

# La Biosíntesis de las Poliaminas en el Hongo Fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*

## Polyamine Biosynthesis in the Phytopathogenic Fungus *Macrophomina phaseolina*

Martha Viviana Roa Cordero y Raymundo Rosas Quijano, Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Reynosa, Tamaulipas, CP 88710, México. Correspondencia: viviana.udes@gmail.com

(Recibido: Diciembre 12, 2012 Aceptado: Abril 08, 2013)

---

Roa Cordero MV y Rosas Quijano R. 2013. La Biosíntesis de las poliaminas en el hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*. Revista Mexicana de Fitopatología 31:45-59.

**Resumen.** El estudio del mecanismo biosintético de las poliaminas en los hongos fitopatógenos permite precisar las particularidades metabólicas de este proceso biológico, que pese a su conservación evolutiva, facilita la comprensión del papel que desempeñan estos compuestos en el proceso patogénico. *Macrophomina phaseolina* es un hongo fitopatógeno con un amplio espectro de hospedantes que incluye diferentes especies de granos de interés agroeconómico, tales como legumbres y vegetales. Debido a su potencial necrotrófico, elevada persistencia y distribución geográfica globalizada, la comprensión del papel regulador que ejercen las poliaminas en la virulencia de este microorganismo, constituye un eslabón fundamental para el entendimiento del patosistema planta-*M. phaseolina*. Mientras se progresa en la descripción de la ruta biosintética de las poliaminas en este fitopatógeno, nosotros discutimos un modelo sobre la síntesis de estos compuestos y su función en la patogénesis, basados en la evidencia de su genoma, recientemente secuenciado.

Palabras clave adicionales: Ornitina, putrescina, espermidina, espermina, pudrición carbonosa, antienzima.

Las características generales de los organismos obedecen al binomio herencia-ambiente, lo que establece una estrecha relación entre los rasgos genéticos de los individuos y sus respuestas a las diferentes condiciones del entorno. Esto podría explicar la evolución de sistemas de regulación complejos que permiten la adaptación celular y reflejan la interacción hospedero-patógeno.

Las poliaminas son policationes alifáticas de origen orgánico, que gracias a su versatilidad y ubicuidad participan en la regulación de procesos moleculares y

**Abstract.** The study of polyamine biosynthetic mechanisms in phytopathogenic fungi is relevant in order to clarify the metabolic variations of this biological process, which despite its evolutionary conservation, could help to understand the role of these compounds in the fungal pathogenic process. *Macrophomina phaseolina* is a fungal plant pathogen with wide host spectrum including economically important crops such as legumes and vegetables. Due to its necrotrophic potential, high persistence and global distribution, the comprehension of the regulatory role played by polyamines in fungal virulence is a key factor to understand the pathosystem plant-*M. phaseolina*. Since polyamine metabolism in *M. phaseolina* is not yet completely understood, we discuss a model to explain the polyamine biosynthetic pathways and their role in the pathogenesis, based on their recently sequenced genome.

Additional keywords: Ornithine, putrescine, spermidine, spermine, charcoal rot, antizyme.

---

The main characteristics of the organisms are due to the inheritance-environment duo, which establishes a close relationship between genetic traits of individuals and their responses to different environmental conditions. In turn, this could explain the evolutionary process of complex regulatory systems that allow cell adaptation and reflects the host-pathogen interaction.

Polyamines are organic aliphatic polycations, which due to their versatility and ubiquity are involved in the regulation of several cellular and molecular processes. They are nitrogenous compounds largely bound to proteins, nucleic acids and cell membranes due to their positive charge, distributed along the molecule. Previous reports have described a role of polyamines as osmolytes, due to their high cytoplasmic concentrations (Rajam *et al.*, 2004). Putrescine (diamine), spermidine (triamine) and spermine (tetramine) are the most abundant polyamines in

celulares. Se trata de compuestos nitrogenados cuya carga positiva, distribuida a lo largo de la molécula, los capacita para establecer asociaciones con proteínas, ácidos nucleicos y membranas celulares. Se ha descrito además que, dada su alta concentración en el citoplasma, pueden comportarse como osmolitos (Rajam *et al.*, 2004). La diamina putrescina, la triamina espermidina y la tetramina espermina son las poliaminas más abundantes en las células vivas (Groopa y Benavides, 2008); no obstante, pese a que la espermina se encuentra en la mayoría de eucariotas superiores, un gran número de especies fúngicas no la sintetizan (Morgan, 1998; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

El estudio de las poliaminas en diferentes modelos (mamíferos, parásitos protozoarios, hongos, plantas, etc.) ha permitido dilucidar su papel como reguladores de una amplia gama de procesos biológicos relacionados con el crecimiento, desarrollo y la diferenciación celular, entre otros (Coburn, 2009; Igarashia and Kashiwagic, 2010; Iacomino *et al.*, 2012). Inicialmente se les atribuyó este papel únicamente sobre la base de evidencia circunstancial, que reveló un incremento en la concentración de poliaminas en tejidos altamente proliferativos, así como también un aumento precipitado de la actividad enzimática mediadora de su biosíntesis, cuando el crecimiento o la diferenciación celular fueron inducidos (Heby, 1981; Tabor y Tabor, 1985; Kaur-Sawhney *et al.*, 1988; Desforjes *et al.*, 2013). Investigaciones posteriores confirmaron su papel como reguladores de la embriogénesis somática, desarrollo de flores y frutos, respuesta al estrés biótico y abiótico, senescencia, formación de la raíz y brotes en vegetales (Rajam *et al.*, 2004; Wimalasekera *et al.*, 2011; Tisi *et al.*, 2011); la función de las poliaminas en células de mamíferos resulta mucho más compleja, ya que participan en la regulación de diversas actividades celulares a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional, afectando procesos de proliferación, transformación, diferenciación y de apoptosis (Chattopadhyay *et al.*, 2008). Así mismo, se ha establecido que las poliaminas regulan de cierto modo la virulencia de los hongos fitopatógenos, dada la estrecha relación que existe entre su metabolismo y fenómenos biológicos como el dimorfismo, la germinación de esporas, la formación de apresorio y la conidiación (Guevara-Olvera *et al.*, 1993; Khurana *et al.*, 1996; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

A pesar de las particularidades funcionales y del metabolismo de las poliaminas en las células eucariotas y procariotas, su papel en la regulación de diferentes procesos biológicos está determinado principalmente por su naturaleza catiónica, que les permite interactuar con los ácidos nucleicos, fosfolípidos de membrana y algunos componentes de la pared celular. Como consecuencia de estas interacciones, las poliaminas estabilizan la estructura de las macromoléculas polianiónicas, afectan la expresión de los genes y de diversas enzimas (incluidas cinasas y fosfatasa), influyen selectivamente en la traducción de algunos mRNA, regulan interacciones DNA-proteína y el proceso de apoptosis (Chattopadhyay *et al.*, 2008; Pegg, 2009; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, el agente

living cells (Groopa and Benavides, 2008); however, although spermine is produced by higher eukaryotes, a large number of fungal species are incapable of its synthesis (Morgan, 1998; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

The study of polyamines in different models (e.g. mammal cells, protozoans, fungi and plants, among others) has allowed the elucidation of their role in the regulation of a wide range of biological processes related to cell growth, development and differentiation (Coburn, 2009; Igarashia and Kashiwagic, 2010; Iacomino *et al.*, 2012). Early studies suggested their regulatory role based only on circumstantial evidence, which showed an increase in polyamine concentration in highly proliferative tissues, as well as an abrupt increase in enzymatic activity that mediated their biosynthesis, when growth or cellular differentiation were induced (Heby, 1981; Tabor and Tabor, 1985; Kaur-Sawhney *et al.*, 1988; Desforjes *et al.*, 2013). Subsequent reports confirmed their role as regulators of somatic embryogenesis, flower and fruits development, response to biotic and abiotic stress, senescence, root and shoot formation in vegetables (Rajam *et al.*, 2004; Wimalasekera *et al.*, 2011; Tisi *et al.*, 2011). The role of polyamines in mammalian cells is far more complex, as they are involved in the regulation of several cellular activities at transcriptional, translational and post-translational levels affecting the cell proliferation, transformation, differentiation and apoptosis (Chattopadhyay *et al.*, 2008). Furthermore, it has been established that in some way polyamines act as regulators of the virulence of fungal pathogens, taking into account the close relationship between metabolism and biological phenomena such as dimorphism, spore germination, appressorium formation and conidiation (Guevara-Olvera *et al.*, 1993; Khurana *et al.*, 1996; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

Despite the variations of the polyamine metabolism and their functions in eukaryotic and prokaryotic cells, their role as a regulator of various biological processes is primarily due to their cationic nature, which allows them to interact with nucleic acids, membrane phospholipids and some cell wall components. In consequence, the polyamines act stabilizing polyanionic macromolecules, affect the gene expression and the activity of different enzymes including kinases and phosphatases, selectively influence mRNA translation and modulate the regulation of DNA-protein interactions, as well as the apoptotic process (Chattopadhyay *et al.*, 2008; Pegg, 2009; Valdés-Santiago *et al.*, 2012).

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, the etiologic agent of charcoal rot, is a fungal pathogen of economic impact due to its wide spectrum of hosts (containing more than 500 species of plants), including massive consumer grains such as beans, sorghum, cotton and corn, among others (Jana *et al.*, 2003). Charcoal rot affects plants in America, Asia, Africa and some European countries, with a preference for tropical and arid to semi-arid subtropical areas (Islam *et al.*, 2012).

Some of the known virulence mechanisms include the synthesis of toxins and endoglucanases, as well as pycnidia and sclerotia production, whose biogenesis is stimulated

etiológico de la pudrición carbonosa, es un hongo fitopatógeno de gran importancia económica debido a su amplio espectro de hospederos, en el que figuran más de 500 especies de plantas que incluyen granos de consumo masivo como frijol, sorgo, algodón y maíz, entre otros (Jana *et al.*, 2003). Esta enfermedad afecta a plantas de toda América, Asia, África y algunos países de Europa, teniendo especial predilección por aquellas regiones tropicales y subtropicales de áridas a semi-áridas (Islam *et al.*, 2012).

Dentro de los mecanismos de virulencia documentados se incluyen la síntesis de toxinas, endoglucanasas, producción de picnidios y esclerocios, cuya biogénesis es estimulada bajo condiciones de estrés oxidativo e hídrico, garantizando de esta forma la sobrevivencia del patógeno en el suelo por largos periodos de tiempo (Short *et al.*, 1980; Gray *et al.*, 1991; Baird *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2012). La secuenciación del genoma de *M. phaseolina*, por su parte, pone en evidencia otros elementos que participan en la patogénesis, tales como enzimas hidrolíticas de carbohidratos y de ligninocelulosa; genes de virulencia implicados en procesos de adhesión, biosíntesis de purinas y micotoxinas; genes implicados con procesos de desintoxicación celular y codificadores de transportadores de aminoácidos y poliaminas, entre otros (Islam *et al.*, 2012). No obstante, pese a la reciente accesibilidad al genoma, la base molecular del proceso fisiopatogénico de este polífago solo se comprende parcialmente, por lo que resulta de interés investigar el papel que desempeñan las poliaminas en la regulación de la virulencia de *M. phaseolina* y su función en el patosistema, teniendo en cuenta la evidencia experimental de su importancia en la interacción planta-microorganismo establecida por otros fitopatógenos. La presente revisión propone un modelo para describir la ruta biosintética de poliaminas en *M. phaseolina*, basado en la secuencia de su genoma, recientemente liberada.

**Mecanismos de Biosíntesis y Regulación de las Poliaminas.** El mecanismo de biosíntesis de las poliaminas es común en todos los organismos, salvo por algunas particularidades que detallaremos en el presente apartado. La síntesis de poliaminas comienza con la descarboxilación de la ornitina para formar putrescina, en una reacción catalizada por la ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.17), que constituye el paso limitante del metabolismo de estos compuestos. La ornitina puede derivarse del ciclo de la urea, o de la hidrólisis de la arginina por acción de la arginasa (EC 3.5.3.1). La síntesis de la putrescina puede lograrse además, a través de la descarboxilación de la arginina por la enzima arginina descarboxilasa (EC 4.1.1.19), tal como sucede en bacterias y plantas superiores. Se ha sugerido que la síntesis de putrescina en hongos está determinada principalmente por la actividad de la ornitina descarboxilasa y que al igual que en células de mamíferos, ésta es la única vía de biosíntesis de putrescina (Morgan, 1998; Coffino, 2001; Bagni y Tassoni, 2001; Valdés-Santiago *et al.*, 2012). No obstante, existen reportes que demuestran la actividad de arginina descarboxilasa en una variedad de hongos incluidos fitopatógenos, cuyo crecimiento es inhibido al entrar en contacto con inhibidores de arginina descarboxilasa y de

under oxidative and hydric stress, thus ensuring the survival of the pathogen in soil during long periods of time (Short *et al.*, 1980; Gray *et al.*, 1991; Baird *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2012). On the other hand, *M. phaseolina* genome sequencing revealed another elements involved in pathogenesis such as carbohydrate and lignocellulose hydrolytic enzymes, virulence genes involved in adhesion processes, purines and mycotoxin biosynthesis, genes involved in cellular detoxification and encoders of amino acid and polyamines transporters, among others (Islam *et al.*, 2012). However, despite the availability of genomic data, the molecular basis of this pathophysiological process is only partially understood. Thus, it is relevant to investigate the role of polyamines on the regulation of the virulence of *M. phaseolina* and its role within the pathosystem, taking into account experimental evidence observed in other plant pathogens that demonstrate its importance in plant-microbe interactions. This review proposes a model that describes the polyamine biosynthetic pathway in *M. phaseolina*, based on its recently released sequenced genome.

**Biosynthesis and Regulation Mechanisms of Polyamines.** Polyamine biosynthesis mechanism is common in all organisms, except for some peculiarities that will be detailed in this paragraph. Polyamine synthesis process begins with ornithine decarboxylation to form putrescine in a reaction catalyzed by ornithine decarboxylase (EC 4.1.1.17), which is the rate-limiting enzyme in the metabolism of these compounds. Ornithine originates from urea cycle or from arginine hydrolysis by arginase (EC 3.5.3.1). Putrescine synthesis can also occur through the decarboxylation of arginine by arginine decarboxylase (EC 4.1.1.19), as in bacteria and higher plants. It has been suggested that synthesis of fungal putrescine is mainly determined by the activity of ornithine decarboxylase and, alike mammalian cells, is the only biosynthetic pathway of putrescine (Morgan, 1998; Coffino, 2001; Bagni y Tassoni, 2001; Valdés-Santiago *et al.*, 2012). However, there are reports showing arginine decarboxylase activity in a variety of fungi (including phytopathogenic), whose growth is inhibited in presence of arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase inhibitors (Khan and Minocha, 1989; Gamarnik *et al.*, 1994; Sannazzaro *et al.*, 2004). The above shows that in some of these organisms, as in the higher plants, the two metabolic pathways can be functional. Organisms that possess a constitutive route to synthesize putrescine via agmatine, also possess arginine decarboxylase and agmatinase (EC 3.5.3.11) enzymes to form putrescine. Some plants have alternative routes to synthesize putrescine via agmatine, involving two major steps: conversion of agmatine to N-carbamoylputrescine by the action of agmatine iminohydrolase (EC 3.5.3.12) and then to putrescine by the N-carbamoylputrescine amidohydrolase (EC 3.5.1.53).

The synthesis of the spermine and spermidine occurs by the addition of the aminopropyl groups to putrescine and spermidine precursors, in reactions catalyzed by spermidine synthase (EC 2.5.1.16) and spermine synthase (EC 2.5.1.22), respectively. The aminopropyl groups are donated



ornitina descarboxilasa (Khan y Minocha, 1989; Gamarnik *et al.*, 1994; Sannazzaro *et al.*, 2004). Lo anterior evidencia que en algunos de estos microorganismos, como en las plantas superiores, las dos rutas metabólicas pueden ser funcionales. Los organismos que poseen una ruta constitutiva para sintetizar putrescina vía agmatina, poseen actividad enzimática arginina descarboxilasa y agmatinasa (EC 3.5.3.11) para formar putrescina con eliminación de urea. Algunas plantas poseen rutas alternativas para catalizar la síntesis de putrescina vía agmatina, involucrando dos pasos importantes: transformación de agmatina a N-carbamoylputrescina, por acción de la enzima agmatina iminohidrolasa (EC 3.5.3.12) y formación de putrescina a partir de este intermediario, por acción de N-carbamoylputrescina amidohidrolasa (EC 3.5.1.53).

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

El proceso biosintético puede revertirse por una serie de reacciones catabólicas que están diseñadas para proporcionar las poliaminas requeridas rápidamente. Este ciclo de interconversión consiste en reacciones de acetilación catalizadas por espermidina/espermina acetiltransferasa (EC 2.3.1.57) y escisión oxidativa subsiguiente, por la enzima dependiente de FAD (flavina adenina dinucleótido), poliamina oxidasa (EC 1.4.3.4). La ruta de biosíntesis de poliaminas es esquematizada en la Figura 1.

La regulación de los niveles de poliaminas constituye un mecanismo esencial para la adecuada supervivencia de la célula, ya que estados carenciales o de síntesis ilimitada pueden generar consecuencias deletéreas (Poulin *et al.*, 1993). Tal proceso se determina principalmente por la actividad de las enzimas ornitina descarboxilasa, S-adenosilmetionina descarboxilasa (ODC y SAMDC, respectivamente) y por la espermina/espermidina acetiltransferasa. Es evidente además, que las poliaminas ejercen un mecanismo de control biosintético por hidrólisis independiente de ubiquitinación, que es gobernado por una proteína inhibidora, denominada antienzima (Az) de la ODC (Heller *et al.*, 1976). La Az actúa como un sensor de poliaminas y se sintetiza a partir de dos marcos de lectura abiertos (ORFs) sobrepuestos, a través de un cambio de fase +1 en el marco de lectura abierto +1 frameshifting a nivel ribosomal, estimulado por las poliaminas, en un mecanismo inusual de inactivación y reconocimiento de la ODC, para su posterior hidrólisis por el proteasoma 26S (Chattopadhyay *et al.*, 2011). La Az genera una interrupción en la actividad de los

by decarboxylated S-adenosylmethionine, which is synthesized from the decarboxylation of S-adenosylmethionine by S-adenosylmethionine decarboxylase (EC 4.1.1.50). As already mentioned, the synthesis of spermine is typical of eukaryotic systems; however, not all fungi possess the enzymatic machinery necessary to synthesize this compound (Nickerson *et al.*, 1977).

The biosynthetic process may be reversed by a series of catabolic reactions, designed to provide the required polyamines quickly. This retroconversion cycle consists of acetylation reactions catalyzed by spermidine / spermine acetyltransferase (EC 2.3.1.57) and subsequent oxidative cleavage by polyamine oxidase (EC 1.4.3.4), a flavin adenine dinucleotide (FAD) dependent enzyme. A diagram of the polyamine biosynthesis pathway is shown in Figure 1.

Regulation of polyamine levels is essential for cell survival, since deficiency or unlimited synthesis can generate detrimental consequences (Poulin *et al.*, 1993). Such process is mainly governed by the ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase (ODC and SAMDC, respectively) and spermine/spermidine acetyltransferase. The polyamines can also exert a biosynthetic control mechanism by ubiquitin-independent hydrolysis, which is governed by an inhibitory protein known as ODC antizyme (Az) (Heller *et al.*, 1976). Az acts as a polyamines sensor and is synthesized from two overlapping open reading frames (ORFs), through a ribosomal +1 frameshifting stimulated by polyamines, being an unusual mechanism of inactivation and recognition of ODC for further hydrolysis by the 26S proteasome (Chattopadhyay *et al.*, 2011). Az generates a disruption in the activity of the ODC homodimers by binding to the catalytic site forming a nonfunctional heterodimer (ODC-Az). The formation of this heterodimer leads to the exposure of the ODC carboxyl terminus, making it accessible for the recognition by the proteasome; an event which, combined with the stoichiometric inhibition, decreases the half-life of the enzyme and promotes its hydrolysis. The efficiency of ODC proteolysis is provided by a domain within the N-terminal portion of Az. Once the proteasome processes the ODC-Az complex, the next step involves the hydrolysis of ODC and Az release, to continue the regulatory circuit (Coffino, P., 2001). The inhibitory activity of Az is also carried out by the modulation of polyamine transport and can be deregulated by a protein known as antizyme inhibitor (AZI), through an ubiquitination-dependent hydrolysis, which in turn is negatively regulated by polyamines (Palanimurugan *et al.*, 2004).

The translational frameshifting acts as both sensor and effector of the regulatory transport circuit and polyamine biosynthesis. This has been identified in mammals, fungi and protists, suggesting a distribution due to the presence of this mechanism in the last common ancestor of species belonging to three out of four eukaryotic kingdoms (Ivanov and Atkins, 2007). Fungal Az genes are found in at least four different phyla (Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota and Zygomycota); Ascomycota contains most of the fungal species with AZ

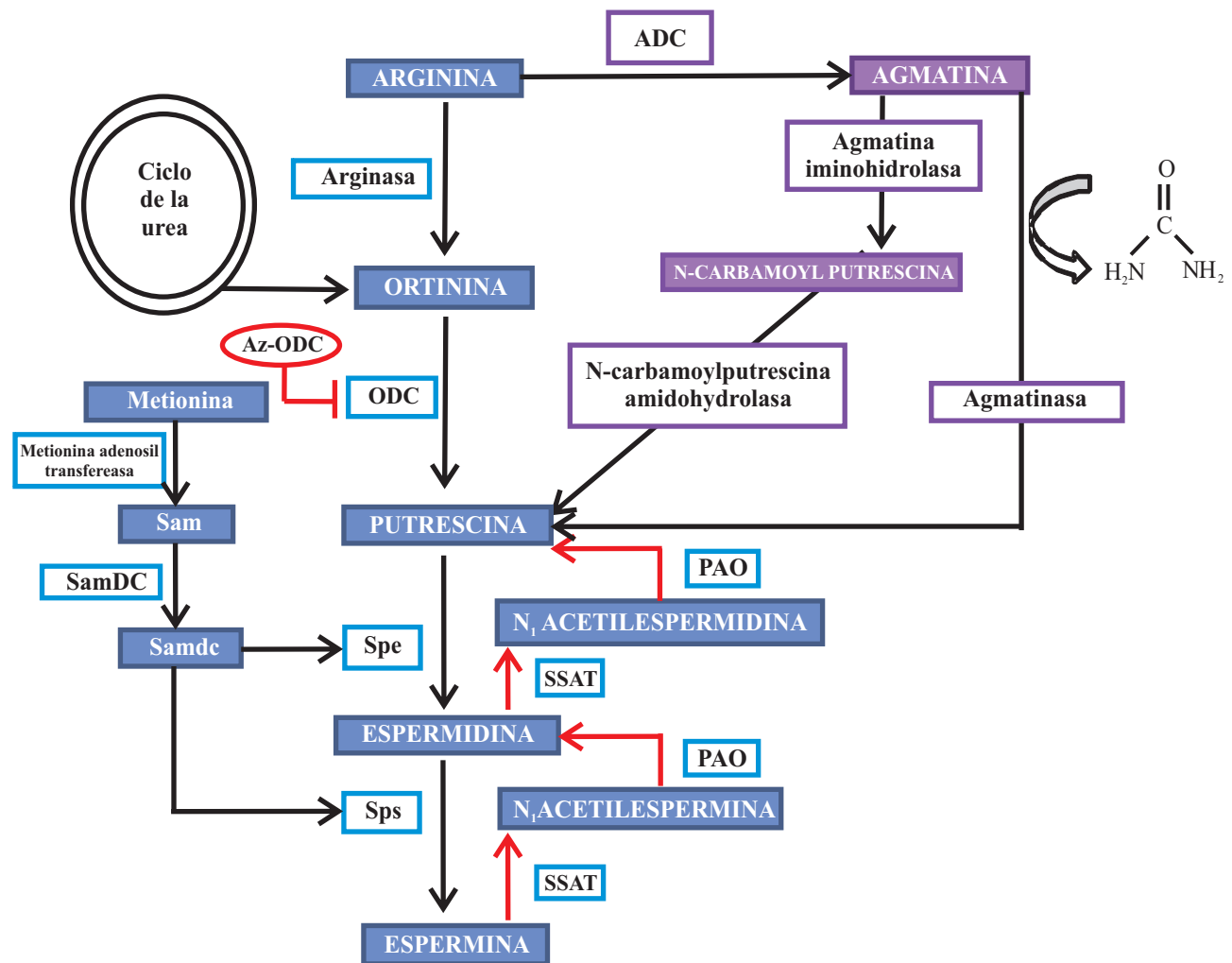


Figura 1. Ruta de biosíntesis y regulación de poliaminas. Se esquematizan las reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo de las poliaminas. En color azul se representa el mecanismo de biosíntesis de poliaminas compartido por eucariotas y procariotas; y en violeta, la vía alternativa que está presente en bacterias, plantas y algunos hongos. En rojo se muestra el mecanismo de interconversión y las reacciones regulatorias de la ruta. En la figura: ODC: Ornitina descarboxilasa; Sam: S-adenosilmetionina; SamDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa; Samdc: Sam descarboxilado; spe: espermidina sintasa; Sps: espermina sintasa; SSAT: espermidina/espermina acetiltransferasa; PAO: poliamina oxidasa; ADC: arginina descarboxilasa; Az-ODC: Antienzima de la ODC.

Figure 1. Polyamines biosynthesis and regulation pathway. Enzymatic reactions involved in polyamines metabolism are shown. Blue boxes indicate polyamines biosynthesis pathway shared by eukaryotas and prokaryotes, whereas violet boxes depict the alternative route exclusive in bacteria, plants and some fungi. Red arrows show polyamine retroconversion mechanism and regulatory reactions. ODC: Ornithine decarboxylase; Sam: S-adenosylmethionine; SamDC: S-adenosylmethionine decarboxylase; Samdc: Sam decarboxylated; Spe: spermidine synthase; Sps: spermine synthase; SSAT: spermidine/spermine acetyltransferase; PAO: polyamine oxidase; ADC: arginine decarboxylase; Az-ODC: ODC antienzyme.

homodímeros de ODC al unirse al sitio catalítico para constituir un heterodímero afuncional (ODC-Az). La formación de este complejo conduce a la exposición del dominio carboxi-terminal de ODC, haciéndolo accesible para reconocimiento por el proteasoma; evento que, sumado a la inhibición estequiométrica, disminuye el tiempo de vida media de la enzima y favorece su hidrólisis. La eficiencia de esta proteólisis está mediada por un dominio que reside en

genes (Ivanov and Atkins, 2007), including *M. phaseolina*. The presence of Az orthologous has been reported in yeast as *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, models in which gene overexpression (SPA and OAZ1 genes respectively) inhibited cell division (Ivanov et al. 2000b; Palanimurugan *et al.*, 2004). In the specific case of *S. pombe*, the SPA gene deletion did not produce detectable effects on yeast viability or any other evident

la región N-terminal de la Az. Una vez el proteasoma procesa el complejo ODC-Az, se prosigue con la hidrólisis de ODC y subsecuente liberación de la Az, para dar continuidad al proceso regulador (Coffino, P., 2001). La actividad inhibitoria de la Az también se lleva a cabo por modulación del transporte de poliaminas y puede ser desregulada por una proteína inhibitoria de la antienzima (AZI), a través de un mecanismo de hidrólisis dependiente de ubiquitinación, que a su vez, es regulado negativamente por las poliaminas (Palanimurugan *et al.*, 2004).

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

La presencia de genes ortólogos de la Az ha sido reportada en levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*, modelos en los que la sobreexpresión génica (SPA y OAZ1, respectivamente) inhibió la división celular (Ivanov *et al.*, 2000b; Palanimurugan *et al.*, 2004). En el caso particular de *S. pombe*, la delección del gen SPA no produjo efectos detectables sobre la viabilidad de las levaduras o cualquier otro cambio fenotípico manifiesto, salvo la acumulación de poliaminas, que durante la fase estacionaria alcanzó concentraciones 20 veces superiores a las obtenidas en la de crecimiento exponencial, en comparación con las cepas nativas. De acuerdo a lo anterior, se pudo establecer que SPA es el regulador principal de la ODC en este microorganismo y que puede tener actividad a corto y largo plazo (Ivanov *et al.*, 2000b).

Existen cerca de 70 genes que codifican la Az en especies fúngicas, identificados *in silico* (Ivanov y Atkins, 2007). Se conocen las secuencias de *Pneumocystis carinii*, *Botryotinia fuckeliana*, *Emericella nidulans*, *Schizosaccharomyces japonicum* y *Schizosaccharomyces octosporus* (Ivanov *et al.*, 2000a). Así mismo, se ha progresado en la identificación de secuencias homólogas de 11 levaduras relacionadas con la Az de *Saccharomyces cerevisiae* (Ivanov *et al.*, 2006).

**Papel de las Poliaminas en el Proceso Patogénico de los Hongos Fitopatógenos.** Aunque el papel de las poliaminas en los patosistemas no es comprendido del todo, existe evidencia que revela su paradójico papel en la interacción planta-hongo, ya que actúan como moduladores del proceso invasivo del patógeno; y a su vez, del mecanismo defensivo de la planta (Chibucos y Morris, 2006). Constituyen por lo tanto, un sistema finamente regulado cuya disrupción se perfila como una alternativa ideal para el desarrollo de técnicas de control de fitopatógenos. No obstante, deben investigarse las respuestas particulares de los microorganismos, ya que los

phenotypic changes, except for the vast accumulation of polyamines observed during the stationary phase, with concentrations 20 times higher than those observed in exponential growth, compared with native strains. Based on the above, it was inferred that SPA is the main regulator of ODC in this organism and can show activity in the short and long term (Ivanov *et al.*, 2000b).

Nearly 70 genes encoding Az in fungal species have been identified *in silico* (Ivanov and Atkins, 2007). The sequences of *Pneumocystis carinii*, *Botryotinia fuckeliana*, *Emericella nidulans*, *Schizosaccharomyces japonicum* and *Schizosaccharomyces octosporus* are known (Ivanov *et al.*, 2000a). Homologous sequences of 11 yeast were also identified closely related to *Saccharomyces cerevisiae* Az (Ivanov *et al.*, 2006).

**Role of polyamines in the pathogenic process of phytopathogenic fungi.** Although the role of polyamines in the pathosystems has not been fully understood, there is evidence revealing their paradoxical role in plant-fungus interaction, since they act as modulators of both the invasive process of the pathogen and the defense mechanism of the plant (Chibucos and Morris, 2006). Therefore they constitute a tightly regulated system, whose disruption emerges as an ideal alternative for the development of pathogen control techniques. However it is necessary to investigate the particular responses of microorganisms, as existing experimental results demonstrate both the polyamines activity as promoters of seed germination, mycelial growth and development of appressoria sclerotia (Pieckenstain *et al.* 2001; Rajam *et al.* 1986; Reitz, 1995) and its inhibitory effect associated with interactions in calmodulin/calcineurin and cAMP-dependent signaling pathways, important for morphogenesis, adaptation and virulence (Choi *et al.* 1998; Ahn *et al.*, 2003).

**Molecular Models of the Pathogenic process by Macrophomina phaseolina.** The infective cycle of *M. phaseolina* begins with the spread of sclerotia, highly persistent structures which are the primary source of dissemination. Sclerotia can be found in roots, colonized host tissues, soil and debris from decaying plant tissues. The severity of charcoal rot shows a direct correlation with the population density of sclerotia in soil, which in turn is affected by extreme temperatures (50 °C and -10 °C) (Short *et al.*, 1980). It has also been described that the presence of soybean wastes on soil surface favors the survival of *M. phaseolina* during the winter, as well as the diversity of fungal pathogens and saprophytes which may negatively affect its persistence (Baird *et al.*, 2003). Microsclerotia formation is an event of great importance for the differentiation and survival of filamentous fungi, whose development can be induced by oxidative stress (Georgiou *et al.*, 2006). The general theory of microbial eukaryotic cell differentiation postulates that this phenomenon is activated by hyperoxidative stages, in which the concentration of oxygen free radicals within the cell exceeds its ability to neutralize them. In accordance with this, the oxidative stress produces transitions from undifferentiated states to differentiated states with three possible responses: 1) Cell adaptation mediated by reducing substances, which

resultados experimentales existentes ponen de manifiesto por una parte, la actividad de las poliaminas como promotores de eventos involucrados en la colonización del hospedero, tales como germinación de semillas, crecimiento micelial, desarrollo de apresorios y esclerocios (Pieckenstein *et al.*, 2001; Rajam *et al.*, 1986; Reitz, 1995) y por otra parte, su efecto inhibitorio asociado a interacciones con las cascadas de señalización dependientes de calmodulina/calcineurina y AMP cíclico, importantes para la morfogénesis, adaptación y virulencia (Choi *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 2003).

**Los Modelos Moleculares del Proceso Patogénico en *Macrophomina phaseolina*.** El ciclo infectivo de *M. phaseolina* comienza con la diseminación del esclerocio, fuente primaria de inoculación de elevada persistencia que se encuentra en las raíces y tejidos de hospederos colonizados; suelo y detritus provenientes de tejidos vegetales en descomposición. La severidad de la pudrición carbonosa demuestra una correlación directa con la densidad poblacional de esclerocios presentes en el suelo, que a su vez se ve afectada por temperaturas extremas (50 °C y -10 °C) (Short *et al.*, 1980). También se ha documentado que la presencia de residuos de soja en la superficie del suelo favorece la supervivencia de *M. phaseolina* durante el invierno, así como la diversidad de hongos patógenos y saprófitos que pueden modular negativamente su persistencia (Baird *et al.*, 2003). La formación del microesclerocio es un evento de diferenciación de gran importancia para la supervivencia de los hongos filamentosos, cuyo desarrollo es inducido, entre otros, por estrés oxidativo (Georgiou *et al.*, 2006). La teoría general de diferenciación de los microorganismos eucariotas postula que este fenómeno es activado por estados hiperoxidantes, esto es, estados en los que la concentración de radicales libres de oxígeno en el interior celular, superan su capacidad para neutralizarlos. De acuerdo a este postulado, el estrés oxidativo media la transición de estados indiferenciados a estados diferenciados, con tres posibles respuestas: 1) adaptación celular mediada por sustancias reductoras que neutralizan las especies reactivas de oxígeno (ROS), con subsecuente retorno al estadio original; 2) la célula alcanza un estado de diferenciación más estable, limitando la entrada de oxígeno ambiental y 3) muerte celular por incapacidad para reducir o limitar la entrada de oxígeno. Los estados indiferenciados y aquéllos diferenciados corresponden a estados de estabilidad celular, que en el caso del esclerocio, son resultado del aislamiento autónomo del oxígeno ambiental, a través de la generación de estructuras impermeables al oxígeno (Georgiou *et al.*, 2006). Otros autores han demostrado la estrecha relación entre el estrés oxidativo y la diferenciación esclerótica de hongos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfisii* y *Sclerotinia minor* (Patsoukis y Georgiou, 2007; Papapostolou y Georgiou, 2010). Diferentes estudios han revelado el papel de las poliaminas como agentes protectores frente al estrés oxidativo (Gropa *et al.*, 2001; Fujisawa *et al.*, 2005; Chattopadhyay *et al.*, 2006), demostrando la correlación directa que existe entre el número de grupos amino de sus moléculas y su poder

neutralize reactive oxygen species (ROS) with a subsequent return to the original stage, 2) cells reaches a more stable state of differentiation, limiting the entry of atmospheric oxygen, and 3) cell death caused by an inability to reduce or limit the entry of oxygen.. Both undifferentiated and differentiated states correspond to states of cellular stability, which in the case of sclerotia, are the result of atmospheric oxygen isolation through the generation of oxygen-impermeable structures (Georgiou *et al.*, 2006). Several studies have demonstrated the close relationship between oxidative stress and the sclerotic differentiation of fungi as *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfisii* and *Sclerotinia minor* (Patsoukis and Georgiou, 2007; Papapostolou and Georgiou, 2010), as well as the role of polyamines as protective agents against oxidative stress (Gropa *et al.* 2001; Fujisawa *et al.*, 2005; Chattopadhyay *et al.*, 2006) with a direct correlation between the number of amino groups molecules and their antioxidant (Lovaas, 1991). Shapira *et al.* (1989) reported that during the sclerotia formation in *Sclerotium rolfisii* the endogenous polyamine levels decreases, but in contrast, increases during the germination of sclerotia and mycelial growth.

Based on all the aspects discussed above, we propose that polyamines can modulate the *M. phaseolina* pathogenic process by regulation of sclerotial biogenesis, which could be inhibited due to their activity as free radical scavengers and to their ability to neutralize lipid peroxidation. However, once the different substates of sclerotial development are reached, polyamines may be involved in the stabilization of these differentiated structures and promote sclerotial germination, which results in hyphal growth towards the host surface, prior to penetration (Dhingra and Sinclair, 1978).

Appresorial formation is another feature of infective cycle of *M. phaseolina* (Ammon *et al.*, 1975). Appresoria is formed from germ tube and it promotes adhesion to epidermal tissue and host colonization, with the aid of cell-wall degrading enzymes, which in turn support the invasive process (Mayek-Pérez *et al.*, 2002). *M. phaseolina* can also penetrate through wounds or natural openings, which are another way to get access into the host (Kaur *et al.*, 2012). The role of polyamines in the regulation of appresorial development has been studied in *Magnaporthe griseae* and *Uromyces viciae-fabae*. It was observed that the addition of ODC, SAMDC and spermidine synthase inhibitors can prevent partially or completely appresorium formation by uredospores of *Uromyces viciae-fabae*, even using SAMDC inhibitor at concentrations as low as 0.025 mM. Indeed, reduction of appresorium development ranged between 63-100% and conidia germination was unaffected (Reitz *et al.*, 1995). In the case of *Magnaporthe griseae* the effect of exogenously added putrescine, spermine and spermidine on conidial suspension was tested. It was reported that polyamines impair appresorium formation by depress of cAMP, an important modulator of appresorium development in *M. griseae*. In this case, the inhibitory effect of polyamines was reversed by treatment with cAMP (Choi *et al.*, 1998).

Appresorium differentiation and maturation are key



antioxidante (Lovaas, 1991). Shapira *et al.* en 1989, describieron que durante la formación del esclerocio de *Sclerotium rolfsii*, el nivel de poliaminas endógenas disminuye; pero incrementa durante la germinación del esclerocio y el crecimiento micelial.

Basados en estas observaciones, proponemos que las poliaminas pueden ejercer un efecto modulador del proceso patogénico de *M. phaseolina*, por medio de la regulación de la esclerogénesis, que puede ser inhibida gracias a su actividad como secuestradores de radicales libres y a su capacidad para neutralizar los procesos de peroxidación lipídica. No obstante, es claro que una vez se alcanzan los diferentes estadios de maduración del esclerocio, estos metabolitos pueden participar en la estabilización de los estados diferenciados y estimular su germinación, que resulta en el crecimiento de la hifa en dirección a la superficie hospedadora, antes de la penetración (Dhingra y Sinclair, 1978).

La formación de apresorio es otra de las características del proceso infectivo de *M. phaseolina* (Ammon *et al.*, 1975). Su desarrollo deriva de la formación del tubo germinal y favorece la adherencia e invasión del hospedador a través de su epidermis, coadyuvado por enzimas que hidrolizan la pared celular y a su vez, favorecen el proceso invasivo (Mayek-Pérez *et al.*, 2002). La entrada del fitopatógeno también puede estar mediada por lesiones del tejido vegetal que constituyen otra puerta de entrada para el microorganismo (Kaur *et al.*, 2012). La participación de las poliaminas en la regulación del desarrollo del apresorio ha sido estudiada en hongos como *Magnaporthe griseae* y *Uromyces viciae-fabae*. Se encontró que el uso de inhibidores de ODC, SAMDC y espermidina sintasa, reduce parcial o completamente la formación del apresorio por uredosporas de *Uromyces viciae-fabae*, haciendo uso de concentraciones tan bajas como 0.025 mM del inhibidor de SAMDC; en general, la reducción de la formación del apresorio a las diferentes concentraciones evaluadas, osciló entre 63-100 % y no se obtuvo efecto alguno sobre la germinación de las conidias (Reitz *et al.*, 1995). En el caso de *Magnaporthe griseae*, se evaluó el efecto de la adición de putrescina, espermina y espermidina a nivel exógeno, sobre una suspensión de conidias; el experimento puso en evidencia la capacidad de las poliaminas para reducir el AMP cíclico, importante modulador de la formación del apresorio en este fitopatógeno, con la subsecuente inhibición de esta estructura; efecto que se revirtió al adicionar el AMPc (Choi *et al.*, 1998).

La diferenciación y maduración del apresorio son eventos críticos en el desarrollo de la infección, por lo que resulta de interés abordar un diseño experimental que permita evaluar el papel que desempeñan las poliaminas en la formación del apresorio, en *M. phaseolina*.

Una vez el patógeno ha penetrado la pared celular epidérmica, la colonización del tejido vascular que resulta del crecimiento intracelular de las hifas, constituye la siguiente etapa del proceso patogénico. El crecimiento del micelio es un evento relacionado con los niveles endógenos de poliaminas. Estudios en *Glomus mosseae* sugieren que la elevada concentración de poliaminas exógenas (10 mM)

process in the infection development. Therefore there is a need of experimental examination that allows knowing the role of polyamines in the appressorium development of *M. phaseolina*.

After penetration of host epidermis cell walls, the intracellular hyphal growth begins, colonizing the vascular tissue, which constitutes the second stage of the pathogenic process. The mycelial growth is an event related to endogenous levels of polyamines. Studies in *Glomus mosseae* suggest that at high concentration of exogenous polyamines (10mM) may be a growth limiting factor whilst they can be exert stimulating effect on growth at low concentrations (1mM). High levels of polyamines can also generate toxic effects on plants, which could be the result of several alterations of physiological process due to polyamines accumulation such as membrane cell depolarization, which increases the cations linkage (K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) or accumulation of oxidation products of polyamines, hydrogen peroxide and free radicals, which could have deleterious effects on organisms (El Ghachtouli *et al.*, 1996). Other reports have described the putrescine role in the mycelial growth of *Aspergillus flavus* (Khurana *et al.*, 1996) and *Yarrowia lipolytica* dimorphic transition (Jiménez-Bremont *et al.*, 2001).

Functions of polyamines have also been studied in others morphological events of fungi, which showed the biosynthetic activity of these polycations during germ tub elongation and spores germination; consequently, *Aspergillus flavus* requires a high putrescine/spermidine ratio for the proper development of these process whilst the spore differentiation to microcycle conidiation is favored at low putrescine/spermidine ratio; these findings have shown the spermidine role in the cell differentiation and spore differentiation to microconidiation, characteristic of fungi belonging to this genus (Khurana *et al.*, 1996). Although there are no reports on the ability to induce microcycle conidiation in *M. phaseolina*, the implications of polyamines in cell differentiation and sporogenesis are critical to the advancement of the knowledge of the regulatory mechanisms of invasion and colonization process in this pathogen.

The production of phytotoxins in *M. phaseolina*, like in other plant pathogens, favors the host colonization; however, their role in the disease development is still not fully understood. The sequence of the *M. phaseolina* genome confirms the existence of non-ribosomal peptide synthetases, which catalyze the production of cyclic peptides including numerous mycotoxins (Islam *et al.*, 2012). Previous research using ODC inhibitor and nonsporulating *Aspergillus parasiticus* mutants has shown the correlation between the regulation of aflatoxins biosynthesis and sporulation process (Guzmán-de-Peña and Ruiz-Herrera, 1997) which in turn, is modulated by polyamines metabolism. Understanding the regulation mechanisms of toxins synthesis (related to regulation of spore pigment biosynthesis in other fungi) in *M. phaseolina* will allow comprehension of the micotoxins role as a pathogenic and virulence factors in different isolates.

**Polyamines Metabolic Pathway in**



puede ser un factor limitante del crecimiento, o ejercer efectos estimulantes a bajas concentraciones (1mM). Niveles elevados de poliaminas también pueden generar toxicidad en plantas, como resultado de la alteración de diferentes efectos fisiológicos por acumulación de poliaminas, dentro de los que se cuentan la despolarización de la membrana celular, que aumenta la fuga de cationes (K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), o la acumulación de los productos de la oxidación de las poliaminas, peróxido de hidrógeno y radicales libres, que pueden tener efectos deletéreos sobre el microorganismo (El Ghachtouli *et al.*, 1996). Otros estudios han revelado el papel de la putrescina en el crecimiento del micelio de *Aspergillus flavus* (Khurana *et al.*, 1996) y en la transición dimórfica de *Yarrowia lipolytica* (Jiménez-Bremont *et al.*, 2001).

La función de las poliaminas también ha sido estudiada en otros eventos morfogénicos de los hongos, que ponen de manifiesto la actividad biosintética de estos poliaminas durante la elongación del tubo germinal y la germinación de esporas; se ha reportado que para el desarrollo de estos procesos, *Aspergillus flavus* requiere una alta tasa de putrescina/espermidina, mientras que la diferenciación de esporas bajo el microciclo de conidiación se favorece con una baja tasa de putrescina/espermidina; esto revela el papel que ejerce la espermidina en los procesos de diferenciación celular y desarrollo de las conidias bajo el microciclo de conidiación, característico de hongos de este género (Khurana *et al.*, 1996). Aunque no existen reportes sobre la inducción del microciclo de conidiación en *M. phaseolina*, las implicaciones de las poliaminas en la diferenciación celular y esporogénesis son de trascendental interés para avanzar en el conocimiento de los mecanismos de regulación del proceso de invasión y colonización de este patógeno.

La producción de fitotoxinas en *M. phaseolina*, al igual que sucede con otros fitopatógenos, favorece el proceso de colonización del hospedero; sin embargo, su papel en el desarrollo de la enfermedad no ha sido comprendido del todo. La secuencia del genoma de este microorganismo confirma la existencia de sintetasas peptídicas no ribosomales, que catalizan la producción de péptidos cíclicos en donde se incluyen numerosas micotoxinas (Islam *et al.*, 2012). Estudios con un inhibidor de la ODC y cepas no esporogénicas de *Aspergillus parasiticus* han permitido demostrar la correlación existente entre la regulación de la producción de aflatoxinas y el proceso de esporulación (Guzmán-de-Peña y Ruiz-Herrera, 1997), que está modulado a su vez, por el metabolismo de las poliaminas. El conocimiento de los mecanismos de regulación de la síntesis de toxinas en *M. phaseolina*, dada su estrecha relación con los mecanismos de regulación de la síntesis de pigmentos de las esporas de otros hongos, permitirá comprender las implicaciones que tienen en el proceso patogénico y dilucidar a detalle su papel como mecanismos de patogenicidad y virulencia en aislamientos particulares.

**Ruta Metabólica de Poliaminas en *Macrophomina phaseolina*.** La ruta metabólica de poliaminas que proponemos como modelo en *M. phaseolina*

***Macrophomina phaseolina*.** The *M. phaseolina* polyamine metabolic pathway proposed in this paper (figure 2) was deduced by a BLAST analysis of reference proteins of *Magnaporthe oryzae*, because this phytopathogenic fungus has the lowest relative phylogenetic distance to *M. phaseolina*, and sequences are available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (Crous *et al.*, 2006). When it was not possible to carry out analysis with sequences belonging to this microorganism, we used fungi of the genus *Aspergillus*, *Laccaria*, and *Verticillium*. Table 1 shows the accession numbers and identity percentages of the polyamine metabolic pathway proteins with not annotated sequences in the *M. phaseolina* genome.

According to our in silico analysis we can conclude that *M. phaseolina* possesses the enzymatic machinery to synthesize spermine, unlike the report of Nickerson *et al.* in 1977. Our observations are consistent with previous reports attributing the absence of detectable levels of spermine to unfavorable physiological regulatory conditions for its production (e.g. temperature, magnesium or manganese concentrations, etc.) (Marshall *et al.*, 1979). Spermine production by *M. phaseolina* is particularly relevant because of its association with the function of the sclerotia as resting bodies and the transition from mycelium to mature sclerotia in *S. rolfii* (Shapira *et al.*, 1989) as well as the growth of mycelium and sclerotia maturation in *Sclerotinia sclerotiorum* (Gárriz *et al.*, 2008). Spermine has been implicated in several cellular functions in eukaryotic cells able to synthesize it, such as blocking and modulation of ion channels, regulation of translation, cellular growth processes in mammals (Stevens and Winther, 1979; Williams 1997; Mandal *et al.*, 2013) and furthermore, is required for  $\alpha$ -alanine biosynthesis, a metabolic intermediary in Coenzyme A biosynthesis, in yeasts (White *et al.*, 2001).

We have found that *M. phaseolina* genome possesses homologous sequences with all regulatory proteins involved in polyamine metabolic pathway described in other organisms, which maximizes the polyamine availability according to particular cellular requirements. The presence of ODC antizyme is an additional evidence that reaffirms the evolutionary conservation of this mechanism; however further studies are necessary to demonstrate its peculiarities, and especially to elucidate the antizyme negative control mechanism, which seems to be different for each fungus and differs from the ODC regulation mechanism described for higher eukaryotes (Ivanov *et al.* 2000b).

Our homology analysis do not allow us to confirm the existence of an alternative route for putrescine synthesis driven by arginine decarboxylase (ADC), since the identity percentage obtained by comparing ADC sequences of *Arabidopsis thaliana* with those of *M. phaseolina* (annotated as ornithine/DAP/Arginine decarboxylase) was only 24 % (E-value: 5e-04). Since there are no available fungal reference proteins for ADC in the gene bank database, we consider necessary to experimentally test the effects of over-expression of the Az annotated in its genome, in order to determine whether ornithine decarboxylation is

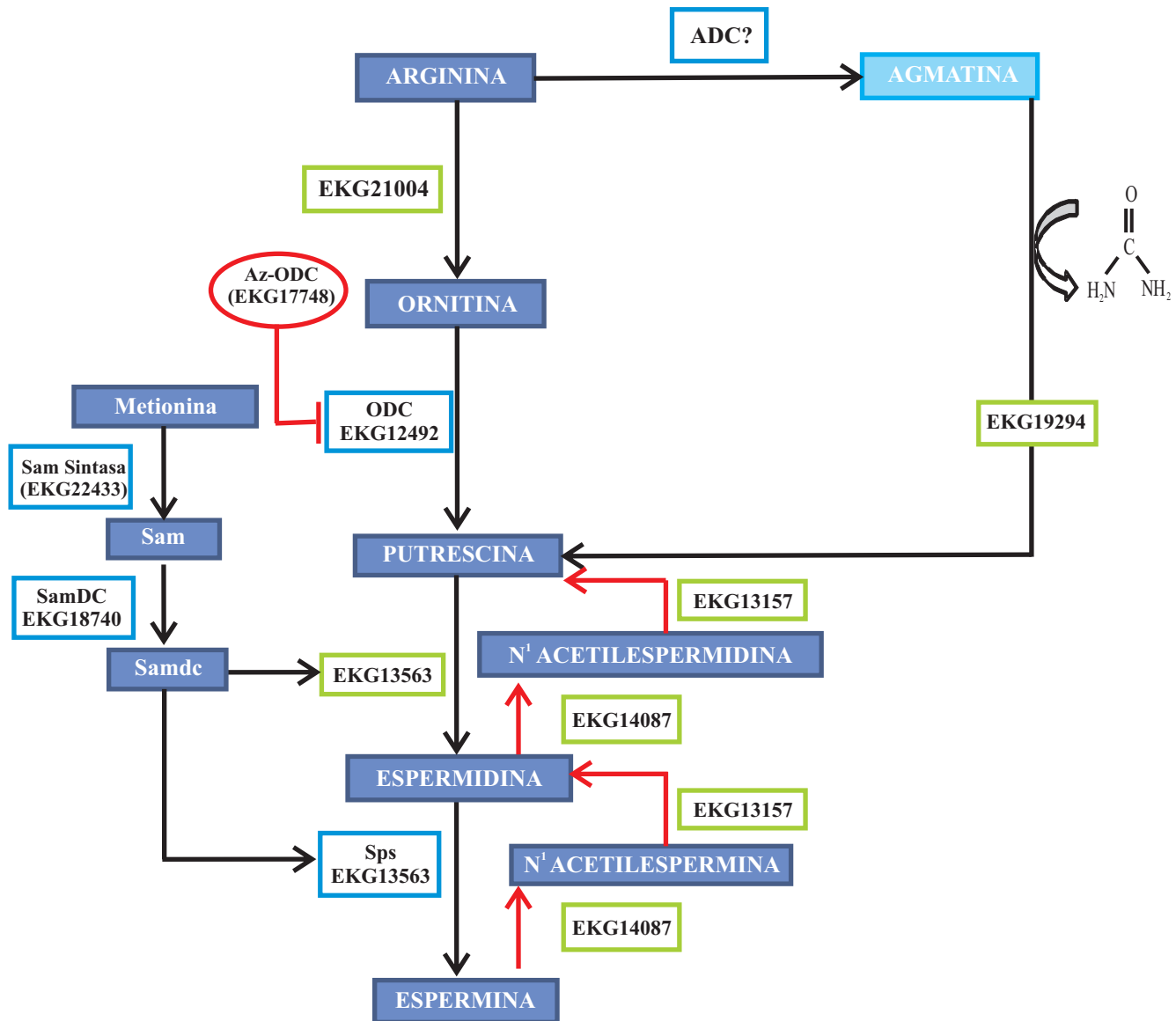


Figura 2. Modelo del metabolismo de las poliaminas en *M. phaseolina*. Los números de acceso que se muestran en los recuadros verdes corresponden a las enzimas homólogas del metabolismo de las poliaminas identificadas en el genoma de *M. phaseolina* por medio de un análisis BLAST. Los recuadros azules indican los números de acceso de las enzimas homólogas anotadas en el genoma del microorganismo. Las flechas en rojo corresponden a la ruta catabólica.

Figure 2. The model of polyamine metabolism in *M. phaseolina*. Green boxes show the accession numbers to homologous enzymes of the polyamines metabolism identified in the *M. phaseolina* genome by BLAST analysis. Blue boxes indicate the access numbers of the homologous enzymes with annotated sequences in the *M. phaseolina* genome. The red arrows show the catabolic pathway.

(Figura 2) fue construida por medio de un análisis BLAST, usando proteínas de referencia de *Magnapothe oryzae*, por tratarse del fitopatógeno que presenta la menor distancia filogenética (Crous *et al.*, 2006) con información disponible en la base de datos del NCBI. En los casos en los que no fue posible hacer el análisis con este microorganismo, se utilizaron hongos del género *Aspergillus*, *Laccaria* y *Verticillium*. La Tabla 1 muestra los números de acceso y porcentajes de identidad obtenidos

the only source of putrescine in *M. phaseolina*, as has been demonstrated in *S. pombe* (Ivanov *et al.*, 2000b). We do not recommend using ODC inhibitors as a strategy to test ADC activity in this organism, mainly because fungal resistance to inhibitors such as difluoromethylomithine (DFMO) has been reported in *Septoria tritici* and *Ustilago maydis* (Smith *et al.*, 1992; Walters, 1995).

#### PERSPECTIVES AND CONCLUSIONS

Tabla 1. Identificación *in silico* de proteínas homólogas para el metabolismo de poliaminas en el genoma de *Macrophomina phaseolina*. Se muestran los resultados obtenidos por medio de análisis BLAST para identificación de enzimas homólogas relacionadas con el metabolismo de las poliaminas en el genoma de *M. phaseolina*, por comparación con secuencias proteicas de referencia de otros hongos disponibles en base de datos del NCBI. Se muestran los números de acceso para las secuencias homólogas en el genoma de *M. phaseolina*, el porcentaje de identidad, la cobertura y significancia del análisis.

Table 1. *In silico* identification of *Macrophomina phaseolina* homologous proteins involved in polyamine metabolism. Table shows the BLAST analysis to identify homologous enzymes involved in the metabolism of polyamines, in comparison with reference protein sequences of several fungal species available at NCBI database. Accession numbers for the sequences shown homologous to the genome of *M. phaseolina*, the percent identity, coverage and significance analysis

Número de acceso <i>M. phaseolina</i>	% de identidad	Cobertura	Significancia (Valor-E)	Proteína homóloga	Tamaño (aa)	Organismo de referencia (número de acceso)
EKG13563	84 %	99 %	0.0	Espermidina sintasa	292	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 (XP_752719)
EKG13563	84 %	98 %	0.0	Espermidina sintasa	292	<i>Magnaporthe oryzae</i> (XP_003712083)
EKG14087	46 %	97 %	4e-37	Diamina N- acetiltransferasa	181	<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82 (XP_001881287)
EKG13157	39 %	97 %	2e-114	Poliamina oxidasa	534	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 (XP_001392310)
EKG13157	51 %	93 %	3e-151	Poliamina oxidasa	534	<i>Verticillium albo- atrum</i> VaMs. 102 (XP_003008145)
EKG13157	58 %	93 %	0.0	Poliamina oxidasa dependiente de flavina	534	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 (XP_747726)
EKG1004 (ureohidrolasa)	77 %	70 %	2e-137	Arginasa	244	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15 (XP_003713240)
EKG19294	58 %	89 %	2e-143	Agmatinasa	401	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15 XP_003718599)
EKG14788	24 %	27 %	5e-04	Arginina descarboxilasa	447	<i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_974684)

para aquellas proteínas de la ruta metabólica que no se encuentran anotadas en el genoma de *M. phaseolina*.

De acuerdo a los hallazgos del análisis *in silico* es posible afirmar que *M. phaseolina* cuenta con la maquinaria enzimática para sintetizar espermina, a diferencia de lo

The experimental confirmation of the processes proposed in this review, as well a thorough analysis of the *M. phaseolina* genome, will help to make progress in the knowledge of polyamine metabolism and their role in the pathogenicity and virulence of *M. phaseolina*, in order to



reportado por Nickerson *et al.* en 1977. Nuestros hallazgos son consistentes con las observaciones de otros autores que atribuyen la ausencia de niveles detectables de espermina en los hongos filamentosos evaluados, a las desfavorables condiciones de regulación fisiológica bajo las cuales se produjo esta poliamina (temperatura, concentración de magnesio o manganeso, etc.) (Marshall *et al.*, 1979). La producción de espermina por *M. phaseolina* reviste particular interés, ya que se trata de un metabolito asociado a la función del esclerocio como estructura de resistencia y a la transición del micelio a esclerocio maduro en *S. rolfisii* (Shapira *et al.*, 1989); así como a la maduración del esclerocio y crecimiento del micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* (Gárriz *et al.*, 2008). Se sabe además, que esta tetramina participa en diversas funciones celulares de los eucariotas que la sintetizan, tales como modulación o bloqueo de canales iónicos; regulación de la traducción; crecimiento celular en mamíferos (Stevens y Winther, 1979; Williams, 1997; Mandal *et al.*, 2013) y que es requerida para la biosíntesis de  $\beta$ -alanina, un intermediario metabólico de la biosíntesis de Coenzima A, en levaduras (White *et al.*, 2001).

Se encontró homología con todas las proteínas reguladoras de la ruta metabólica descritas para otros organismos, lo que garantiza la disponibilidad de las diferentes poliaminas según los requerimientos celulares de *M. phaseolina*. La presencia de la antienzima de ODC, constituye una evidencia adicional que reafirma la conservación evolutiva de este mecanismo, sin embargo es necesario demostrar experimentalmente sus particularidades, especialmente para dilucidar el mecanismo de control negativo de la antienzima, que aparentemente varía de hongo a hongo y difiere de los mecanismos de regulación de ODC, descritos para eucariotas superiores (Ivanov *et al.*, 2000b).

Los resultados del análisis de homología no nos permiten confirmar la existencia de una ruta alternativa para síntesis de putrescina por actividad de arginina descarboxilasa (ADC), ya que el porcentaje de identidad obtenido al comparar la secuencia de esta enzima en *Arabidopsis thaliana* con aquella de *M. phaseolina* (anotada en el genoma como Ornitina/DAP/Arginina descarboxilasa) fue solo de 24 % (valor E: 5e-04). No existen ADC fúngicas de referencia disponibles en el banco de datos, por lo que proponemos poner a prueba experimentalmente los efectos de la sobre expresión de la Az anotada en su genoma, para dilucidar si la descarboxilación de la ornitina es la única fuente de putrescina en *M. phaseolina*, tal como se ha demostrado en *S. pombe* (Ivanov *et al.*, 2000b). Consideramos que el uso de inhibidores de la ODC como estrategia para evaluar actividad ADC en este hongo, no es la alternativa más adecuada, puesto que la insensibilidad a algunos inhibidores como difluorometilornitina (DFMO) ha sido reportada en *Septoria tritici* y *Ustilago maydis* (Smith *et al.*, 1992; Walters, 1995).

## PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES

La evaluación experimental de las características que ponemos en evidencia en el presente documento, así como la

improve the control strategies for *M. phaseolina* from the pathosystem perspective. It is also necessary to focus in the search of alternative routes for the synthesis of putrescine via agmatine, to determine whether ADC activity is present in this organism and the potential genetic regulatory mechanisms controlling this route.

**Acknowledgements.** This work was conducted at Laboratorio de Biotecnología Vegetal, in Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Mexico and was supported by SIP number 20120551 and CB- 2011-01 169 827 grants. M.V. Roa-Cordero want to thank Universidad de Santander (UNDES) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the support during her M.Sc. studies.

## LITERATURA CITADA

- Ahn, I.P., Kim, S., Choi, W.B., and Lee, Y.H. 2003. Calcium restores prepenetration morphogenesis abolished by polyamines in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting red pepper. *FEMS Microbiology Letters* 227: 237-241.
- Ammon, V., Wyllie, T.D., and Brown, M.F. Jr. 1975. Investigation of the infection process of *Macrophomina phaseolina* on the surface of soybean roots using scanning electron microscopy. *Mycopathologia* 55:77-81.
- Bagni, N., and Tassoni, A. 2001. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301-317.
- Baird, R.E., Watson, C.E., and Scruggs, M. 2003. Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. *Plant Disease*. 87:563-566.
- Chattopadhyay, M.K., Park, M.H., and Tabor, H. 2008. Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine. *PNAS* 105: 6554-6559.
- Chattopadhyay, M.K., Fernandez, C., Sharma, D., McPhie, P., and Masison, D.C. 2011. Yeast ornithine decarboxylase and antizyme form a 1:1 complex in vitro: purification and characterization of the inhibitory complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406: 177-182.
- Chattopadhyay, M.K., Tabor, C. W., and Tabor, H. 2006. Polyamine deficiency leads to accumulation of reactive oxygen species in a spe2 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 751-761.
- Chibucos, M.C., and Morris, P.F. 2006. Levels of polyamines and kinetic characterization of their uptake in the soybean pathogen *Phytophthora sojae*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3350-3356.
- Choi, W.B., Kang, S.H., Lee, Y.W., and Lee, Y.H. 1998. Cyclic AMP restores appressorium formation inhibited by polyamines in *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 88:58-62.
- Coburn, R.F. 2009. Polyamine effects on cell function: possible central role of plasma membrane PI (4, 5) P2. *Journal of cell physiology* 221: 544-551.

investigación detallada del genoma de *M. phaseolina* para encontrar otras, permitirán avanzar en la comprensión del metabolismo de las poliaminas en este patógeno y dilucidar su papel en los procesos de patogenicidad y virulencia, con miras a mejorar las estrategias de control del hongo desde la perspectiva integral del patosistema. Es necesario además, concentrar algunos esfuerzos para determinar la existencia de una ruta alternativa para la síntesis de putrescina vía agmatina, que nos permitan dilucidar si la actividad ADC está presente en este microorganismo y de ser así, explorar las condiciones de regulación genética bajo las cuales esta ruta podría ser activa.

**Agradecimientos.** Este trabajo se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología vegetal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, bajo el financiamiento de los proyectos: SIP número 20120551 y CB-2011-01 169827. M.V. Roa-Cordero agradece a la Universidad de Santander (UDES), y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo para la realización de estudios de Maestría.

- Coffino, P. 2001. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 188-194.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Philips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., and Groenewald, J.Z. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in mycology* 55: 235-253.
- Desforges, B., Curmi, P.A., Bounedjah, Q., Nakib, S., Hamon, L., De Bandt, J-P., and Pastré, D. 2013. An Intercellular polyamine transfer via gap junctions regulates proliferation and response to stress in epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*. D.O.I: 10.1091/mbc.E12-10-0729.
- Dhingra, O.D., and Sinclair J. B. 1987. *Biology and Pathology of Macrophomina phaseolina*. Vicosá, Brazil, Universidad Federal de Vicosá.
- El Ghachtouli, N., Paynot, M., Martin-Tanguy, J., Morandi, D., and Gianinazzi, S. 1996. Effect of polyamines in *Glomus mosseae*. *Mycological Research* 100: 597-600.
- Elad, Y. 1991. An inhibitor of polyamine biosynthesis difluoromethylornithine and the polyamine spermidine for the control of gray mold (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica* 19:201-209.
- Fujisawa, S., and Kadoma, Y. 2005. Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer research* 25:965-970.
- Gamarnik A., Frydman, F.R., and Barreto, D. 1994. Prevention of infection of soybean seeds by *Colletotrichum truncatum* by polyamine biosynthesis inhibitors. *Phytopathology* 84: 1445-1448.
- Gárriz, A., Gonzalez, M.E., Marina, M., Ruiz, O.A., and Pieckenstein, F.L. 2008. Polyamine metabolism during sclerotial development of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological research* 112: 414-422.
- Georgiou, C. D., Patsoukis, N., Papapostolou, I., and Zervoudakis, G. 2006. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology* 46: 691-712.
- Gray, F.A., Mihail, J.D., Lavign, R.J., and Porter, P.M. 1991. Incidence of charcoal rot of sorghum and soil populations of *Macrophomina phaseolina* associated with sorghum and native vegetation in Somalia. *Mycopathologia* 114: 145-151.
- Groppa, M. D., and Benavides, M. P. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34: 35-45.
- Groppa, M., Tomaro, M., and Benavides, M. 2001. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science* 161: 481-488.
- Guevara-Olvera, L., Calvo-Mendez, C., and Ruiz-Herrera, J. 1993. The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of General Microbiology* 137: 485-493.
- Guzmán-de-Peña, D., and Ruiz-Herrera, J. 1997. Relationship between Aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology* 21:198-205.
- Heby, O. 1981. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19:1-20.
- Heller, J.S., Fong, W.F., and Canellakis, E.S. 1976. Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 1858-1862.
- Iacomino, G., Picariello, G., and D'Agostino, L. 2012. DNA and nuclear aggregates of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823: 1745-1755.
- Igarashia, K., and Kashiwagic, K. 2010. Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42: 39-51.
- Islam, S., Haque, S., Islam, M.M., Emdad, E.M., Halim, A., Hossen, M., Hossain, Z., Ahmed, B., Rahim, S., Rahman, S., Alam, M., Hou, S., Wan, X., Saito, J.A., and Alam, M. 2012. Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC Genomics* 13:493.
- Ivanov, I.P., and Atkins, J.F. 2007. Ribosomal frameshifting in decoding antizyme mRNAs from yeast and protists to humans: close to 300 cases reveal remarkable diversity despite underlying conservation. *Nucleic Acids Research* 35: 1842-1858.
- Ivanov, I.P., Gesteland, R.F. and Atkins, J. F. 2006. Evolutionary specialization of recoding: Frameshifting in the expression of *S. cerevisiae* antizyme mRNA is via an atypical antizyme shift site but is still + 1. *RNA* 12: 332-337.
- Ivanov, I.P., Gesteland, R.F., Atkins, J.F. 2000a. Antizyme expression: a subversion of triplet decoding, which is remarkably conserved by evolution, is a sensor for an autoregulatory circuit. *Nucleic Acids Research* 28: 3185-3196.
- Ivanov, I.P., Matsufuji, S., Murakami, Y., Gesteland, R.F., Atkins, J.F. 2000b. Conservation of polyamine regulation by translational frameshifting from yeast to mammals. *EMBO Journal* 19:1907-1917.

- Jana, T., Sharma, T.R., Prasad, R. D., and Arora, D. K. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. *Microbiological research* 158: 249-257.
- Jiménez-Bremont, J.F., Ruiz-Herrera, J., and Domínguez, L. 1977. A. 2001. Disruption of gene YIODC reveals absolute requirement of polyamines for mycelial development in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 1:195-204.
- Kaur, S., Dhillon, G.S., Brar, S.K., Vallad, G.E., Chand, R., and Chauhan, V.B. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology* 2012:1-16.
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A.F., and Galston, A.W. 1988. Spermidine and flower-bud differentiation in thin-layer explants of tobacco. *Plants* 173:282-284.
- Khan, A.J., and Minocha, S.C. 1989. Biosynthetic arginine decarboxylase in phytopathogenic fungi. *Life Sciences* 44: 1215-1222.
- Khurana, N., Saxena, R. K., Gupta, R., and Rajam, M. V. 1996. Polyamines as modulators of microcycle conidiation in *Aspergillus flavus*. *Microbiology* 142: 517-523.
- Lovaas, E. 1991. Antioxidative effects of polyamines. *Journal of the American Oil Chemists Society* 68:353-358.
- Mandal, S., Mandal, A., Johansson, H.E., Orjalob, A.V., and Parka, M.H. 2013. Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *PNAS* 110 : 2169-2174.
- Marshall, M., Geraldine Russo, G., Van Etten, J., and Nickerson, K. 1979. Polyamines in dimorphic Fungi. *Current Microbiology* 2:187-190.
- Mayek-Pérez N., Garcia-Espinosa, R., López-Castaneda, C., Acosta Gallegos, J. A., and Simpson, J. 2002. Water relations, histopathology, and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 185-195.
- Morgan, D.L.M. Polyamines: an introduction. 1998. pp. 3-30. *In: Morgan DML (ed.). Polyamine protocols. Vol.79. Human Press, Totowa, New Jersey, USA. 186p.*
- Nickerson, K.W., Dunkle, L.D., and Van Etten, J.1977. Absence of spermine in filamentous fungi. *Journal of Bacteriology* 129: 173-176.
- Palanimurugan, R., Scheel, H., Hofmann, K., and Dohmen, R.J. 2004. Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme. *EMBO Journal* 23: 4857-4867.
- Papapostolou, I., and Georgiou, C.D. 2010. Superoxide radical induces sclerotial differentiation in filamentous phytopathogenic fungi: a superoxide dismutase mimetics study. *Microbiology* 156: 960-96.
- Patsoukis, N., and Georgiou, C.D. 2007. Effect of thiol redox state modulators on oxidative stress and sclerotial differentiation of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Arch Microbiol* 188: 225-233.
- Pegg, A. E. 2009. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 61: 880-894.
- Pieckenstain, F.L., Garriz, A., Chornomaz, E.M., Sanchez,D.H., and Ruiz, O.A. 2001. The effect of polyamine biosynthesis inhibition on growth and differentiation of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80: 245-253.
- Poulin, R., Coward, J.K., Lakanen, J.R., and Pegg, A.E. 1993. Enhancement of the spermidine uptake system and lethal effects of spermidine overaccumulation in ornithine decarboxylase-overproducing L1210 cells under hyposmotic stress. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 4690-4698.
- Rajam, M.V., Kumria, R., and Singh, S. 2004. Molecular biology and genetic engineering of Polyamines in plants. pp. 60-77. *In: Srivastava PS, Narula A and Srivastava S (eds.). Plant Biotechnology and Molecular Markers. Anamaya Publishers, New Delhi, India.420p.*
- Rajam, M.V., Weinstein, L.H., and Galston, A.W. 1986. Kinetic studies on the control of the bean rust fungus (*Uromyces phaseoli* L.) by an inhibitor of polyamine biosynthesis. *Plant Physiology* 82: 485-487.
- Reitz, M., Waiters, D., and Moerschbacher, B. 1995. Germination and appressorial formation by uredospores of *Uromyces viciae-fabae* exposed to inhibitors of polyamine biosynthesis. *European Journal of Plant Pathology* 101: 573-578.
- Sannazzaro, A., Álvarez, C.L., Mendez, A. B., Pieckenstain, L., Albertó, E. O., and Ruíz, O. A. 2004. Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. *FEMS Microbiology Letters* 230:115-121.
- Shapira, R., Altam, A., Henis, Y., and Chet, L. 1989. Polyamines and ornithine decarboxylase activity during growth and differentiation in *Sclerotium rolfsii*. *Journal of General Microbiology* 135: 1361-1367.
- Short, G.E., Wyllie, T.D., and Bristow, P.R. 1980. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and in residue of soybean. *Phytopathology* 70: 13-17.
- Smith, T. A., Barker, J. H. A., and Owen, W. J. 1992. Insensitivity of *Septoria tritici* and *Ustilago maydis* to inhibitors of ornithine decarboxylase. *Mycological Research*. 96:395-400.
- Stevens, L., and Winther, M.D. 1979. Spermine, spermidine and putrescine in fungal development. *Advances in Microbial Physiology* 19:63-148.
- Tabor, C.W., and Tabor, H. 1985. Polyamines in Microorganisms. *Microbiological Reviews* 49: 81-99.
- Tisi, A., Federico, R., Moreno, S., Lucretti, S., Moschou, P.N., Roubelakis-Angelakis, K.A., Angelini, R., and Cona, A. 2011. Perturbation of polyamine catabolism can strongly affect root development and xylem differentiation. *Plant Physiology* 157:200-215.
- Urdiales, J. L., Medina, M.A., and Sanchez-Jimenez, F. 2001. Polyamine metabolism revisited. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 13: 1015-



1019.

- Valdés-Santiago, L., Cervantes-Chávez, J.A., León-Ramírez, C.G., and Ruiz-Herrera, J. 2012. Polyamine metabolism in fungi with emphasis on phytopathogenic species. *Journal of Amino Acids* 2012: 1-13.
- Walters, D. R. 1995. Inhibition of polyamine biosynthesis in fungi. *Mycol. Res.* 99:129-139.
- White, W. H., Gunyuzlu, P.L., and Toyn, J.H. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* is capable of de novo pantothenic acid biosynthesis involving a novel pathway of  $\beta$ -alanine production from spermine. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 10794-10800.
- Williams, K. 1997. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochemical Journal* 325: 289-297.
- Wimalasekera, R., Tebartz, F., and Scherer, G.F.E. 2011. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Science* 181:593-603.