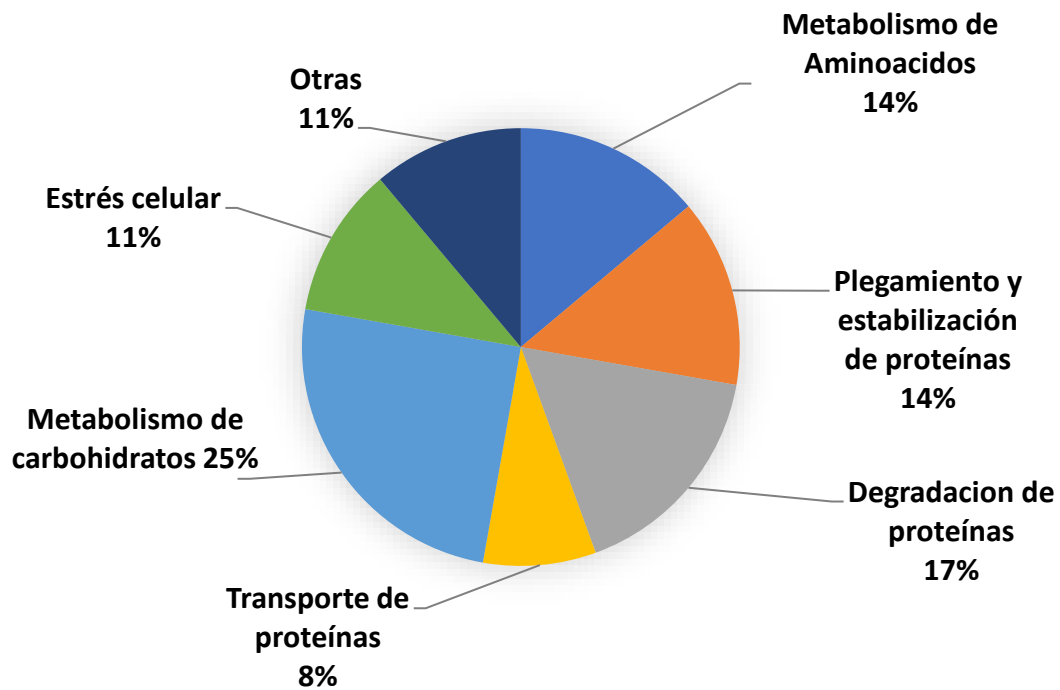


Figura 7. Clasificación funcional de proteínas diferencialmente acumuladas en *Fusarium verticillioides* expuesto a la fracción antifúngica de *Jacquinia macrocarpa*.

categorías de procesos biológicos tales como el metabolismo de aminoácidos, metabolismo de carbohidratos, el plegamiento y estabilización de proteínas, degradación de proteínas, proteínas de transporte y la respuesta a estrés oxidativo.

Proteínas del metabolismo de los aminoácidos

En respuesta a la fracción butanólica de *J. macrocarpa*, la mancha 12 (Figura 6) identificada como argininosuccinato sintasa, aumentó su acumulación. Esta proteína es una enzima que participa en la síntesis de arginina que cataliza la conversión de citrulina y aspartato en argininosuccinato (Figura 8) (Wagemaker y col., 2007). Takahara y col. (2012) mencionaron en su estudio que la arginina no era necesaria para la germinación conidial de *Colletotrichum higginsianum*, sin embargo, es crítica para la penetración y el crecimiento biotrófico en células del huésped. Esto pudo corroborarse al observar un aumento en la capacidad de crecimiento invasivo de *C. higginsianum* en membranas de celofán suplementadas con arginina, lo que indica que la biosíntesis de arginina es crítica para la fase temprana de la infección fúngica de las plantas.

Por otro lado, las manchas 21, 22 y 23 (Figura 6), acumuladas en respuesta al extracto butanólico, se identificaron como tres proteoformas de 3-isopropilmalato deshidratasa, la cual es una enzima que cataliza el segundo paso de la biosíntesis de leucina (Figura 8). Esta enzima es necesaria para la patogenicidad en una amplia variedad de hongos fitopatógenos y la inhibición de su expresión no produce lesiones, por lo tanto, las plantas resistirán más a las infecciones (Jastrzębowska y Gabriel, 2015; Que y col., 2019). La interrupción del gen *leu1* que codifica para isopropilmalato deshidratasa en el hongo *Magnaporthe grisea*, *Magnaporthe oryzae* y *Fusarium graminearum* es

esencial para la patogénesis fúngica (Hamer y col., 2001; Que y col., 2019). Lo anterior, puede ser debido a que la enzima promueve la síntesis de leucina, la cual puede sufrir una transaminación descarboxilativa y formar isovalerato, un compuesto que forma parte de la estructura del tricoteceno Toxina T-2 (Beremand y col., 1988).

Los puntos 18, 20 y 1 (Figura. 6), identificados como glutamina amidotransferasa, cistationina β -sintasa (CBS) y NADP-específicas glutamato deshidrogenasa, respectivamente, disminuyeron su acumularon en respuesta al extracto butanólico de *J. macrocarpa*. Las glutaminas amidotransferasas son la principal forma de incorporación de nitrógeno en las vías biosintéticas de aminoácidos, azúcares amino, nucleótidos de purina y pirimidina, coenzimas y antibióticos (Mouilleron y col., 2006). La inactivación de la glutamina amidotransferasa es el mecanismo de acción de la acivicina, un producto de fermentación de *Streptomyces* que inhibe el crecimiento de *Alternaria*, *Magnaporthe* y *Botrytis* (Maeda y col., 2014), por lo que se sugiere que la extracto de *J. macrocarpa* pudiera tener el mismo efecto que la acivicina. Mientras que, CBS es responsable de la conversión de homocisteína en cistationina en la vía de transulfuración inversa (Traynor y col., 2019), un paso comprometido en la biosíntesis de cisteína. La represión de CBS puede causar estrés redox debido al peróxido de hidrógeno producido en respuesta a la alta acumulación de homocisteína. El CBS también disminuyó su acumulación en *Phyllosticta citricarpa*, causante de la mancha negra en los cítricos, cuando el hongo se expuso a los compuestos orgánicos volátiles antimicrobianos de *Saccharomyces cerevisiae*, sugiriéndose un estrés redox debido al aumento de H₂O₂ (Fialho y col., 2016).

La NADP-específica glutamato deshidrogenasa (Figura 6) está involucrada en la asimilación de amonio y la biosíntesis de glutamato, catalizando la aminación de α -cetoglutarato a glutamato (An, 2001; Figura 8). Esta proteína también disminuyó su acumulación en *Candida albicans* expuesta a los antifúngicos ketoconazoles y caspofungina (Hoehamer y col., 2010). La disminución en la abundancia de esta enzima sugiere una reducción en la biosíntesis de glutamato, comprometiendo el metabolismo energético al aumentar los niveles de α -cetoglutarato, aumentando la actividad del ciclo de Krebs induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Johnson, 2003).

En respuesta al extracto butanólico de *J. macrocarpa*, la abundancia de la dihidrolipoíl deshidrogenasa (punto 29), que es una flavoproteína que forma complejos de α -cetoglutarato deshidrogenasa en piruvato y α -cetoglutarato en mitocondrias, también promueve la producción de EROs debido a múltiples reacciones de transferencia de electrones (Figura 8; Tahara y col., 2007).

Proteínas del Metabolismo de los Carbohidratos

Se identificaron siete proteínas que aumentaron y dos que disminuyeron su acumulación, relacionadas con el metabolismo de carbohidratos en *F. verticillioides* expuestos al extracto butanólico de *J. macrocarpa* (Tabla 1). Entre las proteínas que aumentaron su acumulación están los puntos 30 y 31, los cuales se identificaron como proteoformas de piruvato cinasa. Esta enzima interviene en el paso final de la glucólisis catalizando la conversión del fosfoenolpiruvato en piruvato, formando una molécula de ATP (Figura. 8). Las altas cantidades de ATP disminuyen la presencia de piruvato quinasa, por lo que el aumento de esta enzima sugiere una disminución de ATP en *F. verticillioides* y una posible acumulación de piruvato (Zhang y col., 2017). La acumulación de

piruvato podría causar un aumento de piruvato descarboxilasa, otra proteína que incrementó su acumulación en este estudio correspondiente al punto 24. La abundancia de piruvato descarboxilasa sugiere la producción de altas concentraciones de acetaldehído a partir de la vía de piruvato-acetaldehído-acetato (vía PAA). Esta alta concentración de acetaldehído pudiera ser precursor de efectos tóxicos y anomalías estructurales en el micelio de *F. verticillioides* (Baburina y col., 1998). La proteína piruvato descarboxilasa también es una enzima esencial para producción de lípidos y energía en los micelios, y la eliminación del gen que la codifica, causa un crecimiento reducido del micelio en *F. graminearum* (Son y col., 2002).

Los puntos 26 y 27 (Figura 6) identificados como proteoformas de aconitato hidratasa mitocondrial, otra enzima clave en el metabolismo energético, también aumentaron su acumulación. La aconitato hidratasa mitocondrial cataliza la isomerización de citrato a isocitrato a través de cis-aconitato. Esta enzima es un regulador clave en el ciclo de Krebs, que afecta de igual forma a otras vías y que, en consecuencia, afecta el suministro de energía (Minic, 2005). La acumulación de esta enzima, así como otras enzimas, sugiere que *F. verticillioides* demanda energía del ciclo de Krebs, que se utilizará para realizar recambios o redireccionamientos metabólicos para contrarrestar los efectos causados por los componentes de la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*.

Otra enzima que aumentó su acumulación es la transaldolasa (punto 13). Esta enzima conecta la vía de la pentosa fosfato (PPP) con la glucólisis. La transaldolasa está involucrada en la fase oxidativa de la PPP, y se ha demostrado que aumenta en condiciones tempranas de estrés oxidativo (de Arruda Grossklaus y col., 2013). El aumento de esta enzima también sugiere una sobreactividad del PPP para contrarrestar la baja NADPH intracelular (Figura 8).

El punto 29 también aumentó su acumulación. Este punto, identificado como dihidrolipoil deshidrogenasa, también conocido como dihidrolipoamida deshidrogenasa, es parte del complejo piruvato deshidrogenasa, el cual

transforma el piruvato en acetil-CoA mediante un proceso llamado descarboxilación del piruvato. En *F. graminearum*, el aumento de la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa se correlaciona con el retraso del crecimiento y el fracaso en la producción de conidios y peritecios debido a la disminución de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (Gao y col., 2016).

Por último, las enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (punto 34) y fosfoglicerato cinasa (punto 2) disminuyeron su acumulación. Ambas enzimas participan en la segunda fase de la glucólisis, catalizando la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato a 1-3 bifosfoglicerato y transfiriendo reversiblemente a este último a 3 fosfoglicerato, respectivamente (Figura 8). En estudios recientes se observaron resultados similares cuando *Penicillium expansum* se expuso a quitosano y *A. fumigatus* a itraconazol (Gautam y col., 2016; Li y col., 2019). La disminución de estas enzimas sugiere que se produce una redirección del metabolismo para priorizar los ciclos esenciales en *F. verticillioides*. Esta reorganización sugiere que el gliceraldehído-3-fosfato se transforma en glucosa-6-fosfato (gluconeogénesis) que ingresa a la PPP, causando una disminución en la acumulación de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato quinasa (Senac y Hahn-Hägerdal, 1991). El aumento en la acumulación de la enzima transaldolasa en este estudio, sugiere que lo anteriormente mencionado es una posibilidad viable de que pueda estar pasando en el metabolismo de *F. verticillioides*.

Proteínas de Plegamiento y Estabilización Proteica

Dentro de las enzimas que participan en este grupo, podemos mencionar a las proteínas de choque térmico (Hsp). Estas son chaperonas moleculares que juegan un papel crítico en el correcto plegamiento, estabilización y modificación postraducciona de las proteínas, así como en la tolerancia al estrés. Se identificaron como Hsp a tres puntos (10 y 11 como Hsp70 y 32 como Hsp30) los

cuales disminuyeron su acumulación (Figura 6). Amarsaikhan y col. (2017) y Gautam y col. (2016) obtuvieron resultados similares a nuestro estudio al exponer a *A. fumigatus* a los antifúngicos sintéticos voriconazol e itraconazol, respectivamente, observando una disminución en la acumulación de estas enzimas y provocando estrés fúngico. Pandey y col. (2018), observaron que la abundancia de esta proteína puede mejorar la tolerancia en condiciones de estrés en el micelio fúngico, lo que contribuye con la virulencia fúngica, por lo que la ausencia de esta enzima compromete a *F. verticillioides* a ser más susceptible al estrés provocado por *J. macrocarpa*.

En nuestro estudio, se identificaron dos proteoformas de peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPlasa). Una aumentó (punto 35), mientras que la segunda (punto 36) disminuyó su acumulación en respuesta a la fracción inhibidora. Las PPlasas juegan un papel en el plegamiento de proteínas al catalizar la isomerización de formas cis y trans de enlaces peptídicos que preceden a los residuos de prolina. Esta proteína, junto con la ciclofilina A, es un factor de virulencia importante para la infección del arroz por *M. grisea* y la colonización de plantas por *Botrytis cinerea* (González-Fernández y col., 2014). Además, Nelson y col. (2011), propusieron que esta enzima se asocia al poro de transición mitocondrial para inhibir el fosfato inorgánico promoviendo la apoptosis por estrés oxidativo.

Proteínas de Degradación de Proteica

Las proteasas vacuolares son esenciales en la morfogénesis y la adaptación a las condiciones nutricionales ambientales (Yike, 2011). Un análisis proteómico entre las razas de virulencia débil y fuerte de *F. oxysporum* mostró que, en la raza de virulencia fuerte, se acumularon tres proteoformas de la proteasa vacuolar A (Sun y col., 2014), destacando la importancia de esta proteína en la virulencia fúngica. Por otro lado, las serinas carboxipeptidasas tienen diversas funciones biológicas y son necesarias para el crecimiento y conidiación de hifas sanas en *A. oryzae* y *F. oxysporum* (Morita y col., 2012; Sun y col., 2014). En este trabajo, tres proteoformas de la proteasa vacuolar A (puntos 3, 4 y 5) y una

serina carboxipeptidasa (punto 7) disminuyeron su acumulación en *F. verticillioides* en respuesta al extracto butanólico de *J. macrocarpa*. La exposición de *F. verticillioides* a los extractos butanólicos resultó en cambios morfológicos en la ultraestructura de la hifa que se caracterizó por atrofia y deformación (Figura. 5).

Proteínas de Transporte

Cinco puntos de proteína acumulados diferencialmente estuvieron relacionados con el transporte intracelular (Figura 6); entre ellos, el punto 33 identificado como proteína nuclear de unión a GTP GSP1/Ran, el cual aumentó en abundancia. Esta proteína participa en el transporte nucleocitoplasmático y es esencial para la importación de proteínas al núcleo (Figura 8; Avis y Clarke 1996). En contraste, las manchas 8 y 9 (Dipeptidil aminopeptidasa/acilaminoacil-peptidasa) y las 37 y 38 (porina proteica de la membrana externa mitocondrial) disminuyeron su acumulación. *Verticillium dahliae* es un fitopatógeno cosmopolita que causa marchitamientos vasculares y pérdidas significativas de cultivos en muchas plantas. Se ha visto que la ausencia de *Vst1* (cepa $\Delta vst1$) en este hongo, causó estructuras de conidióforos alteradas y tasas de esporulación disminuidas (Sarmiento-Villamil y col., 2018). Además, se reportó que la transcripción que codifica para dipeptidil aminopeptidasa/acilaminoacil-peptidasa, una serina proteasa de la familia de peptidasa S9A involucrada en el transporte y el metabolismo de aminoácidos, fue una de las dos transcripciones más reguladas negativamente en la cepa *Verticillium* $\Delta vst1$ (Sarmiento-Villamil y col., 2018). Esto sugiere que el extracto butanólico de *J. macrocarpa* que inhibe *F. verticillioides* puede contener componentes que pueden afectar los mismos procesos alterados en *Verticillium* $\Delta vst1$.

Proteínas de Respuesta al Estrés Oxidativo

La fracción butanólica de *J. macrocarpa* indujo la disminución de la acumulación de cuatro puntos identificados como proteínas relacionadas con el estrés celular. La Figura 6, muestra la proteína disulfuro isomerasa (punto 6), oxidorreductasa (tipo PRX5, punto 19), peroxirredoxina (punto 20) y peroxidasa (punto 25). Valenzuela-Cota y col. (2019) demostró que la fracción butanólica de *J. macrocarpa* afecta la viabilidad de las esporas induciendo una alta concentración de EROs e inhibiendo las actividades de superóxido dismutasa y catalasa en *F. verticillioides*. La disminución en la acumulación de estas cuatro proteínas antioxidantes deja en descubierto un sistema de eliminación de EROs deteriorado como uno de los principales mecanismos afectados por la fracción inhibidora butanólica.

Otras Proteínas

Cuatro puntos de proteína que aumentaron su acumulación en respuesta al extracto butanólico de *J. macrocarpa* pertenecen a la categoría de otras proteínas. Las metiltransferasas dependientes de S-adenosilmetionina (SAM) (Figura. 6; puntos 15 y 17) pueden transferir un grupo metilo de SAM a muchas moléculas que tienen una función central en procesos biológicos esenciales, como la biosíntesis de moléculas pequeñas, el ADN y la metilación de proteínas. Las metiltransferasas SAM son indispensables para los hongos, especialmente para la biosíntesis de algunos metabolitos secundarios clave como toxinas, pigmentos, polioles y micosporinas (Huang y col., 2019). La pirofosfatasa inorgánica (punto 14) cataliza la hidrólisis del pirofosfato inorgánico en ortofosfato inorgánico, esta enzima se distribuye ampliamente entre los diferentes grupos taxonómicos fúngicos. La pirofosfatasa inorgánica es esencial para la vida y participa en el metabolismo energético, acelerando una reacción termodinámicamente desfavorable a través de la hidrólisis de fosfato (Chen y

Williams, 2018). Por lo tanto, la inhibición específica de la pirofosfatasa inorgánica sirve como un mecanismo importante en el desarrollo de fármacos antimicóticos (Rumsfeld y col., 2000). La proteína NMT1 (punto 16), acumulada en respuesta a la fracción butanólica de *J. macrocarpa* es necesaria para la biosíntesis de tiamina. La tiamina es un cofactor esencial no sintetizado por los animales y ha demostrado ser esencial para la virulencia en hongos patógenos de plantas (Hoppenau y col., 2014). En consecuencia, la inhibición de la biosíntesis de tiamina puede ser un enfoque inteligente para el desarrollo de antifúngicos (Meir y Osherov, 2018). La acumulación ascendente de proteínas relacionadas con la biosíntesis de tiamina puede sugerir que la biosíntesis de este aminoácido no se encuentra entre los objetivos de los compuestos inhibidores presentes en la fracción butanólica de *J. macrocarpa*.

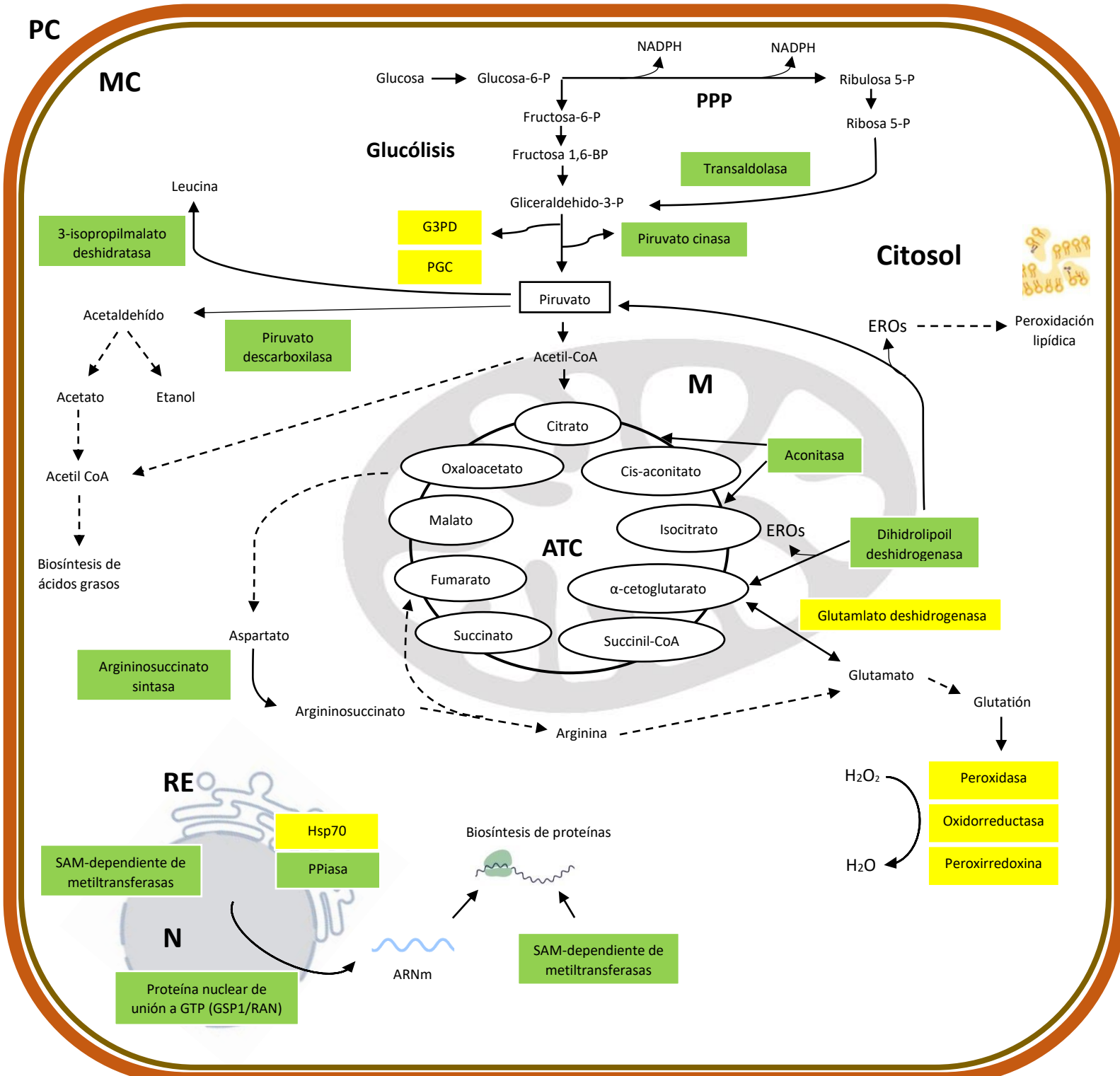


Figura 8. Resumen de los efectos del extracto butanólico de *J. macrocarpa* sobre el perfil proteico de *Fusarium verticillioides*. Proteínas en recuadros verdes, aumentaron su abundancia. Proteínas en recuadros amarillos, disminuyeron su abundancia. Abreviaciones para componentes celulares. PC, pared celular; MC: Membrana celular; RE: Retículo endoplasmático; N: núcleo; M: mitocondria. Abreviaciones para metabolitos, enzimas y otras proteínas: G3PD: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; PGC: Fosfoglicerato cinasa; Hsp70, proteína choque térmico 70; PPIasa: peptidil-proil cis-trans isomerasa; Abreviaciones para rutas metabólicas: PPP: ruta de las pentosas fosfato; ATC: Ácido tricarbóxico; EROs: especies reactivas de oxígeno.

CONCLUSIONES

El análisis proteómico comparativo de la respuesta de *F. verticillioides* al extracto butanólico de *J. macrocarpa* condujo a la identificación de 38 puntos de proteína acumulados diferencialmente. Estas proteínas están involucradas en el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, así como al transporte, degradación, plegamiento y estabilización de proteínas, respuesta al estrés oxidativo y actividades diversas. Los resultados muestran que, en general, las proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos aumentan en abundancia, lo que sugiere una alta demanda de energía en el hongo. En contraste, las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, las proteasas y las proteínas críticas para el correcto plegamiento y estabilización proteica durante el estrés se acumularon de manera negativa, es decir, disminuyeron su acumulación, sugiriendo que tales mecanismos son el objetivo de los compuestos responsables del efecto inhibitorio de la fracción butanólica. Cabe destacar que la acumulación de proteínas diversas, cuya inhibición directa o inhibición de las vías en las que están involucradas son objetivos antifúngicos bien conocidos, permite descartarlos como probablemente implicados en el efecto del extracto butanólico de *J. macrocarpa* en el crecimiento de *F. verticillioides*.

RECOMENDACIONES

Se recomienda llevar a cabo una electroforesis bidimensional utilizando tiras de enfoque isoeléctrico de 4 a 7 o de 5 a 8 con la finalidad de separar las proteínas que se encuentran la zona central del gel. Se pueden utilizar criterios menos estrictos de selección de manchas, con esto se identificarán un mayor número de proteínas que nos proporcione información acerca del metabolismo fúngico.

Se recomienda realizar el análisis proteómico en diferentes periodos de tiempo para observar la variación en la acumulación de las proteínas, las alteraciones o regulaciones que se genera en el metabolismo del hongo provocado por el estrés de los compuestos de la fracción butanólica de *J. macrocarpa*.

A su vez, se puede realizar un análisis proteómico libre de geles, mismo que nos proporcionará la identificación y la variación de un gran número de proteínas, las cuales pueden servir como punto de partida para futuros estudios.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, F. M., y Komatsu, S. (2004). A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics*, 4(7), 2072-2081.
- Abdel-Monaim, M., Abo-Elyousr, K., and Morsy, K. (2011). Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). *Crop Protection* 30(2): 185-191. doi:10.1016/j.cropro.2010.09.016.
- Agrios, G. N. (2005). Introduction to plant pathology. *Elsevier Academic Press Publication*.
- Al-Hatmi, A. M., Meis, J. F., y de Hoog, G. S. (2016). *Fusarium*: molecular diversity and intrinsic drug resistance. *PLoS pathogens*, 12(4).
- Alezones, J., y González, A. (2009). Effects of different fungicides on the incidence of *Fusarium verticillioides* in seeds of a white-grained maize hybrid. *Fitopatología Venezolana*, 22(2), 31-32.
- Alltech (2019). Fumonisin ¿Cómo detectarla? ¿Qué consecuencias tiene para nuestro ganado? <https://alltechspain.blogspot.com/2019/07/fumonisin-as-como-detectarla-que.html?m=1>
- Amarsaikhan, N., Albrecht-Eckardt, D., Sasse, C., Braus, G. H., Ogel, Z. B., y Kniemeyer, O. (2017). Proteomic profiling of the antifungal drug response of *Aspergillus fumigatus* to voriconazole. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(7), 398-408.
- An, G.-H. (2001). Improved growth of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), in the presence of tricarboxylic acid cycle intermediates. *Biotechnology Letters* 23(12): 1005-1009. doi:10.1023/A:1010523800650
- ASERCA, Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. (2012). Boletín ASERCA Regional Peninsular: La Industrialización del Maíz. 56/12. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Mérida, México. 32 p. Boudergue.
- Aqueveque, P., Céspedes, C. L., Becerra, J., Aranda, M., y Sterner, O. (2017). Antifungal activities of secondary metabolites isolated from liquid fermentations of *Stereum hirsutum* (Sh134-11) against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). *Food and Chemical Toxicology*, 109, 1048-1054.
- Avis, J.M., and Clarke, P.R. (1996). Ran, a GTPase involved in nuclear processes: its regulators and effectors. *Journal of Cell Science* 109(10): 2423-2427.

- Babu Joseph, M. A. D., & Kumar, V. (2008). Bioefficacy of plant extracts to control *Fusarium solani* f. sp. *melongenae* incitant of brinjal wilt. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 3(2), 56-59.
- Baburina, I., Dikdan, G., Guo, F., Tous, G.I., Root, B., and Jordan, F. (1998). Reactivity at the substrate activation site of yeast pyruvate decarboxylase: inhibition by distortion of domain interactions. *Biochemistry* 37(5): 1245-1255. doi:10.1021/bi9709912
- Bacon, C. W., Yates, I. E., Hinton, D. M., y Meredith, F. (2001). Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives*, 109(suppl 2), 325-332.
- Bajpai, V.K., Shukla, S., y Kang, S.C. (2008). Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresource Technology* 99(18): 8903-8908. doi:10.1016/j.biortech.2008.04.060
- Bauerschmitt, H., Funes, S., y Herrmann, J. M. (2008). The membrane-bound GTPase Guf1 promotes mitochondrial protein synthesis under suboptimal conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 283(25), 17139-17146.
- Bartinicki-Garcia, S. (1990). Role of vesicles in apical growth and a new mathematical model of hyphal morphogenesis. *Tip growth in plant and fungal cells*.
- Becher, R., Weihmann, F., Deising, H. B., y Wirsal, S. G. (2011). Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses. *BMC genomics*, 12(1), 52.
- Belmont, R. M., Cruz, V. C., Martínez, G. M., García, G. S., Licon, R. G., Domínguez, S. Z., y Moreno, M. C. (2000). Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18(2), 125-131.
- Beremand, M. N., y Desjardins, A. E. (1988). Trichothecene biosynthesis in *Gibberella pulicaris*: Inheritance of C- 8 hydroxylation. *Journal of Industrial Microbiology*, 3(3), 167-174.
- Bidart, T. (2004). Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. *Revista chilena de infectología*, 21, 13-19.
- Buitimea-Cantúa, G.V., Rosas-Burgos, E.C., Cinco-Moroyoqui, F.J., Burgos-Hernández, A., Plascencia-Jatomea, M., Cortez-Rocha, M.O., y Gálvez-Ruiz, J.C. (2013). In Vitro Effect of Antifungal Fractions from the Plants *Baccharis glutinosa* and *Jacquinia macrocarpa* on Chitin and β -1,3-Glucan Hydrolysis of Maize Phytopathogenic Fungi and on the Fungal β -1,3-Glucanase and Chitinase Activities. *Journal of Food Safety* 33(4): 526-535. doi:10.1111/jfs.12085.

- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., and Righetti, P.G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25(9): 1327-1333. doi:10.1002/elps.200305844.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2019). Public Health Image Library. <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=4011>
- Chen, C., Long, L., Zhang, F., Chen, Q., Chen, C., Yu, X., Liu, Q., Bao, J., and Long, Z. (2018). Antifungal activity, main active components and mechanism of *Curcuma longa* extract against *Fusarium graminearum*. *Plos One* 13(3): e0194284. doi:10.1371/journal.pone.0194284
- Chen, X., and Williams, C. (2018). Fungal Peroxisomes Proteomics. In *Proteomics of Peroxisomes: Identifying Novel Functions and Regulatory Networks*. Edited by L.A. del Río and M. Schrader. Springer Singapore, Singapore. pp. 67-83
- Cobb, A. H. y Kirkwood, R. C. (2000). *Herbicides and their mechanisms of action* (Vol. 295). Sheffield: Sheffield Academic Press.
- Cruz, H. E., y Verdalet, I. (2007). Tortillas de maíz: una tradición muy nutritiva. *Revista de Divulgación Científica y Tecnología de la Universidad de Veracruz*, 20(3), 1-3.
- D'Arco, G., Fernández-Franzón, M., Font, G., Damiani, P., y Mañes, J. (2009). Survey of fumonisins B1, B2 and B3 in conventional and organic retail corn products in Spain and Italy and estimated dietary exposure. *Food Additives and Contaminants*, 2(2), 146-153.
- de Arruda Grossklaus, D., Bailão, A.M., Vieira Rezende, T.C., Borges, C.L., de Oliveira, M.A.P., Parente, J.A., and de Almeida Soares, C.M. (2013). Response to oxidative stress in *Paracoccidioides* yeast cells as determined by proteomic analysis. *Microbes and Infection* 15(5): 347-364. doi:10.1016/j.micinf.2012.12.002
- de la Torre-Hernández, M. E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., y Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisin—Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77-91.
- Di Ciaccio, L. S., Spotorno, V. G., Córdoba Estévez, M. M., Rios, D. J. L., Fortunato, R. H., & Salvat, A. E. (2018). Antifungal activity of *Parastrephia quadrangularis* (Meyen) Cabrera extracts against *Fusarium verticillioides*. *Letters in applied microbiology*, 66(3), 244-251.
- Djordjevic, J. T., y Lev, S. (2018). Fungal Secretion: The Next-Gen Target of Antifungal Agents? *Cell chemical biology*, 25(3), 233-235.

- Edwards, S. G., y Godley, N. P. (2010). Reduction of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat with early fungicide applications of prothioconazole. *Food Additives and Contaminants*, 27(5), 629-635.
- Fajardo-Somera, R. A., Jöhnk, B., Bayram, Ö., Valerius, O., Braus, G. H., y Riquelme, M. (2015). Dissecting the function of the different chitin synthases in vegetative growth and sexual development in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 75, 30-45.
- Fialho, M.B., de Andrade, A., Bonatto, J.M.C., Salvato, F., Labate, C.A., and Pascholati, S.F. (2016). Proteomic response of the phytopathogen *Phyllosticta citricarpa* to antimicrobial volatile organic compounds from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Research* 183: 1-7. doi:10.1016/j.micres.2015.11.002.
- Fimbres-López, F., Rosas-Burgos, E. C., Burgos-Hernández, A., Plascencia-Jatomea, M., Aldana-Madrid, M. L., Cota-Arriola, O., y Cortez-Rocha, M. O. (2016). Antifungal activity of methanolic extracts of *Jacquinia macrocarpa* and *Krameria erecta* on the growth of *Fusarium verticillioides* and effect on fumonisin production. *Revista Mexicana de Micología*, 43, 1-9.
- Fraczek, M. G., Bromley, M., Buied, A., Moore, C. B., Rajendran, R., Rautemaa, R., y Bowyer, P. (2013). The cdr1B efflux transporter is associated with non-cyp51a-mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7), 1486-1496.
- Frías-Escalante, M. P., Burgos-Hernández, A., Plascencia-Jatomea, M., Aldana-Madrid, M. L., & Cortez-Rocha, M. O. (2015). Antifungal, acute toxicity and mutagenicity activity of extracts from *Datura stramonium*, *Jacquinia macrocarpa* and *Krameria erecta* on *Fusarium verticillioides*. *African Journal of Biotechnology*, 14(28), 2251-2257.
- Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., y Galvano, G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *Journal of food protection*, 64(1), 120-131.
- Gao, T., Chen, J., and Shi, Z. (2016). *Fusarium graminearum* pyruvate dehydrogenase kinase 1 (FgPDK1) Is Critical for Conidiation, Mycelium Growth, and Pathogenicity. *Plos One* 11(6): e0158077. doi:10.1371/journal.pone.0158077.
- Gasch, A. P. (2007). Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast*, 24(11), 961-976.
- Gautam, P., Mushahary, D., Hassan, W., Upadhyay, S. K., Madan, T., Sirdeshmukh, R., y Sarma, P. U. (2016). In-depth 2-DE reference map of *Aspergillus fumigatus* and its proteomic profiling on exposure to itraconazole. *Sabouraudia*, 54(5), 524-536.
- González-Fernández, R., Aloria, K., Valero-Galván, J., Redondo, I., Arizmendi, J.M., and Jorrín-Novo, J.V. (2014). Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. *Journal of Proteomics* 97: 195-221. doi:10.1016/j.jprot.2013.06.022

- Gonzalez-Fernandez, R., y Jorrin-Novo, J. V. (2011). Contribution of proteomics to the study of plant pathogenic fungi. *Journal of proteome research*, 11(1), 3-16.
- Grabon, A., Khan, D., y Bankaitis, V. A. (2015). Phosphatidylinositol transfer proteins and instructive regulation of lipid kinase biology. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(6), 724-735.
- Graves, P. R., y Haystead, T. A. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(1), 39-63.
- Gregorí Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1-1.
- Hagiwara, D., Miura, D., Shimizu, K., Paul, S., Ohba, A., Gonoï, T., y Kawamoto, S. (2017). A novel Zn²-Cys₆ transcription factor AtrR plays a key role in an azole resistance mechanism of *Aspergillus fumigatus* by co-regulating cyp51A and cdr1B expressions. *PLoS pathogens*, 13(1), e1006096.
- Hamer, L., Adachi, K., Dezwaan, T., Lo, S., Montenegro-Chamorro, M., Frank, S., Darveaux, B., Mahanty, S., Heiniger, R., and Skalchunes, A. (2001). Methods for the identification of inhibitors of 3-isopropylmalate dehydratase as antibiotics. Patent USA 2003143657
- Harris, S. D. (2006). Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *International review of cytology*, 251, 41-77.
- Hoehamer, C.F., Cummings, E.D., Hilliard, G.M., and Rogers, P.D. (2010). Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(5): 1655-1664. doi:10.1128/AAC.00756-09.
- Hoppenau, C.E., Tran, V.-T., Kusch, H., Aßhauer, K.P., Landesfeind, M., Meinicke, P., Popova, B., Braus-Stromeyer, S.A., and Braus, G.H. (2014). *Verticillium dahliae* VdTHI4, involved in thiazole biosynthesis, stress response and DNA repair functions, is required for vascular disease induction in tomato. *Environmental and Experimental Botany* 108: 14-22. doi:10.1016/j.envexpbot.2013.12.015
- Hou, Y., Zheng, Z., Xu, S., Chen, C., and Zhou, M. (2013). Proteomic analysis of *Fusarium graminearum* treated by the fungicide JS399-19. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107(1): 86-92. doi:10.1016/j.pestbp.2013.05.009.
- Huang, Q., Mukhtar, I., Zhang, Y., Wei, Z., Han, X., Huang, R., Yan, J., and Xie, B. (2019). Identification and Characterization of Two New S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferase Encoding Genes Suggested Their Involvement in Stipe Elongation of *Flammulina velutipes*. *Mycobiology* 47(4): 441-448. doi:10.1080/12298093.2019.1658332.
- Huerta-Ocampo, J. A., Barrera-Pacheco, A., Mendoza-Hernández, C. S., Espitia-Rangel, E., Mock, H. P., y Barba de la Rosa, A. P. (2014). Salt stress-induced

alterations in the root proteome of *Amaranthus cruentus* L. *Journal of proteome research*, 13(8), 3607-3627.

Huerta-Ocampo, J. Á., Osuna-Castro, J. A., Lino-López, G. J., Barrera-Pacheco, A., Mendoza-Hernández, G., De León-Rodríguez, A., y de la Rosa, A. P. B. (2012). Proteomic analysis of differentially accumulated proteins during ripening and in response to 1-MCP in papaya fruit. *Journal of proteomics*, 75(7), 2160-2169.

INEGI. (2014). Encuesta Nacional Agropecuaria ENA-2014. 40 p

INEGI (Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía). (2017). "Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA)", <http://www.beta.inegi.org.mx/programas/ena/2017/>

Joseph, B., Dar, M. A., y Kumar, V. (2008). Bioefficacy of plant extracts to control *Fusarium solani* f. sp. melongenae incitant of brinjal wilt. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 3(2), 56-59.

Meijer, W. H., van der Klei, I. J., Veenhuis, M., y Kiel, J. A. (2007). ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy*, 3(2), 106-116.

Jastrzębowska, K., and Gabriel, I. (2015). Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. *Amino Acids* 47(2): 227-249. doi:10.1007/s00726-014-1873-1.

Johnson, E.A. (2003). *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *International Microbiology* 6(3): 169-174. doi:10.1007/s10123-003-0130-3.

Jiménez, R., Naty, M., Rojas, S., Victoriconsejer, H., Rincón, A., Hebeaseso, V., y Vaquera Huerta, H. (2009). Marchitez del chile poblano (*Capsicum annum* L.): Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, Producción de Semillas.

Jiménez-Reyes, M.F. (2019). Natural compounds: a sustainable alternative to the phytopathogens control. *Journal of Chilean Chemical*, 46(2), 4459-4465.

Kniemeyer, O., Schmidt, A. D., Vödisch, M., Wartenberg, D., y Brakhage, A. A. (2011). Identification of virulence determinants of the human pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* by proteomics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(5), 368-377.

Koo, B. S., Park, H., Kalme, S., Park, H. Y., Han, J. W., Yeo, Y. S., y Yoon, M. Y. (2009). α - and β -tubulin from *Phytophthora capsici* KACC 40483: molecular cloning, biochemical characterization, and antimicrotubule screening. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(3), 513.

Kumar, K. N., Venkataramana, M., Allen, J. A., Chandranayaka, S., Murali, H. S., y Batra, H. V. (2016). Role of *Curcuma longa* L. essential oil in controlling the growth and zearalenone production of *Fusarium graminearum*. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 522-528.

- Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2005). *Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell, Oxford, England.
- Li, M., Chen, C., Xia, X., Garba, B., Shang, L., and Wang, Y. (2019). Proteomic analysis of the inhibitory effect of chitosan on *Penicillium expansum*. *Food Science and Technology*. 1-8. doi:10.1590/fst.40418
- Liu, T. T., Lee, R. E., Barker, K. S., Lee, R. E., Wei, L., Homayouni, R., y Rogers, P. D. (2005). Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2226-2236.
- Liu, X., Jiang, J., Shao, J., Yin, Y., & Ma, Z. (2010). Gene transcription profiling of *Fusarium graminearum* treated with an azole fungicide tebuconazole. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(4), 1105-1114.
- Llorent-Martínez, E. J., Fernández-de Córdoba, M. L., Ruiz-Medina, A., y Ortega-Barrales, P. (2012). Fluorimetric determination of thiabendazole residues in mushrooms using sequential injection analysis. *Talanta*, 96, 190-194.
- Logrieco, A., Bottalico, A., y Ricci, V. (1990). Occurrence of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereal grains from some Mediterranean countries. *Phytopathologia Mediterranea*, 81-89.
- Ma, Z., Proffer, T. J., Jacobs, J. L., y Sundin, G. W. (2006). Overexpression of the 14 α -demethylase target gene (CYP51) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4), 2581-2585.
- Maeda, K., Nakajima, Y., Motoyama, T., Kitou, Y., Kosaki, T., Saito, T., Nishiuchi, T., Kanamaru, K., Osada, H., Kobayashi, T., and Kimura, M. (2014). Effects of acivicin on growth, mycotoxin production and virulence of phytopathogenic fungi. *Letters in Applied Microbiology* 59(4): 377-383. doi:10.1111/lam.12289
- Magan, N., Medina, A., y Aldred, D. (2011). Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre-and postharvest. *Plant Pathology*, 60(1), 150-163.
- Mamza, W. S., Zarafi, A. B., y Alabi, O. (2010). In vitro evaluation of six fungicides on radial mycelial growth and regrowth of *Fusarium pallidoroseum* isolated from castor (*Ricinus communis*) in Samaru, Nigeria. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(2), 116-122.
- Manilal, A., Merdekios, B., Idhayadhulla, A., Muthukumar, C., & Melkie, M. (2015). An in vitro antagonistic efficacy validation of *Rhizophora mucronata*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(1), 28-32.
- Marín, P., Jurado, M., Magan, N., Vázquez, C., y González-Jaén, M. T. (2010). Effect of solute stress and temperature on growth rate and TRI5 gene expression using

real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. *International journal of food microbiology*, 140(2-3), 169-174.

Marín, P., de Ory, A., Cruz, A., Magan, N., y González-Jaén, M. T. (2013). Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisin biosynthesis. *International journal of food microbiology*, 165(3), 251-258.

Meir, Z., and Osherov, N. (2018). Vitamin Biosynthesis as an Antifungal Target. *Journal of Fungi* 4(2): 72. doi:10.3390/jof4020072

Minic, Z. (2015). Proteomic studies of the effects of different stress conditions on central carbon metabolism in microorganisms. *Journal of Proteomics & Bioinformatics* 8: 80. doi:10.4172/jpb.1000355

Mohammad, H., Elghazawy, N. H., Eldesouky, H. E., Hegazy, Y. A., Younis, W., Avrimova, L., y Seleem, M. N. (2018). Discovery of a novel dibromoquinoline compound exhibiting potent antifungal and antivirulence activity that targets metal ion homeostasis. *ACS infectious diseases*, 4(3), 403-414.

Moreno-Limón, S., González-Solís, L. N., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Ávila, M. L., y Perales-Ramírez, A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, (32), 193-205.

Moreno-Salazar, S. F., Robles-Zepeda, R. E., & Johnson, D. E. (2008). Plant folk medicines for gastrointestinal disorders among the main tribes of Sonora, Mexico. *Fitoterapia*, 79(2), 132-141.

Morita, H., Tomita, S., Maeda, H., Okamoto, A., Yamagata, Y., Kusumoto, K.-I., Amano, H., Ishida, H., and Takeuchi, M. 2012. A serine-type carboxypeptidase KexA of *Aspergillus oryzae* has broader substrate specificity than yeast Kex1, and is required for normal hyphal growth and conidiation. *Applied and Environmental Microbiology* 78(22): 8154. doi:10.1128/AEM.01601-12

Mouilleron, S., Badet-Denisot, M.-A., and Golinelli-Pimpaneau, B. 2006. Glutamine Binding Opens the Ammonia Channel and Activates Glucosamine-6P Synthase. *Journal of Biological Chemistry* 281(7): 4404-4412. doi:10.1074/jbc.M511689200

Murillo-Williams, A., and Munkvold, G. 2008. Systemic infection by *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three temperature regimes. *Plant Disease* 92(12): 1695-1700. doi:10.1094/PDIS-92-12-1695.

- Pandey, V., Singh, M., Pandey, D., and Kumar, A. 2018. Integrated proteomics, genomics, metabolomics approaches reveal oxalic acid as pathogenicity factor in *Tilletia indica* inciting Karnal bunt disease of wheat. *Sci Rep* 8(1): 7826.
- Patterson, K. C., y Streck, M. E. (2014). Diagnosis and treatment of pulmonary aspergillosis syndromes. *Chest*, 146(5), 1358-1368.
- Perfect, J. R. (2017). The antifungal pipeline: a reality check. *Nature reviews Drug discovery*, 16(9), 603.
- Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., & Shirai, K. (2003). Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 582-586.
- Que, Y., Yue, X., Yang, N., Xu, Z., Tang, S., Wang, C., Lv, W., Xu, L., Talbot, N.J., and Wang, Z. (2019). Leucine biosynthesis is required for infection-related morphogenesis and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Current Genetics*: 1-17. doi:10.1007/s00294-019-01009-2
- Rico-Sole, R. (2011). Economic impact of mycotoxins in nuts and dried fruit chain. In *International Symposium on Mycotoxins in Nuts and Dried Fruits* 963 (pp. 155-172).
- Riquelme, M., Bredeweg, E. L., Callejas-Negrete, O., Roberson, R. W., Ludwig, S., Beltrán-Aguilar, A., y Freitag, M. (2014). The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. *Molecular biology of the cell*, 25(8), 1312-1326.
- Riquelme, M., Gierz, G., & Bartnicki-García, S. (2000). Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology*, 146(7), 1743-1752.
- Robertson-Hoyt, L. A., Kleinschmidt, C. E., White, D. G., Payne, G. A., Maragos, C. M., & Holland, J. B. (2007). Relationships of resistance to *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination with agronomic performance of maize. *Crop science*, 47(5), 1770-1778.
- Roberson, R. W., Saucedo, E., Maclean, D., Propster, J., Unger, B., Oneil, T. A., y Lowry, D. (2011). The hyphal tip structure of *Basidiobolus* sp.: a zygomycete fungus of uncertain phylogeny. *Fungal biology*, 115(6), 485-492.
- Roncero, M. I. G., Hera, C., Ruiz-Rubio, M., Maceira, F. I. G., Madrid, M. P., Caracuel, Z., & Velasco, C. (2003). *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(2), 87-98.
- Rosas-Burgos, E. C., Cortez-Rocha, M. O., Cinco-Moroyoqui, F. J., Robles-Zepeda, R. E., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D. I., & Lares-Villa, F. (2009). Antifungal activity in vitro of *Baccharis glutinosa* and *Ambrosia confertiflora*

extracts on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2257.

Roselló, J., Sempere, F., Sanz-Berzosa, I., Chiralt, A., & Santamarina, M. P. (2015). Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticillioides*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(2), 359-367.

Roveda, G. (2007). Mecanismos de adaptación de maíz asociado a *Glomus* spp. en suelos con bajo fósforo disponible. *Agronomía colombiana*, 25(2), 349-356.

Roy, H., y Ibba, M. (2006). Phenylalanyl-tRNA synthetase contains a dispensable RNA-binding domain that contributes to the editing of noncognate aminoacyl-tRNA. *Biochemistry*, 45(30), 9156-9162.

Rumsfeld, J., Ziegelbauer, K., and Spaltmann, F. 2000. High-Throughput Assay for Inorganic Pyrophosphatases Using the Cytosolic Enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* and Human as an Example. *Protein Expression and Purification* 18(3): 303-309. doi:10.1006/prep.1999.1189.

Saha, D., Dasgupta, S., & Saha, A. (2005). Antifungal activity of some plant extracts against fungal pathogens of tea (*Camellia sinensis*). *Pharmaceutical biology*, 43(1), 87-91.

Sarmiento-Villamil, J.L., García-Pedrajas, N.E., Baeza-Montañez, L., and García-Pedrajas, M.D. (2018). The APSES transcription factor Vst1 is a key regulator of development in microsclerotium- and resting mycelium-producing *Verticillium* species. *Molecular Plant Pathology* 19(1): 59-76. doi:10.1111/mpp.12496.

Scholthof, K. B. G. (2003). One foot in the furrow: linkages between agriculture, plant pathology, and public health. *Annual Review of Public Health*, 24(1), 153-174.

Senac, T., and Hahn-Hägerdal, B. 1991. Effects of increased transaldolase activity on D-xylulose and D-glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* cell extracts. *Applied and Environmental Microbiology* 57(6): 1701-1706

SENASICA. (2009). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Campaña de Manejo Fitosanitario del Mango en el Estado de Guerrero.*

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA-SIAP. 2010. Cierre de la producción agrícola por cultivo. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-producción-agrícola-por-cultivo/>

Shishodia, S. K., Tiwari, S., & Shankar, J. (2019). Resistance mechanism and proteins in *Aspergillus* species against antifungal agents. *Mycology*, 10(3), 151-165.

- SIAP (2021). Servicio de información agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Información, acciones y programas. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
- Sloan, A. E. (2007). TrendSense 2008 Market Report. *Sloan Trends Inc., Escondido, Calif. Retrieved March, 3, 2010*
- Stie, J., y Fox, D. (2008). Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryotic Cell*, 7(2), 177-186
- Solfrizzo, M., Chulze, S. N., Mallmann, C., Visconti, A., De Girolamo, A., Rojo, F., y Torres, A. (2004). Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. *Food additives and contaminants*, 21(11), 1090-1095.
- Son, H., Min, K., Lee, J., Choi, G.J., Kim, J.-C., and Lee, Y.W. (2012). Differential roles of pyruvate decarboxylase in aerial and embedded mycelia of the ascomycete *Gibberella zeae*. *FEMS Microbiology Letters* 329(2): 123-130. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02511.x
- Sorgo, A. G., Heilmann, C. J., Dekker, H. L., Bekker, M., Brul, S., de Koster, C. G., y Klis, F. M. (2011). Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 10(8), 1071-1081.
- Stuart, R. A. (2008). Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 40(5), 411.
- Suárez-Jiménez, G.M., Cortez-Rocha, M.O., Rosas-Burgos, E.C., Burgos-Hernández, A., Plascencia-Jatomea, M., and Cinco-Moroyoqui, F.J. 2007. Antifungal activity of plant methanolic extracts against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and fumonisin B1 production. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(2): 134-142.
- Sun, Y., Yi, X., Peng, M., Zeng, H., Wang, D., Li, B., Tong, Z., Chang, L., Jin, X., and Wang, X. 2014. Proteomics of *Fusarium oxysporum* Race 1 and Race 4 Reveals Enzymes Involved in Carbohydrate Metabolism and Ion Transport That Might Play Important Roles in Banana Fusarium Wilt. *Plos One* 9(12): e113818. doi:10.1371/journal.pone.0113818
- Taba, S. (2004). *Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo*. Cimmyt.
- Tagne, A., Zollo, P.A., Fontem, D., Mathur, S., and Neergaard, E. (2013). Fungicides and essential oils for controlling maize seed-borne *Fusarium moniliforme* and its

transmission into seedlings. *World Journal of Agricultural Sciences* 9(3): 290-297. doi:10.5829/idosi.wjas.2013.9.3.1741.

- Tahara, E.B., Barros, M.H., Oliveira, G.A., Netto, L.E., and Kowaltowski, A.J. (2007). Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. *The FASEB Journal* 21(1): 274-283. doi:10.1096/fj.06-6686com
- Takahara, H., Huser, A., and O'Connell, R. (2012). Two arginine biosynthesis genes are essential for pathogenicity of *Colletotrichum higginsianum* on *Arabidopsis*. *Mycology* 3(1): 54-64. doi:10.1080/21501203.2011.654353
- Talibi, I., Askarne, L., Boubaker, H., Boudyach, E. H., Msanda, F., Saadi, B., y Aoumar, A. A. B. (2012). Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop Protection*, 35, 41-46.
- Teixeira, M. C., Santos, P. M., Fernandes, A. R., y Sá-Correia, I. (2005). A proteome analysis of the yeast response to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Proteomics*, 5(7), 1889-1901.
- Timón Gómez, A. (2016). Mecanismos de adaptación de la actividad mitocondrial en respuesta a estrés (Doctoral dissertation).
- Traynor, A.M., Sheridan, K.J., Jones, G.W., Calera, J.A., and Doyle, S. (2019). Involvement of Sulfur in the Biosynthesis of Essential Metabolites in Pathogenic Fungi of Animals, Particularly *Aspergillus* spp.: Molecular and Therapeutic Implications. *Frontiers in Microbiology* 10(2859). doi:10.3389/fmicb.2019.02859
- Valenzuela-Cota, D. F., Buitimea-Cantúa, G. V., Plascencia-Jatomea, M., Cinco-Moroyoqui, F. J., Martínez-Higuera, A. A., & Rosas-Burgos, E. C. (2019). Inhibition of the antioxidant activity of catalase and superoxide dismutase from *Fusarium verticillioides* exposed to a *Jacquinia macrocarpa* antifungal fraction. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(8), 647-654.
- Valenzuela-Cota, D. F., Buitimea-Cantúa, G. V., Rosas-Burgos, E. C., Cinco-Moroyoqui, F. J., Yépiz-Gómez, M. S., Cortez-Rocha, M. O., y Burgos-Hernández, A. (2014). The antifungal effect of *Jacquinia macrocarpa* plant extracts on the growth of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. *Revista Mexicana de Micología*, 39.
- Van Der Linden, J. W., Camps, S. M., Kampinga, G. A., Arends, J. P., Debets-Ossenkopp, Y. J., Haas, P. J., & Karawajczyk, A. (2013). Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clinical infectious diseases*, 57(4), 513-520.

- Velázquez-Gurrola, A., Angulo-Escalante, M. Á., García-Estrada, R. S., Carrillo-Fasio, J. A., & Guerrero-Ontiveros, C. A. (2006). Extractos de semilla de *Moringa oleifera* Lam. para el Control de *Rhizopus stolonifer* Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2).
- Sales, M. D. C., Costa, H. B., Fernandes, P. M. B., Ventura, J. A., & Meira, D. D. (2016). Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 26-31.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194-205.
- Vödtsch, M., Albrecht, D., Leßing, F., Schmidt, A. D., Winkler, R., Guthke, R., & Kniemeyer, O. (2009). Two-dimensional proteome reference maps for the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Proteomics*, 9(5), 1407-1415.
- Wagemaker, M.J., Eastwood, D.C., Van der Drift, C., Jetten, M.S., Burton, K., Van Griensven, L.J., and den Camp, H.J.O. (2007). Argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase: two ornithine cycle enzymes from *Agaricus bisporus*. *Mycological Research* 111(4): 493-502. doi:10.1016/j.mycres.2007.01.016
- Wang, S., Zheng, Y., Xiang, F., Li, S., & Yang, G. (2016). Antifungal activity of *Momordica charantia* seed extracts toward the pathogenic fungus *Fusarium solani* L. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(4), 881-887.
- Warham, E. J., Butler, L. D., y Sutton, B. C. (1996). Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de laboratorio. CIMMYT. México, D. F. 84p.
- Washburn, M. P., Wolters, D., y Yates III, J. R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature biotechnology*, 19(3), 242.
- Wolters, D. A., Washburn, M. P., y Yates, J. R. (2001). An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Analytical chemistry*, 73(23), 5683-5690.
- Yang, F. E. N., Jensen, J. D., Svensson, B., Jørgensen, H. J., Collinge, D. B., y Finnie, C. (2012). Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat. *Molecular plant pathology*, 13(5), 445-453
- Yike, I. (2011). Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. *Mycopathologia* 171(5): 299-323. doi:10.1007/s11046-010-9386-2

- Zhang, Y., Zhang, Z., Zhang, X., Zhang, H., Sun, X., Hu, C., y Li, S. (2012). CDR4 is the major contributor to azole resistance among four Pdr5p-like ABC transporters in *Neurospora crassa*. *Fungal biology*, 116(7), 848-854.
- Zhang, X., Leger, R.J.S., and Fang, W. (2017). Pyruvate accumulation is the first line of cell defense against heat stress in a fungus. *MBio* 8(5): e01284-01217. doi:10.1128/mBio.01284-17.
- Zhang, L., Wang, L., Liang, Y., y Yu, J. (2019). FgPEX4 is involved in development, pathogenicity, and cell wall integrity in *Fusarium graminearum*. *Current genetics*, 1-12

ANEXOS

Tabla Suplementaria 1. Proteínas identificadas de *Fusarium verticillioides* expuesto a la fracción antifúngica de *Jacquinia macrocarpa* mediante LC/MS-MS y análisis bioinformático utilizando el subconjunto de proteínas de *F. verticillioides* nrNCBI y Spectrum Mill MS Proteomics Workbench.

Spot no. ^(a)	Proteína ^(b)	Número de acceso ^(c)	Mr/pI Exp. ^(d)	Mr/pI Teórico. ^(e)	PM ^(f)	% Sec ^(g)	Score ^(h)	Ratio ⁽ⁱ⁾	Péptidos identificados
1	NADP-específica glutamato deshidrogenasa	XP_018754252	63.5/3.45	48.9/5.75	3	8%	39.33	0.38	K.DAFVAGLETAQK.Y K.IIELGGSVVSLSDSK.G R.TALAVAAIPER.V
2	Fosfoglicerato cinasa	XP_018757237	45.1/3.46	56.7/8.85	10	23%	156.86	0.21	K.AEDGAVILLENLR.F K.ATLDAVVDAVQK.D K.ELPGVTALSSK.- K.IQLIDNLLDK.V K.IVIIGGGDTATVAK.K K.LSITDVDVK.G K.LVLPVDYITADKFDK.D K.TLEGVVSIGNSLFDEAGSK.T K.TVGNLVEK.A R.VDFNVPLDADK.N
3	Proteasa vacuolar A	XP_018759035	45.1/4.08	42.9/4.68	4	10%	38.96	0.45	K.DQDFAEATK.E R.FDGILGLGYDR.I K.FTGDIEYIPLR.R K.YDSSASSTYK.E
4	Proteasa vacuolar A	XP_018759035	44.2/4.16	42.9/4.68	3	10%	46.39	0.45	K.DQDFAEATK.E R.FDGILGLGYDR.I K.FTGDIEYIPLR.R K.YDSSASSTYK.E
5	Proteasa vacuolar A	XP_018759035	43.4/4.25	42.9/4.68	3	21%	66.79	0.44	K.AYWEVDLEAIAFGDEVAEQEN TGAILDTGTSLNVLPSALAE LLNK. E K.FDGILGLGYDR.I K.LLDEPVFAFYLDNQDGESEAT FGGIDK.S
6	Proteína disulfuro isomerasa	XP_018744207	63.6/4.49	55.3/4.74	14	36%	193.91	0.45	K.AAGITSYMIK .Q + Oxidation (M) K.ADKFPSFAIQEVVK.N K.ALAPEYEEAATTLK.E R.DTYLFGGVNDAVAEAEAGVK. A K.EITHDNIK.F K.FVEDFAAGK.I K.INFATIDAK.A K.QSLPAVSILTK.D K.SEPINETQEGPVTVVAK.S K.SYNDIVLDDTK.D K.TVEDLANFIK.E R.VDATLNDVPDEIQGFPTIK.E K.VVVVAYLNADDK.L K.YDDLASQFAASEFK.S
7	Proteína hipotética FVEG_14045 (Tubulina beta)	XP_018762116	52.3/4.71	57.8/5.2	2	6%	25.02	0.48	R.NFLFAGDWMQPYHQLV PNVL DK.I R.TGQNVYDIR.G
8	Proteína hipotética FVEG_00389 (Disulfuro isomerasa)	XP_018742493	87.5/5.22	71.7/5.16	8	26%	154.23	0.40	K.GDTVHILNPD SK.G K.DCEGVAEPR.W K.LTGHPNLR.Y R.GYAVLAFNYK.G R.IDTEGSGQITQVR.G R.LAEVQLDAVAR.L R.LSNTSVLVVGSGETNAK.A R.NYIVAINTEAEVK.R

									K.SGGVGITGVSAGGYNTR.S R.VILIDLDSGSWK.D
9	Proteína hipotética FVEG_00389 (Disulfuro isomerasa)	XP_01874 2493	85.9/5.31	71.7/5.16	11	23%	139.97	0.47	K.AGGEVELIVVPEEG HGFGLPK.N K.DCEGVAEPR.W K.GDVTIHLNPDSE R.GYAVLAFNYK.G R.ILDTADFYEPSPDGSK.L R.LAEVQLDAVAR.L R.LSNTSVLVVGSGETNAK.A K.LTGHPNLR.Y R.NYIVAINTEAEVK.R K.SGGVGITGVSAGGYNTR.S
10	Proteína Hsp70	XP_01875 1449	84.3/5.35	73.2/5.68	6	13%	74.53	0.48	R.ADSVLNDRTER.A R.IIENSEGAR.T K.NLSGEGTATAAEIK.E K.TSGIDLSGDR.M R.TTPSVVFAEDGER.L R.VVNEPTAAALAYGLEK.E
11	Proteína Hsp70	XP_01875 1449	76.5/5.31	73.2/5.68	3	6%	34.69	0.49	K.SQVFSTAADFQTAIVEIK.V K.TSGIDLSGDR.M R.VVNEPTAAALAYGLEK.E
12	Argininosucinato sintasa	XP_01875 8679	46.1/5.45	47.2/5.29	5	13%	61.93	2.52	R.EFVQNAIAFSQK.A K.GNVIIVGR.S M.IPVSSTPK.A M.TVTGSLEIFK.E R.VCLAYSGGLDTSTILK.W
13	Proteína hipotética FVEG_09588 (Transaldolasa)	XP_01875 6532	37.1/5.01	33.2/4.97	10	34%	53.4	2.11	K.AAEILQR.D K.ATGTTVVSDSGDFVSIK.Y K.EEDPGVQSVK.T R.FDFNEDQMAVEK.L + Oxidation (M) K.GGPIDQQVDDALDR.L R.ILDWFK.A K.LIDVAIDYAK.Q K.SYINDEALFR.F K.VSTEVDAR.Y R.YSFDTQASVVK.A
14	Pirofosfatasa inorgánica	XP_01874 3465	34.6/5.18	45.4/7.81	6	19%	35.75	3.36	K.ATDFVLAEPEK.A K.DSGITDFR.T K.DVAASGGFHR.L R.IGYVGEFGK.I K.IQIDELTSHYGMTPDDYTAVR. C + Oxidation (M) K.VALLEPNDPSDVTEIIGTGK.V
15	Proteína hipotética FVEG_11957 (Metiltransferasa)	XP_01875 9741	31.3/5.08	34.3/5.09	9	39%	135.27	2.38	R.AYSAQQGATYAEHR.R R.EAHPEAVGTENDVVR.Q K.EmLTGDMTGVLVLLVR.K + Oxidation (M) R.FDTLIDVCGPGTATR.S K.GKEmLTGDMTGVLVLLVR.K + Oxidation (M) K.ILNDAGVEK.G K.LYDAIIDFHK.E R.SITLNVK.F K.TAYGLDPSEGMISTAR.S + Oxidation (M)
16	Proteína NMT1	XP_01875 6775	32.2/5.64	38.3/5.72	8	24%	123.89	2.08	K.AMIHTLAAK.A + Oxidation (M) K.ATDFVLAEPEK.A K.DDVQMLR.I + Oxidation K.DSGITDFR.T K.DVAASGGFHR.L R.IGYVGEFGK.I R.SFAYFSK.D

									K.VALLEPNDPSDVTEIIGTGK.V
17	Proteína hipotética FVEG_00448 (S-adenosilmetionina dependiente metiltransferasa (SAM, clase I))	XP_01874 2582	29.8/5.42	30.9/5.55	4	17%	85.43	2.20	K.ELTVENLSVGVVGINTK.D K.ESLVQDK.E R.IFQIEYAAEAVK.Q K.QGSVVVGIASK.T
18	Proteína hipotética FVEG_06630 (Glutamina aminotransferasa)	XP_01875 2219	25.3/5.25	24.4/5.08	4	24%	59.97	0.43	K.LAVDGVITGQNPASAHAVGK.A K.LTSAMPVLEDEIK.R K.VDGKPLLEGR.E K.VLVVLTQSJK.M
19	Oxidoreductasa (PRX 5)	XP_018745 113	17.5/4.99	18.3/5.18	6	37%	76.62	0.49	R.DEEPGEIEK.S R.FAIVDQGK.V K.FSQTIGWNIGER.T K.ILFMSDK.D K.ILFMSDKDAK.F + Oxidation (M) K.VVYAARDEEPGEIEK.S
20	Peroxiredoxina	XP_01874 3179	17.6/5.32	20.5/8.8	2	16%	24.1	0.48	R.FLGDPTGEFTK.A R.VGQEIPNLVDLLEDSGPNK.V
21	3-isopropilalato deshidratasa	XP_01874 8458	106.2/5.62	85.5/5.48	3	5%	35.37	2.81	K.TLVVTGPNFGCGSSR.E R.IQIDGELAPGVSSK.D R.AM ^u VVPGSGLVK.A + Oxidation (M)
22	3-isopropilalato deshidratasa	XP_01874 8458	105.1/5.69	85.5/5.48	13	21%	155.3	2.61	R.AM ^u VVPGSGLVK.A + Oxidation (M) K.DIASFIEEDSR.T K.DVVLHAIGR.I R.ELPAEPPHVDER.T K.GTAAPLDR.S K.HCLVNGLDDIGLTMQQEDK.I + Oxidation (M) R.IEDKDNLEAIAAEAR.A R.IQIDGELAPGVSSK.D K.SLQSDPGAK.Y R.SNVDTDAIIPK.Q K.TLVVTGPNFGCGSSR.E K.VFIGSCTNAR.I R.YKEDGSENPDFILNQEPFR.Q
23	3-isopropilalato deshidratasa	XP_01874 8458	103.7/5.76	85.5/5.48	15	22%	220.41	2.71	R.AM ^u VVPGSGLVK.A + Oxidation (M) K.DIASFIEEDSR.T R.DIEIDLPNQLIK.N K.DVVLHAIGR.I R.ELPAEPPHVDER.T K.FGVTYFGLGDK.R K.GTAAPLDR.S R.IQIDGELAPGVSSK.D K.LDGTILLYIDR.H R.NLSMEAR.M + Oxidation (M) R.SNVDTDAIIPK.Q K.TLVVTGPNFGCGSSR.E K.VFIGSCTNAR.I K.VFSAHIVDEK.L R.YKEDGSENPDFILNQEPFR.Q
24	Piruvato descarboxilasa	XP_01874 9901	61.4/5.88	63.2/5.72	7	14%	96.15	2.10	R.ALIMTAEASAR.N R.AQSIVEGSDLLLITIGALK.S K.DLVSVFGGEK.T K.EVHQLIDK.L K.SMPAPSIPEVR.N + Oxidation (M) K.TELNELLTNK.E R.YSTYPGVAMR.G + Oxidation (M)

25	Peroxidasa	XP_01876 0767	24.58/6.14	25.6/5.85	7	38%	103.33	0.49	K..DIGEVTGGNVEFPPIIGDK.Q R.IVKPYLR.F K.LGSIAPNFQAETTK.G K.LIGLSANTIESHEGWIK.D K.LQPEFTK.R R.TIFSYPASTGR.N R.VIDSLQTGDKYR.I
26	Aconitato hidratasa mitochondrial	XP_01875 9992	89.21/6.28	85.7/6.2	5	7%	64.58	2.05	R.ASVTVDVAPTSR.N R.DIPILIK.S K.EHAALPR.T K.LAPPTGDGLPSK.L K.SAFTVTPGSEQIR.N
27	Aconitato hidratasa mitochondrial	XP_01875 9992	87.5/6.36	85.7/6.2	13	18%	178.97	2.06	R.ASVTVDVAPTSR.L R.DALNHGK.A K.DIPILIK.A R.EHAALPR.H K.EIGDFAR.Q K.EVYNFLSTACAK.Y K.GYDPGQDTYQAPPSR.A R.IHETNLK.K K.LAPPTGDGLPSK.G K.MSENLDIVR.A + Oxidation (M) K.NATTGEWGAVPAVAR.D K.QGMPLTFTDPADYDK.I + Oxidation (M) K.SAFTVTPGSEQIR.A
28	Cistationina sintasa	XP_01875 0773	60.22/6.35	56/5.95	10	25%	152.5	0.49	R.AATVLSATELIGNTPLVR.L R.ALGATIIR.T K.DTPLTTLK.F R.EFASPINPGK.R K.FFEWNSAAVVTEK.T K.INAIVAGAGTGGTITGLAR.G R.LDEIVTDPR.E K.TTDPYEGATIASLR.L K.VDLLTWMINK.K + Oxidation (M) K.VEGIGYDFIPDVLDDQIVDK.W
29	Dihidrolipoil deshidrogenasa	XP_01874 9920	55.68/6.51	54.4/6.7	10	27%	139.25	2.42	K.AEEEEAVVVEYK.K K.DLVVIGGGVAGYVAAIK.A K.ETSVGLTK.G R.GIEVGEVK.L K.NILIATGSEATPFPGLEIDEK.R R.RPYTGGLGLENIGLEADDR.R K.TNQDTEGMVK.M + Oxidation (M) K.VDLNEGGETSVR.G R.VIIDSEYR.T K.VTIVEFLGQGGPGMDTEIAK.N + Oxidation (M)
30	Piruvato cinasa	XP_01876 0785	70.4/6.64	60.3/6.35	12	28%	237.5	2.58	K.ADPEHLGIGQLQ.- K.AENTIPYVSHFEEMCTLVK.R + Oxidation (M) R.AQDIYDIR.E R.DSGLNVVR.M K.EILEATDGVVMVAR.G + Oxidation (M) K.GGMGNTNTRL.I + Oxidation (M) K.GVNLNPTDVLDPALSEK.D K.KGVNLNPTDVLDPALSEK.D K.NITNVIEPGR.V R.SSIICTIGPK.T K.SVAATAQDHLEFGGK.I K.TNSVEAINK.L

31	Piruvato cinasa	XP_01876 0785	69.1/6.83	60.3/6.35	14	31%	237.5	3.16	K.ADPEHLGIGQLQ.- R.AQDIYDIR.E R.ASLDLGAGGIIVLSTSGESAR. M R.DSGLNVVR.M K.EILEATDGV M VAR.G + Oxidation (M) K.FGVENNVD M VFASFIR.R + Oxidation (M) K.GG M GNTN T LR.I + Oxidation (M) K.GVNLPNTD V DLPALSEK.D K.HIQIISK.I K.NITNVIEPGR.V R.GVAIALDTK.G R.SSIICTIGPK.T K.TNSVEAINK.L R.VIYVDDGVLAFDVLEIKDEK.T
32	Proteina hipotética FVEG_01283 (Gliceraldehido3- fosfato deshidrogenasa	XP_01874 3991	27.7/6.48	24.2/6.01	8	44%	110.32	0.47	K.AHESTEVTHHQQSK.E K.FKDGILSIVVPK.A R.LLDDFDSYSR.Q R.NFYNSDASFTPLFR.L R.SGLTHWQPK.F R.TYTAGTPPAGLVEGSQSR.G R.VDQDNVSAK.F K.VEDEAEAK.A
33	Proteina nuclear GTP GSP1/Ran	XP_01874 3901	23.3/6.49	24.8/6.92	2	9.2%	85.11	2.35	K.VDLNEGGETSV.R R.VIIDSEYR.T
34	Gliceraldehido 3- fosfato deshidrogenasa	XP_01874 9661	27.1/6.86	36.9/6.39	5	20%	73.8	0.35	K.AGISLNDNFVK.L R.GAAQNIIPSSTGAAK.A K.KVIISAPSADAP M YVVGVNENK .Y + Oxidation (M) K.VIPELNGK.L R.VPTANVS V DLTVR.L
35	Peptidil-prolil cis- trans isomerasa mitocondrial	XP_01874 2514	18.5/7.37	24.3/9.58	2	12%	94.54	2.43	K.ALEATGSGSGAVK.Y R.IIPDF M LQGGDFTR.G + Oxidation (M)
36	Peptidil-prolil cis- trans isomerasa mitocondrial	XP_01874 2514	18.9/7.57	24.3/9.58	7	36%	94.54	0.42	K.ALEATGSGSGAVK R.ATIVDSGEL.- K.FADENFK.L R.IIPDF M LQGGDFTR.G + Oxidation (M) R.INFNLYDK.L R.INFNLYDKEVPK.T K.RATIVDSGEL.-
37	Porina proteica de la membrana externa mitocondrial	XP_01874 6309	27.1/9.21	29/8.8	10	43%	149.35	0.49	K.ATSAAIEGK.Y R.EGVTLGLGGSFDTQK.L R.GIAALAYNVLLR.E K.GPVANVD A VVGHEGFLAGASA GYDANK.A R.IDPVSFTK.V R.IEVADSLAK.G K.LDQATHK.L K.LEGLFNFLPATAAK.G K.TGNAVGLEVASK.Y K.VNSQVEAGAK.A
38	Porina proteica de la membrana externa mitocondrial	XP_01874 6309	26.9/9.38	29/8.8	11	40%	149.35	0.40	R.AFFDLLK.G K.ATSAAIEGK.Y K.DTAPNGVAFK.V R.EGVTLGLGGSFDTQK.L R.GIAALAYNVLLR.E R.IDPVSFTK.V K.IEVADSLAK.G K.LDQATHK.L K.LEGLFNFLPATAAK.G K.TGNAVGLEVASK.Y K.VNSQVEAGAK.A

<p>a Los números de mancha corresponden a la figura 16. b. Los identificadores corresponden a la base de datos nrNCBI subconjunto <i>Fusarium verticillioides</i>. c Masa molecular/punto isoeléctrico experimentales. d Masa molecular/punto isoeléctrico teóricos. e Número de péptidos identificados. f. Cobertura de secuencia. g. Valores de score >23 indican identidad o extensa homología p<0.01. h. Cambio de veces expresado como la relación del % de volumen entre el control (<i>F. verticillioides</i>) y el estrés (<i>F. verticillioides</i> expuesto al extracto butanólico de <i>J. macrocarpa</i>).</p>									