Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Expresión heteróloga de la proteína PfAvr4 de *Pseudocercospora fijiensis* y análisis de su efecto *in planta*.

Tesis que presenta

Gilberto Andrés Muñoz Pérez

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2018

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Gilberto Andrés Muñoz Pérez** titulado **"Expresión heteróloga de la proteína PfAvr4 de *Pseudocercospora fijiensis* y análisis de su efecto *in planta*.** fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, en la línea de investigación planta-patógeno, en el laboratorio 06 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Ignacio Islas Flores, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

_____

Dra. Clelia de la Peña Seaman

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, noviembre de 2018.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____

Nombre: I.B.Q. Gilberto Andrés Muñoz Pérez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado Enfoque agro-genómico en el estudio de la Sigatoka negra en el Proyecto de Ciencia Básica número 6027800001 bajo la dirección de la Dra. Blondy Canto Canché.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento al proyecto de Ciencia Básica número 6027800001 “Enfoque agro-genómico en el estudio de la Sigatoka negra” y del cual este trabajo forma parte.

Al CONACYT por la beca No. 453930, otorgada a Gilberto Andrés Muñoz Pérez, para la realización de los estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY) por permitirme el acceso a sus instalaciones, particularmente a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP), así como al ingeniero Fernando Contreras Martín y al personal de apoyo del invernadero.

Al comité tutoral integrado por la Doctora Blondy Canto Canché y los Doctores Julio Vega Arreguin e Ignacio Islas Flores. Agradezco mucho las observaciones y consejos dados por el Dr. Julio Vega, definitivamente son parte importante en el resultado de este trabajo. Agradezco a la Dra. Blondy Canto por la oportunidad que me dio para formar parte de este proyecto y por la confianza depositada en mi persona; así mismo, muchas gracias por sus comentarios, sugerencias y por el impulso para seguir trabajando. Mención especial para mi asesor y amigo, el Dr. Ignacio Islas, mi admiración y mis respetos. Gracias por animarme, por creer en mi trabajo, por permitirme equivocarme en el camino, pero también por enseñarme como corregir el rumbo, por alentarme a seguir en busca de los objetivos más anhelados en nuestro andar por esta vida.

A los maestros Bartolomé Chi Manzanero, Mildred Carrillo Pech y Miguel Tzec Simá, por su valioso apoyo técnico, por estar siempre allí para brindar su experiencia, consejos y conocimiento, desde luego, su amistad no puede quedar sin mencionarse, muchas gracias.

A la Dra. María Eugenia Sánchez Sandoval, por brindarme consejos de su vasta

experiencia en lo que concierne a la purificación de proteínas.

A la Dra. Georgina Estrada Tapia por su valioso apoyo para la obtención de material biológico utilizado durante el desarrollo de este trabajo.

A mis Compañeros del Laboratorio 06, a los que ya no están, pero que fueron parte en mi proceso de integración en el grupo de investigación (Diane, Aarón, Eligio y Margarita). A Yamily Burgos por sus comentarios, experiencia y apoyo técnico, pero más importante aún, por su valiosa amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de la Dra. Blondy Canto en la Unidad de Biotecnología del CICY, por su amistad y su valioso apoyo.

A mis compañeros de la UBBMP, por sus comentarios, apoyo, amistad y por los momentos de diversión compartidos.

DEDICATORIAS

A Dios. A mis padres porque con sacrificio y esfuerzo me han permitido avanzar durante el camino de la vida. Los amo y los respeto.

A mi amigo el Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, por su valioso apoyo y por haberme facilitado la incorporación a esta actividad que tanto me apasiona.

A mis amigos, esas personas que, sin ser tu familia, han llegado a convertirse en parte de ella, es un orgullo tener amigos como ustedes, quienes con dedicación y humildad siguen un camino que decidimos recorrer por el gusto a hacer ciencia. Gracias por ser parte de este camino Sergio García Laynes, José Ignacio Laines Hidalgo y Federico García Laynes.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN **1**

CAPÍTULO I **7**

ANTECEDENTES 7

1.1 Importancia del género *Musa* 7

1.2 Importancia del cultivo de banano en México 7

1.3 Enfermedades del banano 8

1.4 Sigatoka negra 8

1.4.1 Origen y distribución 10

1.4.2 Ciclo de la enfermedad 11

1.4.3 Ciclo de vida de *P. fijiensis* 12

1.4.4 Estrategias de control 13

1.5 Interacción Planta-Patógeno 15

1.5.1 Efectores 16

1.5.1.1 Efector CfAvr4 de *Cladosporium fulvum* 17

1.5.1.2 Efector Pf-Avr4 de *Pseudocercospora fuligena* 18

1.5.1.3 Efector PfAvr4 de *Pseudocercospora fijiensis* 19

1.6 Proteínas recombinantes en *Escherichia coli* 20

OBJETIVO GENERAL 22

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22

JUSTIFICACIÓN..... 23

HIPÓTESIS 24

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 25

CAPÍTULO II 27

MATERIALES Y MÉTODOS 27

2.1 SECUENCIAS DE PFAVR4 27

2.2 IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DEL PÉPTIDO SEÑAL 28

2.3 ANÁLISIS DE DOMINIOS EN PFAVR4 28

2.4 IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DE PUTATIVAS MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES EN PFAVR4.... 28

2.5 GENERACIÓN DE ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE PFAVR4 DE *P. FIJIENSIS* Y ORTÓLOGOS FUNCIONALES (CFAVR4 DE *C. FULVUM* Y PF-AVR4 DE *P. FULIGENA*) EN PYMOL..... 29

2.6 ANÁLISIS DE ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES SOBRELAPADAS DE PFAVR4 DE *P. FIJIENSIS* VS CFAVR4 DE *C. FULVUM* Y PF-AVR4 DE *P. FULIGENA* 29

2.7 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE ADN 29

2.8 AMPLIFICACIÓN DE PFAVR4 DE *P. FIJIENSIS* MEDIANTE PCR 30

2.9 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR (PFAVR4) CON EL TAMAÑO ESPERADO 31

2.10 GENERACIÓN DEL VECTOR P-GEM T- EASY-PFAVR4 32

2.11 TRANSFORMACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* DH5A 32

2.12 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS POR MINIPREP 32

2.13 AMPLIFICACIÓN DE PFAVR4 DE *P. FIJIENSIS* CON LOS OLIGONUCLEÓTIDOS COMPLEMENTARIOS LIC Y LIGACIÓN AL VECTOR DE EXPRESIÓN PLATE..... 33

2.14 SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES PLATE-PFAVR4-I Y PLATE-PFAVR4-M .. 33

2.15 DIGESTIONES DE LOS VECTORES PLATE-PFAVR4-I Y PLATE-PFAVR4-M PARA CONFIRMAR LA LIBERACIÓN DE LOS INSERTOS DE INTERÉS 33

2.16 TRANSFORMACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* CEPA ROSETTA GAMI B CON EL VECTOR PLATE RECOMBINANTE 34

2.17 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PFAVR4 (MADURA E INMADURA) 34

2.18 PURIFICACIÓN DE PFAVR4 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD 35

2.19 GELES DE 12 % SDS-PAGE 35

2.20 SECUENCIACIÓN DE AMINOÁCIDOS DE PFAVR4 RECOMBINANTE 36

2.21 ELECTROELUCIÓN DE PFAVR4 MADURA E INMADURA 36

2.22 ENSAYOS DE INFILTRACIÓN CON PFAVR4-M O PFAVR4-I EN PLANTAS DE BANANO RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A *P. FIJIENSIS* 36

2.23 ENSAYOS DE REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN EN UN POSIBLE DÍMERO DE PFAVR4-M 37

2.24 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PFAVR4-M Y PFAVR4-I SIGUIENDO EL MÉTODO DE PETERSON 38

2.25 TINCIÓN DE PROTEÍNAS 38

CAPÍTULO III 40

RESULTADOS 40

3.1 IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE PFAVR4 EN LA BASE DE DATOS DEL JGI 40

3.2 ALINEAMIENTOS 40

3.3 PÉPTIDO SEÑAL 42

3.4 DOMINIO DE UNIÓN A QUITINA DE PFAVR4 43

3.5 MODIFICACIONES POST TRADUCCIONALES EN PFAVR4 43

3.6 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PFAVR4, CFAVR4 Y PF-AVR4 43

3.7 TRASLAPE DE ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE PFAVR4 VS CFAVR4 Y PFAVR4 VS PF-AVR4 46

3.8 AMPLIFICACIÓN DEL CDS DE PFAVR4 47

3.9 AMPLIFICACIÓN DEL CDS DE PFAVR4 DE *P. FIJIENSIS* CON LOS ADAPTADORES LIC Y GENERACIÓN DE LOS VECTORES PLATE-PFAVR4-I Y PLATE-PFAVR4-M 48

3.10 SECUENCIACIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN PLATE-PFAVR4-I Y PLATE-PFAVR4-M 50

3.11 RESTRICCIÓN DE LOS VECTORES PLATE-PFAVR4-I Y PLATE-PFAVR4-M..... 53

3.12 TRANSFORMACIÓN DE *E. COLI* ROSETTA GAMI B CON LOS VECTORES PLATE-PFAVR4-I O PLATE-PFAVR4-M..... 54

3.13 EXPRESIÓN DE PFAVR4 (MADURA E INMADURA) EN *E. COLI* ROSETTA GAMI B 55

3.14 SECUENCIACIÓN DE AMINOÁCIDOS DE PFAVR4-I Y PFAVR4-M RECOMBINANTES 57

3.15 ELECTROELUCIÓN DE PFAVR4 MADURA E INMADURA 58

3.16 ENSAYOS DE REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN DE UN OLIGÓMERO PUTATIVO DE PFAVR4-M..... 60

3.17 ENSAYOS DE INFILTRACIÓN CON PFAVR4-I O PFAVR4-M EN BANANOS RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A *P. FIJIENSIS* 61

CAPÍTULO IV 66

DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... 66

CAPÍTULO V 74

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS 74

5. CONCLUSIONES 74

5.1 PERSPECTIVAS..... 74

BIBLIOGRAFÍA 76

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Principales estados productores de bananos en la República Mexicana y su organización en zonas de producción 8

Figura 1.2 Islas fiji 11

Figura 1.3 Ciclo de la enfermedad de la Sigatoka negra en hojas de banano 11

Figura 1.4 Ciclo de vida de *P. fijiensis* 13

Figura 1.5 Sistema inmune vegetal 16

Figura 1.6 Diagrama experimental 25

Figura 2.1 Secuencias de nucleótidos de los CDSs >151116-26_M05-AV4B2_T7.ab1 y >151116-26_C07-AVO8_T7.ab1 27

Figura 2.2 Secuencias de aminoácidos deducidas *in silico* a partir de los CDSs de >151116-26_M05-AV4B2_T7.ab1 y >151116-26_C07-AVO8_T7.ab1 28

Figura 2.3 Esquematización del diseño del experimento de infiltración en las hojas de banano susceptibles y resistentes a *P. fijiensis* 37

Figura 3.1 Alineamiento de nucleótidos de PfAvr4 B2, PfAvr4 08 y Jgi|Mycfi2|196075 .. 41

Figura 3.2 Alineamiento de aminoácidos de PfAvr4 B2, PfAvr4 08 y Jgi|Mycfi2|196075 41

Figura 3.3 Predicción del péptido señal putativo de PfAvr4 B2 por SignalP-4.1 42

Figura 3.4 Dominio de unión a quitina en la secuencia de PfAvr4 43

Figura 3.5 Estructura terciaria de PfAvr4 de *Pseudocercospora fijiensis* 44

Figura 3.6 Estructura terciaria de CfAvr4 de *Cladosporium fulvum* 45

Figura 3.7 Estructura terciaria de Pf-Avr4 de *Pseudocercospora fuligena* 45

Figura 3.8 Modelamiento tridimensional de las estructuras de PfAvr4 de *P. fijiensis* (azul) y CfAvr4 (verde)..... 46

Figura 3.9 Alineamiento tridimensional de las estructuras de PfAvr4 de *P. fijiensis* (azul) y Pf-Avr4 de *P. fuligena* (verde)..... 47

Figura 3.10 CDS de PfAvr4 de *P. fijiensis* a partir de la clona PfAvr4 B2 y análisis del producto de PCR en gel de 1 % de agarosa..... 48

Figura 3.11 CDS de PfAvr4-M de *P. fijiensis* con los cebadores Fp52Avr4 y Rc52Avr4 a partir de pGEM-T Easy-PfAvr4 y análisis del producto de PCR en gel de 1 % de agarosa 49

Figura 3.12 CDS de PfAvr4-I de *P. fijiensis* con los cebadores Fc52Avr4 y Rc52Avr4 a partir de pGEM-T Easy-PfAvr4 y análisis del producto de PCR en gel de 1 % de agarosa 49

Figura 3.13 Secuencia de nucleótidos del plásmido recombinante pLATE-PfAvr4-I..... 50

Figura 3.14 Alineamiento de secuencias del CDS de PfAvr4 reportado en el portal JGI con el CDS clonado en el vector pLATE-PfAvr4-I..... 51

Figura 3.15 Secuenciación de nucleótidos del plásmido recombinante pLATE-PfAvr4-M 52

Figura 3.16 Alineamiento de secuencias del CDS de PfAvr4 reportado en el portal JGI con el CDS clonado en el vector pLATE-PfAvr4-M..... 53

Figura 3.17 Digestión de los vectores pLATE-PfAvr4-I y pLATE-PfAvr4-M con las enzimas de restricción Stu I y Xba I..... 54

Figura 3.18 Imagen del gel de 1 % de agarosa que muestra los productos de PCR obtenidos a partir de las cepas de *E. coli* Rosetta gami B, transformadas con los plásmidos de expresión pLATE-PfAvr4-I o pLATE-PfAvr4-M..... 55

Figura 3.19 Perfil electroforético de la proteína recombinante PfAvr4-I en gel de 12 % SDS-

PAGE..... 56

Figura 3.20 Perfil electroforético de la proteína recombinante PfAvr4-M en gel de 12 % SDS-PAGE..... 57

Figura 3.21 Proteínas identificadas por porcentaje de cobertura de secuencia..... 58

Figura 3.22 Perfil de polipéptidos de la fracción L3 de PfAvr4-M analizado en gel de 15 % SDS-PAGE..... 59

Figura 3.23 Perfil de polipéptidos de las proteínas electroeluidas PfAvr4-I y PfAvr4-M y separadas por electroforesis en gel de 15 % SDS-PAGE teñido con $AgNO_3$..... 60

Figura 3.24 Perfil de polipéptidos de PfAvr4-M alquilada, reducida y separada por electroforesis en geles de 15 % SDS-PAGE y su tinción con $AgNO_3$..... 61

Figura 3.25 Curvas del área de necrosis causada por la infiltración de concentraciones crecientes de PfAvr4-I en hojas de banano susceptible a *P. fijiensis*..... 62

Figura 3.26 Curva del área de necrosis causada por la infiltración de concentraciones crecientes de PfAvr4-M en hojas de banano susceptible a *P. fijiensis*..... 62

Figura 3.27 Curvas del área de necrosis causada por la infiltración de concentraciones crecientes de PfAvr4-I en hojas de banano resistente a *P. fijiensis*..... 63

Figura 3.28 Curvas del área de necrosis causada por la infiltración de concentraciones crecientes de PfAvr4-M en hojas de banano resistente a *P. fijiensis*..... 64

Figura 3.29 Registro fotográfico del desarrollo de la necrósis en hojas de banano durante un período de 96 h de infiltración con PfAvr4-I o PfAvr4-M..... 65

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 2.1 Oligonucleótidos utilizados en el desarrollo de este trabajo 30

Cuadro 2.2 Condiciones para los ciclos de PCR 31

Cuadro 2.3 Diferentes etapas de la elución de la proteína recombinante a partir de la columna Probond..... 35

Cuadro 3.1 Modificaciones post-traduccionales putativas en PfAvr4..... 43

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
$AgNO_3$	Nitrato de plata
ARN	Ácido ribonucleico
Avr	Factor de avirulencia
BDP	BODIPY-TMR-SE (Fluoróforo)
CaMV 35S	Promotor constitutivo 35 S del virus del mosaico de la coliflor
CBM 14	Family 14 Chitin-binding domain (Dominio de unión a quitina)
CDS	Coding-Sequence (Secuencia codificante)
Cf-4	Cognado de resistencia de ortólogos Avr4
$CuSO_4.5H_2O$	Sulfato de cobre pentahidratado
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
e.g.	Por ejemplo (Latín)
et al.	Y otros (Latín)
ETI	Effector-Triggered Immunity (Inmunidad disparada por efectores)
FHIA	Fundación Hondureña de Investigación Agrícola
F1MAD	Clona de PfAvr4 maduro

F1NM	Clona de PfAvr4 inmaduro
HEPES	Ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinetanesulfónico
HR	Hypersensitive response (Respuesta hipersensible)
HT 6His	Histidine-Tag (Etiqueta de histidinas)
H_2O	Agua
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
JGI	Joint Genome Institute
Kb	Kilobase (1000 pares de base de ADN o ARN)
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodalton (1000 daltones), unidad de masa atómica
$KNaC_4H_4O_2$	Tartrato de sodio y potasio
LC-MS-MS	Cromatografía líquida acoplada a masas-masas
LIC	Ligation-Independent Cloning (Ligación independiente de la clonación)
MAPKs	Mitogen-Associated Protein Kinase (Proteína cinasa asociada a mitógeno)
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
$MgSO_4$	Sulfato de magnesio
mL	Mililitro (Unidad de volumen)

mM	Milimolar (Concentración molar)
MPTs	Modificaciones post-traduccionales
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Na_2CO_3	Carbonato de sodio
NB-LRR	Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat (Proteínas con repeticiones ricas en leucina y unión a nucleótido)
ng	Nanogramos (Unidad de masa)
nm	Nanómetros (Unidad de longitud)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Resonancia magnética nuclear)
nM	Nanomolar (Concentración molar)
ORF	Open Reading Frame (Marco de lectura abierto)
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns (Patrones moleculares asociados a patógenos)
pb	Pares de bases (Pares de bases de ADN O ARN)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
pH	Potencial de hidrógeno
pmol	Picomol (Concentración molar)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PRR	PAMP-Recognition Receptors (Receptores de reconocimiento de PAMPs)
PR-10	Promotor del gen de resistencia PR-10 (Inducible)
PS	Peptide Signal (Péptido señal)
PTI	PAMP-Triggered Immunity (Inmunidad disparada por PAMPs)
RBS	Ribosome-Binding Site (Sitio de unión a ribosoma)
RLK	Receptor-Like Kinase (Receptor parecido a cinasa)
RLP	Receptor-Like Protein (Proteína parecida a receptor)
ROS	Reactive Oxigen Species (Especies reactivas de oxígeno)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	SDS-Polyacrilamide gel electrophoresis (Gel de poliacrilamida desnaturalizante)
SN	Sigatoka negra
SOC	Caldo super óptimo con represión de catabólito
StSy	Gen de la estilbeno sintasa
Stu I	Enzima de restricción (*Streptomyces nodosus*)
TnEn-42	Gen de la endoquitinasa de *Trichoderma harzianum*
Tris-HCl	Tris-Ácido clorhídrico
V	Volts (Potencial eléctrico)

µg	Microgramos (Unidad de masa)
µL	Microlitros (Unidad de volumen)

RESUMEN

Las plantas constantemente son afectadas por factores abióticos y bióticos; estos últimos, con el propósito de cumplir con su ciclo de vida, afectan la fisiología de sus respectivos hospederos, les causan enfermedades e incluso la muerte sino se aplica un manejo adecuado de la enfermedad. La Sigatoka negra (SN) ocasionada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*, es la enfermedad más devastadora del cultivo de bananos y actualmente se encuentra distribuida en todas las regiones productoras del mundo. La estrategia más común para su control es con la aplicación frecuente de fungicidas en grandes volúmenes. No obstante, el uso indiscriminado de estas sustancias ha ocasionado que el patógeno adquiera resistencia. La cantidad de aplicaciones de fungicidas en los cultivos ha impactado negativamente al ambiente, al afectar a la flora y fauna coexistente con el cultivo, pero además, ha generado problemas de salud al personal que ahí labora. Ante dicha problemática, es necesario generar más investigación respecto a la interacción *P. fijiensis*-*Musa* sp, para así implementar estrategias que permitan un mejor control de la enfermedad. Se sabe que *P. fijiensis* utiliza una gran cantidad de factores de virulencia y efectores proteicos (Avr´s) para modular el metabolismo del hospedero. En el presente trabajo, el factor de avirulencia Avr4 de *P. fijiensis* (PfAvr4) fue expresado en su forma madura (PfAvr4-M) e inmadura (PfAvr4-I) en *Escherichia coli*. Las proteínas recombinantes fueron purificadas por cromatografía de afinidad, separadas en geles de 12 % SDS-PAGE. Las secciones conteniendo las bandas de proteína con el tamaño esperado fueron escindidas del gel y divididas en dos lotes, el primero de ellos fue secuenciado por LC-MS/MS y el segundo se electroeluyó en bolsas de diálisis con tamaño de poro de 3.5 kDa. La solución de electroelución se utilizó en ensayos de infiltración de hojas de banano resistente y susceptible a la SN. La secuenciación de proteínas a partir de las bandas de gel mostró la presencia de PfAvr4-M o PfAvr4-I, esta última en menor cantidad. No obstante, cuatro péptidos de *E. coli* fueron co-purificados con PfAvr4-M o PfAvr4-I. Las infiltraciones se realizaron con diferentes concentraciones de proteína durante 96 horas. Se observó

que PfAvr4-M o PfAvr4-I, generaron respuestas hipersensibles (HR) cuando fueron infiltrados en la variedad resistente. El área necrótica aumentó conforme el tiempo y la concentración de proteína infiltrada incrementaron. En contraste, no se observó HR en la variedad susceptible. Este resultado apoya la hipótesis de la presencia de un cognado de resistencia, aún no identificado en la variedad resistente de banano. La proteína PfAvr4 recombinante purificada, puede ser utilizada para diseñar experimentos que permitan profundizar en la biología de la interacción, incluso en el desarrollo de herramientas moleculares que permitan controlar con mayor eficiencia a este fitopatógeno.

ABSTRACT

Plants are constantly affected by abiotic and biotic factors; the latter, with the purpose of fulfilling their life cycle, affect the physiology of their respective hosts, causing diseases and even death if an adequate management of the disease is not applied. Black Sigatoka (BS) caused by the fungus *Pseudocercospora fijiensis*, is the most devastating disease of banana cultivation and is currently distributed in all the producing regions of the world. The most common strategy for its control is the frequent application of fungicides in large volumes. However, the indiscriminate use of these substances has caused the pathogen to acquire resistance. The amount of applications of fungicides in crops has negatively impacted the environment, affecting the flora and fauna coexisting with the crop, but also, has generated health problems for the staff that works there. Given this problem, it is necessary to generate more research regarding the interaction *P. fijiensis-Musa* sp, in order to implement strategies that allow better control of the disease. It is known that *P. fijiensis* uses a large number of virulence factors and protein effectors (Avr's) to modulate the host's metabolism. In the present work, Avr4 avirulence factor of *P. fijiensis* (PfAvr4) was expressed in its mature (PfAvr4-M) and immature (PfAvr4-I) form in *Escherichia coli*. The recombinant proteins were purified by affinity chromatography, separated in gels of 12% SDS-PAGE. The sections containing the protein bands with the expected size were excised from the gel and divided into two batches, the first one was sequenced by LC-MS/MS and the second was electroeluted in dialysis pockets with 3.5 kDa pore size. The electroelution solution was used in infiltration tests of leaves of resistant and susceptible bananas to BS. The sequencing of proteins from the gel bands showed the presence of PfAvr4-M or PfAvr4-I, the latter in smaller amount. However, four *E. coli* peptides were co-purified with PfAvr4-M or PfAvr4-I. Infiltrations were performed with different protein concentrations for 96 hours. It was observed that PfAvr4-M or PfAvr4-I, generated hypersensitive responses (HR) when they were infiltrated in the resistant variety.

The necrotic area increased as time and the concentration of infiltrated protein increased. In contrast, no HR was observed in the susceptible variety. This result supports the hypothesis of the presence of a resistance cognate, not yet identified in the resistant banana variety. The purified recombinant PfAvr4 protein can be used to design experiments that allow to know more about the biology of the interaction, even in the development of molecular tools that allow controlling this phytopathogen with greater efficiency.

INTRODUCCIÓN

Pseudocercospora fijiensis es el hongo patógeno causante de la enfermedad foliar de bananos y plátanos, conocida como Sigatoka negra (SN) (Churchill, 2011; Stergiopoulos *et al*., 2014; Friesen, 2016; Alakonya *et al*., 2018). Esta enfermedad es la más devastadora del cultivo y en la actualidad se encuentra distribuida en todas las regiones productoras de banano (Stergiopoulos *et al*., 2014; Arango *et al*., 2016; Friesen, 2016; Alakonya *et al*., 2018).

Entre las diferentes estrategias que se han utilizado para contrarrestar el efecto de la SN en los cultivos de banano; la aspersión periódica de fungicidas ha sido la que mejores resultados ha producido (Cañas-Gutiérrez *et al*., 2009; Churchill, 2011; Stergiopoulos *et al*., 2014; Arango *et al*., 2016; Friesen, 2016). No obstante, las preocupaciones relacionadas con los efectos deletéreos de los fungicidas sobre el ambiente, la salud de la fauna y de las personas que tienen contacto directo o indirecto con tales compuestos, son un motivo de constante alerta (Friesen, 2016). Una alternativa a la aspersión indiscriminada de fungicidas se ha basado en la identificación de variedades de bananos resistentes a la SN y su multiplicación mediante propagación *in vitro*. Sin embargo, la propagación *in vitro* de bananos resistentes a la SN no ha dado los resultados esperados, debido a factores como: a) el largo periodo de tiempo que toma su multiplicación, b) la estrecha base genética del banano, c) la elevada esterilidad masculina, d) baja fertilidad femenina y e) la naturaleza poliploide de las variedades comerciales de banano (Sowmya *et al*., 2016). Esos factores y el poco control que se tiene sobre el fitopatógeno, ha facilitado el camino para el desarrollo y prueba en condiciones de campo de cultivares de banano modificados genéticamente y que de forma heteróloga expresan genes que codifican para péptidos antifúngicos (Remy *et al*., 1998; Chakrabarti *et al*., 2003; Kosky *et al*., 2010; Vishnevetsky *et al.,* 2011; Kovács *et al*., 2013). Vishnevetsky *et al*., (2011). En pruebas de campo realizadas por cuatro años consecutivos encontraron que, plantas de banano de la variedad Enano Gigante,

que coexpresaban al gen de la endoquitinasa (TnEn-42) de *Trichoderma harzianum*, al gen de la estilbeno sintasa (StSy) de *Vitis vinifera*, bajo el control de los promotores CaMV35S o PR-10 respectivamente, o al gen de la superóxido dismutasa (CuZn-SOD) de tomate bajo el control del promotor de ubiquitina, tenían una reducción en el síndrome de la SN (Vishnevetsky *et al*., 2011). Además, la producción y calidad del fruto, no se afectaron (Sowmya *et al*., 2016). Dichos resultados son alentadores, aunque no concluyentes debido a que no son garantía de que las plantas de banano mantengan niveles constantes de protección contra la SN o que *P. fijiensis* no modifique sus características genéticas para romper la resistencia conferida a dichas plantas. En años recientes se ha descrito que algunas cepas de *P. fijiensis* han sido capaces de infectar cultivares de banano que previamente habían sido considerados como tolerantes a dicho patógeno, *i.e*., Calcuta IV (Vishnevetsky *et al*., 2011; Stergiopoulos *et al*., 2014; Escobar-Tovar *et al*., 2015). El escenario arriba descrito evidencia que es necesario profundizar en el estudio de los mecanismos que median la interacción *P. fijiensis*-*Musa* sp, pues a través de su entendimiento se podrían diseñar estrategias moleculares que en condiciones *in vitro* o de campo, permitan un control más eficiente de este fitopatógeno.

La interacción planta-patógeno ocurre de manera constante, pues de ello depende la sobrevivencia de ambos organismos o en contraparte la sobrevivencia del más apto. Boyd *et al*. (2013), postularon que las plantas deben ser capaces de reconocer y defenderse de potenciales patógenos que se localizan en su superficie, mientras los patógenos, deben ser capaces de manipular la biología de la planta con el propósito de generar un ambiente adecuado para su reproducción y crecimiento. La alta frecuencia y especialización de la interacción patógeno-hospedero ha dado como resultado que tanto plantas como patógenos desarrollen genes que faciliten o dificulten esta interacción.

Reportes recientes han mostrado que la producción y secreción de efectores proteicos es una estrategia ampliamente utilizada por diversos fitopatógenos para colonizar al hospedero (Toruño *et al*., 2016; Selin *et al*., 2016). Por ejemplo, Jiang *et al*. (2013) reportaron que el efector HopZ1a de *Pseudomonas syringae* interactúa con el represor transcripcional JAZs, causando su degradación y activando la señalización del ácido jasmónico durante la infección bacteriana, promoviendo de esta manera la colonización de la bacteria. Por mencionar otro ejemplo, Huang *et al*. (2017), describieron que el efector PsAvr3c del oomiceto *Phytophthora sojae*, se une físicamente y estabiliza a proteínas ricas en serina, lisina y arginina (GmSKRPs), estas proteínas se asocian con un complejo que contiene componentes del complejo de maduración de los ARN “espliceosoma” y de esta manera alteran el mecanismo de maduración de transcritos de genes relacionados a defensa del hospedero, promoviendo de esta novedosa manera el éxito en la colonización del hospedero.

En el caso de *P. fijiensis*, Stergiopoulos *et al*. (2010) demostraron que el efector proteico PfAvr4 es el ortólogo funcional de CfAvr4 de *Cladosporium fulvum*; este efector protege a la pared celular fúngica contra la hidrólisis que causan las quitinasas secretadas por la planta hospedera. La protección de la pared ocurre debido a la unión de CfAvr4 con la quitina de la pared celular de *C. fulvum* (van den Burg *et al*., 2006). En el trabajo de Stergiopoulos *et al*. (2010), se demostró la capacidad del ortólogo Avr4 de *P. fijiensis* (PfAvr4), para inducir la respuesta hipersensible dependiente del gen de resistencia Cf-4 en plantas de tomate.

El efector CfAvr4 es una proteína de 135 aminoácidos, la cual es procesada en los extremos N y C terminal por proteasas del hospedero o del mismo hongo, dando lugar a una proteína madura de 86 aminoácidos (Mesarich *et al*., 2016). CfAvr4 presenta un dominio de unión a quitina (uno de los principales componentes de la pared celular fúngica). Dicha característica explica la elevada capacidad de CfAvr4 y sus ortólogos para precipitar a la quitina *in vitro* (van den Burg *et al*., 2006;

Stergiopoulos *et al*., 2010; Mesarich *et al*., 2016).

En el caso de PfAvr4 Stergiopoulos *et al*. (2010) y Mesarich *et al*. (2016), describieron que en *P. fijiensis* la proteína está constituida por 121 aminoácidos, veintiuno de los aminoácidos localizados en el N terminal constituyen el péptido señal. Además, PfAvr4 posee un dominio de unión a quitina y ambos autores reportaron la expresión heteróloga de PfAvr4. van den Burg *et al*. (2006) marcaron con el compuesto fluorescente BDP, a CfAvr4 de *C. fulvum* y mediante microscopía confocal establecieron que durante la interacción de *C. fulvum* con plantas resistentes y susceptibles de tomate Moneymaker, CfAvr4 se une a la quitina de *C. fulvum* en el apoplasto de las plantas de tomate. Este tipo de experimentos permite ver que en el caso de la interacción entre *P. fijiensis*-*Musa* sp., hace falta generar diferentes herramientas bioquímicas, que permitan realizar estudios de localización aún más profundos y específicos de PfAvr4 y sus ortólogos. Por otra parte, Mesarich *et al*. (2016) identificaron el residuo de aminoácido indispensable para disparar la respuesta hipersensible dependiente de proteínas Cf-4 y de efectores Avr4 ortólogos al de *P. fijiensis*, los cuales conservaban el dominio de unión a quitina. Esto sugiere que además del dominio de unión a quitina presente en los diferentes ortólogos Avr4, la presencia de un residuo de prolina en la posición 87 de CfAvr4 de *C. fulvum*, es esencial para inducir la respuesta hipersensible en plantas con el cognado Cf-4 (Mesarich *et al*., 2016).

Arango *et al*. (2016) ratificaron la presencia de un ortólogo de Avr4 de *C. fulvum* en *P. fijiensis* (PfAvr4), mismo que fue expresado, concentrado y posteriormente infiltrado en hojas de las variedades de banano Calcuta IV y Enano Gigante. La infiltración activó la respuesta hipersensible en la variedad Calcuta IV. Por lo tanto, este resultado, sugiere que la variedad de banano Calcuta IV, probablemente posee proteínas de resistencia (proteínas R), mismas que aún no han sido identificadas, y que podrían ser ortólogos del Cf-4 presente en las especies resistentes de tomate.

En el presente trabajo se realizó la expresión heteróloga y purificación por cromatografía de afinidad y electroelución de la proteína PfAvr4. La proteína PfAvr4 obtenida se utilizó en ensayos de infiltración en hojas de bananos resistentes y susceptibles a *P. fijiensis*. Se determinó que la PfAvr4 recombinante mantuvo su actividad biológica como efector, pues generó respuesta hipersensible (HR) en las zonas infiltradas. Además, se observó una correlación entre el tamaño de las áreas necróticas y las variaciones en la cantidad de proteína infiltrada. Este trabajo, representa un paso hacia la generación de herramientas bioquímicas que permitan profundizar en el conocimiento del mecanismo de interacción entre *P. fijiensis-Musa* sp.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Importancia del género *Musa*

Plátanos y bananos mantienen diferencias genéticas y fisiológicas que determinan que los primeros acumulen almidón de cadena larga y compleja y los segundos almidón de cadena corta. Esta diferencia es suficiente para que los primeros requieran de mayor tiempo de maduración o de un proceso de cocción para su consumo. En contraste, los segundos se consumen como postre mientras maduran (Rodríguez-Caamal *et al*., 2010). En este trabajo, se utilizaron plantas de banano de la variedad Calcuta IV y Enano Gigante. Los bananos son el fruto más popular, y ocupan la sexta posición en cuanto a la escala de alimentos básicos en el mundo solo por detrás del arroz, trigo, maíz, yuca y las papas con más de 144 millones de toneladas producidas anualmente (Alakonya *et al*, 2018). Bananos y plátanos son producidos en más de 100 países, sobre todo en países en vías de desarrollo en las regiones tropicales de África, Asia y América Latina. Así mismo, son casi la única fuente de nutrición para más de 400 millones de personas en los trópicos y en África (Menon, 2016; Jean-Yves *et al*., 2018).

1.2 Importancia del cultivo de banano en México

En México, los principales estados productores de banano son Chiapas, Tabasco, Veracruz, Colima, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca los cuales se agrupan en tres regiones productoras: Región Golfo de México, Región Pacífico Centro y Región Pacífico Sur. Dentro de la región Pacífico Sur, se localiza la zona Soconusco, misma que ocupa territorio del estado de Chiapas, y que es catalogada como la más importante zona bananera del país (Orozco *et al*., 2001; Hernández *et al*., 2016; SIAP, 2016; Figura 1.1).

Figura 1.1 Principales estados productores de bananos en la República Mexicana y su organización en zonas de producción. Tomado de Orozco *et al*. (2001).

SIAP, (2016) declaró que en México se cultivan 80,022 hectáreas de banano con una producción de 2,384,778 toneladas/anuales, lo que representa un rendimiento promedio de 30.5 toneladas por hectárea. Chiapas, Tabasco y Veracruz, son los estados con mayor producción de banano con 700 mil toneladas, 601.7 mil toneladas y 322.6 mil toneladas respectivamente.

1.3 Enfermedades del banano

El banano es atacado por diversas enfermedades y patógenos, tal es el caso del moko bacteriano causado por la bacteria *Ralstonia Solanacearum*, la enfermedad viral Bunchy top causada por el virus del bunchy top, enfermedades causadas por el nematodo *Radopholus similis* y el mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* (Ploetz, 2004). No obstante, la enfermedad foliar más devastadora del banano es la SN, causada por el hongo hemibiotrófico *Pseudocercospora fijiensis* (Friesen, 2016).

1.4 Sigatoka negra

La SN es uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta al cultivo de bananos en América, Asia y África (Carlier *et al*., 2000; Lepoivre *et al*., 2003; Marín *et al*., 2003; Chuc-Uc *et al*., 2011; Churchill, 2011). Deteriora el área foliar de la planta por lo que la fotosíntesis disminuye y en consecuencia se afecta la floración,

la cosecha y el llenado del racimo, además de que los frutos maduran prematuramente (Daly, 1976; Craenen y Ortiz, 2003).

El agente causal de la SN es un hongo hemibiotrófico; después de que sus esporas han germinado sobre la superficie abaxial de las hojas de banano y las hifas han penetrado los estomas, *P. fijiensis* en un proceso aparentemente inocuo, coloniza la cavidad estomática y el mesófilo foliar, constituyendo su fase biotrófica (Meredith y Lawrence, 1969). La colonización de estomas por parte del hongo, compromete el proceso de fotosíntesis al reducir la conductividad estomática y en consecuencia la tasa fotosintética (Belalcázar y Merchan, 1991; Merchan, 2000; Churchill, 2011). Esta vía de entrada del hongo ocurre tanto en los cultivares susceptibles como en los que muestran una alta resistencia a la enfermedad (Meredith y Lawrence, 1969).

En la etapa necrotrófica el hongo modifica su comportamiento hacia una fase altamente agresiva que devasta la hoja de banano hasta causar la muerte del tejido foliar (Churchill, 2011). El resultado final de la interacción *P. fijiensis*-*Musa* sp., en cultivares susceptibles favorece en su totalidad a *P. fijiensis* (Daly, 1976), mientras que en cultivares resistentes, la infección de *P. fijiensis* es detenida en los primeros días de la interacción (Cavalcante *et al*., 2011).

En las plantas susceptibles, una vez establecido, *P. fijiensis* produce un elevado número de conidios (estructuras resultantes de la reproducción asexual) y ascosporas (estructuras que resultan de la reproducción sexual); ambos tipos de estructuras son infectivas en banano. Las ascosporas, confieren una alta variabilidad genética a *P. fijiensis* como producto de la recombinación entre las cepas parentales. Mientras que los conidios, mantienen alta fidelidad genética con las cepas a partir de las cuales se originaron. En la naturaleza, ambos tipos de reproducción se presentan en un solo ciclo infecto-reproductivo de *P. fijiensis*. Como resultado de esta forma de vida, la SN logra rápidamente predominar sobre otras enfermedades foliares del banano que son menos virulentas (Romero, 2003).

La dispersión de las ascosporas y conidios de *P. fijiensis* ocurre a través del agua y

del viento; los conidios son las estructuras que infectan a las plantas más cercanas al sitio de su producción; mientras que las ascosporas se dispersan a mayores distancias para propagar la infección a nuevas plantas (Meredith y Lawrence, 1969; Stover, 1980; Marín *et al*., 2003; Churchill, 2011).

Una vez que los conidios o ascosporas llegan a la hoja de la planta, y si las condiciones son favorables para el patógeno (elevada humedad y temperatura entre 25 y 29 °C); las estructuras germinan después de 4 a 6 días y los tubos germinativos penetran los estomas. Enseguida, se presenta un periodo de incubación que varía según las condiciones ambientales y generalmente en esta etapa no se distingue ningún síntoma de la enfermedad.

1.4.1 Origen y distribución

Los primeros registros que se tienen de la SN, se remontan a 1963, en las islas Fiji, ubicadas en el sudeste asiático (Manzo *et al*., 2005; Figura 1.2). En el Continente Americano, la SN se detectó por primera vez en Honduras en 1972 (Stover y Dickson, 1976), de ahí se diseminó a los países de América Central, México y parte de América del Sur (Stover, 1980; Fullerton y Stover, 1990). En México la enfermedad se identificó por primera vez en el sudeste del país en 1981, en las zonas bananeras de Chiapas y Tabasco (Contreras, 1983).

La enfermedad de la SN, en la actualidad se encuentra distribuida en todas las regiones productoras de banano (Arango *et al*., 2016; Alakonya *et al*., 2018).

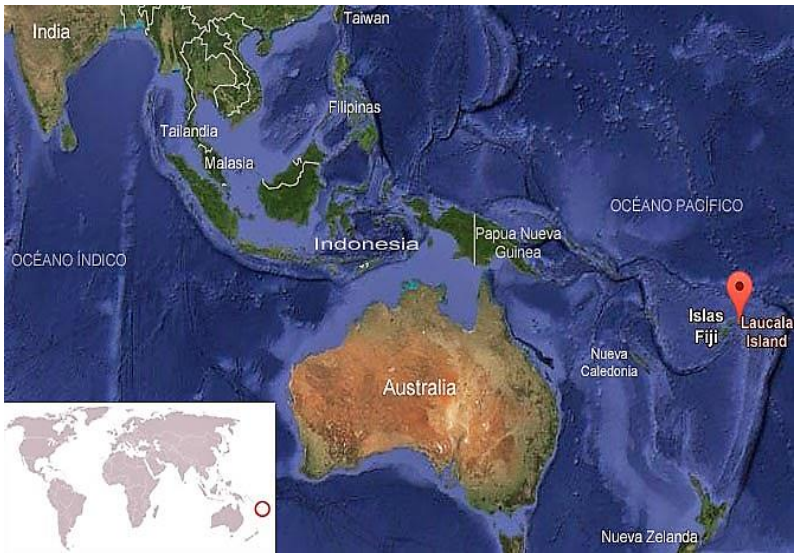


Figura 1.2 Islas Fiji. País insular de Oceanía localizado en el Océano Pacífico, donde posiblemente tuvo origen la enfermedad de la Sigatoka negra.

1.4.2 Ciclo de la enfermedad

El desarrollo de la enfermedad (SN) es favorecido por alta humedad, elevada precipitación, y temperaturas promedio de 20 °C; los periodos secos inhiben el crecimiento del hongo (Craenen, 1998). De acuerdo a Meredith y Lawrence (1969) y Fouré (1985) se han identificado seis estadios en la evolución de los síntomas de la enfermedad: uno de punto, dos de raya y tres de mancha (Figura 1.3).

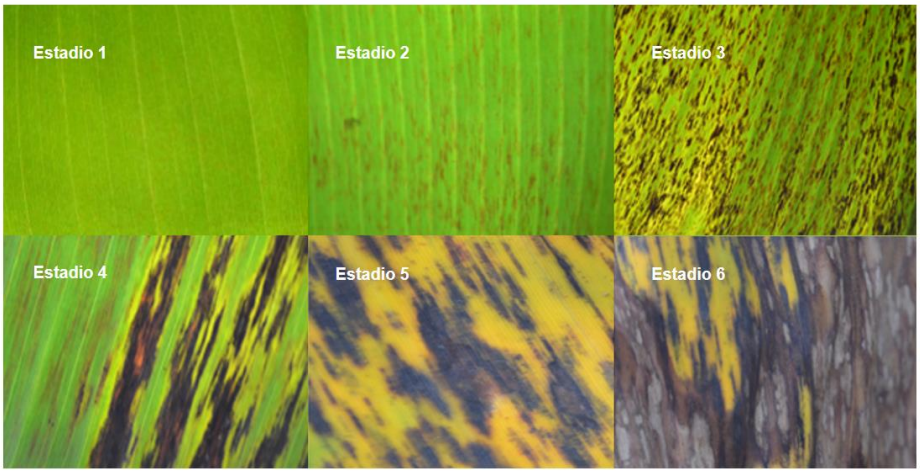


Figura 1. Ciclo de la enfermedad de la Sigatoka en hojas de banano (Modificado de Burgos-Canul, 2013).

Las características particulares que distinguen a los diferentes estadios de la SN son los descritos a continuación: Estadio 1. Pequeña decoloración de ~ 1 mm de largo, de color blanca o amarilla, visible únicamente en el envés de la hoja. Estadio 2. La decoloración se convierte en una estría de 2 a 3 mm de largo, de color rojizo, siendo visible, tanto en el haz como en el envés de la hoja. Estadio 3. La estría aumenta sus dimensiones, haciéndose más larga y más ancha. Es a partir de este estadio que aparecen los conidióforos, los cuales dan lugar a la producción de conidios. Estadio 4. La mancha ovalada toma una coloración marrón o café oscuro en el envés y negra en el haz de la hoja. Estadio 5. La mancha se torna totalmente negra y está rodeada por un halo amarillo; cuyo centro empieza a hundirse. Estadio 6. El centro de la mancha se seca, llega a ser blanco-grisáceo y claramente puede apreciarse la presencia de los peritecios (Bayer Crop Science, 2005).

1.4.3 Ciclo de vida de *P. fijiensis*

La duración del ciclo de vida del agente causal de la SN está influenciada por las condiciones climáticas, la susceptibilidad o resistencia del hospedero, la variabilidad del patógeno, los sistemas de explotación y el manejo de los cultivos. El ciclo de vida se inicia con la germinación de las esporas, las cuales después de liberarse y dispersarse por la acción del agua y el viento se depositan sobre las hojas libres de la enfermedad. Para que ocurran los procesos de germinación y penetración, es indispensable la presencia de agua libre sobre las hojas. Las esporas germinan en menos de dos horas, dando lugar a tubos germinativos rectos que se alargan y ramifican hacia los estomas por donde penetran en menos de una semana (Meredith y Lawrence, 1969).

Bajo condiciones óptimas, el período de incubación dura entre 17 y 29 días. Los primeros conidios se forman en las lesiones tipo estría. La culminación del ciclo de vida ocurre con la liberación de las primeras ascosporas, tal evento puede ocurrir entre los ~ 49 y ~ 64 días después de la infección en banano (Merchán, 2000). En la Figura 1.4, se representan las etapas del ciclo de vida de *P. fijiensis* (Bennett y

Arneson, 2003). En ausencia de alguna forma de control, el ciclo de vida del patógeno en cada hoja inicia desde el momento en el cual la ascospora o el conidio se deposita en las hojas del hospedero, se adhiere y emite sus estructuras de infección y reproducción. El periodo de vida de cada hoja puede variar entre dos y ochos meses, según su posición en la planta, la variedad, el clima y el estado de atención del cultivo; todo ello influencia la duración del ciclo infectivo de *P. fijiensis* en las áreas de producción de banano.

Las hojas solo pueden ser infectadas durante el tiempo que permanecen con fotosíntesis activa, pero la producción de esporas se puede prolongar durante varios meses en las hojas secas pero aún sin descomponer (Merchan, 2000).

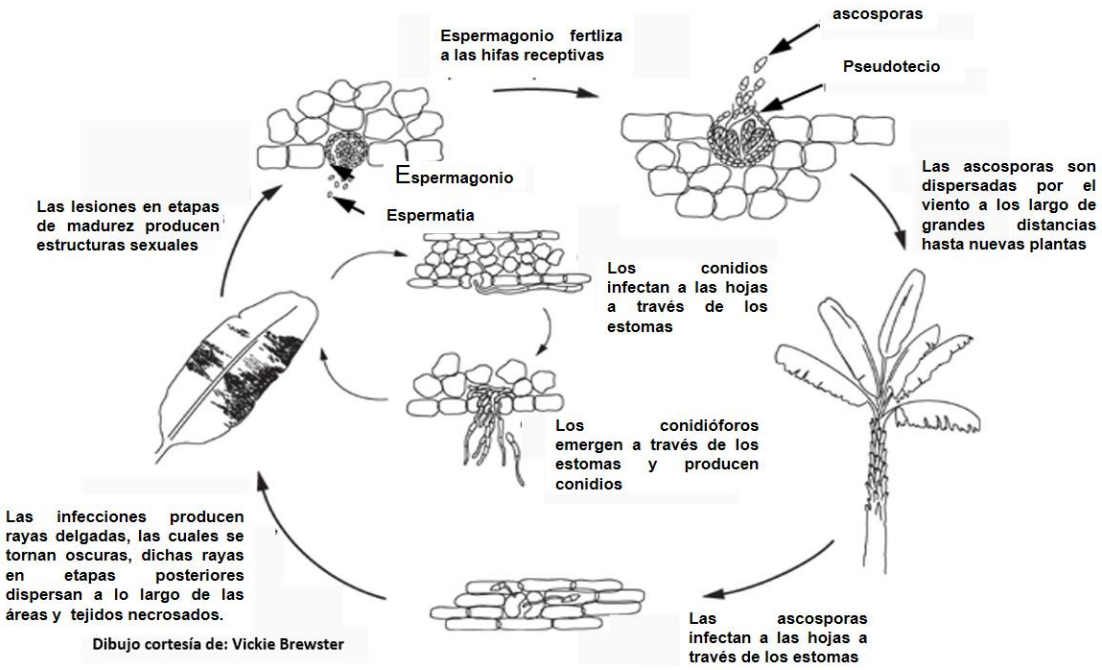


Figura 1. Ciclo de vida de *P. fijiensis*, (Modificada de Bennett y Arneson, 2003).

1.4.4 Estrategias de control

En la búsqueda de alternativas que permitan abatir la incidencia de la SN en las áreas de cultivo, se han utilizado los cultivares híbridos [FHIA 1 (AAA), FHIA 2

(AAAB)] (Vuylsteke *et al*., 1997), los cuales presentan alta resistencia a la infección por *P. fijiensis*. Desafortunadamente, el cultivo masivo de dicho híbrido ha sido descartado debido a que sus frutos han tenido poca aceptación en los mercados consumidores de banano (González *et al*., 1996).

Roux *et al*. (2004), consideraron el uso de variedades resistentes a la SN como una alternativa al manejo de la enfermedad, aunque los métodos de propagación convencionales limitaron el éxito de esta estrategia dado el resultado de la esterilidad y la poliploidía característica de los cultivos de banano.

Los escasos resultados en el control de *P. fijiensis* abrieron la posibilidad para la utilización de transgénicos, la gran mayoría sobreexpresando péptidos antimicrobianos contra hongos (Remy *et al*., 1998; Chakrabarti *et al*., 2003; Kosky *et al*., 2010; Vishnevetsky *et al*., 2011; Kovács *et al*., 2013; Sowmya *et al*., 2016). Vishnevetsky *et al*. (2011), obtuvieron líneas transgénicas de banano que sobreexpresaban péptidos antifúngicos y que durante cuatro años consecutivos en ensayos de campo mostraron una reducción en los síntomas de la SN, interesantemente, la calidad de los frutos no se vio afectada. Aunque alentadores, esos resultados no han sido concluyentes y por dicha razón, a nivel mundial el control de la SN continúa realizándose con base en fungicidas sintéticos.

Los programas de fumigación de las plantaciones de bananos, dependiendo de la región y condiciones climáticas deben ser aplicados en intervalos de 7 a 12 días; lo anterior resulta en 35-50 ciclos de aspersión de fungicidas por año. Sin embargo, el patógeno ha desarrollado resistencia y con ello, de forma indirecta, han aumentado los costos de control, el impacto negativo sobre el ambiente y ha acentuado la renuencia a consumir una fruta que cada vez contiene mayores niveles de plaguicidas (González *et al*., 1996; Patiño *et al*., 2007; Stergiopoulos *et al*., 2014; Arango *et al*., 2016; Friesen, 2016).

En México al menos el 60 % de los agroquímicos que se utilizan para el control de las plagas y enfermedades del banano, se destinan al control de la SN, esto hace

de esta enfermedad la principal preocupación de quien se dedica a la producción de esta fruta (http://www.campocolima.gob.mx/, 2012).

Debido al gran impacto ecológico-ambiental que han causado los plaguicidas, se busca disminuir el número de aplicaciones en las zonas de cultivo, es por ello que es deseable establecer las condiciones que permitan realizar un manejo integral de las plantaciones. Esto último probablemente solo se consiga cuando se integren los conocimientos obtenidos a partir de los diversos estudios de biología, ecología, genética y bioquímica que se han orientado a determinar las condiciones que favorecen o limitan la interacción de *P. fijiensis-Musa* sp (Muñoz, 2015).

1.5 Interacción Planta-Patógeno

Boyd *et al*. (2013) describieron que la interacción entre plantas y patógenos involucra al menos dos formas de asociación molecular. Inicialmente, las plantas deben ser capaces de reconocer y defenderse en contra de los potenciales patógenos que perciben. En el caso de los patógenos, estos deben de ser capaces de manipular la biología de la planta para crear un ambiente adecuado para su reproducción y crecimiento. Por lo tanto, plantas y patógenos a lo largo de la evolución han generado genes que facilitan la interacción. Boyd *et al*. (2013), estipularon que la primera línea de respuesta de defensa de las plantas, involucra la presencia en la planta de proteínas receptoras denominadas receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos receptores se encargan del reconocimiento del patógeno a través de los PAMPs. Una vez que ocurre la asociación PRR-PAMP, el hospedero inicia una respuesta general de defensa PTI (Figura 1.5). Se sabe que los patógenos son capaces de suprimir la PTI mediante el uso de proteínas efectoras, las cuales son secretadas hacia el interior o exterior de las células de las plantas. La segunda línea de respuesta de defensa de las plantas, involucra el reconocimiento de efectores (proteínas Avr) a través de genes de resistencia (genes R) localizados en el citosol de las células vegetales. Una vez que ocurre el reconocimiento del efector, las plantas disparan un mecanismo de

defensa más fuerte que puede incluir la muerte celular; esta estrategia se conoce como ETI (Figura 1.5).

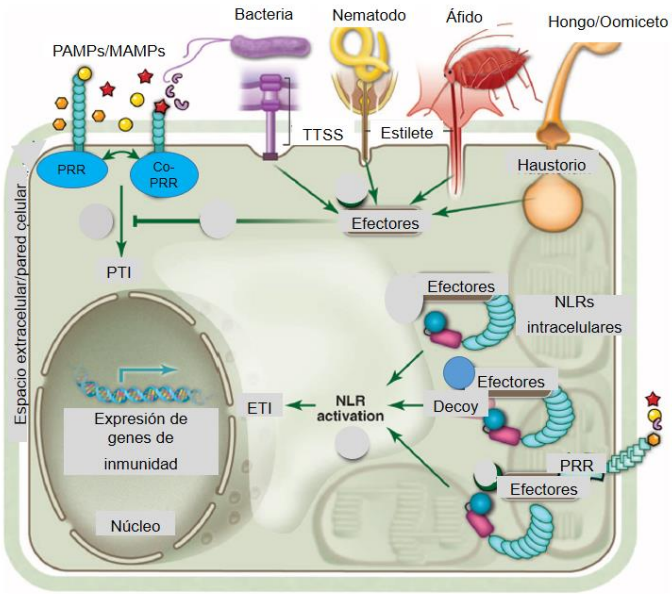


Figura 1. Sistema inmune vegetal, (Modificada de Dangl *et al*., 2013).

1.5.1 Efectores

Aunque las plantas carecen de un sistema inmune global, poseen un sistema inmune sofisticado, capaz de reconocer a todas las clases de patógenos (Toruño *et al*., 2016). La coevolución entre plantas y patógenos, ha culminado en grandes arsenales de receptores de la defensa innata. Esos receptores están codificados en el genoma vegetal. Su función consiste en percibir y reconocer estructuras conservadas en los patógenos y en consecuencia, evitar la colonización del patógeno mediante el despliegue de respuestas inmunes que involucran la secreción de proteínas de resistencia; fitoalexinas, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), ácido salicílico, etileno, entre otros (Boyd *et al*., 2013; Toruño *et al*., 2016). Por otra parte, con el propósito de conseguir la entrada al interior de la planta y colonizar los diversos tejidos, los patógenos han desarrollado estrategias que les permiten realizar el proceso de patogénesis, una de ellas, es la secreción de un grupo de proteínas conocidas como

efectores. Los efectores proteicos son secretados y su función es modular y contrarrestar el sistema inmune de la planta hospedera, para establecer las condiciones adecuadas para el desarrollo del ciclo de vida del patógeno (Toruño *et al*., 2016; Lo Presti y Kahmann, 2017). La acción biológica de los efectores secretados puede ocurrir en el apoplasto (efectores apoplásticos) o dentro del citoplasma (efectores citoplasmáticos) de las células del hospedero, desde donde también, pueden ser dirigidos a compartimentos celulares (Toruño *et al*., 2016).

1.5.1.1 Efector CfAvr4 de *Cladosporium fulvum*

La descripción inicial de un efector de los ascomicetos se realizó en *Cladosporium fulvum*, donde se detectó a CfAvr4 (Joosten *et al*., 1994, 1997; van den Burg *et al*., 2006). El efector CfAvr4, es una proteína de 135 aminoácidos (14.55 kDa), secretada por *C. fulvum* al apoplasto de tomate. CfAvr4 es procesada en sus extremos amino (N) y carboxilo (C) terminal por proteasas del mismo hongo y el hospedero, dando lugar a una proteína madura de 86 aminoácidos (9.56 kDa) con ocho residuos de cisteína (Joosten *et al*., 1994, 1997). Estos residuos de cisteína forman cuatro enlaces de disulfuro intramoleculares (Cys40-70, Cys50-56, Cys64-109 y Cys86-101); los cuales, con la excepción de Cys50-56, son requeridos para la estabilidad conformacional de CfAvr4 en el ambiente rico de proteasas del apoplasto de tomate (van den Burg *et al*., 2001, 2003). Basado en este patrón de enlaces disulfuro, así como de resonancia magnética nuclear (NMR), se determinó que CfAvr4 posee un dominio peritrophin-A (IPR002557/chitin-binding type 2 (ChtBD2; SM00494) de la familia 14 de unión a carbohidratos (CBM14) (van den Burg *et al*., 2003, 2004; Chang y Stergiopoulos, 2015). Como su nombre lo sugiere, este dominio se une a quitina (constituida por monómeros de N-acetilglucosamina unidos por enlaces β-1, 4), la cual es uno de los mayores componentes estructurales de las paredes celulares fúngicas; la quitina está ausente en las plantas y por lo tanto es blanco de las quitinasas vegetales como parte de la repuesta de defensa basal (Grover, 2012). En ensayos de precipitación por afinidad se confirmó que CfAvr4, específicamente se une a la quitina (van den Burg *et al*., 2003, 2006),

mientras que mediante acoplamiento de fluoróforos al CfAvr4 se encontró que durante la colonización del tomate susceptible, CfAvr4 se une a la pared celular de las hifas de *C. fulvum*, protegiéndola (van den Burg *et al*., 2006). Además, *in vitro* se demostró que CfAvr4, protege la pared celular de especies de hongos tales como: *Trichoderma viride*, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Plectosphaerella cucumerina*, en contra de la hidrólisis ejercida por quitinasas básicas de tomate (van den Burg *et al*., 2006; van Esse *et al*., 2007). Mesarich *et al*. (2016), a través de estudios moleculares y bioquímicos, determinaron que un residuo de prolina en la posición 87 de CfAvr4, es fundamental para inducir la respuesta hipersensible dependiente de la proteína de resistencia Cf-4.

1.5.1.2 Efector Pf-Avr4 de *Pseudocercospora fuligena*

Pseudocercospora fuligena, es un patógeno de tomate y causa la enfermedad conocida como “la mancha negra de la hoja”, es filogenéticamente cercano a *P. fijiensis*, ambos comparten el tipo de parasitismo hemibiotrófico y pertenecen a la clase de dotideomicetos. Kohler *et al*. (2016) durante el análisis del genoma de *P. fuligena*, identificaron una proteína con el 67 % de identidad con CfAvr4, a esta proteína se le denominó Pf-Avr4 (Kohler *et al*., 2016). Pf-Avr4 tiene una identidad de 78 % con PfAvr4. Pf-Avr4 es una proteína de 128 aminoácidos [13.62 kDa (inmadura); 11.35 kDa (madura)] con un péptido señal de 23 aminoácidos en el extremo N terminal. Además, tiene un dominio de unión a quitina localizado entre los aminoácidos 45 al 103 (Kohler *et al*., 2016). Mediante ensayos de precipitación *in vitro*, previamente se demostró la afinidad de CfAvr4 y la PfAvr4 de *P. fijiensis* para unirse con alta afinidad a quitina (van den Burg *et al*., 2006; Stergiopoulos *et al*., 2010); a través de estos ensayos, se logró determinar la afinidad de los Avr4 hacia la quitina, indicando que se une a la pared celular fúngica. Ensayos *in vitro* de protección de la pared celular contra la hidrólisis ejercida por quitinasas de plantas de *Solanum lycopersicum* o bacterianas (*Streptomyces griseus*) sobre *T. viride*,

confirmaron que la Pf-Avr4 de *P. fuligena* blinda la pared celular fúngica contra la acción de dichas enzimas (Kohler *et al*., 2016).

Pf-Avr4 de *P. fuligena* fue el primer efector ortólogo de CfAvr4 en ser caracterizado estructuralmente por medio de cristalografía; previamente solo CfAvr4 había sido parcialmente caracterizado utilizando resonancia magnética nuclear, pero dicha estructura no fue resuelta completamente (van den Burg *et al*., 2004). La estructura cristalina de Pf-Avr4 abarca de los residuos 31 al 105, pues los residuos restantes del N y C terminal exhibieron un alto grado de desorden, y por lo tanto no fueron incluidos en el modelo final (Kohler *et al*., 2016). Pf-Avr4 es una proteína globular compuesta de una α hélice N terminal seguida por un plegamiento β sándwich, lo cual es común entre los dominios de unión a quitina (Boraston *et al*., 2004). Dicho dominio, está constituido por una hoja β central, compuesta de tres hebras β antiparalelas y una hoja β en el C terminal, comprendida de dos hebras β antiparalelas (Kohler *et al*., 2016). Aproximadamente 30 % de la secuencia de Pf-Avr4 está organizada en α y β estructuras, el 70 % restante forma estructuras tipo bucles. Una vez obtenida la estructura cristalográfica y los resultados de los ensayos de precipitación, se realizaron experimentos de infiltración con Pf-Avr4 recombinante. Se observó que en plantas Moneymaker +Cf-4 (plantas con el cognado de resistencia) Pf-Avr4 generó respuesta de hipersensibilidad, mientras que infiltraciones realizadas en plantas –Cf-4 (plantas sin el cognado de resistencia), no hubo respuesta de hipersensibilidad. Esto permitió concluir que el factor de avirulencia Pf-Avr4 es un ortólogo funcional del CfAvr4 y del PfAvr4 de *P. fijiensis*.

1.5.1.3 Efector PfAvr4 de *Pseudocercospora fijiensis*

Stergiopoulos *et al*. (2010), mediante BlastP y herramientas bioinformáticas analizaron los genomas de los dotideomicetos: *P. fijiensis*, *P. graminicola*, *Stagonospora nodorum*, *Pyrenophora tritici-repentis*, y *Alternaria brassicicola* en la búsqueda de efectores ortólogos de CfAvr4. Las secuencias obtenidas con valores E de corte $1e^{-4}$ fueron analizadas. En el genoma de *P. fijiensis* se encontró una

proteína ortóloga identificada como Mycfi 1: 87167. Esta proteína se renombró como PfAvr4, su análisis estructural y de secuencia de aminoácidos mostró que PfAvr4 tiene un 42 % de identidad con CfAvr4. Además, PfAvr4 es una proteína de 121 aminoácidos [13.03 kDa (inmadura); 10.80 kDa (madura)], posee un péptido señal de 21 aminoácidos en su extremo N terminal y también tiene un dominio de unión a quitina Peritrophin-A (InterPro ID: IPR002557). La comparación entre los dominios de unión a quitina de CfAvr4 y PfAvr4 reveló una alta identidad. El efector PfAvr4 posee diez residuos de cisteína, ocho de ellos tienen una posición idéntica a la observada en CfAvr4, lo que sugiere un patrón de enlaces disulfuro similar y homología estructural entre ambas proteínas (van den Burg *et al*., 2004). Los otros dos residuos de cisteínas en el C terminal de PfAvr4, pueden estar involucrados en la formación de un enlace disulfuro adicional (Stergiopoulos *et al*., 2010).

1.6 Proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

La producción de proteínas recombinantes ha revolucionado el avance en los estudios bioquímicos. A diario, grupos de investigación desarrollan proyectos en los cuales se necesita obtener o aumentar la cantidad de cierta proteína (enzimas, anticuerpos, hormonas, etc.), para su análisis. Los días en los que se necesitaba colectar kilogramos de tejido animal o vegetal para la purificación de pequeñas cantidades de la proteína de interés han quedado atrás con la aplicación de la tecnología del ADN recombinante (Rosano y Ceccarelli, 2014).

La expresión y purificación de proteínas, son actividades centrales en la bioquímica. Las proteínas recombinantes pueden ser expresadas usando sistemas procariotas (*Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*), sistemas eucariotas (levadura, células de insectos y células de mamíferos) o sistemas *in vitro* (Jia y Ok, 2016). En el presente trabajo se utilizó a *E. coli* como sistema de producción de la proteína recombinante PfAvr4 dado que es un microorganismo de manipulación sencilla, de crecimiento rápido y además de que su medio de crecimiento no es tan caro en comparación al de otro tipo de células. Tripathi (2016), describió que *E. coli* se ha utilizado para la

producción de farmacéuticos, nutracéuticos, proteínas terapéuticas, intermediarios para el diagnóstico, vacunas, anticuerpos, enzimas y proteínas complejas, todos ellos de alto valor comercial. En *E. coli*, proteínas heterólogas pueden ser producidas en una cantidad que va del 5 al 50 % de la proteína celular total.

En este trabajo, se utilizó la cepa de expresión *E. coli* Rosetta Gami B para expresar a la proteína efectora PfAvr4 de *P. fijiensis* dado que en el hongo es poco abundante y no necesariamente de expresión constitutiva. *E. coli* Rosetta Gami B, es una cepa que combina las características de *E. coli* BL21, Origami y Rosetta para mejorar la expresión de proteínas eucariotas, así como la formación de los enlaces disulfuro de la proteína de interés (característica de PfAvr4) en el citoplasma de la bacteria.

OBJETIVO GENERAL

Expresar en *Escherichia coli* a la proteína PfAvr4 de *Pseudocercospora fijiensis* y analizar el efecto de la proteína recombinante en plantas de banano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar secuencias de ADN y aminoácidos de PfAvr4 para su expresión heteróloga en *Escherichia coli*.
2. Expresar y purificar *in vitro* a la proteína PfAvr4 recombinante.
3. Analizar el efecto de la proteína PfAvr4 en plantas de banano susceptibles y resistentes a la Sigatoka negra.

JUSTIFICACIÓN

La expresión heteróloga de PfAvr4 en *Pichia pastoris* se ha descrito previamente; sin embargo, la proteína recombinante o las construcciones moleculares a partir de donde se expresó no necesariamente están accesibles al público. Con el extracto de PfAvr4 recombinante concentrado, se han realizado ensayos para medir su afinidad por quitina y otros oligosacáridos. También, se han realizado ensayos en los que se ha encontrado que en plantas que sobreexpresan el cognado de resistencia, cuando se infiltran con extracto concentrado de PfAvr4 recombinante, estas son capaces de generar una respuesta hipersensible (HR). Sin embargo, debido a la falta de evidencia que sostenga que la infiltración se realizó con PfAvr4 recombinante puro, no se descarta que dicha respuesta sea ocasionada por otros péptidos coexistentes en el extracto. Dado que, no se ha reportado si PfAvr4 recombinante purificada a partir de *E. coli*, es capaz de generar una HR en plantas de banano, entonces en este trabajo se expresó en *E. coli* a PfAvr4 y se purificó mediante cromatografía de afinidad y electroelución. La proteína se utilizó para evaluar la respuesta de defensa de plantas de banano resistentes y susceptibles a la SN. Esto con el objetivo de determinar si la actividad biológica hace de esta proteína un buen candidato para la generación posterior de herramientas bioquímicas que permitan profundizar en el conocimiento de la interacción *P. fijiensis*-*Musa* sp.

HIPÓTESIS

Si la proteína efectora PfAvr4 expresada en *Escherichia coli* en sus formas madura e inmadura, es funcional, entonces será capaz de generar la respuesta hipersensible en plantas de banano resistentes a la Sigatoka negra.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

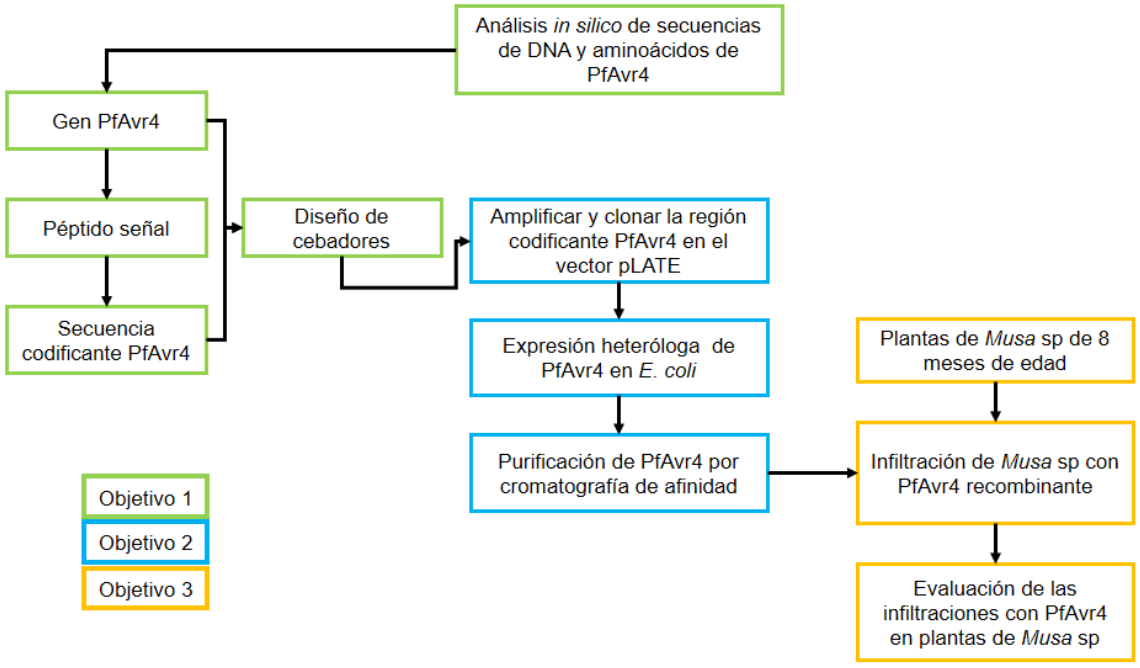


Figura 1. Diagrama experimental. Se ilustran los pasos que se siguieron en este trabajo de investigación.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Secuencias de PfAvr4

Para la realización del presente trabajo, el grupo de investigación de la Dra. Blondy Canto Canché, proporcionó dos clonas en el vector p-GEM T-Easy, las cuales contienen las secuencias de nucleótidos (ORF) PfAvr4 denominadas p-GEM T-Easy-08 (>151116-26_C07-AVO8_T7.ab1) y p-GEM T-Easy-B2 (>151116-26_M05-AV4B2_T7.ab1), respectivamente (Figura 2.1). El tamaño de los amplicones es de 384 pb y su identidad fue confirmada previamente por secuenciación de los plásmidos recombinantes.

>151116-26_M05_AV4B2_T7.ab1
ATGCTTTCAACTACGAGAATAACACTGCTCGCCACATTCGCCCTAGCCACGACTTCCTAT
GCTGGAACGATGCAGGTGCGAGACACTGCGCCAGCCTTCGTATGCCCGTCCGCAGATATC
ACGGCGACGAAATGCTTGGGACCGAAAGATTGCCTATACCCGAACCCGAAGACATGCAAT
GGATACATTCAATGCTCGCCAGCGGACGCTTCTTATACGACGGGAATCGTCCACGAGATG
CCATGTCCCAGCGGCCTCCAGTGGAATGACAATCAGAAGTGGTGTGATTGGCCTGAGAAC
TCGACTTGTGGGAACACGGGCGGTACGATCTATCGATGCGACGAAACAGGATGCGACAAC
GTGCATCACCATCACCACCACTAA

>151116-26_C07_AVO8_T7.ab1
ATGCTTTCAACTACGAGAATAACACTGCTCGCCACATTCGCCCTAGCCACGACTTCCTAT
GCTGGAACGATTCAGGTGCGAGACACTGCGCCAGCCTTCGTATGCCCGTCCGCAGATATC
ACGGCGACGAAATGCTTGGGACCGAAAGATTGCCTATACCCGAACCCGAAGACATGCAAT
GGATACATTCAATGCTCGCCAGCGGACGCTTCGTATACGACGGGAATCGTCCACGAGATG
CCATGTCCCAGCGGTCTCCAGTGGAATGACAATCAGAAGTGGTGTGATTGGCCTGAGAAC
TCGACTTGTGGGAACACGGGCGGTACGATCTATCGATGCGACGAAACAGGATGCGACAAC
GTGCATCACCATCACCACCACTAA

Figura 2.1 Secuencias de nucleótidos de los CDSs >151116-26_M05-AV4B2_T7.ab1 y >151116-26_C07-AVO8_T7.ab1. El codón en verde representa la metionina del inicio de la traducción; en azul se señala la secuencia de nucleótidos codificante para la etiqueta de histidinas; en amarillo, el codón de paro de la traducción.

Las secuencias de aminoácidos de los clones PfAvr4 de *P. fijiensis*, fueron deducidas a partir de los clones previamente proporcionados por el grupo de investigación de la Dra. Blondy Canto Canche (Figura 2.2).

>151116-26_M05_AV4B2_T7.ab1

MLSTTRITLLATFALATTSYAGTMQVRDTAPAFVCPSADITATKCLGPKDCLYPNPKTCNGYIQCSPADASYT
TGIVHEMPCPSGLQWNDNQKWCDWPENSTCGNTGGTIYRCDETGCDNV

Aminoacids= 121

>151116-26_C07_AVO8_T7.ab1

MLSTTRITLLATFALATTSYAGTIQVRDTAPAFVCPSADITATKCLGPKDCLYPNPKTCNGYIQCSPADASYT
TGIVHEMPCPSGLQWNDNQKWCDWPENSTCGNTGGTIYRCDETGCDNV

Aminoacids= 121

Figura 2.2 Secuencias de aminoácidos deducidas *in silico* a partir de los CDSs de >151116-26_M05-AV4B2_T7.ab1 y >151116-26_C07-AVO8_T7.ab1

2.2 Identificación *in silico* del péptido señal

Para identificar la presencia del péptido señal y el sitio de corte putativo en PfAvr4, la secuencia de aminoácidos se introdujo a la base de datos del servidor SignalP 4.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), y se analizó con los parámetros estándar del servidor.

2.3 Análisis de dominios en PfAvr4

La búsqueda de dominios funcionales en PfAvr4 se realizó a través del sitio InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/). Para ello, la secuencia de aminoácidos de PfAvr4 se cargó en la base de datos de dicho programa y se analizó con los parámetros estándar del servidor.

2.4 Identificación *in silico* de putativas modificaciones post-traduccionales en PfAvr4

Dado que hasta antes de este trabajo no se había determinado si PfAvr4 presenta modificaciones post-traduccionales, la secuencia de aminoácidos de PfAvr4 se analizó para sitios potenciales de modificaciones post-traduccionales en el programa PSITE de softberry (http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=index&group=programs&subgroup=pr

oloc). Los valores de los parámetros de análisis fueron los preestablecidos por el servidor.

2.5 Generación de estructuras tridimensionales de PfAvr4 de *P. fijiensis* y ortólogos funcionales (CfAvr4 de *C. fulvum* y Pf-Avr4 de *P. fuligena*) en PyMOL

La estructura terciaria putativa de PfAvr4 se obtuvo a partir del servidor I-TASSER (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/). Dicha predicción requirió la secuencia primaria de aminoácidos de PfAvr4. El archivo resultante (estructura terciaria de PfAvr4) del análisis I-TASSER, se visualizó en el programa PyMOL. Con las herramientas de análisis de este programa, se marcó la región del péptido señal, módulo de unión a quitina y los sitios putativos de modificaciones post-traduccionales. Junto con PfAvr4, se analizó *in silico* la estructura de CfAvr4, el procedimiento seguido fue el mismo que para PfAvr4. En el caso de Pf-Avr4 de *P. fuligena*, la estructura con el número de accesión 4Z4A fue descargada en la base de datos del PDB (Protein Data Bank) y la estructura tridimensional fue visualizada en el programa PyMOL.

2.6 Análisis de estructuras tridimensionales sobrelapadas de PfAvr4 de *P. fijiensis* vs CfAvr4 de *C. fulvum* y Pf-Avr4 de *P. fuligena*

Las herramientas de alineamiento de estructuras del programa PyMOL, se utilizaron para realizar las comparaciones entre las estructuras tridimensionales de las tres proteínas (PfAvr4, CfAvr4 y Pf-Avr4). Los alineamientos se hicieron con los archivos obtenidos de la plataforma I-TASSER en el caso de PfAvr4 y CfAvr4 y con la estructura obtenida del PDB para Pf-Avr4.

2.7 Diseño de oligonucleótidos de ADN

Los oligonucleótidos utilizados en este proyecto (Cuadro 2.1) se diseñaron con el programa OligoAnalyzer 3.1 (https://www.idtADN.com/calc/analyzer), de tal forma que permitieron la amplificación del CDS del clon PfAvr4 B2. Además, se diseñaron y se sintetizaron oligonucleótidos para secuenciar al plásmido pLATE (Thermo Scientific). También se diseñaron los oligonucleótidos adaptadores para la

clonación en el vector pLATE. Por otra parte, una vez que se determinó la longitud del péptido señal de PfAvr4, se sintetizaron oligonucleótidos que amplifican PfAvr4 sin la región codificante del péptido señal (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Oligonucleótidos utilizados en el desarrollo de este trabajo. En azul, la secuencia de nucleótidos complementarias al sitio de clonación del plásmido de expresión pLATE; en negro, la secuencia de nucleótidos complementaria al CDS de PfAvr4.

Cebadores			
FcAvr4	ATGCTTTCAACTACGAG AATAACACTGCTCG	**Fc52Avr4**	GGTTGGGAATTGCAAATGCTTTCA ACTACGAGAATAACACTGCTCG
FpAvr4	GGAACGATGCAGGTGC GAGAC	**Fp52Avr4**	GGTTGGGAATTGCAAGGAACGATG CAGGTGCGAGAC
RcAvr4	TTACACGTTGTCGCATC CTGTTTCGTC	**Rc52Avr4**	GGAGATGGGAAGTCATTATTACAC GTTGTCGCATCCTGTTTCGTC

2.8 Amplificación de PfAvr4 de *P. fijiensis* mediante PCR

La amplificación del ADNc de PfAvr4 se realizó a partir del plásmido p-GEM T-Easy-B2 (Figura 3.10). Se utilizó la polimerasa “Dream Taq PCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific) y los oligonucleótidos FcAvr4 y RcAvr4 descritos en el cuadro 2.1. Las condiciones del termociclador se describen en el cuadro 2.2.

Cuadro .2 Condiciones para los ciclos de PCR.

Paso	Temperatura, ° C	Time	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 minutos	1
Desnaturalización	95	30 s	30
Alineamiento	60.1	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1

2.9 Purificación del producto de PCR (PfAvr4) con el tamaño esperado

La purificación de los productos obtenidos mediante la PCR de punto final y los oligonucleótidos específicos de PfAvr4, se realizó con el paquete comercial "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Brevemente, después de la separación por electroforesis en un gel de 1 % de agarosa de los productos de PCR, se localizó la banda de ADN que tuvo el tamaño esperado. Dicha banda se escindió del gel, se colocaron en un tubo Eppendorf de 2 mL, se adicionaron con tres volúmenes del amortiguador QG (amortiguador proporcionado en el paquete comercial) y se incubaron a 50 °C por 10 minutos o hasta que se disolvió el gel. La disolución se agregó con un volumen de isopropanol y se mezcló. La mezcla se colocó en la columna QIAquick spin y se centrifugó por 1 minuto hasta que la muestra permeó a través de la columna, se descartó el filtrado y a la columna se le agregaron 500 µL de amortiguador QG; la columna se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto. La columna se agregó con 750 µL de amortiguador PE (amortiguador proporcionado en el paquete comercial) y se centrifugaron otra vez a 13,000 rpm por 1 minuto. El ADN correspondiente a PfAvr4 se eluyó de la columna agregando 50 µL de amortiguador EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) y centrifugando a 13,000 rpm por 1 minuto.

2.10 Generación del vector p-GEM T- Easy-PfAvr4

El producto PfAvr4 purificado se ligó en el vector pGEM T-Easy siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en un tubo Eppendorf estéril se agregaron 5 µL del amortiguador de ligación 2X y µL de ADN ligasa T4; 1 µL del vector pGEM-T Easy (50 ng); 2 µL del producto purificado y agua libre de nucleasas. El volumen final de la mezcla fue de 10 µL y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.11 Transformación de *Escherichia coli* DH5α

Dos microlitros del plásmido recombinante p-GEM T-Easy-PfAvr4 se adicionaron a la cepa competente de *Escherichia coli* DH5α, la mezcla se incubó por 30 minutos en hielo y enseguida se colocaron a 42 °C por 50 segundos, una alícuota de las células se adicionaron a 0.9 mL de medio de cultivo SOC (2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de $MgCl_2$, 10 mM de $MgSO_4$ y 20 mM de glucosa). El tubo conteniendo las células transformadas, se colocó a 37 °C por 2 horas, enseguida una alícuota de 100 µL se transfirió y plaqueó en cajas Petri conteniendo 100 µg/µL de ampicilina. Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche y las colonias resultantes se analizaron por color y PCR para detectar a las células recombinantes que contenían al inserto de interés.

2.12 Purificación de plásmidos por Miniprep

Las colonias DH5α recombinantes, se colocaron en medio LB líquido conteniendo (agua, triptona, extracto de levadura y NaCl) y 100 µg/mL de ampicilina. La recuperación de los plásmidos a partir de las cepas de *E. coli* recombinantes se realizó mediante el sistema comercial “QIAprep Miniprep” (QIAGEN), siguiendo las indicaciones de los proveedores. La metodología se basa en la aplicación del principio de lisis alcalina a través de una serie de amortiguadores proporcionados en el paquete comercial, además de la utilización de las columnas que coadyuvan en la purificación de los plásmidos recombinantes.

2.13 Amplificación de PfAvr4 de *P. fijiensis* con los oligonucleótidos complementarios LIC y ligación al vector de expresión pLATE

El ADNc de PfAvr4 se amplificó a partir del plásmido recombinante (pGEM T-Easy-PfAvr4) con los cebadores diseñados para el marco de lectura abierto de PfAvr4, pero que además integran las secuencias complementarias al plásmido pLATE (Fc52Avr4, Fp52Avr4 y Rc52Avr4; cuadro 2.1). La ligación de los productos de PCR se realizó siguiendo el protocolo descrito en el manual del paquete comercial "aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System" (Thermo Scientific). Brevemente, la mezcla de la ligación de PfAvr4 en el plásmido pLATE, contenía amortiguador LIC 5X, el PfAvr4 purificado a partir de la PCR, agua libre de nucleasas y la ADN polimerasa T4 (1 U.µL), todo en un volumen final de 10 µL. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Enseguida, la mezcla, se agregó con 1 µL (60 ng= 0.02 pmol ADN) del plásmido pLATE. Estas ligaciones dieron origen a los plásmidos recombinantes pLATE-PfAvr4-I el cual incluye la secuencia codificante para PfAvr4 inmadura (PfAvr4 con péptido señal) y el pLATE-PfAvr4-M (PfAvr4 sin péptido señal) que corresponde a PfAvr4 madura.

2.14 Secuenciación de los plásmidos recombinantes pLATE-PfAvr4-I y pLATE-PfAvr4-M

Una vez ligadas las secuencias codificantes para PfAvr4-M (pLATE-PfAvr4-M) o PfAvr4-I (pLATE-PfAvr4-I) en el vector de expresión pLATE, los plásmidos resultantes se secuenciaron para confirmar que los CDSs estaban en el marco de lectura correcto (Figuras 3.13 y 3.15). La secuenciación de nucleótidos se realizó en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPYCIT).

2.15 Digestiones de los vectores pLATE-PfAvr4-I y pLATE-PfAvr4-M para confirmar la liberación de los insertos de interés

El resultado de la secuenciación de los plásmidos pLATE-PfAvr4-M y pLATE-PfAvr4-I permitió identificar a las clonas cuya secuencia era 100 % homóloga a la secuencia de PfAvr4 depositada en la base de datos del Joint Genome Institute (JGI; Ver Figuras 3.13, 3.14, 3.15 y 3.16). Las clonas 1 y 4 conteniendo los CDSs

de PfAvr4-M y PfAvr4-I, fueron las que se utilizaron para realizar la digestión mediante las enzimas Stu I y Xba I. La digestión se realizó sobre 0.5 µg de ADN plasmídico, adicionado con 2 µL del amortiguador 10 X rojo anza (Thermo Fisher Scientific), y 1 µl de cada enzima de restricción. La mezcla se ajustó a un volumen final de 20 µL con H_2O libre de nucleasas y se incubó a 37 ° C toda la noche. El resultado de la restricción se analizó en un gel de 1.5 % de agarosa.

2.16 Transformación de *Escherichia coli* cepa Rosetta gami B con el vector pLATE recombinante

Una vez obtenidos los vectores recombinantes pLATE-PfAvr4-M o pLATE-PfAvr4-I y confirmada la correcta orientación y secuencia de los CDSs, entonces con dichos vectores se transformó la cepa *E. coli* Rosetta Gami B (Figura 3.18). Esta cepa contiene los elementos regulatorios que codifican para la ARN polimerasa T7, misma que está bajo el control transcripcional del promotor lacUV5, el cual es inducido por IPTG. La transformación de *E. coli*, se realizó utilizando el tratamiento de choque térmico siguiendo el protocolo descrito en “Molecular Cloning a Laboratory Manual” (véase 2.11).

2.17 Inducción de la expresión de PfAvr4 (Madura e inmadura)

Una vez comprobada la transformación de las cepas de expresión de *E. coli* mediante PCR de colonia (Las PCRs de colonias, se realizaron con las condiciones descritas en el cuadro 2.2), entonces se indujo la expresión de PfAvr4, para ello, se agregó IPTG (1 mM) al medio de cultivo LB/ampicilina/kanamicina/cloranfenicol (100 µg.mL; 15 µg.mL; 35 µg.mL) para *E. coli* Rosetta Gami B, cuando se alcanzó una densidad óptica de entre 0.5 a 0.8 unidades de absorbancia (U. A) a 600 nm, entonces los cultivos se incubaron a ~ 15 °C en agitación a 120 rpm/min por 16 horas. La expresión de PfAvr4 se indujo con IPTG debido a que el plásmido pLATE, cuenta con un promotor que solo puede ser transcrito por una ARN polimerasa T7, la cual se encuentra codificada en el genoma de la cepa *E. coli* Rosetta-gami B utilizada en este estudio.

2.18 Purificación de PfAvr4 mediante cromatografía de afinidad

La purificación de PfAvr4 recombinante a partir de la fracción soluble de la bacteria se realizó mediante cromatografía de afinidad, utilizando la resina "ProBond™" INVITROGEN. Después de transcurrido el tiempo de inducción (ver 2.17), el medio de cultivo se centrifugó a 6,000 rpm por 10 minutos a 4 ° C. Las pastillas de bacterias precipitadas se resuspendieron en amortiguador STET (8 % sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA y 0.1 % de Tritón X 100, 1 mM de PMSF). Las pastillas de bacteria se lisaron mediante 7 pulsos de sonicación (0.08 Hertz). El lisado se centrifugó a 10,000 rpm por 30 minutos a 4 ° C, el sobrenadante se filtró en membranas Millex-GS de 0.45 µm (MF-Millipore™ membrane). El filtrado se aplicó a la columna de níquel (resina ProBond) equilibrada previamente con el amortiguador 1 (50 mM Tris-HCl pH 7.5 y 350 mM NaCl). La columna se lavó con el amortiguador 1 (ver cuadro 2.3), y los siguientes lavados se hicieron con el amortiguador 1 adicionado con concentraciones crecientes de imidazol (Sigma) (10, 50 y 200 mM), finalmente, la proteína se eluyó de la resina con 250 mM de imidazol.

Cuadro 2. Diferentes etapas de la elución de la proteína recombinante a partir de la columna Probond. Filtrado, lavado y eluciones realizadas durante la purificación de PfAvr4 (madura e inmadura).

Filtrado: Sobrenadante del amortiguador STET.	**Lavado 4 (L3):** Amortiguador 1 + 200 mM imidazol.
Lavado 1 (L): Amortiguador 1.	**Elución 1 (L4):** Amortiguador 1 + 250 mM imidazol.
Lavado 2 (L1): Amortiguador 1 + 10 mM imidazol.	
Lavado 3 (L2): Amortiguador 1 + 50 mM imidazol.	

2.19 Geles de 12 % SDS-PAGE

El análisis de la expresión de PfAvr4 en la cepa Rosetta-gami B, se realizó cargando 40 µL del extracto proteico soluble de Rosetta-gami B en geles de 12 % SDS-PAGE (Figuras 3.19 y 3.20). El perfil de polipéptidos se obtuvo fraccionando las proteínas

por electroforesis a 100 volts. Las proteínas estándares de peso molecular fueron las Prestained SDS-PAGE Standars, broad range (BIO-RAD).

2.20 Secuenciación de aminoácidos de PfAvr4 recombinante

Las bandas de los polipéptidos con los pesos putativos esperados para PfAvr4-M (14 kDa) y PfAvr4-I (16.3 kDa), fueron escindidas de los geles de 12 % SDS-PAGE e individualmente secuenciadas en el Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT/UNAM). Los péptidos resultantes fueron comparados con la base de proteínas de *P. fijiensis* depositadas en el Joint Genome Institute (JGI) para confirmar la identidad de la proteína recombinante.

2.21 Electroelución de PfAvr4 madura e inmadura

La electroelución de PfAvr4-I o PfAvr4-M, se realizó a partir de fragmentos de gel de 12 % SDS-PAGE, los cuales fueron escindidos según el peso molecular putativo para cada proteína recombinante PfAvr4-M (~13.83 kDa) y PfAvr4-I (~16.06 kDa). Por separado, los fragmentos de gel se colocaron en membranas de diálisis con tamaño de corte de 3.5 kDa (Spectra/Por). La electroelución se realizó a 50 V por 36 horas en un amortiguador compuesto de Tris-base 12.5 mM, glicina 96 mM y SDS 0.05 % (Figura 3.23).

2.22 Ensayos de infiltración con PfAvr4-M o PfAvr4-I en plantas de banano resistentes y susceptibles a *P. fijiensis*.

Los ensayos de infiltración *in planta*, se realizaron con 150 y 300 ng de las proteínas PfAvr4-M o PfAvr4-I, electroeluidas. Las hojas de banano resistente (Calcuta IV) y susceptibles (Enano gigante) utilizadas en los ensayos se dividieron en cuatro cuadrantes sobre la zona adaxial, posteriormente en cada cuadrante, con un bisturí estéril se hicieron incisiones y sobre ellas se colocaron las muestras y concentraciones en un volumen final de 40 µL (Figura 2.3). Además de la infiltración de las proteínas electroeluidas, se infiltró A) quitosano (Sigma) en una concentración de 0.15 %, B) 10 µg de proteasa pronasa E (Sigma), C) amortiguador

de resuspensión de proteínas, D) agua-Ditiotreitol y E) un corte sin infiltrar (Control negativo). Las áreas necróticas se midieron cada 24 horas por un período de 96 horas. Los resultados se registraron con fotografías tomadas con una cámara Nikon, con un lente de 50 mm. Las imágenes se usaron para determinar las áreas necróticas por medio del programa Image J (https://imagej.nih.gov/ij/), utilizando los parámetros predeterminados en el programa para determinación de áreas.

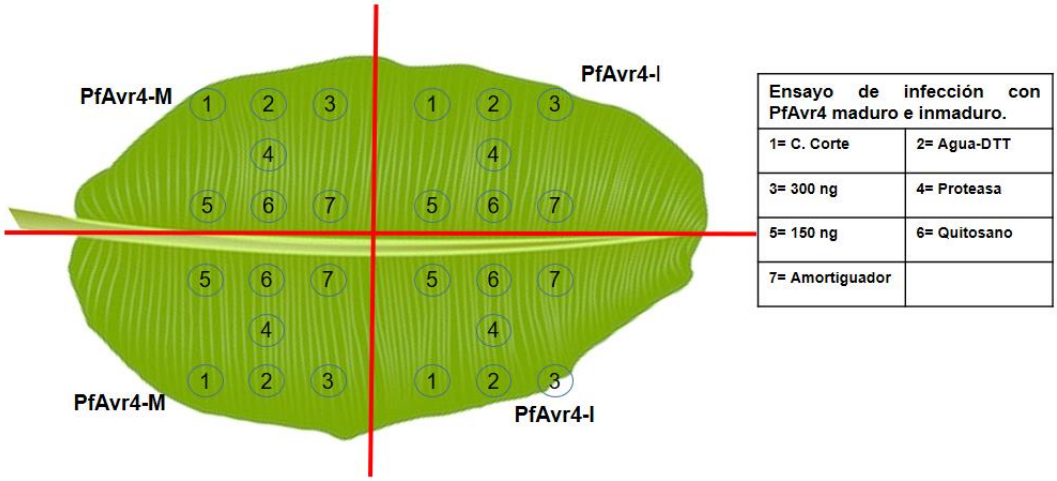


Figura 2.3 Esquematización del diseño del experimento de infiltración en las hojas de banano susceptibles y resistentes a *P. fijiensis*. La zona adaxial se dividió en cuatro cuadrantes. Del lado derecho, las muestras y su distribución en cada cuadrante.

2.23 Ensayos de reducción y alquilación en un posible dímero de PfAvr4-M

Una banda de proteína con un peso molecular de ~ 28 kDa, presuntamente correspondiente a un oligómero de PfAvr4-M se escindió de los geles SDS-PAGE, y fue sometida a reducción y alquilación (Figura 3.24). Brevemente las bandas de gel se colocaron en tubos eppendorf, se les adicionaron 130 µL del amortiguador de desnaturalización (Urea 8 M en 10 mM de HEPES pH 8) y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente. Enseguida se les agregaron ditiotreitol (DTT) 10 mM y se incubó a temperatura ambiente por 3 horas. Las muestras se adicionaron con iodocetamida 5.5 mM, se homogenizó y la mezcla se incubó 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 10 mM de DTT.

2.24 Cuantificación de las proteínas PfAvr4-M y PfAvr4-I siguiendo el método de Peterson

Se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de proteína (1 a 100 µg de albúmina sérica bovina, fracción V, Sigma). En tubos de ensayo se colocaron 80 µL de la proteína cuya concentración se desea conocer (PfAvr4-M y PfAvr4-I), el volumen de todos los tubos se completó con agua destilada a 1000 µL, a cada uno de los tubos se les adicionaron 100 µL de 0.15 % de desoxicolato de sodio; los tubos se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Concluida la incubación a cada uno de los tubos se les adicionaron 100 µL de ácido tricloroacético al 72 %, frío. Los tubos se incubaron en hielo por 20 minutos y se centrifugaron a 3500 rpm durante 30 minutos. El precipitado de cada uno de los tubos se resuspendió en 1 mL de agua destilada, a la resuspensión se le añadió 1 mL de la solución A: en partes iguales de CTC (0.1 % $CuSO_4.5H_2O$, 0.2 % $KNaC_4H_4O_2$ y 10 % de Na_2CO_3), SDS al 10 %, 0.8 N de NaOH y H_2O y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. A cada tubo se le añadió 0.5 mL del reactivo de Folin-H_2O (dilución 1:6), se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de los tubos se determinó a 750 nm en un espectrofotómetro Genesys 10 UV (Thermo Spectronic).

2.25 Tinción de proteínas

La tinción de los perfiles de proteínas con nitrato de plata en geles SDS-PAGE se realizó de acuerdo a Heukeshoven y Dernick, 1985. Brevemente, después de la electroforesis, los geles se incubaron toda la noche en una solución de fijación (metanol 25 %, ácido acético 10 % y formaldehido 0.075 %). Enseguida, los geles se lavaron tres veces con etanol al 30 % en agitación constante. Los cambios de solución de lavado se realizaron cada 20 minutos. Enseguida, los geles se incubaron por un minuto en 0.02 % de tiosulfato de sodio. Los geles se lavaron 3 veces con agua destilada, cada lavado fue de 20 segundos. Enseguida se incubaron por 20 minutos en oscuridad en una solución de 0.2 % de nitrato de plata y formaldehído 0.075 %. Los geles se lavaron 2 veces con agua destilada por 20

segundos cada vez y se adicionaron con 50 mL de una solución de revelado compuesta de 6 % de carbonato de sodio anhidro, 0.05 % de formaldehido y 1 mL de tiosulfato de sodio al 0.02 %. Cuando se observaron las bandas de proteína, los geles se lavaron con agua destilada y se detuvo la reacción en 30 mL de una solución conteniendo 25 % de metanol y 10 % de ácido acético.

Tinción de proteínas con azul de Coomassie R-250. Después de la electroforesis los geles SDS-PAGE fueron sumergidos en una solución de tinción de proteínas compuesta de 25 % metanol, 10 % ácido acético y 0.25 % de azul de Coomassie R-250 (Sigma). Los geles se incubaron toda la noche en agitación constante. El desteñido se realizó en una solución de 25 % de metanol y 10 % de ácido acético.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Identificación de secuencias de PfAvr4 en la base de datos del JGI

El Blastp en la base de datos que alberga las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de *Pseudocercospora fijiensis* (http://genome.jgi.doe.gov/Mycfi2/Mycfi2.home.html) usando como sonda las secuencias de aminoácidos de las clonas PfAvr4 08 (>151116-26_C07-AVO8_T7.ab1) y la de PfAvr4 B2 (>151116-26_M05-AV4B2_T7.ab1) detectó una secuencia de nucleótidos con una alta homología para PfAvr4 08 y PfAvr4 B2, respectivamente. Esta secuencia se identificó como jgi|Mycfi2|196075|fgenesh1_pg.4_#_8.

3.2 Alineamientos

La secuencia jgi|Mycfi2|196075|fgenesh1_pg.4_#_8, se introdujo en el programa MultAlin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) y se alineó con las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de las clonas PfAvr4 08 y PfAvr4 B2 (Figuras 3.1. y 3.2). El alineamiento de aminoácidos entre las secuencias de PfAvr4 08 y Jgi|Mycfi2|196075, reveló variación de algunos residuos de aminoácidos en las cadenas peptídicas (Figura 3.2) estos cambios ocurrieron en las posiciones de nucleótidos 72 (timina en lugar guanina), 213 (guanina en lugar timina) y 255 (timina en lugar de citosina). El cambio de nucleótidos en las posiciones 213 y 255 de PfAvr4 08, resultó en mutaciones silenciosas, pues el aminoácido resultante es el mismo (TCG o TCT= serina; GGT o GGC= glicina). De igual manera, el cambio de nucleótido en la posición 72 de PfAvr4 08 respecto a PfAvr4 B2 y Jgi|Mycfi2|196075, resultó en la sustitución del aminoácido metionina por una isoleucina (Figura 3.2). En contraste con los resultados arriba descritos, la comparación de las secuencias de aminoácidos de PfAvr4 B2 y Jgi|Mycfi2|196075 mostró un 100 % de homología (Figura 3.2).

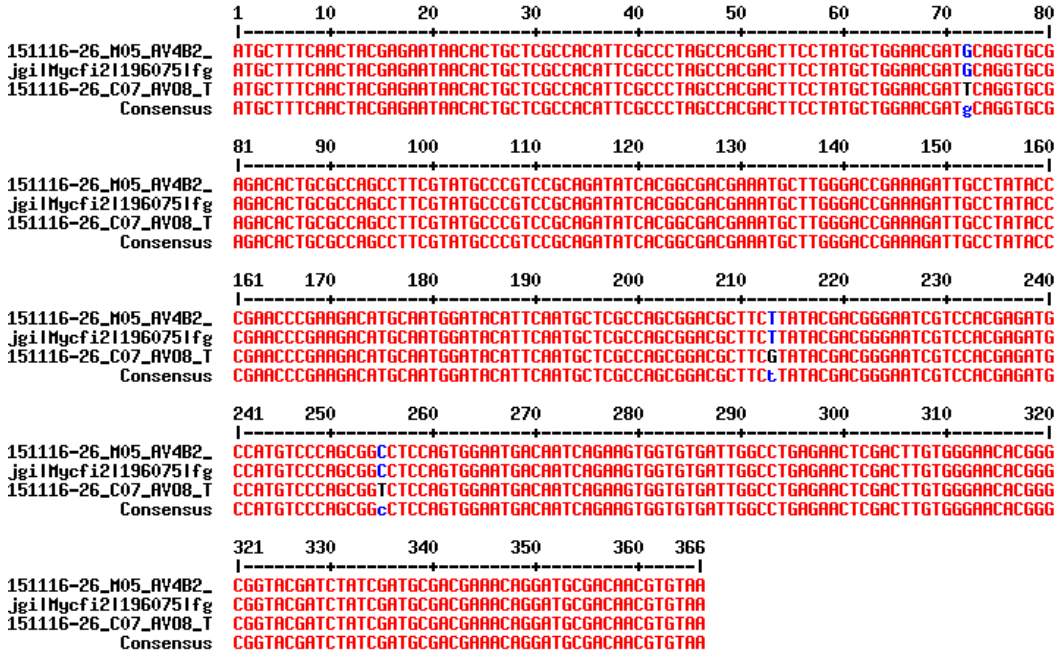


Figura 3.1 Alineamiento de nucleótidos de PfAvr4 B2, PfAvr4 08 y Jgi|Mycfi2|196075. En rojo, nucleótidos idénticos; en azul, nucleótidos que mantienen su identidad respecto a la secuencia de nucleótidos reportada en JGI; en negro, cambio en la secuencia respecto a la reportada en JGI.

El alineamiento de las secuencias de nucleótidos de PfAvr4 08, PfAvr4 B2 y Jgi|Mycfi2|196075 (Figura 3.1) mostró una alta homología entre las secuencias.

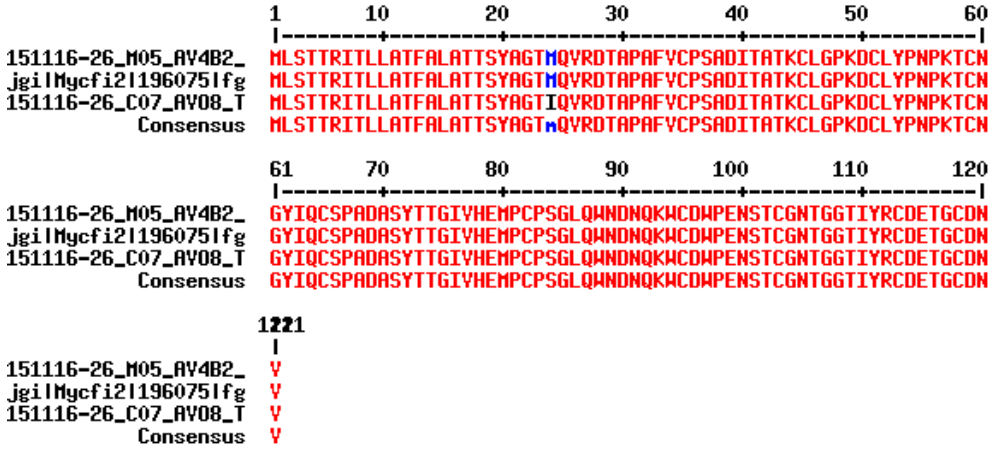


Figura 3.2 Alineamiento de aminoácidos de PfAvr4 B2, PfAvr4 08 y

Jgi|Mycfi2|196075. Los residuos de aminoácidos en rojo son idénticos; en azul, aminoácidos que mantienen su identidad con la secuencia reportada en JGI; en negro, cambio en residuo de aminoácido respecto a la secuencia reportada en JGI.

Con base en lo descrito se seleccionó el clon PfAvr4 B2 como clona molde para continuar con el desarrollo de este trabajo.

3.3 Péptido señal

El análisis en el programa SignalP 4.1 de la secuencia de aminoácidos deducida de la clona PfAvr4 B2 identificó un péptido señal putativo de 21 aminoácidos y un sitio de corte ubicado entre la alanina de la posición 21 y la glicina de la posición 22 (Figura 3.3)

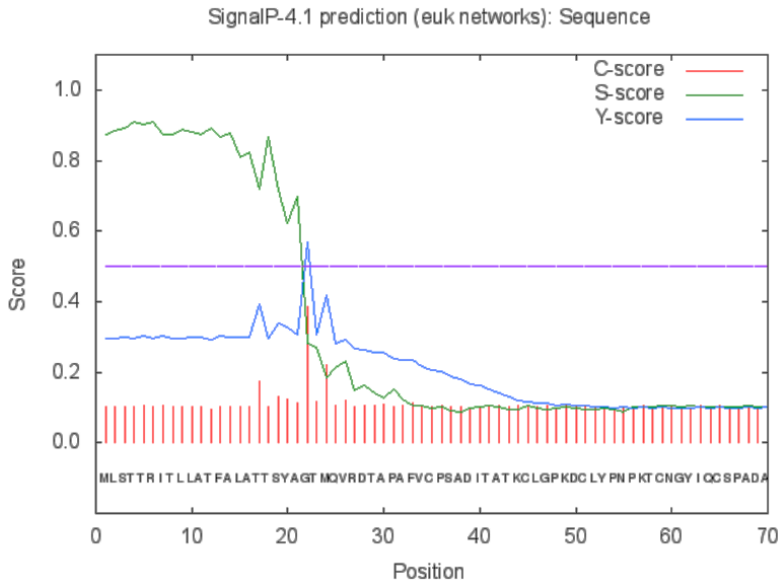


Figura 3.3 Predicción del péptido señal putativo de PfAvr4 B2 por SignalP 4.1. En la figura. C-score (rojo), señala el primer residuo de aminoácido inmediato al sitio de corte; S-score (verde), distingue el segmento que abarca el péptido señal y el de la proteína madura (sin péptido señal); Y-score, realiza un promedio del C-score y el S-score, y genera la mejor predicción del sitio de corte del péptido señal.

3.4 Dominio de unión a quitina de PfAvr4

El análisis en la base de datos del InterPro de la secuencia primaria de aminoácidos de PfAvr4 detectó que posee un dominio de unión a quitina, comprendido entre los aminoácidos 33-105 (Figura 3.4).

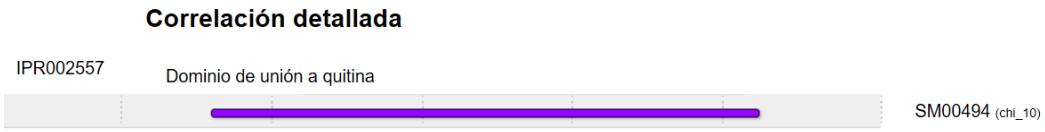


Figura 3.4 Dominio de unión a quitina en la secuencia de PfAvr4. En morado, aminoácidos del 33 al 105; IPR002557, peritropina dominio de unión a quitina; SM00494, módulo de unión a quitina, particularmente encontrado en proteínas de matriz peritrópica de quitinasas de insectos y animales. Modificada de Interpro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/).

3.5 Modificaciones post traduccionales en PfAvr4

El análisis de PfAvr4 mediante el programa PSITE identificó sitios de glicosilación y fosforilación. Las secuencias putativas, así como sus respectivas posiciones en la secuencia primaria de PfAvr4, se enlistan en el cuadro 3.1.

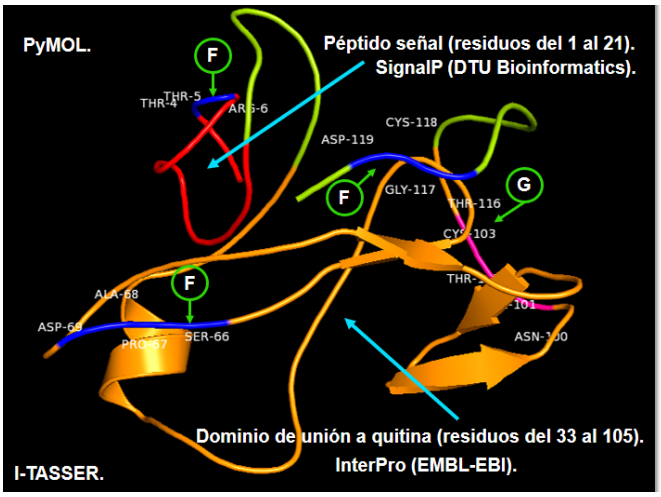
Cuadro 3.1 Modificaciones post-traduccionales putativas en PfAvr4.

	Inicio	Fin	Secuencia
Glicosilación	100	103	NSTC
Fosforilación	4	6	TTR
	66	69	SPAD
	116	119	TGCD

3.6 Estructura tridimensional de PfAvr4, CfAvr4 y Pf-Avr4

Utilizando la plataforma de predicción de función y estructuras terciarias del servidor I-TASSER y el software PyMOL, se determinó que PfAvr4 posee un plegamiento que consiste de 4 hojas β plegadas y una estructura de α hélice. En rojo se muestra

el péptido señal, el cual consiste de 21 aminoácidos, localizado en el N terminal. En naranja, el dominio de unión a quitina comprendido entre los aminoácidos 33 al 105 (Figura 3.5).



Aminoácidos	121 aa
Peso molecular	~ 13 KDa

ProtParam (ExPASy).

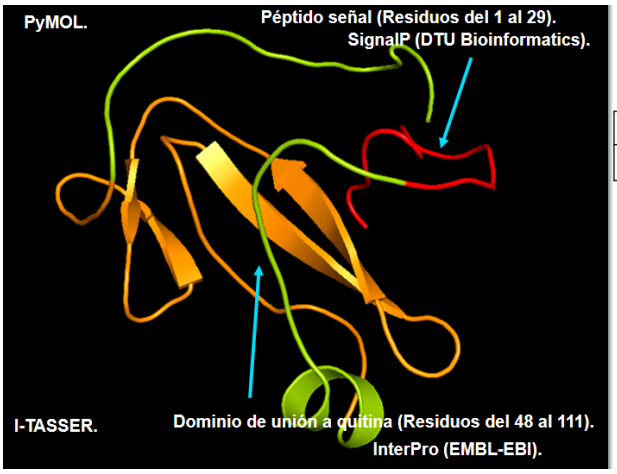
	Inicio	Fin	Sequencia
Glicosilación	100	103	NSTC
Fosforilación	4	6	TTR
	66	69	SPAD
	116	119	TGCD

PSITE (Softberry).

Sitio de Fosforilación	F
Sitio de glucosilación	G

Figura 3.5 Estructura terciaria de PfAvr4 de *Pseudocercospora fijiensis*. Al lado derecho, cuadro superior, señala características generales de PfAvr4; cuadro de en medio, sitios putativos a modificación post-traduccional; cuadro inferior, acotaciones usadas en la estructura terciaria para resaltar los sitios de fosforilación y glucosilación en PfAvr4. En la figura, en rojo, péptido señal; naranja, módulo de unión a quitina; verde, resto de la proteína constituida principalmente por estructuras formando bucles; azul, sitios de fosforilación; fucsia, sitios de glucosilación.

La estructura tridimensional de CfAvr4 consiste de 4 hojas β plegadas y una α hélice. En rojo se señala el péptido de transición, el cual está constituido por 29 aminoácidos localizado en el N terminal del residuo 1 al 29. En naranja, el domino de unión a quitina localizado entre los aminoácidos 48 al 111 (Figura 3.6).

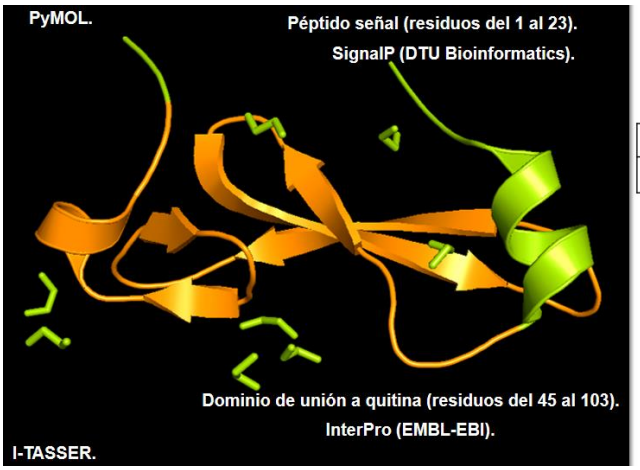


Aminoácidos	135 aa
Peso molecular	~ 14.5 KDa

ProtParam (ExPASy).

Figura 3.6 Estructura terciaria de CfAvr4 de *Cladosporium fulvum*. Al lado derecho en el cuadro, se muestran algunas de las características generales de CfAvr4. En la figura, rojo, péptido señal; naranja, dominio de unión a quitina; verde, resto de la proteína constituida por bucles.

La estructura tridimensional del monómero de Pf-Avr4 de *P. fuligena* (La estructura depositada en el PDB, fue resuelta en forma dimérica) está conformado por 5 hojas β plegadas y una α hélice. En rojo, el péptido señal, el cual tiene una longitud de 23 aminoácidos y en naranja, el módulo de unión a quitina que se ubica entre los residuos 45 al 103 (Figura 3.7).



Aminoácidos	128 aa
Peso molecular	~ 13.6 KDa

ProtParam (ExPASy).

Figura 3.7 Estructura terciaria de Pf-Avr4 de *Pseudocercospora fuligena*. Al lado derecho, en el cuadro, se muestran algunas de las características generales de Pf-Avr4. En la figura, naranja, módulo de unión a quitina; verde, resto de la

proteína y la α hélice.

3.7 Traslape de estructuras tridimensionales de PfAvr4 vs CfAvr4 y PfAvr4 vs Pf-Avr4

El traslape de las estructuras tridimensionales de PfAvr4 y CfAvr4, mostró un alto grado de empalme, esto se puede apreciar entre las 4 hojas β plegadas de ambas proteínas. Se observó también sobrelapamiento entre las α hélices de PfAvr4 y su ortólogo CfAvr4, así como entre secciones que conforman los bucles de ambas proteínas (Figura 3.8).

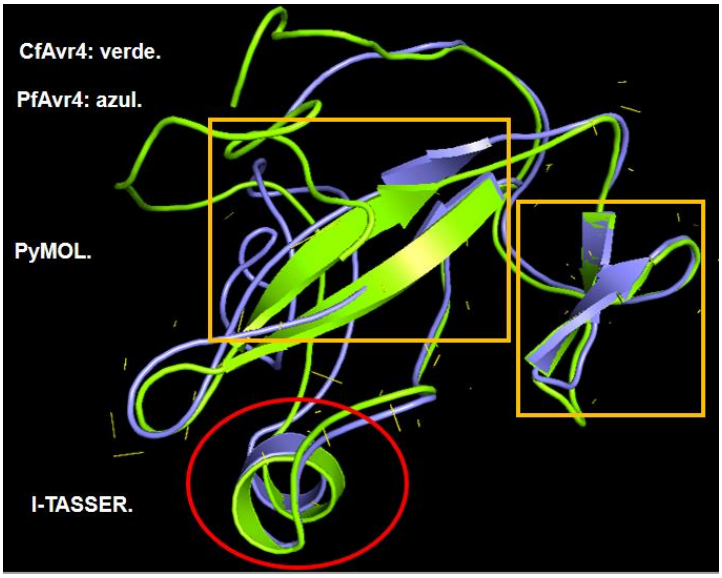


Figura 3.8 Modelamiento tridimensional de las estructuras de PfAvr4 de *P. fijiensis* (azul) y CfAvr4 (verde). En la figura, en los cuadros amarillos, las hojas β plegadas; en el cuadro rojo, las α hélices.

El alineamiento entre PfAvr4 de *P. fijiensis* y Pf-Avr4 de *P. fuligena*, mostró sobrelapamiento de 4 de las hojas β plegadas. Se observó correlación entre las α hélices de ambas proteínas. También se observó similitud en la distribución de los bucles de ambas proteínas (Figura 3.9).

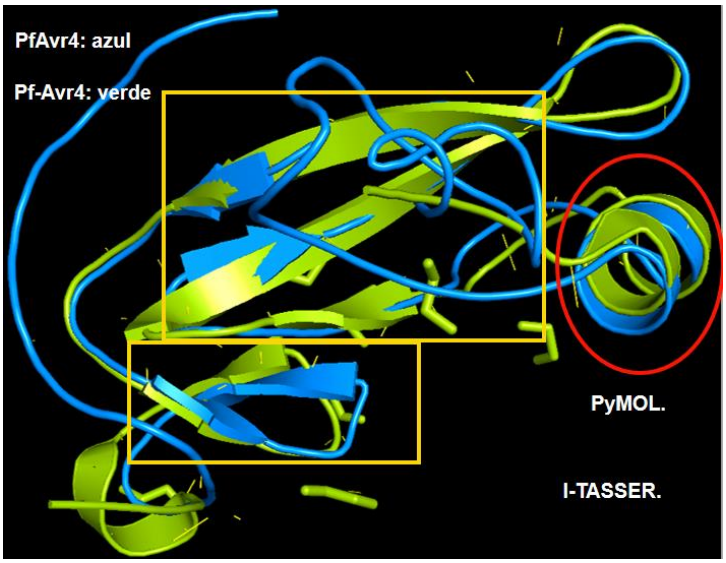


Figura 3.9 Alineamiento tridimensional de las estructuras de PfAvr4 de *P. fijiensis* (azul) y Pf-Avr4 de *P. fuligena* (verde). En la figura, en los cuadros amarillos, las hojas β plegadas; en el cuadro rojo, las α hélices.

3.8 Amplificación del CDS de PfAvr4

La amplificación por PCR del CDS de PfAvr4 de *P. fijiensis* a partir del ADN plasmídico de la clona PfAvr4 B2, y el posterior fraccionamiento de los productos de la PCR en geles de 1 % de agarosa mostró un producto de 366 pb, el cual corresponde al tamaño esperado (Figura 3.10). Este amplicón no incluye la secuencia codificante para la etiqueta de histidinas en el C terminal. El producto de PCR fue purificado, tal como se describió en el punto 2.9 de este documento y enseguida se realizó su ligación en el vector PGEM T-Easy. El vector recombinante fue denominado pGEM T-Easy-PfAvr4 (ver punto 2.10).

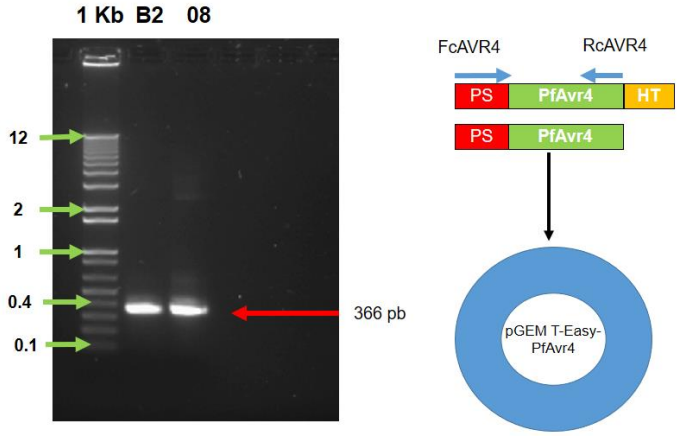


Figura 3.10 CDS de PfAvr4 de *P. fijiensis* a partir de la clona PfAvr4 B2 y análisis del producto de PCR en gel de 1 % de agarosa. La flecha a la derecha de la imagen indica el producto de PCR con el tamaño esperado. Los números a la izquierda de la imagen muestran el tamaño de los marcadores de ADN. Los números y siglas (1 Kb, B2 y 08) ubicados en la parte superior de la imagen indican la nomenclatura de las muestras analizadas en el gel. El esquema a la derecha de la figura ejemplifica los pasos experimentales que se siguieron para la amplificación y clonación del CDS de PfAvr4 en el vector pGEM-T-Easy.

3.9 Amplificación del CDS de PfAvr4 de *P. fijiensis* con los adaptadores LIC y generación de los vectores pLATE-PfAvr4-I y pLATE-PfAvr4-M

Con el vector pGEM T-Easy-PfAvr4 como templado y los oligonucleótidos Fp52Avr4 (sentido) y Rc52Avr4 (reverso), o Fc52Avr4 (sentido) y Rc52Avr4 (reverso), se amplificaron los CDSs que codifican a la proteína PfAvr4-M (madura) o PfAvr4-I (inmadura), respectivamente (Figura 3.11 y 3.12). Los amplicones se visualizaron en geles de 1 % de agarosa e incluyen las secuencias codificantes para PfAvr4-M [madura] (Figura 3.11) y PfAvr4-I [inmadura] (Figura 3.12) y los adaptadores complementarios al sitio de clonación del vector pLATE. Los productos de PCR fueron purificados como se describió en el punto 2.9 de este documento y se ligaron al vector de expresión pLATE, tal como se describe en el punto 2.13 de este documento. Los vectores resultantes se denominaron pLATE-PfAvr4-M y pLATE-PfAvr4-I.

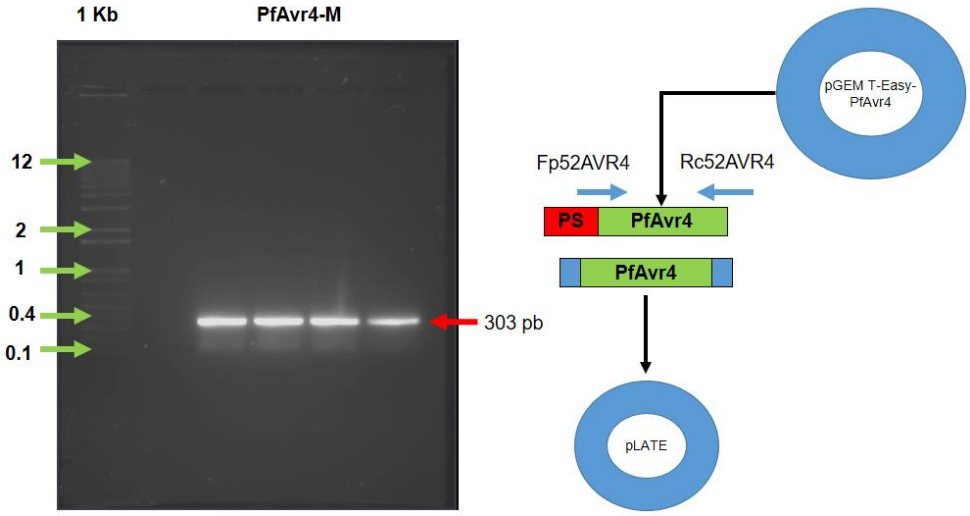


Figura 3.11 CDS de PfAvr4-M de *P. fijiensis* con los cebadores Fp52Avr4 y Rc52Avr4 a partir de pGEM-T Easy-PfAvr4 y análisis del producto de PCR en gel de 1 % de agarosa. La flecha a la derecha de la imagen indica el producto de PCR con el tamaño esperado. Los números a la izquierda de la imagen muestran el tamaño de los marcadores de ADN. El número y sigla (1 Kb y PfAvr4) ubicados en la parte superior de la imagen indican la nomenclatura de las muestras analizadas en el gel. El esquema a la derecha de la figura ejemplifica los pasos experimentales que se siguieron para la amplificación y clonación del CDS de PfAvr4-M en el vector de expresión pLATE.

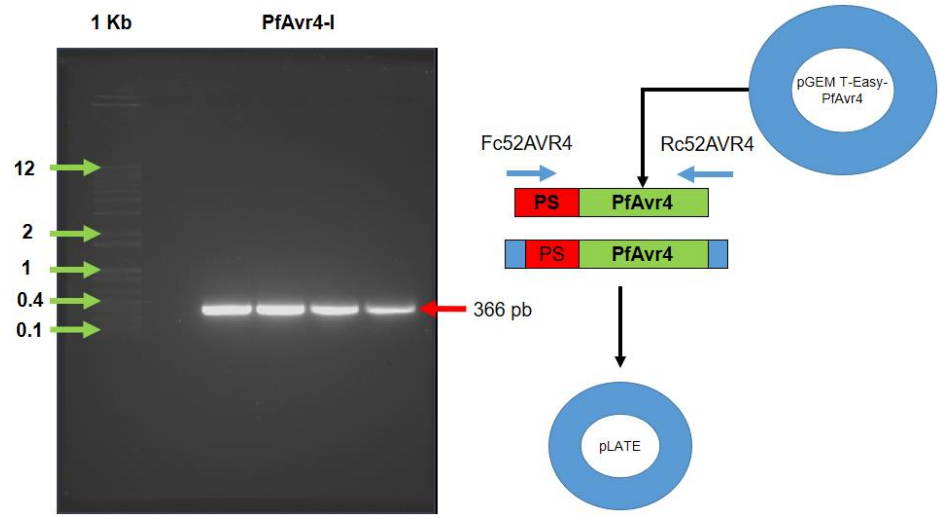


Figura 3.12 CDS de PfAvr4-I de *P. fijiensis* con los cebadores Fc52Avr4 y Rc52Avr4 a partir de pGEM-T Easy-PfAvr4 y análisis del producto de PCR en gel

de 1 % de agarosa. La flecha a la derecha de la imagen indica el producto de PCR con el tamaño esperado. Los números a la izquierda de la imagen muestran el tamaño de los marcadores de ADN. El número y sigla (1 Kb y PfAvr4) ubicados en la parte superior de la imagen indican la nomenclatura de las muestras analizadas en el gel. El esquema a la derecha de la figura ejemplifica los pasos experimentales que se siguieron para la amplificación y clonación del CDS de PfAvr4-I en el vector de expresión pLATE.

3.10 Secuenciación de los vectores de expresión pLATE-PfAvr4-I y pLATE-PfAvr4-M

Los vectores de expresión pLATE-PfAvr4-M y pLATE-PfAvr4-I fueron secuenciados. Las clonas que tuvieron 100 % de homología con la secuencia codificante de PfAvr4 reportada en la base de datos del Joint Genome Institute fueron utilizadas en los experimentos de expresión heteróloga. El análisis de nucleótidos de la clona denominada F1NM (Figura 3.14) mostró que esta contiene el CDS de la proteína inmadura (pLATE-PfAvr4-I), los adaptadores LIC y elementos que permiten manipular la inducción y purificación de PfAvr4-I (Secuencia de unión a ribosoma (RBS) y la etiqueta de histidinas; Figura 3.13).

Figura 3.13 Secuencia de nucleótidos del plásmido recombinante pLATE-PfAvr4-I. Los cuadros de colores a la derecha de la secuencia de nucleótidos indican algunos de los elementos del plásmido de expresión. Azul marino, secuencia que codifica para los seis residuos de histidinas; verde militar, secuencia de unión a ribosoma; verde fluorescente, secuencia codificante de PfAvr4 inmaduro; rojo, secuencia de hibridación de los cebadores LIC.

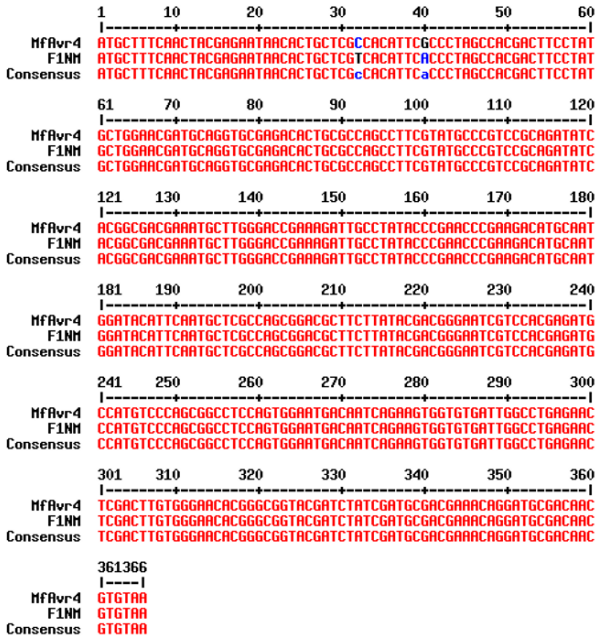


Figura 3.14 Alineamiento de secuencias del CDS de PfAvr4 reportado en el portal JGI con el CDS clonado en el vector pLATE-PfAvr4-I. En la secuencia, en rojo, secuencias homólogas; en azul, secuencias que muestran identidad con la secuencia reportada en el JGI; negro, cambios respecto a la secuencia reportada en JGI.

El alineamiento de nucleótidos de la secuencia de PfAvr4-I contenida en el vector de expresión pLATE-PfAvr4-I con el CDS de PfAvr4 depositado en la base de datos del JGI mostró un alto porcentaje de homología (Figura 3.14). No obstante, en la secuencia PfAvr4-I también se observaron dos cambios de nucleótidos con respecto a la secuencia depositada en el JGI. Un cambio ocurrió en el nucleótido de la posición 32 y modificó al codón pues originalmente codificaba a una alanina y ahora codifica a una valina. Sin embargo, ambos aminoácidos son apolares por lo que se espera que no influyan en el plegamiento de PfAvr4-I. El otro cambio tuvo lugar en la posición 40, de este modo el aminoácido de la posición 14 de PfAvr4-I, cambio de una alanina a un residuo de treonina, si este aminoácido es importante en el plegamiento y función de la proteína, dicho cambio podría afectar el tránsito celular y el plegamiento de PfAvr4 inmadura, dado que esa posición corresponde al péptido

señal.

Figura 3.15 Secuenciación de nucleótidos del plásmido recombinante pLATE-PfAvr4-M. Los cuadros de colores a la derecha de la secuencia de nucleótidos indican algunos de los elementos del plásmido de expresión. Azul marino, secuencia que codifica para los seis residuos de histidinas; verde militar, secuencia de unión a ribosoma; verde fluorescente, secuencia codificante de PfAvr4 maduro; rojo, secuencia de hibridación con los cebadores LIC.

Análisis de la secuencia de nucleótidos resultante de la secuenciación del vector pLATE-PfAvr4-M y correspondiente a la clona F1MAD (Figura 3.16), mostró que el constructo de expresión, además de contener el CDS de PfAvr4-M, también contiene los elementos que permiten regular la inducción de la expresión de PfAvr4-M (Secuencia de unión a ribosoma (RBS) y la etiqueta de histidinas; Figura 3.15). El alineamiento de nucleótidos de PfAvr4-M correspondiente a la clona pLATE-PfAvr4-M con la secuencia reportada en la base de datos del JGI mostró una homología del 100 % (Figura 3.16).

```
           1       10        20        30        40        50        60
           |--------+---------+---------+---------+---------+---------|
MfAvr4     GGAACGATGCAGGTGCGAGACACTGCGCCAGCCTTCGTATGCCCGTCCGCAGATATCACG
F1MAD      GGAACGATGCAGGTGCGAGACACTGCGCCAGCCTTCGTATGCCCGTCCGCAGATATCACG
Consensus  GGAACGATGCAGGTGCGAGACACTGCGCCAGCCTTCGTATGCCCGTCCGCAGATATCACG

           61      70        80        90        100       110       120
           |--------+---------+---------+---------+---------+---------|
MfAvr4     GCGACGAAATGCTTGGGACCGAAAGATTGCCTATACCCGAACCCGAAGACATGCAATGGA
F1MAD      GCGACGAAATGCTTGGGACCGAAAGATTGCCTATACCCGAACCCGAAGACATGCAATGGA
Consensus  GCGACGAAATGCTTGGGACCGAAAGATTGCCTATACCCGAACCCGAAGACATGCAATGGA

           121    130       140       150       160       170       180
           |--------+---------+---------+---------+---------+---------|
MfAvr4     TACATTCAATGCTCGCCAGCGGACGCTTCTTATACGACGGGAATCGTCCACGAGATGCCA
F1MAD      TACATTCAATGCTCGCCAGCGGACGCTTCTTATACGACGGGAATCGTCCACGAGATGCCA
Consensus  TACATTCAATGCTCGCCAGCGGACGCTTCTTATACGACGGGAATCGTCCACGAGATGCCA

           181    190       200       210       220       230       240
           |--------+---------+---------+---------+---------+---------|
MfAvr4     TGTCCCAGCGGCCTCCAGTGGAATGACAATCAGAAGTGGTGTGATTGGCCTGAGAACTCG
F1MAD      TGTCCCAGCGGCCTCCAGTGGAATGACAATCAGAAGTGGTGTGATTGGCCTGAGAACTCG
Consensus  TGTCCCAGCGGCCTCCAGTGGAATGACAATCAGAAGTGGTGTGATTGGCCTGAGAACTCG

           241    250       260       270       280       290       300
           |--------+---------+---------+---------+---------+---------|
MfAvr4     ACTTGTGGGAACACGGGCGGTACGATCTATCGATGCGACGAAACAGGATGCGACAACGTG
F1MAD      ACTTGTGGGAACACGGGCGGTACGATCTATCGATGCGACGAAACAGGATGCGACAACGTG
Consensus  ACTTGTGGGAACACGGGCGGTACGATCTATCGATGCGACGAAACAGGATGCGACAACGTG

           301
           |-|
MfAvr4     TAA
F1MAD      TAA
Consensus  TAA
```

Figura 3.16 Alineamiento de secuencias del CDS de PfAvr4 reportado en el portal JGI con el CDS clonado en el vector pLATE-PfAvr4-M. En la secuencia, en rojo, secuencias homólogas; en azul, secuencias que muestran identidad con la secuencia reportada en el JGI; negro, cambios respecto a la secuencia reportada en JGI

3.11 Restricción de los vectores pLATE-PfAvr4-I y pLATE-PfAvr4-M

En paralelo a la secuenciación de los vectores de expresión pLATE-PfAvr4-I y pLATE-PfAvr4-M, estos también fueron digeridos con las enzimas de restricción (Xba I y Stu I, Thermo Scientific). El análisis en gel de 1.5 % de agarosa de los productos de la digestión de ambos vectores (Figura 3.17), mostró una banda de tamaño cercano a lo esperado (~ 4,378 pb), correspondiente al vector pLATE. La restricción del vector pLATE-PfAvr4-I también liberó un producto de ~ 526 pb, correspondiente al tamaño de PfAvr4-I. La digestión del vector pLATE-PfAvr4-M, liberó una banda menor (~ 463 pb), correspondiente a PfAvr4-M.

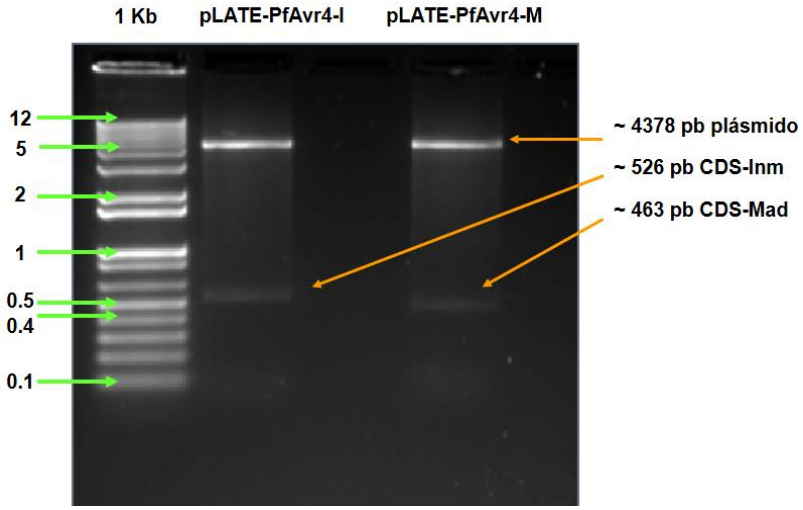


Figura 3.17 Digestión de los vectores pLATE-PfAvr4-I y pLATE-PfAvr4-M con las enzimas de restricción Stu I y Xba I. En la parte superior de la figura, de izquierda a derecha, marcador de tamaño de ADN gene ruler 1 Kb Plus; producto de la digestión del vector pLATE-PfAvr4-I y pLATE-PfAvr4-M. En la izquierda con flecha verdes, se muestran los principales indicadores de tamaño de ADN. Al lado derecho de la figura, se señalan los pesos aproximados de los fragmentos de ADN generados tras la digestión del vector con las enzimas Xba I y Stu I.

3.12 Transformación de *E. coli* Rosetta Gami B con los vectores pLATE-PfAvr4-I o pLATE-PfAvr4-M

Una vez que por secuenciación de nucleótidos (Figuras 3.13 y 3.15) y por medio de digestión enzimática (Figura 3.17), se confirmó la presencia del CDS de PfAvr4 maduro e inmaduro en los vectores pLATE-PfAvr4-M y pLATE-PfAvr4-I, se transformó la cepa *E. coli* Rosetta gami B siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.11. La transformación de la cepa Rosetta gami B con los vectores pLATE-PfAvr4-I o pLATE-PfAvr4-M se confirmó por medio de PCR de colonia usando los oligonucleótidos Fc52Avr4 y Rc52Avr4 o Fp52Avr4 y Rc52Avr4. Los productos de PCR se fraccionaron y visualizaron en un gel de 1 % de agarosa. Se observaron las bandas esperadas de ~ 366 pb en PfAvr4-I y de ~ 303 pb en PfAvr4-M (Figura 3.18).

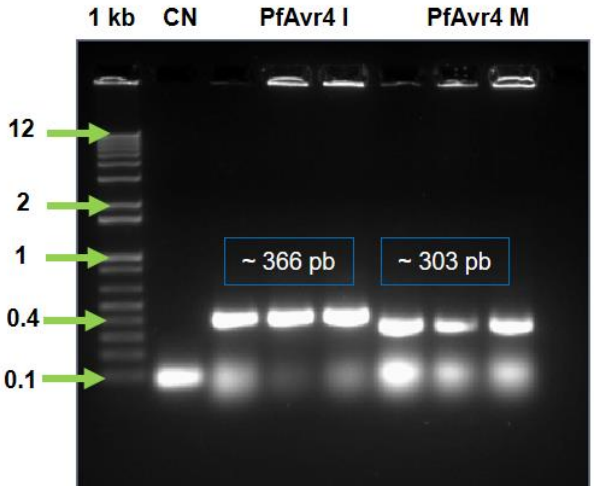


Figura 3.18 Imagen del gel de 1 % de agarosa que muestra los productos de PCR obtenidos a partir de las cepas de *E. coli* Rosetta gami B, transformadas con los plásmidos de expresión pLATE-PfAvr4-I o pLATE-PfAvr4-M. En la parte superior de la imagen y de izquierda a derecha, el marcador de ADN de 1 Kb, gene ruler 1 Kb Plus; control negativo de amplificación por PCR (CN); PfAvr4 I o PfAvr4 M, colonias de *E. coli* transformadas con el vector pLATE-PfAvr4-I o pLATE-PfAvr4-M. En los rectángulos azules, se indican los tamaños putativos de los productos de PCR para el CDS inmaduro (~ 366 pb) y el maduro (~ 303 pb).

3.13 Expresión de PfAvr4 (madura e inmadura) en *E. coli* Rosetta gami B

Las colonias de *E. coli* Rosetta gami B transformadas con los vectores de expresión pLATE-PfAvr4-I o pLATE-PfAvr4-M, fueron crecidas hasta alcanzar una densidad óptica de entre 0.5 a 0.8 a 600 nm. Enseguida se indujo la expresión de PfAvr4 mediante la adición de IPTG, tal como se describió en el apartado 2.17 de este documento.

Dieciséis horas después de la inducción de la expresión, las células Rosetta gami B, se recuperaron por centrifugación, y se les extrajo la proteína soluble. Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad (Ver 2.18 y Cuadro 2.3), las fracciones de proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de 12 % SDS-PAGE. La tinción de los geles con azul de Coomassie mostró un perfil complejo de polipéptidos (Figura 3.19); no obstante, en las fracciones L1, L2 y L3,

se observaron bandas de proteína de ~ 16.06 kDa, lo cual corresponde al tamaño de PfAvr4-I [Peso molecular calculado con base en los 121 aminoácidos de PfAvr4-I, más los residuos codificados en el vector de expresión pLATE, y que son indispensables para la traducción y purificación].

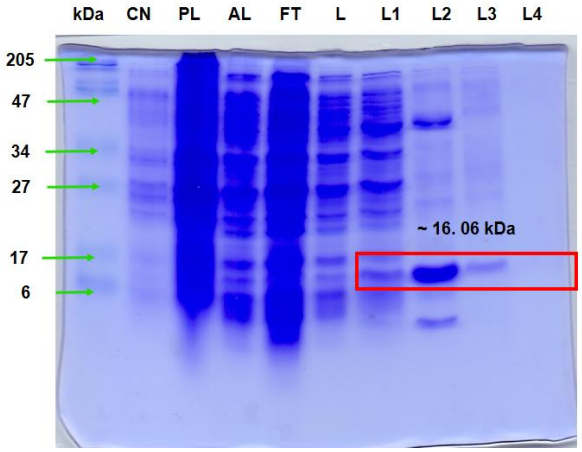


Figura 3.19 Perfil electroforético de la proteína recombinante PfAvr4-I en gel de 12 % SDS-PAGE. A la izquierda de la figura se muestra, el marcador de peso molecular de proteínas Prestained SDS-PAGE Standars, broad range de BIO-RAD. Las leyendas en la parte superior de la imagen: CN, pastilla sin inducir; PL, pastilla inducida; AL, fase soluble inducida; FT, filtrado; L, lavado de columna de Ni; L1-L4, eluciones con concentraciones crecientes de imidazol: L1= 10 mM, L2= 50 mM, L3= 200 mM y L4= 250 mM. El rectángulo rojo contiene al polipéptido correspondiente a PfAvr4-I.

El análisis en geles de 12 % SDS-PAGE de las fracciones de proteína purificadas a partir de la cepa Rosetta gami B expresando a la proteína PfAvr4-M (Figura 3.20), reveló una banda de proteína con peso molecular de ~ 13.83 kDa que corresponden al tamaño de PfAvr4-M [Peso molecular calculado en base a los 100 aminoácidos de PfAvr4-M, más los residuos de aminoácidos del vector pLATE que participan en la traducción y purificación]. La banda de PfAvr4-M se localizó en las fracciones L1 y L2 (Figura 3.20).

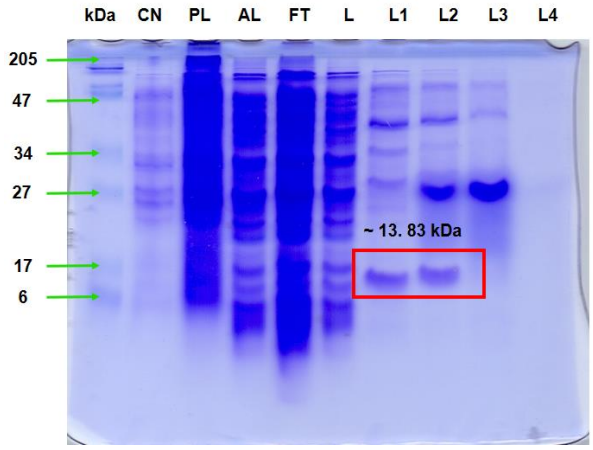


Figura 3.20 Perfil electroforético de la proteína recombinante PfAvr4-M en gel de 12 % SDS-PAGE. A la izquierda de la figura se muestra, el marcador de peso molecular de proteínas. En la parte superior de la imagen, las leyendas corresponden a: CN, pastilla sin inducir; PL, pastilla inducida; AL, fase soluble inducida; FT, filtrado; L, lavado de columna de Ni; L1-L4, eluciones con concentraciones crecientes de imidazol: L1= 10 mM, L2= 50 mM, L3= 200 mM y L4= 250 mM. El rectángulo rojo encierra al polipéptido correspondiente a PfAvr4-M.

3.14 Secuenciación de aminoácidos de PfAvr4-I y PfAvr4-M recombinantes

La secuenciación de aminoácidos de las proteínas contenidas en las bandas escindidas de los geles de 12 % SDS-PAGE, mostraron que PfAvr4-M y PfAvr4-I estuvieron presentes (Figura 3.21). No obstante, se identificaron otros 4 péptidos en las muestras. El origen de éstos fue por una contaminación con proteínas de *E. coli* que no pudieron ser removidas durante la purificación de PfAvr4 con la cromatografía de afinidad.

Probability Legend: over 95 % 80 % to 94 % 50 % to 79 % 20 % to 49 % 0 % to 19 %				E. coli		Secuencia-usuario	
	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	BioSample Mad	BioSample InMa	BioSample Mad-secuencia	BioSample InMa-secuencia
MfAvr4 M carbohydrate-binding module family 14 protein [Pseudocercospora fijiensis CIRAD 86]	gi|6313…	11kDa				17 %	
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD 0S= Escherichia coli 06:H1 (strain CFT073/ATCC70092..	sp|P0A…	21kDa			46 %		
Adenylate kinase 0S= Escherichia coli 0145:H28 str. RM12581 GN= adk PE=3 SV=1	A0A023….	26kDa		5.2 %			
Pyridoxine/pyridoxamine 5´-phosphate oxidase 0S= Escherichia coli 0139:H2B (strain E24377A/ETEC) GN…	sp|A7Z	26kDa			5.5 %		
Uncharacterized protein 0S= Escherichia coli PE=4 SV=1	tr|A0A0…	21kDa			15 %		

Figura 3.21 Proteínas identificadas por porcentaje de cobertura de secuencia. En la parte superior izquierda, el porcentaje de homología cubierto en los péptidos identificados; en la parte superior derecha, péptidos de *E. coli* y de usuario (PfAvr4) identificados en las muestras; parte inferior, lista de proteínas encontradas en la secuenciación y su porcentaje de cobertura en cada una de las muestras analizadas.

3.15 Electroelución de PfAvr4 madura e inmadura

Las fracciones proteicas de PfAvr4-I o PfAvr4-M purificadas mediante cromatografía de afinidad, fueron analizadas por electroforesis en geles de 15 % SDS-PAGEs y teñidas con azul de Coomassie (Figura 3.22). Las bandas de proteína con el tamaño esperado de PfAvr4-M (~ 13.83 kDa) o de PfAvr4-I (~ 16.06 kDa) fueron escindidas del gel y electroeluidas tal como se describe en el apartado 2.21 de este documento.

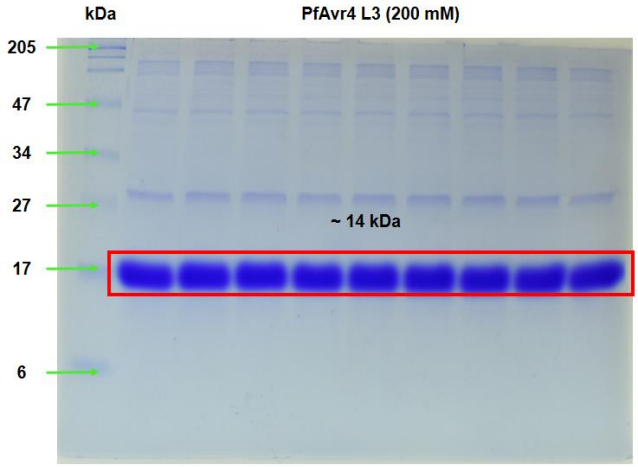


Figura 3.22 Perfil de polipéptidos de la fracción L3 de PfAvr4-M analizado en gel de 15 % SDS-PAGE. La fracción L3 de PfAvr4-M purificada mediante cromatografía de afinidad fue separada por electroforesis y teñida con azul de Coomassie. En la parte superior, de izquierda a derecha, el marcador de peso molecular de proteínas y la muestra correspondiente a la fracción L3 de PfAvr4-M. En el rectángulo rojo, el polipéptido correspondiente a PfAvr4-M.

Las proteínas electroeluidas fueron fraccionadas en un gel de 15 % SDS-PAGE y teñidas con $AgNO_3$ (Figura 3.23). Interesantemente, el perfil de polipéptidos resultante difirió del perfil que mostraban las proteínas antes de ser electroeluidas (Figuras 3.19 y 3.20). En el caso de PfAvr4-M (Figura 3.20), en el gel de 15 % SDS-PAGE se observó que la proteína estaba localizada a ~ 14 kDa; sin embargo, la proteína electroeluida (Figura 3.23), mostró un polipéptido de ~ 28 kDa y otro de ~ 17 kDa en el gel SDS-PAGE teñido con plata. En el caso de PfAvr4-I electroeluida, se observó un polipéptido de ~ 28 kDa.

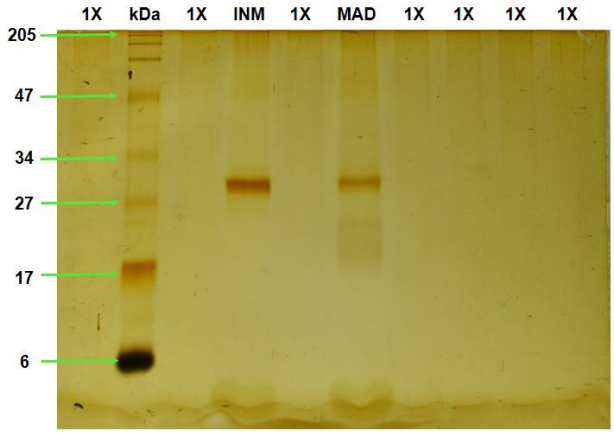


Figura 3.23 Perfil de polipéptidos de las proteínas electroeluidas PfAvr4-M y PfAvr4-I, y separadas por electroforesis en gel de 15 % SDS-PAGE teñido con $AgNO_3$. En el lado izquierdo de la figura, proteínas marcadoras de peso molecular. En la parte superior de izquierda a derecha: 1X, amortiguador Laemmli 1X; kDa, indicador de peso molecular; INM, PfAvr4-I electroeluida (2 µg); MAD, PfAvr4-M electroeluida (2 µg).

3.16 Ensayos de reducción y alquilación de un oligómero putativo de PfAvr4-M

Para determinar si las bandas de 28 kDa observadas en ambas preparaciones corresponden a oligómeros, las bandas de 28 kDa fueron cortadas y los fragmentos de gel fueron tratados como se describe en el punto 2.23 de este documento. Después del tratamiento de reducción/alquilación, un volumen de 40 µL de muestra se cargó en un gel de 15 % SDS-PAGE con sus respectivos controles [muestras sin tratamiento (P-T)]; el gel fue teñido con $AgNO_3$. No se observó disociación del putativo dímero (Figura 3.24).

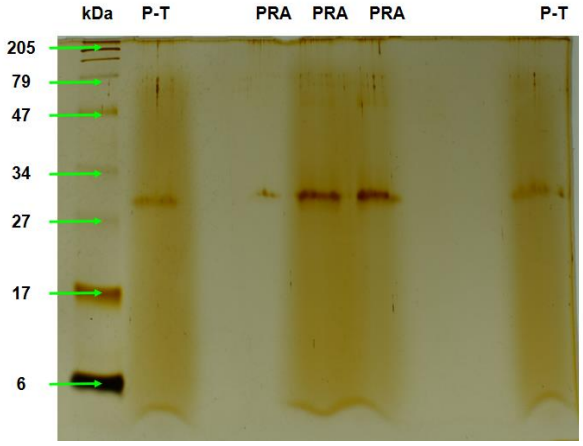


Figura 3.24 Perfil de polipéptidos de PfAvr4-M alquilada, reducida y separada por electroforesis en geles de 15 % SDS-PAGE y su tinción con $AgNO_3$. En el lado izquierdo, marcador de referencia de peso molecular de proteínas. En la parte superior del gel, se indica las leyendas de cada una de las muestras analizadas: kDa, indicador de peso molecular de proteínas; P-T, muestras sin tratamiento; PRA, muestras reducidas y alquiladas de PfAvr4-M.

3.17 Ensayos de infiltración con PfAvr4-I o PfAvr4-M en bananos resistentes y susceptibles a *P. fijiensis*

Se emplearon 150 o 300 ng de PfAvr4-I o PfAvr4-M electroeluidas (en 40 µL) y se infiltraron plantas de banano susceptibles (Enano gigante) y resistentes (Calcuta IV) a *P. fijiensis*.

Ambas preparaciones proteicas causaron lesiones necróticas (Figura 3.25 y 3.26), cuya área aumentó conforme incrementó tanto la concentración de proteína como el tiempo del ensayo (monitoreo durante 96 h). Por ejemplo, la infiltración de 150 ng de PfAvr4-I en Enano Gigante a las 24, 48, 72 y 96 horas, indujeron áreas necróticas de 0.36, 0.61, 0.78 y 0.84 cm^2, respectivamente. La infiltración con 300 ng de PfAvr4-I en las plantas de banano susceptible mostró que en los mismos periodos de tiempo las áreas necróticas fueron de 0.39, 0.78, 0.97 y 1.02 cm^2, respectivamente (Figura 3.25). En el caso de las infiltraciones con 150 o 300 ng de PfAvr4-M, se determinó que las áreas necróticas de las 24, 48, 72 y 96 horas fueron de 0.30, 0.41, 0.50 y 0.61 cm^2 para la primera concentración, mientras que para la

segunda fueron de 0.22, 0.45, 0.53 y 0.58 cm² (Figura 3.26).

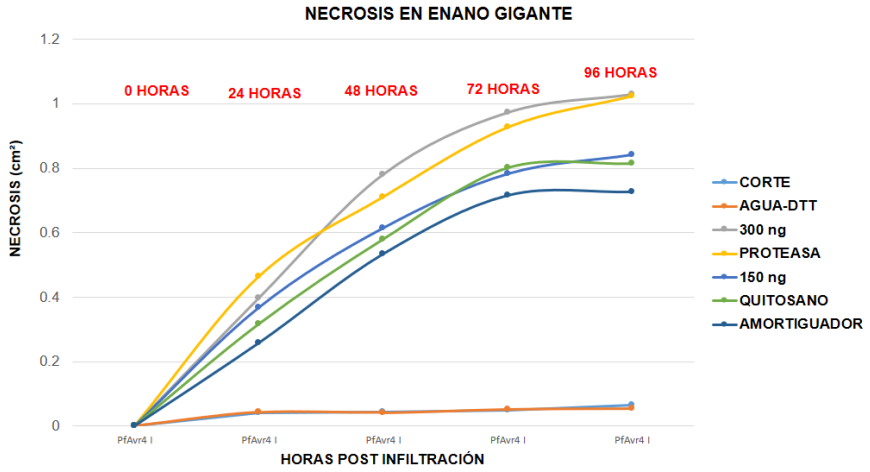


Figura 3.25 Curvas del área de necrosis causada por la infiltración de concentraciones crecientes de PfAvr4-I en hojas de banano susceptible a *P. fijiensis*. A la derecha se indican las muestras infiltradas.

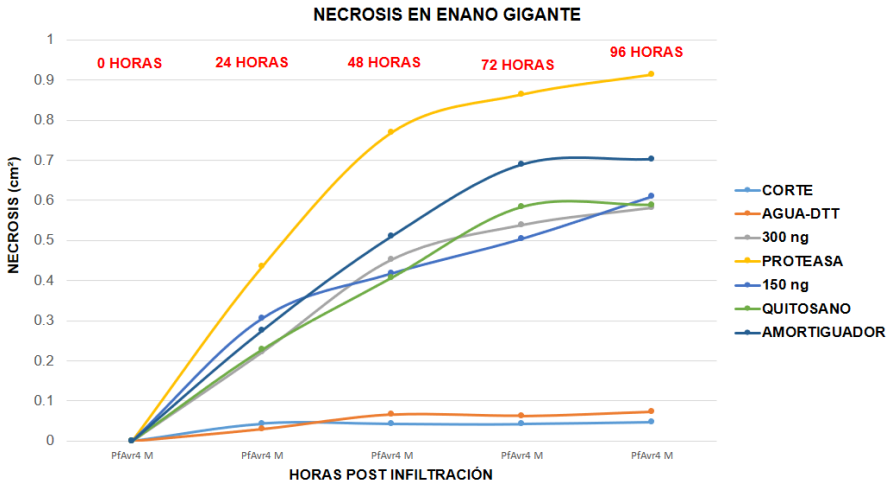


Figura 3.26 Curvas del área de necrosis causada por la infiltración de concentraciones crecientes de PfAvr4-M en hojas de banano susceptible a *P. fijiensis*. A la derecha se indican las muestras infiltradas.

La infiltración de banano resistente (Calcuta IV) con 150 o 300 ng de PfAvr4-I y su evaluación por 96 horas, mostró que a las 24, 48, 72 y 96 horas, los 150 ng causaron áreas necróticas de 0.45, 0.67, 0.90 y 1.23 cm², mientras que los 300 ng indujeron áreas necróticas de 0.78, 1.32, 1.86 y 2.06 cm². El área necrótica fue mayor en la

zona infiltrada con 300 ng de PfAvr4-I (Figura 3.27). Las infiltraciones de 150 o 300 ng de PfAvr4-M en el cultivar Calcuta IV mostró que la concentración más baja indujo lesiones de 0.66, 0.90, 1.01 y 1.36 cm², mientras que la mayor concentración causó lesiones de 0.96, 1.29, 1.86 y 2.08 cm², respectivamente. Las lesiones desarrollaron mayor área necrótica en las áreas infiltradas con mayor concentración de PfAvr4-M (Figura 3.28). En conclusión, PfAvr4-I y PfAvr4-M indujeron áreas necróticas similares en los bananos resistentes conforme la concentración de proteína aumento de 150 a 300 ng.

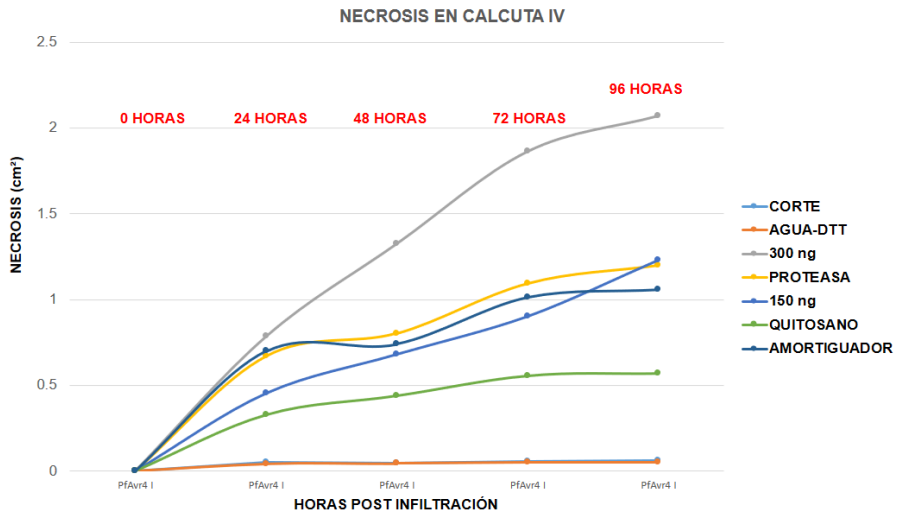


Figura 3.27 Curvas del área de necrosis causada por la infiltración de concentraciones crecientes de PfAvr4-I en hojas de banano resistente a *P. fijiensis*. A la derecha se indican las muestras infiltradas.

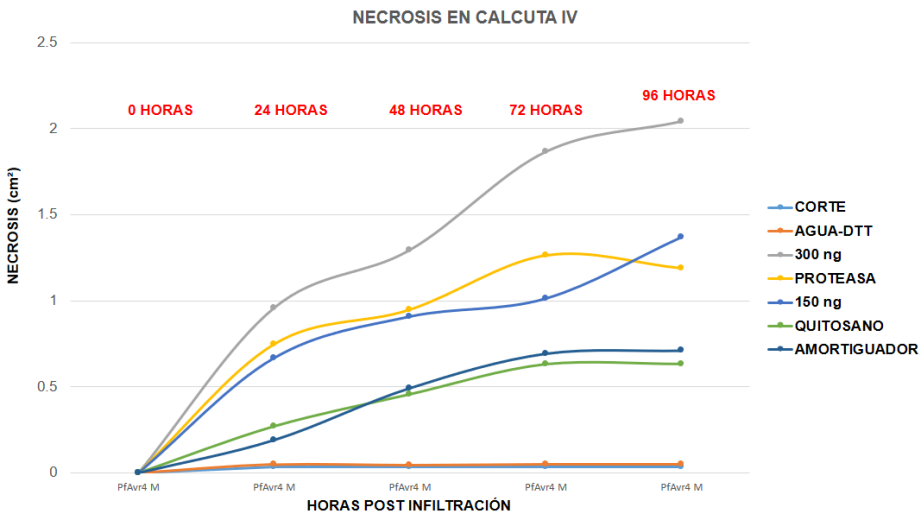


Figura 3.28 Curvas del área de necrosis causada por la infiltración de concentraciones crecientes de PfAvr4-M en hojas de banano resistente a *P. fijiensis*. A la derecha se indican las muestras infiltradas.

Los cortes (controles de necrosis inducida por daño) en las hojas generaron pequeñas áreas necróticas e igual ocurrió en las áreas infiltradas con el amortiguador de resuspensión de las proteínas. Sin embargo, en esos casos en la variedad resistente las lesiones necróticas siempre fueron menores a las ocasionadas por la infiltración de las proteínas electroeluidas PfAvr4-I o PfAvr4-M, o por el quitosano o la pronasa E. El quitosano generó lesiones necróticas propias de su función como inductor de la inmunidad disparada por PAMPs.

El registro fotográfico de las áreas infiltradas se realizó cada 24 horas, durante las 96 horas de duración del ensayo de infiltración (Figura 3.29).

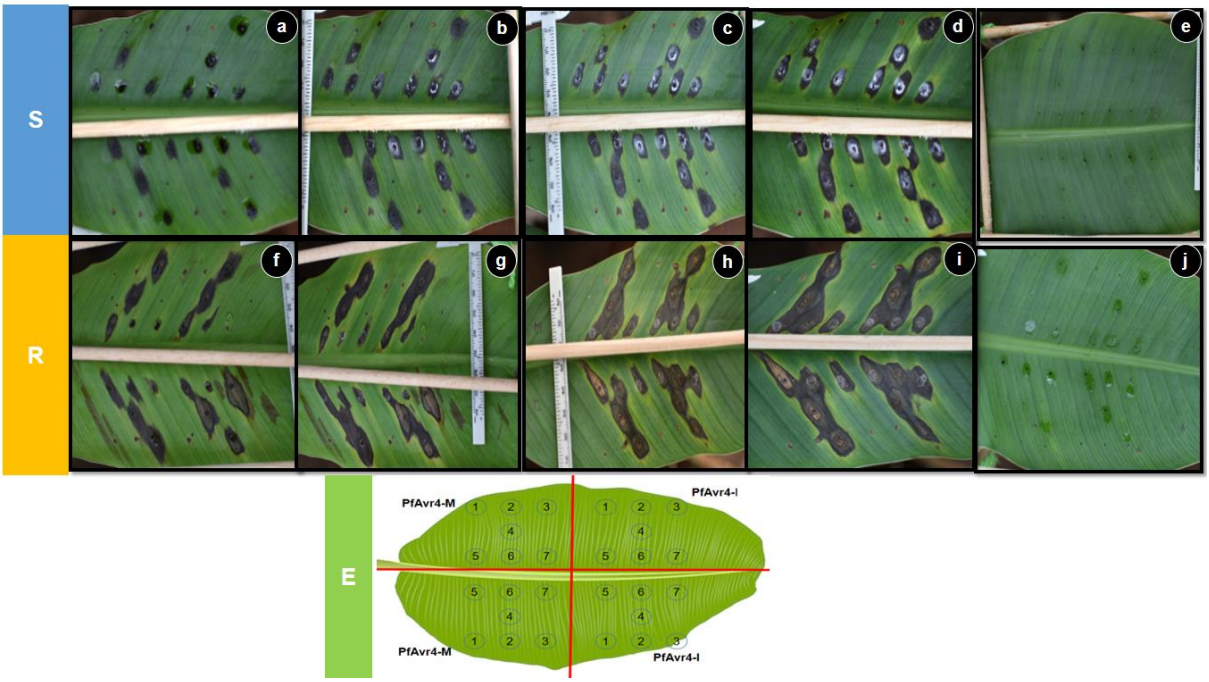


Figura 3.29 Registro fotográfico del desarrollo de la necrosis en hojas de banano durante un período de 96 h de infiltración con PfAvr4-M o PfAvr4-I. La barra de color azul ubicada a la izquierda de la figura, indica las hojas del banano susceptible (S) Enano Gigante infiltradas con PfAvr4-M y PfAvr4-I. La barra de color naranja indica las hojas del banano resistente (R) Calcuta IV infiltradas con PfAvr4-M y PfAvr4-M. La barra de color verde, señala el esquema (E) de la distribución de las muestras infiltradas en las hojas de los bananos resistentes y susceptibles. Los registros fotográficos de la necrosis se realizaron a las 24 (a y f), 48 (b y g), 72 (c y h) y 96 (d e i) horas. Los paneles e y j señalan el aspecto a las 96 h de hojas de banano susceptible (e) y resistente (j) inoculadas con las diferentes muestras. Loa números en el esquema (E) indican las muestras inoculadas en las hojas de banano: 1, control de corte; 2, agua con DTT; 3, 300 ng de proteína electroeluida; 4, Pronasa E; 5, 150 ng de proteína electroeluida; 6, quitosano; 7, amortiguador de resuspensión de las proteínas.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Efectores ortólogos de PfAvr4 de *P. fijiensis* han sido expresados de forma heteróloga y se han caracterizado parcialmente mediante ensayos moleculares y bioquímicos, *e.g.* experimentos de infiltración, análisis de protección contra actividad hidrolítica mediada por efectores Avr4, ensayos de precipitación con quitina u otros polisacáridos, co-transformación transitoria de Avr4 y proteínas de resistencia, sobreexpresión de genes de resistencia, expresión de proteínas de fusión y determinación estructural mediante cristalografía (Stergiopoulos *et al*., 2010; Kohler *et al*., 2016; Mesarich *et al*., 2016). En esos estudios se demostró que PfAvr4, tiene la capacidad de unirse a la pared celular de *Trichoderma viride* y de esta forma proteger a la pared celular fúngica de la acción de quitinasas secretadas por el hospedero. Además, se ha descrito que en presencia del cognado de resistencia, PfAvr4 genera una HR, lo cual sugiere la interacción entre el efector y el receptor (Stergiopoulos *et al*., 2010). Arango *et al*. (2016), infiltraron un concentrado del medio de cultivo de *P. pastoris* en plantas de banano resistentes y susceptibles a la SN; el infiltrado contenía una cantidad desconocida de PfAvr4-M recombinante. Las plantas resistentes desarrollaron una respuesta hipersensible (HR). Dada la HR observada, se discutió que las plantas resistentes poseen proteínas tipo NB-LRR de resistencia contra el agente causal de la SN, lo cual es lo que se espera, y que PfAvr4 pudiera estar protegiendo a la pared celular de *P. fijiensis* contra la hidrólisis causada por quitinasas del hospedero o bacterias que coexisten en la planta.

Diversos estudios bioquímicos, moleculares y bioinformaticos describen las características de las proteínas efectoras (Dalio *et al*., 2018). En este estudio, el análisis en el servidor SignalP 4.1 de la secuencia primaria de PfAvr4 identificó la presencia de un péptido señal de 21 aminoácidos en el N terminal de la proteína (Figura 3.3). Este resultado es consistente con los reportes de los efectores Avr4 de

P. fuligena y *C. fulvum* los cuales poseen un péptido señal en su N-terminal (Stergiopoulos *et al*., 2010; Kohler *et al*., 2016).

Las modificaciones post-traduccionales (MPT) en las proteínas tienen efectos fundamentales en su estructura y en su función dado que pueden modular interacciones proteína-proteína o rutas metabólicas completas. Según Duan y Walther (2015), después de ser sujetas a MPTs, las proteínas adquieren funciones fundamentales de regulación en diversas rutas metabólicas en comparación con las funciones que desempeñan cuando no han sido sujetas a tales MPTs. En cuanto a la interacción planta-patógeno, las MPTs son importantes para el sistema inmune de las plantas pues su ocurrencia resulta en modificaciones en las vías de señalización y que generan respuestas rápidas y apropiadas ante los patógenos (Withers y Dong, 2017). Por su parte, en los patógenos las MPTs son una estrategia de activación/inactivación de proteínas para detener o evadir la inmunidad del hospedero a través de las actividades de los efectores (Withers y Dong, 2017). En este estudio, la predicción *in silico* de motivos de PfAvr4 regulados por modificaciones post-traduccionales (Cuadro 3.1; Figura 3.5) mostró que la proteína contiene al menos tres motivos de fosforilación (residuos del 4 al 6, 66 al 69 y del 116 al 119) y uno de glicosilación (residuos del 100 al 103). Estos hallazgos son importantes porque pueden ser fundamentales en la regulación de la función de PfAvr4 y hasta antes de este estudio no se habían descrito. En estudios futuros se deberá determinar la relevancia funcional de tales motivos y de las modificaciones en PfAvr4 y su función en la interacción *P. fijiensis*-*Musa* sp.

Mucho se ha discutido acerca de la baja identidad que los efectores ortólogos poseen entre sus secuencias primarias de aminoácidos, por lo que la búsqueda de efectores basada solo en su secuencia de aminoácidos no es suficiente y por ello también se debería considerar el estudio de la conservación de sus estructuras tridimensionales (Dalio *et al*., 2018). En el caso de Pf-Avr4 de *P. fuligena*, ortólogo de PfAvr4 de *P. fijiensis*, Kohler *et al*. (2016), describieron su resolución estructural,

destacando la presencia de una α-hélice cercana al N terminal, además de cinco hojas β plegadas, representando así un 30 % en contenido de α hélices y β plegadas, con un 70 % de estructuras en bucles. Hasta antes de este estudio el PfAvr4 de *P. fijiensis*, no se había caracterizado a nivel estructural ni *in silico* ni experimentalmente. En este estudio, el análisis *in silico* por medio de I-Tasser (Figura 3.5), reveló que PfAvr4 de *P. fijiensis* tiene un plegamiento tridimensional consistente de cuatro hojas β plegadas y una α hélice, lo que representa un 16 % del total de la proteína, mientras que el 84 % restante corresponde a estructuras en bucles. Cabe destacar que la α hélice se localiza en el N terminal de la proteína, característica que comparte con las Pf-Avr4 de *P. fuligena* y CfAvr4 de *C. fulvum*. A diferencia de Pf-Avr4 de *P. fuligena*, los efectores PfAvr4 de *P. fijiensis* y CfAvr4 contienen una hoja β plegada menos (Figuras 3.8 y 3.9). Además, el alineamiento de PfAvr4 de *P. fijiensis* con ambas proteínas ortólogas mostró correlación en el patrón de conservación de α hélices y hojas β plegadas (Figuras 3.8 y 3.9). Esta observación apoya la propuesta de los autores quienes indican que se debe analizar la estructura tridimensional para afinar la búsqueda de efectores putativos de avirulencia (Dalio *et al*., 2018).

El análisis de PfAvr4 de *P. fijiensis* en la base de datos de InterPro, mostró que esta proteína posee un domino de unión a quitina (Figura 3.4) que comprende del aminoácido 33 al 105. Dicho módulo de unión ha sido descrito previamente en proteínas de unión a quitina, *e.g.* peritropina A, y en los ortólogos CfAvr4 de *C. fulvum* y Pf-Avr4 de *P. fuligena* (Boraston *et al*., 2004; Stergiopoulos *et al*., 2010). La función de este dominio ha sido analizada en ensayos de precipitación *in vitro* incubando con quitina y otros polisacáridos y ensayos de protección contra la hidrólisis de la pared fúngica mediada por quitinasas de *T. harzianum*. No obstante, el ensayo de protección de pared celular contra la hidrolisis por quitinasas no ha sido aplicado en los patógenos productores de los efectores Avr4, es decir, *C. fulvum*, *P. fuligena* y *P. fijiensis*. Esa prueba es importante dado que permitirá confirmar el papel de estas proteínas en sus respectivos patógenos.

En este trabajo, la expresión heteróloga de PfAvr4 de *P. fijiensis*, se consiguió en la cepa *E. coli* Rosetta-gami B, aunque previamente se intentó en las cepas de *E. coli* BL21, *E. coli* Rosetta II, *E. coli* Origami, *E. coli* Artic y *E. coli* Shuffle. En todos los casos se ensayaron diferentes condiciones de expresión, *e.g.* velocidad de agitación por minuto, volumen de cultivo, temperatura, tiempos de inducción, concentración de inductor y amortiguadores de lisis, entre otros. En el caso de las cepas BL21, Rosetta y Origami, no se observó la expresión de PfAvr4. En el caso de *E. coli* Artic, si se observó la producción de PfAvr4; sin embargo, la producción fue menor que en las cepas Shuffle y Rosetta-gami B. Lobstein *et al*. (2012) reportaron la generación de la cepa *E. coli* Shuffle, la cual coadyuva en el plegamiento de proteínas ricas en cisteínas a través de la oxidación de los grupos tioles en su citosol oxidante. PfAvr4 contiene diez residuos de cisteínas, por lo que el uso de *E. coli* Shuffle se consideró un buen candidato para la producción heteróloga. Recientemente Kohler *et al*., (2016) reportaron la estructura cristalográfica de la proteína recombinante Pf-Avr4 de *P. fuligena*. En este trabajo PfAvr4 de *P. fijiensis* fue expresado en *E. coli* Rosetta-gami B, la cual tiene como característica propia un citosol oxidante debido a la deleción de los genes que codifican para la tiorredoxina B y la glutatión reductasa (trxB/gor), dicha característica favorece el plegamiento de proteínas ricas en cisteínas. Además, en su cromosoma contiene genes que codifican para codones poco usuales en *E. coli*, pero de uso más frecuente en eucariotas, esto favorece la expresión de los ADNc exógenos y la expresión de la proteína deseada.

La secuenciación de aminoácidos de PfAvr4-I y PfAvr4-M confirmaron la presencia de ambas proteínas (expresión heteróloga); PfAvr4-I estuvo presente en cantidades bajas (Figura 3.21). Además, cuatro proteínas adicionales fueron identificadas en las bandas secuenciadas (Figura 3.21); tales proteínas son producto de contaminación durante el proceso de lisis de *E. coli*, de acuerdo con la identidad de los polipéptidos identificados en la secuenciación. Estos resultados sugieren que con el fin de obtener PfAvr4 como proteína única es necesario mejorar el proceso

de purificación, posiblemente mediante el incremento del número de lavados de la columna o agregar pasos de purificación como la cromatografía de exclusión molecular.

Arango *et al*. (2016), reportaron la expresión de PfAvr4 a partir de *P. pastoris* y su infiltración en plantas de bananos, no obstante, a pesar de generar HR en las plantas de banano resistentes a *P. fijiensis*, no se demostró que PfAvr4 estuviera pura o que hubiera sido sometida a algún proceso de purificación de proteínas. Solo se describe la filtración y concentración del medio de cultivo en columnas de filtración con tamaño de corte de 3 kDa. En este trabajo se caracterizó el efecto de diferentes concentraciones de PfAvr4-M o PfAvr4-I sobre accesiones resistentes y susceptibles de banano a *P. fijiensis.* Se observó HR en plantas resistentes a *P. fijiensis* infiltradas con las proteínas PfAvr4-M o PfAvr4-I y los péptidos co-purificados, este resultado sugiere que ambas proteínas son biológicamente activas y son consistentes con la hipótesis de la presencia de un cognado de resistencia que reconoce a PfAvr4-M (Arango *et al*., 2016). El resultado obtenido con PfAvr4-I, enfatiza la posibilidad de que el péptido señal y su conformación tridimensional, no afecten los residuos de aminoácidos de PfAvr4 que interactúan con el putativo cognado de resistencia.

Las áreas necróticas ocasionadas por PfAvr4-M o PfAvr4-I en las plantas resistentes aumentaron con la concentración de proteína infiltrada (150 o 300 ng), probablemente por el incremento en la interacción entre PfAvr4-M o PfAvr4-I y el cognado de resistencia. Las infiltraciones con PfAvr4-I o PfAvr4-M en las plantas susceptibles produjo lesiones necróticas desde las 24 h, pero los síntomas de HR (halo clorótico y amarillamiento del tejido) se observaron hasta las 72-96 h (Figura 3.29).

Las lesiones necróticas observadas en los bananos susceptibles, pudieron resultar de la interacción de ciertos dominios de las proteínas infiltradas con proteínas de la

célula vegetal, o por los compuestos presentes en el amortiguador y que pudieron interferir en el equilibrio osmótico de las células hospederas, produciendo estrés y su posterior respuesta. Otra posibilidad es que las lesiones necróticas resultaran al menos en parte por el corte causado en la hoja de banano durante la infiltración de PfAvr4, pero también debido al contacto entre PfAvr4 y FKBP en el retículo endoplásmico, esta asociación pudo aumentar la concentración de proteínas mal plegadas en este compartimento, resultando en la activación de la inmunidad disparada por estrés en el retículo endoplásmico (UPR, por sus siglas en inglés, Unfolded Protein Response; Fan *et al*., 2018). Esta respuesta ha sido descrita durante la interacción del efector PcAvr3a12 con su proteína blanco FKBP en *Arabidopsis thaliana* (Fan *et al*., 2018). Sin embargo, la respuesta inmune dependiente de UPR aún no ha sido estudiada en la interacción *P. fijiensis*-banano.

Se ha descrito que las plantas responden al estrés generando cambios en su metabolismo como una estrategia para superar este estado fisiológico, *e.g*. generación de ROS, modificaciones en la actividad de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), síntesis y dinámica de hormonas y la activación-represión de factores de transcripción (Rejeb *et al*., 2014). En nuestro estudio, es probable que las plantas de banano susceptibles al no contar con un receptor activador de inmunidad contra PfAvr4, utilicen algunos de los mecanismos descritos anteriormente para contrarrestar los efectos de la infiltración con el efector PfAvr4.

Durante el proceso de purificación de PfAvr4-M, se observó un péptido con un peso de ~ 28 kDa (Figura 3.20); se hipotetizó que este péptido era un producto de la dimerización de los monómeros de PfAvr4-M. Los ensayos de reducción y alquilación no lograron la disociación de la proteína de ~ 28 kDa (Figura 3.24). Szilágyi y Závodszky (2000) describieron que las características estructurales *e.g*. bajo peso molecular, número de cavidades internas en las proteínas, elevada densidad de empaquetamiento, grado de polaridad en la superficie proteica, incremento en el número de puentes de hidrógeno y salinos, aumento en el número

de aminoácidos hidrofóbicos y de enlaces iónicos entre aminoácidos y los metales presentes en la solución, son las que confieren termoestabilidad a las proteínas termófilas con respecto a sus ortólogas mesofílicas. En el caso de los ortólogos Avr4, se ha descrito que el contenido de cisteínas les brinda estabilidad estructural en el micro-ambiente de la interacción hospedero-patógeno rico en proteasas (van den Burg *et al*., 2001, 2003). Un análisis para evaluar la termoestabilidad de PfAvr4 y sus ortólogos, podría proporcionar más información de si estas proteínas resisten altas temperaturas, y si esto pudiera ser un factor que evite la disociación del dímero.

Una posibilidad que no puede descartarse para la formación del dímero de ~ 28 kDa es que durante la electroelución de PfAvr4-M, esta proteína se haya dimerizado a través de puentes de hidrógeno y por la interacción particular de sus residuos de aminoácidos tirosina, serina y triptófano, resultando en un dímero muy estable. Kohler *et al*. (2016) cristalizaron a Pf-Avr4 de *P. fuligena* en su forma dimérica (monómeros A y B), debido a que no consiguieron cristalizar al monómero. Su análisis mostró que la mayor estabilidad del dímero se debió a la interacción entre los monómeros A y B, la cual fue favorecida por puentes de hidrógeno entre los residuos de tirosina 72/A y 72/B, serina 84/A y triptófano 97/B y entre la serina 84/B y triptófano 97/A.

Por último, existe la posibilidad de que dicho péptido sea una proteína de *E. coli* que fue co-purificada con PfAvr4-M debido a que tiene alta afinidad con la resina de níquel usada para la purificación. Mokhonov *et al*., (2018) describieron que uno de los problemas más frecuentes durante el proceso de purificación de proteínas mediante el uso de IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography), se debe a la presencia de proteínas contaminantes, las cuales contienen un alto número de residuos de histidina e incluso arreglos en tándem, y debido a esto co-purifican con la proteína de interés; tal es el caso de la peptidil-prolil-isomerasa SlyD (también conocida como FKBP). En este estudio la proteína FKBP fue la más abundante en

la fracción purificada con el 46 %, mientras que, la proteína de interés constituyó el 17 % (Figura 3.21). La baja cantidad recuperada de la proteína de interés dificultó los análisis de interacción. Una estrategia para incrementar la recuperación de PfAvr4 es utilizar cepas que expresan etiquetas de unión a quitina fusionadas a las proteínas bacterianas de mayor producción *e.g*. SlyD, Can, ArnA y AceE, las cuales son detectadas como los contaminantes más comunes en las purificaciones IMAC. Las cepas de expresión que reúnen tal característica son *E. coli* NiCo21 (DE3) y NiCo22 (DE3), mediante estas cepas es factible purificar proteínas heterólogas usando cromatografía de afinidad en dos pasos, el primero de ellos IMAC y el segundo de interacción quitina-lectina (Robichon *et al*., 2011). Recientemente se describió la modificación genética de *E. coli* BL21 para generar la mutante SlyD/SlyX, la cual no expresa a las proteínas peptidil-prolil-isomerasa (FKBP) ni a la proteasa SlyX, esta cepa es interesante para la expresión de PfAvr4, dado que eliminaría la interferencia debida a SlyD, desafortunadamente, la cepa no es comercial.

Fan *et al*. (2018) describieron que el efector RXLR PcAvr3a12 interacciona en el retículo endoplásmico con su proteína blanco FKBP15-2, la cual es una peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa involucrada en la regulación de la inmunidad vegetal contra *P. capsici*. En nuestro trabajo, se expresó al efector PfAvr4 de *P. fijiensis* y como resultado de la expresión y purificación de la proteína heteróloga se encontró a FKBP de *E. coli*, aunque remota cabe la posibilidad de que PfAvr4 y FKBP hayan interaccionado debido a la conservación de su afinidad de reconocimiento adquirida a lo largo de su proceso evolutivo de efector-proteína blanco, tales como se observó en la interacción *P. capsici-A. thaliana*. Una diferencia entre PfAvr4 y PcAvr3a12, es que el primero es un efector apoplástico mientras que PcAvr3a12 es un efector intracelular, la localización de PfAvr4 dificultaría su asociación con FKBP como proteína intracelular. Sin embargo, es posible que al expresar a PfAvr4 en el citosol de *E. coli*, entonces, la interacción PfAvr4-FKBP se esté favoreciendo.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5. CONCLUSIONES

Se expresó de manera heteróloga a la proteína PfAvr4 de *P. fijiensis* en sus formas madura e inmadura. La purificación de la proteína recombinante y su secuenciación de aminoácidos por medio de LC-MS-MS confirmó la recuperación de PfAvr4-M o PfAvr4-I.

La proteína recombinante recuperada a partir de la electroelución mantuvo su actividad de efector, tal como demostraron los ensayos de infiltración en plantas de banano resistente a *P. fijiensis*. La infiltración de concentraciones crecientes de PfAvr4-M o PfAvr4-I (150 o 300 ng) también causó incrementos en el área necrótica conforme aumentó el tiempo de infiltración o la concentración de proteína. En contraste, la necrosis detectada en los controles de corte o el amortiguador de resuspensión de la proteína fue mucho menor a la generada por las infiltraciones de las proteínas electroeluidas. La aplicación de una proteasa o quitosano también causaron necrosis, esta característica apoya el que la respuesta de necrosis observada en las plantas resistentes, es una respuesta de la inmunidad innata vegetal contra las proteínas infiltradas. En las plantas susceptibles infiltradas, se observó daño, aunque este parece ser producto del estrés generado por la infiltración de PfAvr4 y la posible respuesta de inmunidad mediada por UPR en el retículo endoplásmico. Se observó que las lesiones necróticas son mayores en la variedad resistente (Calcuta IV) comparadas a las de los bananos susceptibles (Enano gigante), hecho que sugiere la presencia de una proteína de resistencia cuya identidad aún se desconoce en la variedad resistente.

5.1 PERSPECTIVAS

Con la proteína PfAvr4 recombinante purificada de *E. coli*, se deberá determinar su capacidad de unión específica a quitina, así como, su habilidad para proteger la

pared de *P. fijiensis* tal como ha sido descrito en *T. viride*.

Dado que PfAvr4-M y PfAvr4-I recombinantes y purificados a partir de *E. coli* Rosetta gami B han inducido la HR en plantas de banano, sugiriendo la conservación de su estructura nativa, entonces la cepa Rosetta gami B puede ser una plataforma amigable para la expresión de un mayor número de efectores proteicos.

Las proteínas expresadas PfAvr4-M y PfAvr4-I, pueden ser usadas para generar anticuerpos para realizar ensayos de inmunolocalización, apoyar análisis de proteómica de pared celular y profundizar los estudios de interacción *P. fijiensis-Musa acuminata*. Los estudios de inmunolocalización no sólo permitirán localizar PfAvr4 en *P. fijiensis* o durante la interacción *P. fijiensis-Musa* sp. sino que el acoplamiento de fluoroforos a PfAvr4 permitiría identificar el sitio de acción del efector dentro de la célula hospedero.

Los anticuerpos también pueden ser usados para ensayos de co-inmunoprecipitación que permitan explorar la interacción proteína-proteína. Potencialmente este análisis permitiría identificar a la o las proteínas que interactúan con PfAvr4 en el hospedero.

La secuenciación de esos péptidos pudiera permitir identificar putativas proteínas de resistencia. Una vez identificadas las putativas proteínas de resistencia, podrán clonarse sus secuencias codificantes y realizarse ensayos de sobreexpresión *in planta*.

BIBLIOGRAFÍA

Arango, I.R.E., C. Díaz-Trujillo, B. Dhillon, A. Aerts, J. Carlier, C.F. Crane, T.V. de Jong, I. de Vries, R. Dietrich, A.D. Farmer, C. Fortes Fereira, S. García, M. Guzman, R.C. Hamelin, E.A. Lindquist, R. Mehrabi, O. Quiros, J. Schmutz, H. Shapiro, E. Reynolds, G. Scalliet, M. Souza Jr, I. Stergiopoulos, T.A.J. Van der Lee, P.J.G.M. de Wit, M. Francoise Zapater, L. Harm Zwiers, I.V. Grigoriev, S.B. Goodwin y G.H.J. Kema (2016). Combating a global threat to a clonal crop: Banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (*Synonym Pseudocercosporafijiensis*) genomes reveal clues for disease control. *PLoS Genet*, 12 (8), e1005876.

Alakonya, A. E., J. Kimunye, G. Mahuku, D. Amah, B. Uwimana, A. Brown y R. Swennen (2018). Progress in understanding *Pseudocercospora* banana pathogens and the development of resistant *Musa* germplasm. Plant Pathology, 67, 759-770.

Bayer Cropscience (2005). Sigatoka negra [Online]. Disponible en: http://www.bayercropscience.com.mx/Bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/SigatokaDiseases BCS [Acceso 10 de diciembre 2014].

Belalcázar, S. y V. Merchan (1991). Capítulo VI: Control de enfermedades. El cultivo del Banano en el Trópico. (Belalcázar, S., Toro Meza, JC, Jaramillo, R. eds). *ICA, Manual de asistencia técnica*, (50), 241-297.

Bennett, R. y Arneson (2003). Black Sigatoka of bananas and plantains [Online]. Disponible en: http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/BlackSigatoka.aspx [Acceso 14 de mayo 2018].

Boraston, A. B., D. N. Bolam, H. J. Gilbert y G. J. Davies (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. Biochem J, 382: 769-781.

Boyd, L.A., C. Ridout, D. O´Sullivan, J. Leach y H. Leung (2013). Plant-pathogen

interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, 29 (4), 233-240.

Burgos-Canul, Y. (2013). Comparación de la expresión de genes en cepas de *Pseudocercosporafijiensis* aisladas de plantaciones de banano con y sin manejo de fungicidas. Tesis Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. 114 pp.

Campo Colima. (2012). Anexo de Plaguicidas Autorizados en Banano [Online]. Disponible en: http://www.campocolima.gob.mx/sitioSPRODUCTO/COEPLATANO/Documentos/plaguicidasplatano.pdf [Acceso 10 diciembre 2014].

Cañas-Gutierrez, G.P., A. Velásquez, J.M. Restrepo-Flórez, P. Rodríguez, C.X. Moreno y R. Arango (2009). Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Pseudocercospora fijiensis*. *Pest management science*, 65 (8), 892-899.

Carlier, J., E. Foure, F. Gauhl, D. Jones, P. Lepoivre, X. Mourichon, C. Pasberg-Gauhl y R. Romero (2000). Fungal diseases of the foliage. *Disease of Banana*, Abacá and enset. (DR Jones, ed.). CAB International, Wallingford, UK, 37-141.

Cavalcante, M. J., J. Escoute, J.P. Madeira, R.E. Romero, M.R. Nicole, L.C. Oliveira y J.L. Verdeil (2011). Reactive oxygen species and cellular interactions between *Pseudocercospora fijiensis* and banana. *Tropical Plant Biology*, 4 (2), 134-143.

Chakrabarti, A., T.R. Ganapathi, P.K Mukherjee y V.A Bapat (2003). MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. *Planta*, 216 (4), 587-596.

Chang, T. y I. Stergiopoulos (2015). Inter- and intra-domain horizontal gene transfer, gain-loss asymmetry and positive selection mark the evolutionary history of the

CBM14 family. *FEBS Journal*, 282 (10), 2014-2028.

Chuc-Uc, J., L. Brito, B. Canto, M. Tzec, C. Rodríguez, L. Peraza, S. Peraza, A. James, C. Cruz, L. Peña e I. Islas-Flores (2011). The *in vitro* secretome of *Pseudocercospora fijiensis* induces cell death in banana leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (6), 572-578.

Churchill, A.C. (2011). *Pseudocercospora fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12 (4), 307-328.

Contreras, M. (1983). El chamusco negro: una nueva enfermedad de la hoja de los bananos. *Revista de geografía agrícola*. 4, 61-102.

Craenen, K. (1998). Black Sigatoka disease of banana and plantain. *A Reference Manual*. International Institute of Tropical Agriculture. Ibadan, Nigeria. pp. 60.

Craenen, K. y R. Ortiz (2003). Genetic improvement for a sustainable management of resistance, pp 181-198. In: Jacome L; Lepoivre P; Marín D; Ortiz R; Escalante JV (eds). *Pseudocercospora fijiensis* leaf spot diseases of bananas: present status and Outlook. *Proceedings of the 2nd International Workshop on Pseudocercospora leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 mayo 2002. INIBAP, Roma. Agronomía Costarricense*, 30 (1), 35-41.

Dalio, R. J. D., J. Herlihy, T. S. Oliveira, J. M. McDowell y M. Machado (2018). Effector Biology in Focus: A Primer for Computational Prediction and Functional Characterization. Molecular Plant-Microbe Interactions, Vol. 31, No. 1, 22-33.

Daly, J. M (1976). The carbon balance of diseased plants: changes in respiration, photosynthesis and translocation. En Physiological Plant Pathology. pp. 450-479.

Dang, J. L., D. M. Horvath y B. J. Staskawicz (2013). Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. Science, Vol. 341, 746-751.

Duan, G. y D. Walther (2015). The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. PLOS computational biology, 11 (2): e1004049.

Escobar-Tovar, L., M. Guzmán-Quesada, J. Sandoval-Fernández y M. Gómez-Lim (2015). Comparative analysis of the *in vitro* and *in planta* secretomes from *Mycosphaerella fijiensis* isolates. Fungal biology, 119 (2015) 447-470.

Fan, G, Y. Yang, T. Li, W. Lu, Y. Du, X. Qiang, Q. Wen y W. Shan (2018). A *Phytophthora capsici* RXLR Effector Targets and Inhibits a Plant PPlase to Suppress Endoplasmic Reticulum-Mediated Immunity. Molecular Plant, 11, 1067-1083.

Fouré, E. (1985). Black leaf streak disease of bananas and plantains (*Pseudocercospora fijiensis* Morelet), study of the symptoms and stages of the disease in Gabon*. IRFA*. Paris, France. pp. 23.

Friesen, T. (2016). Combating the Sigatoka disease complex on banana. *PLoS Genet*, 12 (8), e1006234.

Fullerton, R.A. y R.H. Stover (1990). Sigatoka leaf spot diseases of bananas*. Proceedings of an international workshop held at San José, Costa Rica, 28 March-1 April 1989 INIBAP*, Montpellier, France, pp. 374.

González, R., E. Bustamante, P. Shannon, S. Okumoto y G. Leandro (1996). Evaluación de microorganismos quitinoliticos en el control de la Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis*) en banano. *Manejo integrado de plagas*, 40, 125-128.

Grover, A. (2012). Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews Plant Sciences*, 31 (1), 57-73.

Hernández, E., E. Garrido, L. Iracheta, R. Gracia, B. Canto y P. Hernández (2016). Field evaluation of black Sigatoka (*Pseudocercospora fijiensis* Morelet) tolerance of banana genotypes at Soconusco, Chiapas, Mexico. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 3 (1), 15-25.

Heukeshoven J. y Dernick R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. Electrophoresis. 6, (3): 103-112.

Huang, J., G. Lianfeng, Z. Ying, Y. Tingxiu, K. Guanghui, K. Liang, G. Baodian, Q. Min, W. Yang, J. Maofeng, X. Weiman, Y. Wenwu, W. Zhe, Z. Zhengguang, Z. Xiaobo, G. Mark, W. Yuanchao y D. Suomeng (2017). An oomycete plant pathogen reprograms host pre-mRNA splicing to subvert immunity. Nature communications, 8: 2051.

Jia, B. y C. O. Jeon. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biol*. 6: 160196. http://dx.doi.org/10.1098/rsob.160196.

Jiang, S., Y. Jian, M. Ka-Wai, Z. Huanbin, S. Jikui, Y. H. Sheng y M. Wenbo (2013). Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. PLoS Pathog, 9 (10): e1003715.

Joosten, M. H., R. Vogelsang R, T.J. Cozijnsen, M.C. Verberne y P.J.G.M. de Wit (1997). The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvent Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. *The Plant Cell*, 9 (3), 367-379.

Joosten, M., T. Cozijnsen y P.J.G.M. de Wit (1994). Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulance gene. *Nature*.

367, 384-386.

Kosky, R. G., B. Chong Pérez, J. López Torres, M. Reyes, I. Bermúdez-Caraballoso, N. Montalvo Martín y M. Leiva-Mora (2010). Plantain (*Musa* spp. Cv. ´Navolean´ AAB) transgenic plants from *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of embryogenic cell suspensions. *Biotecnología Vegetal*, 10 (4), 209-218.

Kohler, A. C., Li-Hung Chen, N. Hurlburt, A. Salvucci, B. Schwessinger, A. J. Fisher y I. Stergiopoulos (2016). Structural Analysis of an Avr4 Effector Ortholog Offers Insight into Chitin Binding and Recognition by the Cf-4 Receptor. The Plant Cell, Vol. 28: 1945-1965.

Kovács, G., L. Sági, G. Jacon, G. Arinaitwe, J. P. Busogoro, E. Thiry, H. Strosse, R. Swennen y S. Remy (2012). Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana (´Gros Michel`, AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease. Transgenic Res 22: 117-130.

Leenaars, M. y C. Hendriksen (2005). Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: Evaluation and recommendations. *Ilar Journal*, 46 (3), 269-279.

Lepoivre, P., J. Busogoro, J. Etame, A. El Hadrami, J. Carlier, G. Harelimana, X. Mourichon, B. Panis, A. Riveros, G. Sallé, H. Strosse y R. Swennen (2003). *Pseudocercospora fijiensis* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Banana-*Pseudocercospora fijiensis* interactions. *In 2nd international workshop held in San José, Costa Rica*. pp. 151-159.

Libera, Lo Presti. y R. Kahmann (2017). How filamentous plant pathogen effectors are translocated to host cells. Current opinion in plant biology, 38: 19-24.

Lobstein, J., C. A Emrich, C. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs y M. Berkmen. (2012). Shuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding

disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial cell factories*. 11: 56, http://www.microbialcellfactories.com/content/11/1/56.

Manzo, G., S. Guzmán, M. Rodríguez, A. James y M. Orozco (2005). Biología de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23, 87-96.

Marín, D.H., R.A. Romero, M. Guzmán y T.B. Sutton (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87 (3), 208-222.

Menon, R. (2016). Banana breeding. *In Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement. Springer Singapore*, . 13-14 pp.

Merchan, V. (2000). Prevención y manejo de la Sigatoka negra. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. *Boletín informativo del Instituto Colombiano Agropecuario. Segunda edición. Manizales*, Diciembre de 2000. pp. 30.

Meredith, D. S. y J.S. Lawrence (1969). Black leaf streak disease (*Pseudocercospora fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the British Mycological Society*, 52 (3), 459-476.

Mesarich, C. H., I. Stergiopoulos, H.G. Beenen, V. Cordovez, Y. Guo, M. Karimi Jashni y P.J.G.M. de Wit (2016). A conserved proline residue in Dothideomycete Avr4 effector proteins is required to trigger a Cf-4-dependent hypersensitive response. *Molecular Plant Pathology,* 17 (1), 84-95.

Mokhonov, V. V., E.A. Vasilenko, E.N. Gorshkova, I. V. Astrakhantseva, D. V. Novikov y V. V. Novikov (2018). SlyD-deficient *Escherichia coli* strains: A highway to contaminant-free protein extraction. Biochemical and Biophysical Research Communications, 499 (2018) 967-972.

Muñoz, G. (2015). Efecto del anticuerpo policlonal anti-HF1 en el crecimiento *in vitro* de *Pseudocercospora fijiensis*. Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico Superior de los Ríos. 52 pp.

News Medical Life Sciences. (2014). What is an antibody? [Online]. Disponible en: http://www.news-medical.net/health/What-is-an-Antibody.aspx.pdf. [Acceso 17 octubre 2016].

Novimmune. (2016). Science antibodies [Online]. Disponible en: http://www.novimmune.com/science/antibodies.html. [Acceso 26 octubre 2016].

Orozco-Santos, M., J. Farías-Larios, G. Manzo-Sánchez y S. Guzmán-González (2001). La Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis* Morelet) en México. *INFOMUSA*, 10 (1), 33-37.

Patiño, L. F., E. Bustamante y L.M. Salazar (2007). Efecto de sustratos foliares sobre la Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis* Morelet) en banano (*Musa paradisiaca* L.) y banano (*Musa acuminata* Colla). *Agricultura técnica*, 67 (4), 437-445.

Ploetz, R. (2004). Diseases and pests: A reiew of their importance and management. InfoMusa, vol. 13, No. 2.

Rejeb, I. B., V. Pastor y B. Mauch-Mani (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: Molecular mechanisms. Plants, 3, 458-475.

Remy, S., A. Buyens, B.P.A. Cammue, R. Swennen y L. Sági (1998). Production of transgenic banana expressing antifungal proteins*. In II International Symposium on Banana: I International Symposium on Banana in the Subtropics*, 490, 433-436.

Robichon, C., J. Luo, T. B. Causey, J. S. Benner y J. C. Samuelson (2011). Engineering *Escherichia coli* BL21 (DE3) Derivative Strains To Minimize *E. coli* Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity

Chromatography. Applied and Environmental Microbiology, Vol 77, No. 13, 4634-4646.

Rodríguez-Caamal, D., J. Ruiz, I. Islas-Flores, G. Ramírez y B. Canto (2010). Un hongo mata bananos. *Memorias del primer foro científico juvenil 2010. 2, 27-31*. Consejo Nacional de Ciencía y Tecnología, Mérida, Yucatán.

Romero, R. A., L. Jacome, P. Lepoivre, D. Marín, R. Ortiz, R. Romero y J.V. Escalant (2003). The spread, detection and impact of black leaf streak disease and other *Pseudocercospora* species in the 1990s. *In Pseudocercospora leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on Pseudocercospora leaf spot diseases held in San Jose, Costa Rica on 20-23 May 2002.* (pp. 21-24). International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP).

Rosano, G. L. y E. A. Ceccarelli. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 5. N. 172.

Roux, N. S., H. Strosse, B. Panis, J. Dolezel, M.S. Jain y R. Swennen (2004). Banana improvement: Cellular, molecular biology, and induced mutations. Enfield, NH: *Science Publishers, Inc*.

Sela-Culang I., V. Kunik y Y. Ofran (2013). The structural basis of antibody-antigen recognition. *Frontiers in immunology*, 4, 1-13.

Selin, C., T. R. de Kievit, M. F. Belmonte y F. Dilantha (2016). Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: Progress and challenges. Frontiers in Micribiology, 7: 600. doi: 10.3389/fmicb.2016.00600.

SIAP. (2015). Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera [Online]. Disponible en: http://www.siap.sagarpa.gob.mx. [Acceso 20 noviembre 2015].

Sowmya, H. D., T.R. Usharani, C. Sunisha y S. Mohandas (2016). Engineering Resistance to Sigatoka. In Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement. *Springer Singapore*. pp. 227-236

Stergiopoulos, I., H.A. van den burg, B. Ökmen, H.G. Beenen, S. van Liere, G.H. Kema y P.J.G.M de Wit (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (16), 7610-7615.

Stergiopoulos, I., V. Cordovez, B. Ökmen, H.G. Beenen, G.H. Kema y P.J.G.M. de Wit (2014). Positive selection and intragenic recombination contribute to high allelic diversity in effector genes of *Pseudocercospora fijiensis*, causal agent of the black leaf streak disease of banana. *Molecular Plant Pathology*, 15 (5), 447-460.

Stover, R. H. y J.D. Dickson (1976). Banana leaf spot caused by *Pseudocercospora musicola* and *P. fijiensis* var. difformis a comparision of the first Central American epidemics. *FAO Plant Protection Bulletin*, 24, 36-42.
Stover, R. (1980). Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant Disease*, 64 (8), 750-756.

Swennen y S. Remy (2013). Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana (´Gros Michel´, AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease. *Transgenic Research*, 22 (1), 117-130.

Szilágyi y P. Závodszky (2000). Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. Structure, 8: 493-504.

Toruño, T. Y., I. Stergiopoulos y G.L. Coaker (2016). Plan-Pathogen Effectors: Cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annual Review of Phytopathology*, 54 (1), 419-441.

Tripathi, N. K. (2016). Production and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*. *ChemBioEng Rev*. 3, (3), :116-133.

van den Burg, H. A., P.J.G.M. de Wit y J. Vervoort (2001). Efficient $^{13}C/^{15}N$ double labeling of the avirulence protein AVR4 in a methanol-utilizing strain (Mul +) of *Pichia pastoris*. *Journal Biomolecular NMR*, 20 (3), 251-261.

van den Burg, H. A., C. A. Spronk, S. Boere, M. A. Kennedy, J. P. Vissers, G. W. Vuister, P. J. de Wit y J. Vervoort (2004). Binding of the Avr4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions: the chitin-binding site of Avr4 represents a novel binding site on the folding scaffold shared between the invertebrate and the plant chitin-binding domain. J. Biol. Chem, 279: 16786-16796.

van den Burg, H. A., S. Harrison, M. Joosten, J. Vervoort y P.J.G.M. de Wit (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19 (12), 1420-1430.

van den Burg, H. A., C. Spronk, S. Boeren, M. Kennedy, J. Vissers, G. Vuister, P.J.G.M. de Wit y J. Vervoort (2004). Binding of the Avr4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions: the chitin-binding site of Avr4 represents a novel binding site on the folding scaffold shared between the invertebrate and the plant chitin-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (16), 16786-16796.

van de Burg, H. A., N. Westerink, K. Francois, R. Roth, E. Woestenenk, S. Boeren, P.J.G.M. de Wit, M. Joosten y J. Vervoort (2003). Natural disulfide bond-disrupted mutants of Avr4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4 mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (30), 27349-27346.

van Esse, H. P., M. Bolton, I. Stergiopoulos, P.J.G.M. de Wit y B. Thomma (2007). The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulance factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20 (9), 1092-1101.

Vishnevetsky, J., T.L. White Jr, A.J Palmateer, M. Flaishman, Y. Cohen, Y. Elad, M. Velcheva, U. Hanania, N. Sahar, O. Dgani y A. Perl (2011). Improved tolerance toward fungal disease in transgenic Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. Grand Nain. *Transgenic research*, 20 (1), 61-72.

Vuylsteke, D., R. Ortiz, R. Ferris y J. Crouch (1997). Plantain improvement. *Plant Breeding Reviews*, 14, 267-320.

Withers, J. y X. Dong (2017). Post-translational regulation of plant immunity. Current opinion in pant biology, 38: 124-132.