Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL TRANSCRIPTOMA DE CONIDIOS DE *Pseudocercospora fijiensis* PRODUCIDOS *in vitro*

Tesis que presenta:

GEMALY ELISAMA EK HERNÁNDEZ

En opción al título de

MAESTRA EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México
2019

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

CICY

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Gemaly Elisama Ek Hernández** titulado **"ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL TRANSCRIPTOMA DE CONIDIOS DE *Pseudocercospora fijiensis* PRODUCIDOS *in vitro*"** fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Unidad de Biotecnología, en la línea de investigación de Agrobiotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y la Dra. Ingrid Aileen O'Connor Sánchez, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro. Este trabajo forma parte del proyecto de Ciencia Básica "Enfoque agrogenómico en el estudio de la Sigatoka negra", clave 220957, financiado por el CONACYT.

Atentamente:

Dra. Clelia De la Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 8 de mayo de 2019.

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 de Yucatán, 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:

GEMALY ELISAMA EK HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca núm. 619246 otorgada, con la cual realicé la Maestría en Ciencias Biológicas opción Biotecnología.

Al proyecto “Enfoque agrogenómico en el estudio de la Sigatoka negra” con clave 220957, por el financiamiento otorgado para llevar a cabo este trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. (CICY), en especial a la unidad de Biotecnología por el uso de sus equipos de laboratorio e instalaciones.

La presente tesis se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Microbiana del CICY, bajo la asesoría de Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y la Dra. Ingrid Aileen O'Connor Sánchez a quienes agradezco el apoyo, la asesoría y el tiempo brindado en el desarrollo de esta investigación.

A los integrantes de mi comité tutorial, de revisión de tesis y examen de grado: Dra. Blondy Beatriz Canto Canché, Dra. Ingrid Aileen O'Connor Sánchez, Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores, Dr. Max Mizrain Apolinar Hernández, Dr. Roberto Vázquez Euán y al Dr. Jairo Cristóbal Alejo, por todos los comentarios para enriquecer este trabajo de investigación.

A la Dra. Elsa Beatriz Góngora Castillo y a la Ing. Karla Gisel Carreón Anguiano, por su apoyo en las herramientas bioinformáticas empleadas en la tesis.

A los técnicos de laboratorio: Mtro. Bartolomé Humberto Chi Manzanero y al Mtro. Miguel Alonso Tzec Simá, por todo su apoyo en las técnicas de laboratorio y consejos.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad y consejos durante mi estancia, en especial a la Ing. Karla Gisel Carreón Anguiano por sus conocimientos transmitidos, Br. Juan Timoteo Méndez Díaz, Lic. José Rufino Gómez Tah, Ing. Jewel Nicole Anna Todd.

DEDICATORIAS

A Dios porque todo lo que soy es gracias a Él.

A mi esposo Jorge Luis Ek Chim por su amor incondicional y consejos.

A mi madre Marisela Hernández Guzmán y padre Rigoberto Ek Uc, por su amor, enseñanzas, pero sobre todo por creer en mí.

“Encomienda a Jehová tu camino. Y confía en él; y él hará”

Salmos 37: 5

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS v

ÍNDICE DE FIGURAS vii

ABREVIATURAS xi

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO I 3

ANTECEDENTES 3

1.1. Generalidades del plátano y el banano 3

1.1.1. Producción de banano y plátano en México 4

1.2. *Pseudocercospora* 5

1.2.1. Especies de *Pseudocercospora* que afectan a *Musa* 6

1.3. Sigatoka negra 7

1.3.1. *Pseudocercospora fijiensis*: El agente causal de la Sigatoka negra 8

1.3.1.1. Sigatoka negra en México 9

1.3.2. Infección 9

1.3.3. Sintomatología 11

1.3.4. Estrategias de control 12

1.4. Interacción planta-patógeno. 15

1.4.1. Nutrición de los patógenos 18

1.5. Transcriptómica 19

1.5.1. Técnicas empleadas para obtener perfiles de expresión génica 19

1.5.2. Técnica RNA-Seq 20

1.5.3. Estudios enfocados en transcriptomas de *Pseudocercospora* 20

1.6. Estudios enfocados en conidios 23

JUSTIFICACIÓN. 30

OBJETIVO GENERAL 32

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32

DIAGRAMA EXPERIMENTAL 33

CAPÍTULO II 35

MATERIALES Y MÉTODOS. 35

2.1. Secuenciación 35

2.2. Análisis bioinformático 35

2.2.1. Preparación de las lecturas: análisis de calidad 35

2.2.2. Ensamblaje y alineamiento de los transcritos 36

2.2.3. Identificación de genes expresados: anotación génica 36

2.3. Selección de genes para análisis *in vitro* 37

2.3.1. Evaluación de genes para determinar si son parte del genoma esencial ("core") o parte del dispensoma 38

2.3.2. Identificación *in silico* de efectores putativos en el transcriptoma de conidios en germinación de *P. fijiensis* 40

2.3.3. Evaluación por RT-PCR en tiempo real de la expresión de efectores putativos 40

CAPÍTULO III 45

RESULTADOS 45

3.1. Análisis de calidad de las secuencias de nucleótidos 45

3.2. Ensamblaje y alineamiento de los transcritos 47

3.3. Identificación de genes expresados: anotación génica 50

3.4. Evaluación de algunos genes para determinar si son parte del genoma esencial ("core") o parte del dispensoma 54

3.5. Expresión de tres efectores putativos en diferentes condiciones de crecimiento de *P. fijiensis* 63

CAPÍTULO IV 71

DISCUSIÓN 71

CAPÍTULO V 83

CONCLUSIONES 83

BIBLIOGRAFÍA. 85

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Características morfológicas del estado anamorfo de *P*. *musae, P*. *eumusae* y *P*. *fijiensis* 6

Cuadro 1.2 Versión 2 del ensamblaje del genoma de *P*. *fijiensis* 8

Cuadro 1.3 Versión 2 de la anotación del genoma nuclear de *P*. *fijiensis* 9

Cuadro 1.4 Expresión de los transcriptos de mayor importancia en el trabajo de investigación realizado por Sharma *et al*. (2016) 25

Cuadro 2.1 Cebadores utilizados en PCR punto final 39

Cuadro 2.2 Cebadores utilizados para el análisis de RT-PCR en tiempo real de algunos efectores potenciales de *P*. *fijiensis*. 42

Cuadro 3.1 Resumen del análisis de calidad de las secuencias del transcriptoma de los conidios de *P. fijiensis*..... 47

Cuadro 3.2 Resumen del ensamblaje *de novo* y el alineamiento de los transcritos con el genoma de *P. fijiensis* reportado..... 49

Cuadro 3.3 Genes no representados en el genoma reportado de *P. fijiensis*..... 53

Cuadro 3.4 Genes relacionados con la conidiogénesis de *P. fijiensis* 54

Cuadro 3.5 Genes relacionados con la germinación conidial de *P. fijiensis* 54

Cuadro 3.6 Genes relacionados o potencialmente relacionados con la patogenicidad de *P. fijiensis*..... 54

Cuadro 4.1 Características de los efectores putativos encontrados en el transcriptoma de conidios de *P*. *fijiensis*..... 77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Ciclo de vida de *P. fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra de *Musa* spp. 11

Figura 1.2 Etapas de la enfermedad Sigatoka negra 12

Figura 3.1 Gráfico de la distribución del tamaño de las lecturas de la secuenciación del transcriptoma de conidios de *Pseudocercospora fijiensis* 46

Figura 3.2 Número y longitud de los contigs generados con el programa Trinity..... 48

Figura 3.3 Identificación de homólogos para los 2424 contigs y 77 contigs del transcriptoma de conidios de *Pseudocercospora fijiensis* 51

Figura 3.4 Ontología génica de los 2205 contigs que alinearon con el genoma de *P. fijiensis* y tuvieron homólogos en la base de datos no redundante de proteínas del National Center for Biotechnology Information (NCBI)…….....52

Figura 3.5 Ontología génica de los 71 contigs que no alinearon con el genoma de *P. fijiensis*, pero sí tuvieron homólogos en la base de datos no redundante de proteínas del National Center for Biotechnology Information (NCBI) 53

Figura 3.6 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 81) con homología con una subunidad 1 del citocromo c oxidasa a partir de ADN genómico..... 55

Figura 3.7 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 1942) con homología con una proteína 22 relacionada con la autofagia (Atg*22*) a partir de ADN genómico 56

Figura 3.8 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 929) sin homología con ninguna secuencia reportada a partir de ADN genómico..... 57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.9 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 625) sin homología con ninguna secuencia reportada a partir de ADN genómico..... 58

Figura 3.10 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 612) sin homología con ninguna secuencia reportada a partir de ADN genómico..... 58

Figura 3.11 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 1637) sin homología con ninguna secuencia reportada a partir de ADN genómico..... 59

Figura 3.12 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 605) con homología con una proteína hipotética a partir de ADN genómico..... 60

Figura 3.13 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 1478) con homología con una proteína hipotética a partir de ADN genómico..... 61

Figura 3.14 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 754) con homología con una proteína hipotética a partir de ADN genómico..... 61

Figura 3.15 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 1172) con homología con una proteína hipotética a partir de ADN genómico..... 62

Figura 3.16 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 1009) con homología con una proteína hipotética a partir de ADN genómico..... 62

Figura 3.17 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 379) con homología con una proteína hipotética a partir de ADN genómico..... 63

Figura 3.18 Fotografías del microscopio óptico de conidios de *P. fijiensis* en germinación……..64

Figura 3.19 Electroforesis en gel de 2% de agarosa de las extracciones de ARNs..... 65

Figura 3.20 Electroforesis en gel de 2% de agarosa de muestras de PCR que amplificaron un fragmento de actina a partir de ADN genómico y ADNc..... 65

Figura 3.21 Análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real del efector putativo del contig 373 en *P. fijiensis* crecido en diferentes condiciones..... 67

Figura 3.22 Análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real del efector putativo del contig 376 en *P. fijiensis* crecido en diferentes condiciones..... 68

Figura 3.23 Análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real del efector putativo del contig 649 en *P. fijiensis* crecido en diferentes condiciones..... 69

ABREVIATURAS

A, adenina

ADN, ácido desoxirribonucleico

ADNc, ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla, cDNA

ANOVA, análisis de varianza

ARN, ácido ribonucleico

ARNm, ácido ribonucleico mensajero

Atg7, proteína 7 relacionada con la autofagia

Atg8, proteína 8 relacionada con la autofagia

Atg15, proteína 15 relacionada con la autofagia

Atg22, proteína 22 relacionada con la autofagia

Avr, avirulencia

BLAST, Basic Local Alignment Search Tool (herramienta básica de búsqueda de alineación local)

C, citosina

CAG8, gen regulador de proteínas G involucrado en la conidiogenésis

CFEM, Common in several Fungal Extracelular Membrane (dominio común en varias membranas extracelulares de hongos)

CHI, quitinasa

CoA, coenzima A

cv., cultivar

DE, desviación estándar

EDTA, ácido etilendiaminotetraacético

EST, Expressed Sequence Tag (marcador de secuencia expresada)

ETI, Effector Triggered Immunity (inmunidad desencadenada por efectores)

Foc, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

G, guanina

GLU, β-1,3-glucanasa

GO, Gene Ontology (ontología de genes)

GPD, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GPI, glucosilfosfatidilinositol

h, hora/Horas

H_2O_2, peróxido de hidrógeno

IDT, Integrated DNA Technologies (tecnologías de ADN integradas)

JGI, Joint Genome Institute (instituto de genoma conjunto)

LSD, diferencia mínima significativa

MAMPs, Microbe Associated Molecular Patterns (patrones moleculares asociados a microorganismos)

mL, mililitro

NCBI, National Center for Biotechnology Information (centro nacional de información biotecnológica)

NGS, Next-Generation Sequencing (secuenciación de nueva generación)

PAL, fenilalanina amoniaco liasa

PAMPs, Pathogen Associated Molecular Patterns (patrones moleculares asociados a patogenos)

PCR, Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PDA, Potato Dextrose Agar (agar de papa y dextrosa)

PDB, Potato Dextrose Broth (caldo de papa y dextrosa)

POX, peroxidasa

PR1, proteasa tipo subtilisina

PTI, Immunity Triggered by PAMPs (inmunidad desencadenada por PAMPs)

R, proteína de resistencia

RNA-Seq, RNA-Sequencing (secuenciación de ARN)

ROS, Reactive oxygen species (especies reactivas de oxigeno)

RT-PCR, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

SAR, resistencia sistémica adquirida

spp., indica que se trata de varias o todas las especies del mismo género

sp., significa que no se ha determinado la especie

SSGA, gen que codifica una hidrofobina

T, timina

TAE, amortiguador Tris, Ácido Acético, EDTA

TEF, factor de elongación 1-α

Tm, temperatura de fusión

TRY, gen involucrado en la biosíntesis de triptófano

RESUMEN

La Sigatoka negra es actualmente la enfermedad más importante que afecta a las regiones productoras de *Musa* spp. en el mundo. Esta enfermedad es causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*, anteriormente conocido como *Mycosphaerella fijiensis*. El hongo se reproduce tanto de forma sexual por ascosporas, como asexual por conidios. Ambas estructuras reproductivas son infectivas y determinan la dispersión de la enfermedad a larga y corta distancia. La mayoría de las investigaciones al usar como modelo de estudio a los conidios se han enfocado en conocer los genes relacionados con su formación; proceso llamado conidiogénesis. Existen pocos trabajos que se hayan enfocado en identificar genes de los conidios que participen en la patogénesis, no obstante que, muchos efectores y factores de patogenicidad pueden ser particulares en cada etapa de desarrollo de los patógenos. En este trabajo de investigación se presenta el análisis de un transcriptoma obtenido durante la germinación de conidios de *P*. *fijiensis* para identificar genes relacionados con la conidiogenésis y con la patogenicidad.

A partir de una lista de 105 posibles efectores presentes en el genoma de *P*. *fijiensis*, los cuales están disponibles en la base de datos del *Join Genome Intitute*, se identificaron cinco posibles efectores en el transcriptoma de conidios de *P*. *fijiensis* y de los cuales se analizó la expresión de tres de ellos, en muestras de ADNc a partir micelio crecido en medio de cultivo líquido de papa-dextrosa (PDB), conidios colocados a germinación (0 h), conidios de 8 h en germinación y conidios de 16 h en germinación, ADNc de la interacción de *P*. *fijiensis* con *T*. *harzianum* (1, 3, 7 días), y ADNc de la interacción de *P*. *fijiensis*-*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 (mezcla de ADNc de los días 3, 4 y 9, y mezcla de los días 20, 21, 22 y 23). Estos efectores putativos fueron nombrados contig 373, contig 376 y contig 649. La expresión de los posibles efectores putativos contig 373 y contig 376 fue variable en las diferentes condiciones de cultivo de *P. fijiensis*, mientras que el contig 649 únicamente se observaron en la interacción de *P*. *fijiensis*-*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 (mezcla de los días 20, 21, 22 y 23). También se identificaron transcritos cuyos genes no están representados en el genoma público de *P*. *fijiensis*, contribuyendo por lo tanto al conocimiento del pangenoma de este hongo.

ABSTRACT

Black Sigatoka is currently the most important disease affecting the production regions of *Musa* spp. in the world. This disease is caused by the fungus *Pseudocercospora fijiensis*, previously known as *Mycosphaerella fijiensis*. The fungus has reproduction both sexually by ascospores, and asexually by conidia. Both reproductive structures are infective and determine the dispersion of the disease at long and short distances. Most of the research using conidia as study model has focused on investigating the genes related to the spore formation, a process known as conidiogenesis. There are very few studies that have focused on identifying genes in conidia involved in pathogenesis, although specific genes encoding effectors and pathogenicity factors may be expressed during different periods of the pathogen development. In this study we present the transcriptomic analysis of *P. fijiensis* conidia during germination to identify genes related to pathogenicity and conidiogenesis.

From a list of 105 possible effectors present in the *P. fijiensis* genome, which are available in the *Join Genome Intitute* database, five of those possible effectors were identified in the transcriptome of *P. fijiensis* conidia and three of these possible effectors were selected to analyze their expression in cDNA samples from mycelium cultured in PDB, from conidia placed at germination (0 h), from germinated conidia at 8 h and from germinated conidia at 16 h, cDNA from the interaction of *P. fijiensis* with *T. harzianum* (1, 3 and 7 days), and cDNA from the interaction of *P. fijiensis*-*M. acuminata* cv. Calcutta 4 (pool of days 3, 4 and 9, and pool of days 20, 21, 22 and 23). These posible effectors were called contig 373, contig 376 and contig 649. The expression of the posible effectors contigs 373 and 376 was variable in the different culture conditions of *P. fijiensis*, while the posible effector contig 649 was expressed only in the interaction of *P. fijiensis*-*M. acuminata* cv. Calcutta 4 (pool of days 20, 21, 22 and 23). We also identified some transcripts which had no hits in the public genome of *P. fijiensis*, then contributing to the known pan-genome of this fungus.

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

Los cultivares de *Musa* spp. (plátanos y bananos) se cultivan en las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Tienen importancia en los países en desarrollo porque representan un alimento básico y una fuente de ingresos, ya que en buena medida son productos de exportación destinados a los países desarrollados (Noar y Daub, 2016; Churchill, 2011).

En la agricultura tropical existen factores que contribuyen a un nivel de producción menor al deseado, dichos factores pueden incluir desde situaciones económicas y sociales, que no permiten tener los implementos y conocimientos tecnológicos necesarios, hasta la calidad del germoplasma, el ambiente, y la alta incidencia de plagas y de enfermedades (Madriz *et al*., 2002). Entre las enfermedades más comunes y destructivas que afectan a los cultivos de *Musa* spp. se encuentran los daños foliares ocasionados por las especies del hongo *Pseudocercospora* spp*.,* generando problemas severos en varios lugares del mundo (Ploetz, 2004).

El rayado negro o Sigatoka negra de la hoja del banano ocasionado por *Pseudocercospora fijiensis*, anteriormente conocido como *Mycosphaerella fijiensis* (Arango *et al*., 2016), representa la enfermedad foliar más destructiva de *Musa* spp. provocando cuantiosas pérdidas de producción en diversos países de América Latina, el Caribe, Asia y África (Nadal *et al*., 2009; Manzo *et al*., 2005). El control de esta enfermedad se basa principalmente en el uso de productos químicos, lo que representa importantes desventajas como; la acumulación de residuos tóxicos en el ambiente que afecta negativamente la flora y fauna, problemas en la salud de los campesinos y un desarrollo de resistencia por parte del hongo a los fungicidas más empleados (benzimidazoles, triazoles y estrobirulinas) (Hernández *et al*., 2016; Cuéllar *et al*., 2011).

Entre los trabajos de investigación enfocados en las especies del género *Pseudocercospora*, destacan los análisis transcriptómicos de *Musa acuminata* durante su interacción con *P*. *musicola*, *P*. *fijiensis*, y otras especies de *Pseudocercospora*. A través de ellos se han identificado genes candidatos que contribuyen a la comprensión de los mecanismos de defensa del hospedero frente al patógeno (Noar y Daub, 2016; Mendoza, 2014; Passos *et al*., 2013). Otras investigaciones se han centrado en conocer los cambios a nivel bioquímico e histológico durante el proceso infeccioso (Sánchez *et al*., 2013;

Torres *et al*., 2012). Con respecto a las investigaciones enfocadas en los conidios de las especies de *Pseudocercospora*, estas son pocas y la mayoría orientadas en estudiar la morfología del estado conidial. Otras investigaciones son orientadas a la obtención de conidios, ya que pueden emplearse para determinar la virulencia de distintos aislamientos de *Pseudocercospora*, comprender los aspectos citológicos y bioquímicos de la interacción planta-patógeno, determinar el efecto de la proliferación *Pseudocercospora* en diversos climas, identificar cultivares resistentes de *Musa* spp. y generar bibliotecas de ADNc conidial (Ambawade *et al*., 2015; Conde *et al*., 2008; Peraza *et al*., 2008; Rodríguez *et al*., 2007; Pérez, 2002; Meredith y Lawrence *et al*., 1970). En un trabajo previo del grupo, se realizó una biblioteca de ADNc de conidios de *P. fijiensis* cultivados *in vitro*, de esta se analizaron únicamente 100 secuencias al azar, identificándose genes relacionados con procesos biológicos (Pech, 2013). La biblioteca de ADNc de conidios elaborada por Pech (2013) se utilizó en el presente trabajo para ampliar el análisis bioinformático, principalmente para buscar genes que se expresen en las primeras etapas de desarrollo de la germinación de conidios de *P. fijiensis*, los cuales sean relevantes para comprender el establecimiento de la infección y que pudieran ser blancos para futuros controles de la Sigatoka negra.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Generalidades del plátano y el banano

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) pertenecen al orden Zingiberales, familia Musaceae y género *Musa*. El género *Musa* contiene diversas especies, pero las que destacan son *M. acuminata* (genoma AA) y *M. balbisiana* (genoma BB), por representar a los ancestros comunes de los cultivares *Musa* triploides y tetraploides. Las plantas del género *Musa* son herbáceas perennes adaptadas a regiones tropicales y subtropicales, se distinguen tres partes importantes de estas plantas: i) el cormo con hijuelos y el sistema radicular; ii) el pseudotallo con el sistema foliar y iii) el racimo (Manzo *et al*., 2005; Simmonds y Shepherd, 1955).

Los principales progresos alcanzados en la caracterización del genoma de las especies de *Musa* se han obtenido a partir de la creación de bibliotecas genómicas (Mendoza, 2014). Cabe mencionar que el tamaño de los genomas de *M. balbisiana* (537 Mbp en promedio) y de *M. acuminata* (559-613 Mbp en promedio) se han estimado por citometría de flujo sobre núcleos teñidos con yoduro de propidio (Lysák *et al*., 1999).

Se diferencian los bananos y los plátanos, por lo general, los primeros por consumirse crudos cuando están maduros y los segundos porque es necesario cocinarlos o procesarlos para ser consumidos. El plátano (*Musa* AAB) y el banano (*Musa* AAA) son frutos de gran aceptación en mercados internacionales, además de constituir una fuente alimenticia de importancia para los países productores; contribuyen a la captación de divisas y a la generación de empleo ya que alrededor del 10-15% del cultivo es destinado a la exportación (Noar y Daub, 2016; Beltrán *et al*., 2009*;* Sandoval *et al*., 1991). Actualmente los plátanos y bananos se siembran en al menos 120 países y simbolizan cultivos alimentarios de importancia para todo el mundo (Noar y Daub, 2016; Calberto *et al*., 2015). La India se caracteriza por ser el país con mayor producción de bananos, y Ecuador por ser el país con mayor exportación de bananos (Calberto *et al.,* 2015; Churchill, 2011).

Las enfermedades y plagas de *Musa* spp. representan problemas relevantes en varias partes del mundo. Las enfermedades de *Musa* causadas por hongos, bacterias y virus regularmente dañan toda la planta. En cuanto a las principales enfermedades producidas por virus se incluyen: el bunchy top, causado por el virus bunchy top del banano (BBTV); el mosaico de las brácteas, causado por el virus del mosaico de las brácteas del banano (BBMV); el rayado del banano, causado por el virus del rayado del banano (BSV), y el mosaico del banano, causado por el virus del mosaico del pepino (CMV). Algunas de las enfermedades ocasionadas por bacterias son: el marchitamiento vascular y la enfermedad del Moko, causada por la raza 2 de *Ralstonia solanacearum*. Aunque las plagas que afectan a *Musa* son de menor importancia global también perjudican la producción. Los nematodos se consideran los fitopatógenos más importantes de *Musa*, entre los que causan daño significativo están *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae*, *P*. *goodeyi* y *Helicotylenchus multicinctus*. Las enfermedades causadas por hongos son las más comunes y destructivas. Las de mayor importancia son las originadas por las especies de *Pseudocercospora* (Arango *et al*., 2016; Chang *et al*., 2016; Stover y Dickson, 1976) y el marchitamiento por Fusarium (Guo *et al*., 2014), causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Ploetz, 2004).

1.1.1. Producción de banano y plátano en México

El banano es una fruta de consumo generalizado en México debido a su valor nutritivo, disponibilidad todo el año y su precio relativamente bajo (García *et al*., 2013). México, Colombia, Costa Rica y Filipinas generan entre 4 y 6% de la producción mundial de banano (Soto, 2011).

En México el cultivo de banano y plátano, representa 12% del volumen de producción de frutas en el país. En el mes de abril de 2018 se reportó una superficie de cultivo con 79,628 hectáreas y una producción de 707,968 toneladas, de las cuales el 90% se destina al consumo nacional. La variedad Cavendish representa el 75% del total de producción. Se agrupan en cinco regiones de producción de este cultivo: Golfo de México, Pacífico, Pacífico Centro, Centro y Península de Yucatán. Los principales estados productores son Chiapas, Veracruz, Tabasco, Nayarit, Colima, Michoacán, Jalisco y Guerrero. El sureste del país, específicamente Chiapas, Veracruz y Tabasco, producen 73% de la producción nacional. Por otra parte, la Península de Yucatán es una zona bananera relativamente joven, representando el 0.02% de la producción nacional; sin embargo, existen zonas

entre Yucatán y Quintana Roo con potencial para expandir la producción de estos cultivos (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018; Biblioteca Virtual de Pronatura Sur, 2015; Secretaría de Economía, 2012; Bolio *et al*., 2011).

1.2. *Pseudocercospora*

Pseudocercospora es un género perteneciente al reino Fungi. Los hongos son organismos eucariotas (uninucleados o multinucleados), heterótrofos, presentan una pared celular constituida principalmente por quitina y glucano, se nutren por absorción incorporando sólo nutrientes solubles simples, y tienen reproducción sexual y/o asexual (Lurá *et al*., 1997).

Los ascomicetos representan una división dentro del reino Fungi; comprenden, 3,409 géneros y 32,739 especies. La característica que define a los ascomicetos es la producción de esporas sexuales en ascas y sus hifas divididas por septos. Las esporas asexuales se llaman conidios y se forman aisladas o en cadenas. Tienen la característica de ser muy pequeñas y numerosas. La reproducción sexual de los ascomicetos implica la formación de un asca, estructura que caracteriza a esta división. De acuerdo con la especie, la formación de ascos está precedida por la fusión de gametangios o hifas no especializadas provenientes de cepas de apareamiento complementario. En la mayoría de los ascomicetos, las ascas se forman en estructuras complejas llamadas ascocarpos; cuando una asca madura es turgente y luego estalla liberando al aire ocho ascosporas (Curtis *et al*., 2008).

Pseudocercospora representa uno de los géneros más grandes de ascomicetos, abarca miles de especies y sus anamorfos están distribuidos en más de 30 especies (Crous *et al*., 2007).

Los hongos de las especies de *Pseudocercospora* se caracterizan por ser pequeños, de color negro, tener tejidos estromáticos, sobre los cuales se desarrollan las ascomas y por poseer micelio superficial de color pálido a marrón. Dada la gran variabilidad entre los anamorfos de *Pseudocercospora* por mucho tiempo no se estuvo seguro si eran un grupo monofiléticos, parafiléticos o polifiléticos, no obstante, hoy en día se consideran las especies anamorfas de *Pseudocercospora* como un grupo de origen polifilético (Crous *et al*., 2007; Jacome *et al*., 2003).

La especificidad del patógeno por su hospedante ha desempeñado un papel importante en la identificación de las especies de *Pseudocercospora* (Jacome *et al*., 2003). En la actualidad, gracias al uso de novedosas técnicas de secuenciación y análisis de secuencias de ADN se ha logrado ampliar el conocimiento de las distintas especies de este género (Dean *et al*., 2014).

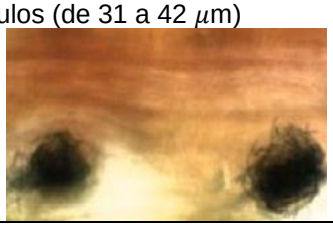
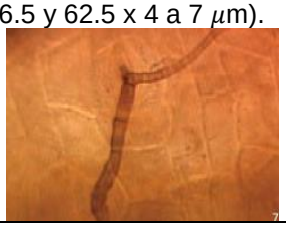
1.2.1. Especies de *Pseudocercospora* que afectan a *Musa*

Aunque algunas especies de *Pseudocercospora* son saprófitas, la mayoría de ellas son conocidas por causar lesiones necróticas en las hojas, los tallos y los frutos de un hospedero vivo. Diferentes especies de *Pseudocercospora* han sido asociadas como las causantes de las manchas foliares del banano. Entre ellas se encuentran: *P*. *musae*, agente causal de Sigatoka amarilla; *P*. *eumusae*, agente causal de la mancha foliar eumusae y *P*. *fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*) agente causal de la Sigatoka negra (Arango *et al*., 2016). Esta última se considera la más importante en la actualidad pues ocasiona las mayores pérdidas de producción en los cultivares de *Musa* (Arango *et al*., 2016; Calberto *et al*., 2015; Churchill, 2011; Manzo *et al*., 2005).

P. musae, *P. eumusae* y *P. fijiensis* se pueden diferenciar visualizando la morfología de sus estructuras conidiales. Por el contrario, sus estadios sexuales (teleomorfos) y los síntomas que causan en *Musa* spp. son prácticamente indiferenciables (Carlier *et al*., 2003; Pérez, 2002). En el cuadro 1.1 se describe la morfología de las estructuras conidiales de *P. musae*, *P. eumusae* y *P. fijiensis*.

Cuadro 1.1 Características morfológicas del estado anamorfo de *P*. *musae, P*. *eumusae* y *P*. *fijiensis* (Carlier *et al*., 2003).

Especie (estado anamorfo)	Conidióforos	Conidios
Pseudocercospora musae	Primera aparición en la etapa de mancha. Son abundantes en ambas superficies foliares. Son rectos, hialinos, la mayoría no son septados, ni geniculados, sin cicatrices en las esporas (entre 5 y 25 x 2 y 5 μm. 	Son obclavados-cilíndricos, rectos o curvos, pálidos a oliváceos muy pálidos, con un número de septos de 0 a 8, sin hilo basal distintivo. Entre 10 y 109 x 2 y 6 μm.

Pseudocercospora eumusae	Primera aparición en la etapa de mancha. Se encuentran principalmente en la superficie superior de la hoja. Tienen forma de pera, sumergidos más o menos errumpentes, ostiolados cuando son jóvenes, pero cuando están maduros a menudo se ven como acérvulos (de 31 a 42 μm) 	Fusiformes, hialinos, cilíndricos y curvados, con 3 a 5 septos. Entre 21.2 y 41.6 x 2.5 μm.
Pseudocercospora fijiensis	Primera aparición en la etapa de primeras rayas (Etapas de Fouré de 2 a 3). Se encuentran principalmente en la superficie inferior de la hoja. Emergen individualmente o en pequeños grupos (de 2 a 6). Los esporodoquios y los estromas están ausentes. Rectos o geniculados, color de pálido a ligeramente marrón, con 0-5 septos, ocasionalmente ramificados, cicatrices en las esporas ligeramente engrosados (entre 16.5 y 62.5 x 4 a 7 μm). 	De obclavados-cilíndricos, rectos o curvos, de hialinos a oliváceos muy pálidos, con número de septos de 1 a 10, con un hilo basal distintivo (cicatriz). Entre 30 y 132 x 2.5 y 5 μm.

1.3. Sigatoka negra

En 1963 en la isla de Fiji se describió por primera vez la enfermedad de la raya negra de la hoja del banano, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* (*Pseudocercospora fijiensis*) (Arango *et al*., 2016). En 1976 en Centroamérica, en el Valle del Ulúa, Honduras, se observó una enfermedad similar a la raya negra de la hoja del banano, la cual se nombró Sigatoka negra, causada por el patógeno *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* Mulder y Stover. Empleando técnicas moleculares y examinando las características morfológicas de *P. fijiensis* y *M. fijiensis* var. *difformis*, se determinó que eran el mismo patógeno. La enfermedad ocasionada por *P. fijiensis* debería nombrarse raya negra, pero el nombre de Sigatoka negra establecido en América Central, ha sido ampliamente

aceptado prevaleciendo hasta nuestros días (Rivas y Rosales, 2003; Stover y Dickson, 1976).

El nombre de la enfermedad Sigatoka negra se debió al color pardo oscuro o negro de las rayas y manchas que ocasiona la enfermedad en la planta. En la actualidad, la Sigatoka negra se considera la enfermedad más destructiva del follaje de *Musa* (Noar y Daub, 2016). La severidad de *P. fijiensis* se magnifica por la propagación vegetativa de *Musa* y su cultivo en grandes extensiones de tierra de un clon genéticamente uniforme.

1.3.1 *Pseudocercospora fijiensis*: El agente causal de la Sigatoka negra

P. *fijiensis* el agente causal de la Sigatoka negra; el hongo presenta en su ciclo de vida un estado perfecto denominado fase ascógena (meiótica) o sexual, y un estado imperfecto denominado fase conídica (mitótica) o asexual (Manzo *et al*., 2005). A *P. fijiensis* se le considera un hongo hemibiotrófico por tener un comportamiento biotrófico y necrotrófico durante su ciclo de vida (Hoss *et al*., 2000). En los primeros estadios de la enfermedad, *P. fijiensis* se comporta como un patógeno biotrófico que coloniza espacios intercelulares sin formar haustorios. Una vez que ocurre la penetración del patógeno por estomas, las hifas colonizan el tejido vegetativo y se torna necrótico. Posteriormente, el hongo comienza a crecer como saprófito en tejifo muerto (Jacome *et al*., 2003).

El genoma de *P*. *fijiensis* ha sido secuenciado (https://genome.jgi.doe.gov/Mycfi2/Mycfi2.info.html) y la información esta disponible en la base de datos del *Join Genome Institute* (secuenciación *paired end*), esta información ha contribuido para conocer la biología de este patógeno. El Cuadro 1.2 muestra los resultados de la versión más reciente del ensamblaje del genoma de *P*. *fijiensis* (Arango *et al*., 2016).

Cuadro 1.2 Versión 2 del ensamblaje del genoma de *P*. *fijiensis*.

Número de andamios (Scaffold)	56
Total de contigs	778
Tamaño del genoma	74.1 Mb
Profundidad de cobertura	~7.11X

De igual manera el Cuadro 1.3 muestra los resultados de la versión más reciente de la anotación del genoma nuclear de *P*. *fijiensis* (Arango *et al*., 2016).

Cuadro 1.3 Versión 2 de la anotación del genoma nuclear de *P*. *fijiensis*.

Número genes	13,107
Longitud promedio de los genes	1833 nucleótidos
Longitud promedio de las proteínas	427 aminoácidos
Promedio de exones por gen	3.62 exones/gen
Longitud promedio de los exones	395 nucleótidos
Longitud promedio de los intrones	154 nucleótidos
Porcentaje de genes completos (con codones de inicio y finalización)	88%
Porcentaje de genes con soporte de homología	74%
Porcentaje de genes con dominios Pfam	49%

1.3.1.1. Sigatoka negra en México

El primer reporte de la enfermedad Sigatoka negra en México se dio a conocer por los productores de Tapachula, Chiapas a finales de 1980. En 1981 se demostró la presencia del hongo *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* (*P*. *fijiensis*) en las áreas plataneras de Tabasco y posteriormente se diseminó por el resto de las áreas bananeras de México. El estado de Veracruz y Oaxaca fueron afectados en el año de 1985, y la región Pacífico Centro que incluye Colima, estado afectado en 1989, y también Jalisco, Michoacán y Guerrero, estados afectados en 1990. De igual manera se difundió en 1994 esta enfermedad en el estado de Nayarit. Dicha enfermedad redujo el rendimiento de producción hasta en un 50%, afectando a la industria bananera. El control de la Sigatoka negra en el país depende básicamente del uso de productos químicos y es apoyado por algunas prácticas de cultivo (Aguilar *et al*., 2014; Beltrán *et al*., 2009; Orozco, *et al*., 2001; Contreras, 1983).

1.3.2. Infección

Las esporas del hongo son la principal fuente de infección, son desplazadas a través del viento y por la lluvia (Manzo *et al*., 2005) (Figura 1.1).

Durante el desarrollo de las primeras etapas de la enfermedad, en las lesiones jóvenes (estrías), bajo condiciones de alta humedad o en una película de agua libre sobre las hojas, se forman los conidios (especialmente durante las etapas 2, 3 y 4). Los conidios se asocian principalmente con la propagación local de la enfermedad durante los períodos de alta humedad, frecuentes rocíos fuertes y riegos intermitentes. Además, a los conidios se

les ha atribuido un papel muy importante en la prevalencia de la enfermedad (Manzo *et al*., 2005; Marín *et al*., 2003; Rivas y Rosales, 2003; Jacome *et al*., 1991).

Las ascosporas son consideradas la principal via de dispersión a distancias largas, en nuevas áreas y durante largos periodos de tiempo húmedo (Manzo *et al*., 2005; Marín *et al*., 2003). Las ascosporas se producen en pseudotecios en las lesiones al madurar. Son comunes en las hojas más viejas de la planta o en las hojas muertas tiradas en el suelo. Para la liberación de ascosporas se requiere la presencia de una película de agua de lluvia o rocío que absorba el pseudotecio, provocando la expulsión forzada de las ascosporas a través de la capa límite de la hoja, donde son esparcidas por corrientes de aire y lluvia. La maduración del pseudotecio requiere la saturación de agua y de tejidos muertos de la hoja durante aproximadamente 48 h (Marín *et al*., 2003).

Debido a que los conidios se propagan a cortas distancias, las ascosporas se consideran más importantes en la propagación de la Sigatoka negra a largas distancias. No obstante, los conidios son capaces de extender significativamente la enfermedad y causar síntomas idénticos a los producidos en la infección por ascosporas (Jacome *et al*., 1991).

La mayoría de las infecciones producidas por *P*. *fijiensis* ocurre en la superficie abaxial de las hojas. Los tubos germinativos del hongo tardan alrededor de 48 a 72 h en penetrar los estomas. O bien pueden crecer epífitamente sobre la superficie foliar hasta 6 días antes de penetrar las hojas. Una infección exitosa es promovida por largos períodos de alta humedad y la presencia de agua en las hojas. La máxima germinación de las esporas ocurre cuando hay agua libre, los conidios germinan en un intervalo de humedad relativa entre 92 a 100% y las ascosporas entre 98 a 100%. El efecto de la temperatura sobre los tubos germinales de las ascosporas es importante porque requieren de un intervalo de 26 a 28 °C después de 24 h de incubación para que tengan un crecimiento máximo (Marín *et al*., 2003). La Figura 1.1 muestra un esquema del ciclo de vida del hongo *P*. *fijiensis*.

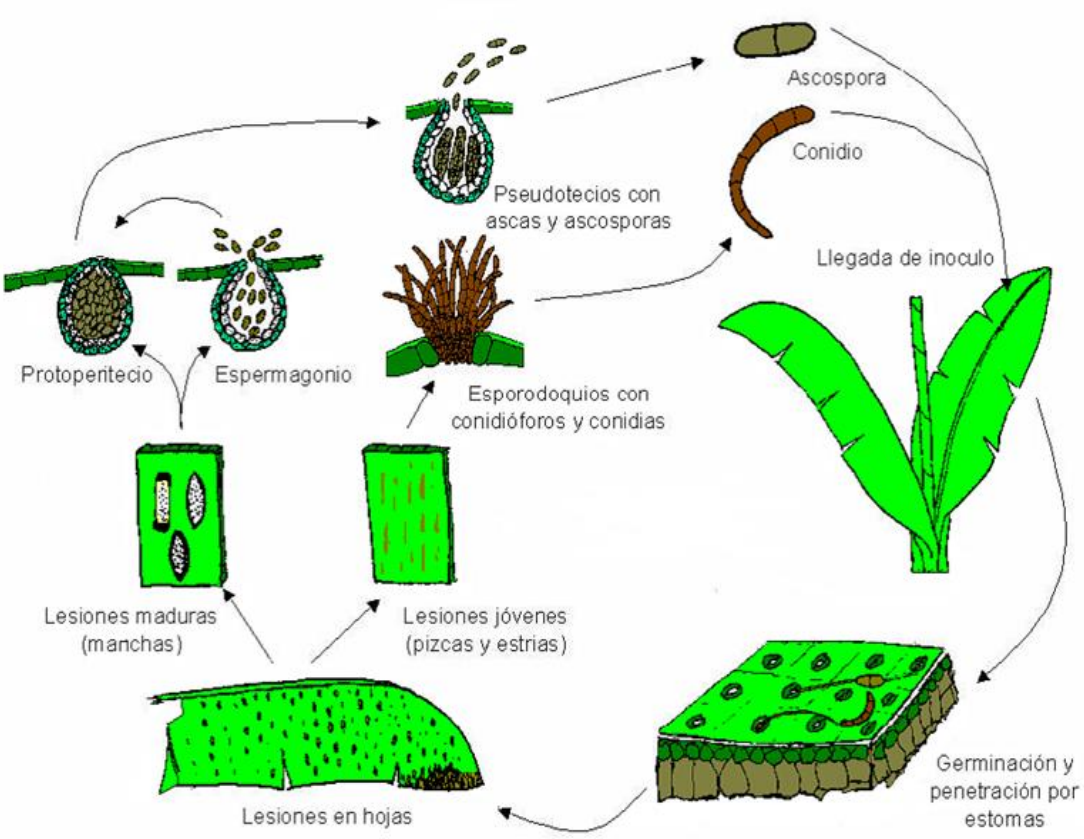


Figura 1.1 Ciclo de vida de *P*. *fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra de *Musa* spp. (Manzo *et al*., 2005).

1.3.3. Sintomatología

La infección de *P*. *fijiensis* en las hojas de *Musa* se manifiesta en seis etapas (Figura 1.2): una de punto, dos de raya y tres de manchas (Manzo *et al*., 2005; Fouré, 1982 y 1985; Meredith y Lawrence, 1969).

1) Etapa de punto: surgen pequeños puntos de 0.25 mm de diámetro, de color amarillo pálido visibles en el envés de la hoja; los puntos son más conocidos como pizcas.

2) Primera etapa de rayas: formación de rayas o estrías cloróticas de 1 mm de ancho por 3-4 mm de largo, de color marrón, visibles en el haz y paralelas a las venas laterales de la hoja.

3) Segundo etapa de rayas: alargamiento y ampliación de las rayas (20-25 mm de longitud y 2 mm de ancho), sin bordes definidos, con coloraciones marrón oscuro y visibles en el envés como rayas amarillas.

4) Primera etapa de mancha: extensión de las estrías para formar manchas de color marrón oscuro en el envés rodeadas por una zona amarilla pálida, y de color negro en el haz.

5) Segunda etapa de macha: se visualizan manchas negras rodeadas de un anillo negro y a veces un halo amarillento, lo que representa el inicio del colapso del tejido de la hoja.

6) Tercera etapa de mancha: las manchas tienen un centro seco y hundido, de color gris claro, rodeadas por un borde definido de color negro. Entre el borde y el color verde de la hoja existe comúnmente una zona de transición amarillo brillante.

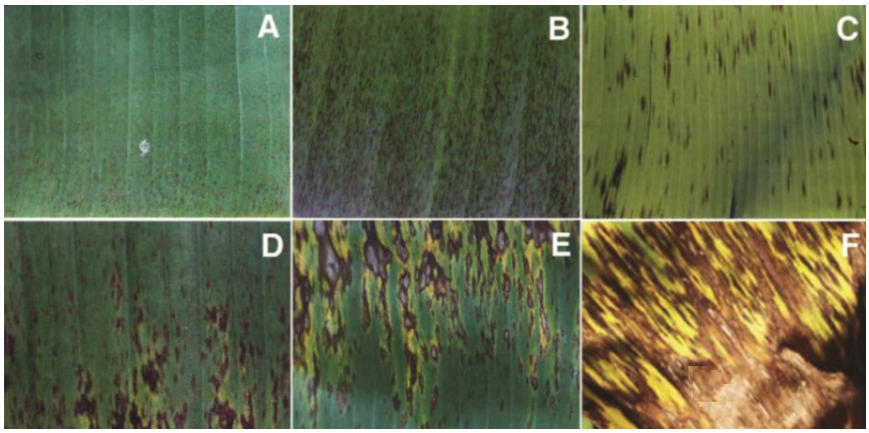


Figura 1.2 Etapas de la enfermedad Sigatoka negra. Etapa 1 (A), etapa 2 (B), etapa 3 (C), etapa 4 (D), etapa 5 (E) y etapa 6 (F) (tomado de Churchill, 2011).

1.3.4. Estrategias de control

En el mundo, el manejo de la Sigatoka negra en las plantaciones comerciales de banano es altamente dependiente del uso de fungicidas, los cuales son apoyados con prácticas culturales de cultivo (deshoje, deshije, drenaje, densidad de la plantación, control de maleza, y fertilización) para reducir fuentes de inóculo y evitar condiciones favorables para el desarrollo del patógeno (Orozco *et al*., 2008; Manzo *et al*., 2005; Ploetz, 2004; Orozco *et al*., 2001).

Los fungicidas son sustancias químicas utilizadas para matar o detener el desarrollo de hongos. Pueden inhibir la germinación de las esporas o el crecimiento del hongo (ProMusa, 2017; Morales, 2002).

Los fungicidas son inhibidores metabólicos ya que bloquean procesos vitales del ciclo de vida del hongo. Sus modos de acción pueden clasificarse en cuatro grupos (Morales, 2002).

- Inhibidores de la cadena de transporte de electrones.
- Inhibidores de enzimas
- Inhibidores de metabolismo del ácido nucleico y síntesis de proteínas.
- Inhibidores de la síntesis del esterol.

También se pueden clasificar como fungicidas protectores o de contacto y fungicidas sistémicos o penetrantes (ProMusa, 2017; Morales, 2002):

- Fungicidas protectores o de contacto. Estos afectan las estructuras del patógeno en la superficie de la planta actuando en las fases de germinación de esporas y penetración de hifas. Una vez que el patógeno ingresa a la planta, estos productos son ineficaces. Un buen control con este tipo de fungicidas solo se logra con intervalos de aplicaciones cortas, lo que incrementa el costo de producción de los cultivos y los riesgos de sobreexposición a sustancias tóxicas en el ambiente y en los agricultores. Estos fungicidas no son muy efectivos si existen condiciones climaticas muy favorables para el desarrollo de la enfermedad fúngica. Ejemplo de estos fungicidas son los derivados del benceno (clorotalonil) y los carbamatos (mancozeb) (ProMusa, 2017; Morales, 2002).
- Fungicidas sistémicos o penetrantes: se desarrollaron como una alternativa a los inconvenientes de los fungicidas de contacto. Estos compuestos penetran en la planta y se movilizan del haz al envés de la hoja y viceversa, y luego del punto donde entraron en contacto con la planta hacia la parte superior de la planta. La aplicación constante y uniforme no es tan importante con estos fungicidas como lo es para los fungicidas de contacto. Entre sus ventajas están que el intervalo entre aplicaciones puede distanciarse y no son lavados por la lluvia. Entre sus desventajas se pueden mencionar que son de mayor costo y existe un mayor riesgo de resistencia en el patógeno cuando se usan de manera inapropiada. Ejemplo de estos fungicida son los bencimidazoles (benomilo, carbendazim, tiabendazol), estos tienen sitio de acción en la proteína estructural de los microtúbulos que forman las fibras del huso mitótico: la β-tubulina. Esta proteína tiene varios papeles en los procesos celulares como el movimiento, el transporte

intracelular y la división celular (ProMusa, 2017; Vázquez *et al*., 2012; Morales, 2002).

El control químico se considera eficaz contra las manchas foliares, pero su alto costo no representa una opción viable para los pequeños productores, representando entre 40% y 60% de los costos de producción (Beltrán *et al*., 2009). Los daños colaterales por el uso indiscriminado de los productos químicos son la resistencia del patógeno y generación de cepas más virulentas, contaminación ambiental, deterioro de la salud humana, entre otros (Orozco *et al*., 2008; Manzo *et al*., 2005; Ploetz, 2004; Sánchez *et al*., 2002).

Los esfuerzos para superar diversos problemas ecológicos debidos al uso excesivo de pesticidas condujeron al uso exitoso de algunas de las nanopartículas en el control de diversos organismos que causan enfermedades en las plantas. La nanoencapsulación de agroquímicos proporciona una concentración efectiva del ingrediente activo con alta estabilidad y entrega dirigida al sitio con un reducido daño colateral y menos ecotoxicidad. Los dendrímeros son una clase específica de macromoléculas, que se han usado para enviar ADN y otras biomoléculas a las células para combatir muchas especies/cepas de virus, bacterias, hongos y priones. Se caracterizan por ser estructuras globulares, de 3 a 7 nanómetros de diámetro que contienen un núcleo central, capas de ramificación y numerosos grupos terminales (Samuel *et al*., 2014; Nair y Kumar, 2013; Lazniewska *et al*., 2012).

Otra estrategia de control es la resistencia genética en la planta porque es benigna con el ambiente y muy eficaz contra algunas plagas y enfermedades. Algunos bananos de cultivares diploides tienen resistencia a la mancha foliar ocasionada por las especies de *Pseudocercospora*, por ello se usan para reemplazar los clones susceptibles; como progenitores en los programas de mejoramiento convencional (Ploetz, 2004). Desde hace décadas se ha planteado que la obtención de híbridos resistentes a Sigatoka negra representa una de las mejores alternativas para el control de esta enfermedad (Dadzie y Orchard, 1997). Muchos programas de mejoramiento genético de *Musa* vía hibridación se basan en la utilización de la resistencia encontrada en especies silvestres de *Musa* como *Musa acuminata* spp. Calcutta 4 cv. *burmannica*, *Musa acuminata* spp. *malaccensis* y *Musa acuminata* spp. *siamea*, y también los cultivares diploides Paka (AA), Pisan lilin (AA), Calcuta (AA) y algunos cultivares triploides como: Yagambi Km 5 (AAA), Saba (ABB) y Pisang Ceylan (ABB) (Hernández, 1995). La Fundación Hondureña de la

Investigación Agrícola (FHIA) produjo híbridos de bananos y plátanos resistentes a la Sigatoka negra; entre los más estudiados están FHIA-01, FHIA-02, FHIA-18, FHIA-21 y FHIA-23. Algunos de los híbridos han demostrado resistencia, pero lamentablemente no tienen la aceptación esperada debido a sus características organolépticas y su vida corta en anaquel, razón por la que no son atractivos en el mercado (Dens *et al*., 2002; Dadzie y Orchard, 1997).

Los enfoques no convencionales también forman parte de las estrategias de control de la enfermedad Sigatoka negra. En particular la transformación genética sobresale en los programas de mejoramiento genético (Ploetz, 2004). El programa de banano de la organización Biodiversity International ha desarrollado 70 mil líneas transgénicas, por ejemplo, se ha insertado en los bananos transgénicos genes que expresan quitinasas, enzimas que hidrolizan quitina. Los bananos transgénicos en el campo, tienen una resistencia limitada a la enfermedad. Por lo que es necesario desarrollar bananos con resistencia a la enfermedad, con el propósito de disminuir el uso excesivo de fungicidas. Hasta el día de hoy se desconoce el grado que los bananos transformados (modificados genéticamente) resolverán los problemas ocasionados por Sigatoka negra y si los consumidores los aceptarán (Rodríguez *et al*., 2016; Ploetz, 2004; Dens *et al*., 2002; RALLT, 2002).

1.4. Interacción planta-patógeno

Las plantas bajo condiciones naturales se encuentran en continuo contacto con diversos organismos, y las pueden afectar mediante daño mecánico, enzimático (Chagas *et al*., 2018; Dodds y Rathjen, 2010; Madriz *et al*., 2002).

Los patógenos tienen diferentes estrategias para invadir a la planta, su éxito puede deberse a su capacidad reproductora durante la etapa de mayor crecimiento de la planta, a una alta capacidad de dispersión, a la formación de estructuras de resistencia dentro de la planta (como las esporas), o a una alta tasa de mutación para generar patotipos virulentos que escapan de la defensa de la planta. Normalmente la planta permanece sana, en parte, gracias a sus mecanismos de defensa (Dodds y Rathjen, 2010; Curtis *et al*., 2003; Madriz *et al*., 2002).

La planta carece de un sistema inmune adaptativo, pero evolutivamente ha desarrollado mecanismos de defensa que le permiten detener y contrarrestar a los patógenos. Los

mecanismos de defensa se dividen en constitutivos e inducidos. La diseminación de los patógenos puede favorecerse cuando la planta se encuentra en condiciones vulnerables, por ejemplo, cuando las plantas presentan heridas o daños físicos, se encuentran con déficit de nutrientes, en condiciones de sequía, etc., dichas condiciones hacen a las plantas susceptibles al ataque de los patógenos (Chagas *et al*., 2018; Dodds y Rathjen, 2010; Curtis *et al*., 2003; Madriz *et al*., 2002).

Los mecanismos de defensa constitutivos se basan en los rasgos distintivos de una especie de planta y generalmente no involucran una respuesta activa del hospedante ante la presencia de un patógeno. Se pueden dividir en mecanismos de defensa estructurales constitutivos, por ejemplo, capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, etc. y mecanismos de defensa químicos, por ejemplo, compuestos tóxicos para el patógeno como las saponinas (Chagas *et al*., 2018; Sánchez *et al*., 2018; Cruz *et al*., 2010; Dodds y Rathjen, 2010; Madriz *et al*., 2002).

La capacidad para diferenciar entre lo propio y lo ajeno es una propiedad común de los seres vivos, y una de las claves para producir la activación del sistema de inmunidad innata para evitar la infección del organismo por patógenos. En las plantas, una familia de proteínas receptoras (con un posible origen evolutivo común) es capaz de reconocer los componentes de los patógenos y activar una respuesta de defensa denominada “resistencia inducida”, la cual involucra cambios en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes (Chagas *et al*., 2018; Dodds y Rathjen, 2010; Castro y García, 2009; Chisholm *et al*., 2006; Madriz *et al*., 2002). Los componentes que se reconocen de los patógenos se denominan inductores, aunque también se les llama MAMPs/PAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns/Pathogen-Associated Molecular Patterns). Suelen ser moléculas muy conservadas y esenciales para la fisiología y el ciclo de vida del patógeno, como lipopolisacáridos (componentes de la pared celular de las bacterias Gram-negativas), peptidoglicanos (componentes de la pared celular de las bacterias Gram-positivas), quitina, glucanos, mananos (componentes de la pared celular de los hongos), entre otros (Chagas *et al*., 2018; Dodds y Rathjen, 2010; Castro y García, 2009; Molina *et al*., 2007). La capacidad de un patógeno para infectar una planta está determinada por sus efectores, moléculas que manipulan la biología de la planta, reprimen la respuesta inmune de la misma o protegen al patógeno para apoyar su crecimiento y colonización. Durante la infección, la expresión de los efectores es regulada a lo largo del ciclo de la infección. La función de la mayoría de los efectores de los hongos

es desconocida. Una función que se ha caracterizado en los efectores es unirse a componentes de la pared celular y protegerla de las enzimas hidrolíticas, o impidir que los componentes de la pared fúngica lleguen al receptor en las células del hospedero y pueda percibirlo (Wawra *et al*., 2016; Sánchez *et al*., 2013; Win *et al*., 2012; De-Jonge *et al*., 2010; Stergiopoulos *et al*., 2010; Tan *et al*., 2010; Stergiopoulos y Wit, 2009). También se ha visto que las enzimas que hidrolizan la pared celular, los inhibidores de proteasas y los disruptores de la vía de señalización hormonal pueden actuar como efectores (Sánchez *et al*., 2018).

En el proceso de resistencia de la planta hacia los patógenos se involucran receptores con especificidad para las cepas patógenas, codificados por genes de resistencia-defensa expresados constitutivamente (R), localizados en la membrana plasmática o en el citosol. Los genes R individuales tienen capacidades de reconocimiento, provocando resistencia cuando el patógeno invasor expresa un gen de virulencia correspondiente (Avr). Estos genes en diferentes patógenos son estructuralmente variables y tienen diferentes funciones en su biología. El reconocimiento de los patógenos por las plantas requiere la presencia de los genes Avr y R en las especies, y es mediado por la unión de un receptor y un ligando (Chagas *et al*., 2018; Couto y Zipfel, 2016; Dodds y Rathjen, 2010; Rocha *et al*., 2004). La asociación proteína R-ligando, origina una cascada de señales y activación de vías de transducción que conllevan la expresión de genes asociados a la defensa (Chagas *et al*., 2018; Birkenbihl *et al*., 2017; Couto y Zipfel, 2016; Tsuda y Somssich, 2015; Dodds y Rathjen, 2010; Madriz *et al*., 2002).

La resistencia inducida por MAMPs/PAMPs (PTI), se caracteriza por la activación de la expresión de genes de defensa, así como la acumulación de calosa y la fortificación de la pared celular. Existen otros mecanismos de resistencia inducida; 1) resistencia sistémica adquirida; que se activa tras la infección de las plantas por patógenos que producen necrosis, 2) resistencia sistémica inducida; que se activa después de la colonización de las raíces por determinadas cepas bacterias u hongos de la rizosfera, 3) resistencia inducida por herida, esta se puede activar por insectos que causan heridas en el tejido vegetal (Chagas *et al*., 2018; Sánchez *et al*., 2018; Couto y Zipfel, 2016; Dodds y Rathjen, 2010; Castro y García, 2009; Molina *et al.*, 2007).

Las interacciones planta-microorganismo son específicas y dependen del genotipo de la planta y del microorganismo; una interacción de ventaja puede existir para una de las

partes (patogénesis o resistencia), o para ambas (simbiosis). El grado de patogenicidad se denomina comúnmente como virulencia, y según la capacidad del patógeno en causar la enfermedad puede ser virulento o poco virulento en un hospedante. En otras palabras, virulencia es un concepto relacionado con la capacidad del patógeno de superar la resistencia de la planta. Una cepa de patógeno es virulenta si produce enfermedad en el hospedante y avirulenta si no la produce. Por otro lado, la resistencia vertical (monogénica o absoluta) y la resistencia horizontal (poligénica o de campo) son los extremos de todo un espectro de niveles de resistencia (Chagas *et al*., 2018; Couto y Zipfel, 2016; Dodds y Rathjen, 2010; Manzo *et al*., 2002).

La interacción planta-patógeno se puede comprender al estudiar la virulencia o avirulencia del patógeno con respecto a la resistencia o susceptibilidad del hospedante. La interacción entre los dos organismos genera una asociación compatible o incompatible. En el primer caso, comprende la interacción de una cepa virulenta y un cultivar susceptible, mientras que, en el segundo caso, comprende un hospedante resistente y un patógeno avirulento. El hospedante se caracteriza comúnmente por tener sistemas de reconocimiento que activan la expresión de mecanismos de defensa frecuentemente asociados a la expresión de una reacción hipersensible en las células infectadas; éstas liberan sustancias para su autodestrucción. Antes de morir, las células infectadas pueden encender un sistema de alarma en el resto del hospedante liberando una señal que induce nuevas sustancias antimicrobianas en otras células. Esta señal puede ser el ácido salicílico (Chagas *et al*., 2018; Sánchez *et al*., 2018; Couto y Zipfel, 2016; Dodds y Rathjen, 2010; Vlot *et al*., 2009; Curtis *et al*., 2003). En una interacción-compatible el hospedero no reconoce al patógeno por lo que no hay respuesta de defensa y surge la enfermedad (Chagas *et al*., 2018; Couto y Zipfel, 2016; Dodds y Rathjen, 2010; Madriz *et al*., 2002).

1.4.1. Nutrición de los patógenos

Los fitopatógenos están obligados a obtener los nutrimentos de fuentes existentes, por lo que invaden y se adaptan al hospedero para reproducirse. Además, necesitan evadir o contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta. Aquellos patógenos capaces de desarrollarse y reproducirse solamente en tejidos de hospedantes vivos son llamados biótrofos (parásitos obligados). Mantienen la célula hospedera viva y emplean mecanismos de invasión poco perceptibles. Los apresorios son estructuras de

penetración usadas por algunos hongos para evitar el daño excesivo del tejido del hospedero durante las fases iniciales de la patogénesis. Entre los patógenos biotróficos están los virus, los nematodos, y algunos hongos (causantes de cenicillas) y oomicetos (causantes de mildius) especializados (Rocha *et al*., 2004; Madriz *et al*., 2002).

Otro tipo de patógeno son los llamados necrotróficos, este grupo engloba a la mayoría de los hongos y las bacterias causantes de enfermedades en las plantas, porque producen muchas veces diferentes toxinas que ocasionan la muerte de las células hospedantes para después obtener nutrientes del tejido muerto (Rocha *et al*., 2004; Madriz *et al*., 2002).

1.5. Transcriptómica

La transcriptómica estudia el conjunto de ARN que existe en una célula, tejido u órgano. El transcriptoma es el conjunto completo de los transcritos en una célula, y sus cantidades en una etapa específica de desarrollo o condición fisiológica (Fang *et al*., 2012; Wang *et al*., 2009). Se usa para entender cómo la información del genoma se traduce en funciones celulares, y cómo la traducción responde a diferentes condiciones del entorno (Fang *et al*., 2012). Los objetivos de la transcriptómica son: 1) catalogar todas los transcritos que incluyen ARNm, ARN no codificante y ARN pequeños; 2) determinar la estructura transcripcional de los genes (en términos de sus sitios de inicio 5 'y 3'), los patrones de empalme, y las modificaciones post-transcripcionales y 3) cuantificar los niveles de expresión cambiante de cada transcrito durante el desarrollo y bajo diferentes condiciones (Fang *et al*., 2012; Wang *et al*., 2009).

1.5.1. Técnicas empleadas para obtener perfiles de expresión génica

Los perfiles de expresión génica o perfiles de transcriptomas permiten determinar la abundancia de cada transcrito dentro un transcriptoma (Fang *et al*., 2012).

Inicialmente los análisis de perfiles transcripcionales se realizaron usando los microarreglos (Kogenaru *et al*., 2012), pero a causa de sus limitaciones, como dependencia de genes caracterizados con anterioridad, dificultad para su estandarización y falta de reproducibilidad (Wang *et al*., 2009), fueron desplazados por las tecnologías RNA-Sequencing (RNA-Seq) dada su amplia gama de ventajas (bajo costo, sensibilidad, precisión y alta cobertura de secuenciación) (Fang *et al*., 2012).

1.5.2. Técnica RNA-Seq

La técnica RNA-Seq involucra la conversión del conjunto de transcritos aislados en ADN complementario (ADNc), para después secuenciarlo directamente con un enfoque basado en la secuenciación masiva y profunda. Esta técnica ha sido implementada en diferentes plataformas NGS (Next-Generation Sequencing) como: Illumina's Genome Analyzer, Roche 454 Genome Sequence, y Applied Biosystems' SOLiD (Kogenaru *et al*., 2012).

Los datos obtenidos con RNA-Seq se miden como proporción del número total de secuencias de transcritos expresados, y no en intensidades de fluorescencia continua, lo que permite disminuir el error por entrecruzamiento de datos (Bullard *et al*., 2010).

Existen varias plataformas NGS que están comercialmente disponibles, la mayoría se basa en la tecnología de secuenciación por síntesis, con una ADN polimerasa. Las plataformas 454 de Roche e Illumina, usan ADN polimerasa para obtener su reacción de secuenciación, mientras SOLID utiliza ADN ligasa. Otra manera de categorizar las secuenciaciones es con base en sí se secuencia una sola molécula (como Helicos y PacBio) o si se secuencian un conjunto de moléculas (Illumina y SOLID) (Chu y Corey, 2012; Ozsolak y Milos, 2011).

En la bioinformática existe un continuo desarrollo de las herramientas de software, para simplificar el proceso de análisis de datos, debido a que la técnica RNA-Seq no emplea sondas específicas de especies o de transcritos. Lo que representa una ventaja, porque evita el sesgo de datos por suposiciones sobre la naturaleza del transcriptoma. Las herramientas para el análisis transcripcional mediante RNA-Seq generalmente se dividen en tres categorías: (1) las que realizan alineación; (2) las que ensamblan transcritos; y (3) las que cuantifican los transcritos (Trapnell *et al*., 2012; Bullard *et al*., 2010).

Con las NGS se abre la oportunidad de conocer el genoma de organismos no modelos o con pobres anotaciones de genes. (Liang *et al*., 2012; Nookaew *et al*., 2012; Fang *et al*., 2012; Bullard *et al*., 2010).

1.5.3. Estudios enfocados en transcriptomas de *Pseudocercospora*

Los plátanos y los bananos han sido estudiados de manera individual y durante su interacción con las especies de *Pseudocercospora*. Uno de los primeros estudios a nivel transcriptómico de *Musa* spp.-*P. fijiensis* se realizó en colaboración con la Empresa

Brasileña de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA) y el Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD); en esta investigación se contribuyó con la creación de bibliotecas genómicas (Mendoza, 2014). En otro trabajo, enfocado en el transcriptoma de *P. fijiensis* interactuando con *M*. *acuminata*, se identificaron genes relacionados con la patogenicidad de este hongo, como por ejemplo proteínas con dominio CFEM; este dominio se ha encontrado en algunas proteínas relacionadas con la patogénesis fúngica y se caracteriza por contener ocho cisteínas. En este mismo trabajo se identificaron cutinasas, enzimas que catalizan la hidrólisis del polímero lipídico cutina, un componente estructural de la cutícula de las plantas. También se encontró una posible salicilato hidroxilasa, la posible función de esta enzima es metabolizar al ácido salicílico para convertirlo en catecol, lo cual evita que el ácido salicílico active los mecanismos de defensa de la planta ante la presencia de *P*. *fijiensis*. Asimismo, se identificaron en los andamios 15 y 21, también caracterizados como cromosomas prescindibles (cromosomas no necesarios para la sobrevivencia del organismo), genes que codifican proteínas hipotéticas que pueden participar en la patogenicidad de *P*. *fijiensis*. Además, encontraron 231 transcritos ricos en cisteínas (con cuatro o más residuos de cisteína) que posiblemente codifican proteínas conocidas como efectores, de los cuales 40 se expresaron diferencialmente en el análisis RNA-Seq. De estos transcritos, 30 se expresaron más en el tejido de la hoja infectado de 6 semanas, mientras que 10 transcritos se expresaron más en el medio de cultivo PDB con micelio de *P*. *fijiensis* de una semana (Noar y Daub, 2016). A pesar de haberse encontrado genes relacionados con la patogenicidad de *P*. *fijiensis* aún se requiere investigación que profundice en el modo de acción del hongo y la biología del patógeno para conocerlo mejor. En la investigación enfocada en el análisis del transcriptoma de la hoja de *M*. *acuminata* en interacción con *P*. *musicola* se identificaron transcritos de fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima que cataliza una reacción en la ruta biosintética de fenilpropanoides, metabolitos que participan en los mecanismos de defensa de la planta. También está involucrada en la biosíntesis de fitoalexinas; compuestos antimicrobianos que participan en la producción de ácido salicílico, molécula señal involucrada en la resistencia sistémica adquirida (SAR). También se encontró la enzima 4-cumarato CoA ligasa, la cual participa en la biosíntesis de flavonoides e isoflavonoides, compuestos con función antioxidante y de defensa ante el ataque de patógenos. De acuerdo a los resultados anteriores se identificaron genes candidatos que contribuirán a la comprensión de los mecanismos de defensa del hospedante frente al patógeno (Passos *et al*., 2013).

En el trabajo de investigación realizado por Stergiopoulos y colaboradores en 2010, se caracterizaron tres efectores en *P. fijiensis* Avr4, Ecp2 y Ecp6, homólogos de efectores de *Cladosporium fulvum*. Se reportó que la función del efector Avr4, es proteger la quitina de las hifas contra la degradación por las quitinasas presentes en la planta. Al efector Ecp2, se le desconoce su función, pero es considerado un factor de virulencia, ya que su eliminación reduce la virulencia de *Cladosporium fulvum*. El efector Ecp6, se propone que es una lectina que se une a la quitina, por contener dominios Lys-M, los cuales están involucrados en la unión a carbohidratos, incluida la quitina. De igual manera Ecp6 contribuye con la virulencia del patógeno al evitar la activación de la inmunidad desencadenada por efectores (ETI) (Stergiopoulos *et al*., 2010). En otra investigación se identificaron efectores putativos usando el genoma de *P. fijiensis*. Se identificaron *in silico* 105 proteínas efectoras putativas, de las cuales 39 se consideraron putativos efectores específicos de *P. fijiensis* (Chang *et al*., 2016). Se sabe que en las plantas muchos genes son activados transcripcionalmente tras el ataque de los patógenos, para señalizar el reconocimiento y la inducción de la defensa en el hospedante, pero aún se requieren estudios para comprender mejor los patosistemas relacionados con las especies de *Pseudocercospora*. Si se conocen las moléculas de las plantas que están involucradas en la respuesta contra el ataque de los patógenos, se podrían diseñar estrategias para combatir las enfermedades: conociendo esas moléculas se podrían identificar los genes que participan en su síntesis, y sobreexpresando esos genes en los cultivos de *Musa* podría conferirse mayor resistencia, o eliminando genes que confieran vulnerabilidad en los hospedantes (Dangl *et al.*, 2013). Con los análisis transcriptómicos se identifican perfiles de expresión durante la interacción planta-patógeno, ofreciendo mejores perspectivas para identificar genes importantes para establecer las enfermedades producidas por los fitopatógenos (Arango *et al*., 2016; Chang *et al*., 2016; Noar y Daub, 2016; Mendoza, 2014).

Otros estudios se han centrado en conocer los cambios que se producen tanto a nivel bioquímico e histológico durante el proceso de infección, ocasionados por las especies de *Pseudocercospora* e identificar cultivares resistentes (Sánchez *et al*., 2013; Torres *et al*., 2012). Sánchez y colaboradores en 2013, observaron en microscopio la acumulación de fenoles en las lesiones foliares causadas por *P. fijiensis* en plantas inoculadas de “Cavendish naine”. La acumulación de los compuestos fenólicos ocurrió desde la aparición de las primeras lesiones e incrementó a medida que evolucionaron las etapas

de la enfermedad. Aunque la inducción de fenoles no fue efectiva en el control del progreso de la enfermedad en esta interacción compatible, los resultados evidencian la presencia de estos compuestos como parte de la respuesta del hospedero ante la infección. Torres y colaboradores en 2012, analizaron la actividad enzimática de la peroxidasa (POX), fenilalanina amoniaco liasa (PAL), β-1,3-glucanasa (GLU) y quitinasa (CHI), así como la producción de H_2O_2 en plantas de banano infectadas con *P. fijiensis*. Las respuestas de defensa se examinaron y compararon en un cultivar resistente (*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4) y susceptible (*M*. *acuminata* cv. Williams). Se observó una rápida inducción de las enzimas fenilalanina amoniaco liasa (PAL), peroxidasa (POX) y β-1,3-glucanasa (GLU) en el cultivar resistente (*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4) a las 6, 12 y 18 h después de la infección, así como la producción de H_2O_2 a las 72 h después de la infección. En cambio, en el cultivar susceptible (*M*. *acuminata* cv. Williams), la inducción de estas enzimas se observó hasta los 6 días después de la inoculación. Estos resultados sugieren que las primeras 72 h después de la infección son importantes para determinar la respuesta del hospedero al patógeno.

De igual manera las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa y en tiempo real, se están empleando para obtener conocimiento genómico de las especies de *Pseudocercospora* (Arango *et al*., 2016; Chang *et al*., 2016; Noar y Daub, 2016; Mendoza, 2014).

1.6. Estudios enfocados en conidios

Un conidio es una espora asexual. Por lo general, se forma en el extremo de un conidióforo, del cual se separa. Los hongos de la división de Ascomycota y Basidiomycota utilizan los conidios como esporas asexuales. Al proceso de formación de conidios se le denomina conidiogénesis u ontogenia conidial. Se considera importante por emplearse para la taxonomía de los hongos (Fan *et al*., 2019; Hagiwara *et al*., 2016; Hokyoung *et al*., 2014; Hokyoung *et al*., 2013; Khan *et al*., 2012; Cobos *et al*., 2011; Kikuma *et al*., 2007).

La identificación de los genes que se expresan en las esporas de los hongos puede permitir la identificación de puntos críticos en la etapa inicial infectiva (adhesión y penetración). La importancia de conocer la biología y la genética de cualquier hongo microscópico que ocasione daños a cultivos de importancia económica, radica en que estos conocimientos permiten identificar puntos débiles para generar estrategias de control. Con esta información se puede realizar trabajos biotecnológicos para

contrarrestar las enfermedades que ocasionan, como por ejemplo producir plantas que se puedan defender a su ataque (Fan *et al*., 2019; Khan *et al*., 2012; Xiao *et al*., 2012; Trujillo y Rodríguez, 2009).

A continuación se describen algunos trabajos de genética y transcriptómica realizados sobre conidios:

Neurospora crassa es un organismo modelo porque es fácil de cultivar y tiene un ciclo de vida haploide que hace que el análisis genético sea simple. Durante la formación de conidios y en los conidios maduros de *N*. *crassa* se identificó la expresión del gen con-6. La proteína CON-6 no tuvo homología con proteínas conocidas, pero es un polipéptido pequeño, hidrófilo que contiene una secuencia con repeticiones, características similares a las proteínas presentes en la embriogénesis tardía del maíz. En el maíz dichas proteínas son inducidas durante el estrés por deshidratación y contribuyen en la resistencia a la desecación. Es posible que desempeñe un papel similar en *Neurospora*, es decir, proteger a las esporas durante la desecación, pero su papel no es claro, porque la inactivación del gen no produce efectos negativos en la viabilidad de las esporas ni otros cambios fenotípicos (White y Yanofsky, 1993).

Especies del género *Aspergillus* (*A*. *fumigatus* y *A*. *nidulans*) son patógenos causantes de diversas enfermedades en pacientes inmunocomprometidos. En *A*. *fumigatus*, se caracterizó un grupo de genes (ALB1, ARP1, ARP2, ABR1, AVR2, AYG1) que participan en la biosíntesis de los pigmentos conidiales; la pigmentación de los conidios de *A. fumigatus* influye significativamente en su virulencia (Tsai *et al*., 1999). En el caso de *A*. *nidulans*, se identificaron tres genes (BRLA, ABAA y WETA), necesarios para completar las diferentes etapas de desarrollo del conidióforo en el hongo (Boylan *et al*., 1987). Otros genes involucrados en la conidiogénesis de *A*. *nidulans* son STUA y MEDA, necesarios para establecer el patrón espacial de los conidióforos. Cuando estos genes presentan mutaciones generan conidióforos espacialmente deformados, pero aún con capacidad para producir conidios viables (Clutterbuck, 1969).

La marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc*)* es una enfermedad grave del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y genera aproximadamente 10-15% de la pérdida anual de este cultivo. Dicho patógeno invade la planta a través de las raíces, coloniza los vasos del xilema y evita la translocación de agua y nutrientes a la parte superior de la planta. La infección es iniciada por conidios que invaden el tejido del

hospedante a menudo por penetración de células epidérmicas. Sharma y colaboradores en 2016, caracterizaron el transcriptoma de Foc en diferentes momentos de la germinación conidial, con la tecnología Illumina Hiseq. Como resultado encontraron transcritos sobreexpresados de los genes vinculados al desarrollo del hongo, como un homologo al gen CCG, implicado en el desarrollo de los conidios, una proteína cinasa dependiente de AMPc, importante para la germinación conidial, una proteína cinasa nim1, involucrada en la fosforilación de proteínas y la regulación mitótica, y familias de genes que codifican efectores secretados, enzimas que hidrolizan la pared celular/pectina, enzimas relacionadas con el metabolismo, transportadores, peptidasas, etc. Dicha investigación reveló que la germinación conidial de Foc se acompaña de cambios rápidos en la expresión génica que preparan al hongo para la patogénesis; el crecimiento del tubo germinativo y la invasión de células del hospedero, se reportó que los grupos de genes relacionados a las diferentes etapas se expresan de manera sucesiva. El Cuadro 1.4, resume la lista de los transcritos encontrados y que tienen mayor importancia. Hasta el momento este ha sido el único reporte sobre la transcriptómica de conidios en los que no sólo se enfocaron al proceso de conidiogénesis en sí, sino también a la búsqueda de genes relacionados con la patogenicidad.

Cuadro 1.4 Expresión de los transcriptos de mayor importancia en el trabajo de investigación realizado por Sharma *et al*. (2016).

Nombre	Función biológica putativa	Foc_0 h	Foc_2 h	Foc_6 h	Foc_24 h
FOXG_05358	Proteína RVS167	35.51	168.06	193.62	216.19
FOXG_05565	Fimbrina	28.75	140.34	198.27	197.66
FOXG_08094	Succinil-CoA: 3-cetoácido-coenzima A transferasa	31.12	204.35	185.99	308.43
FOXG_11436	Succinato-semialdehído deshidrogenasa	26.74	283.76	501.63	231.36
FOXG_02077	Succinato-semialdehído deshidrogenasa	20.41	202.5	608.89	291.53
FOXG_11687	Deshidrogenasa dependiente de FMN	8.04	63.96	62.37	132.91
FOXG_02078	4-aminobutirato aminotransferasa	86.31	693.01	1494.98	1450.29
FOXG_05657	L-xilulosa reductasa	62.87	509.82	996.83	783
FOXG_11000	Proteína que contiene el dominio de la flotilina	25.06	114.43	1488.56	754.9
FOXG_04329	Fosfatidilserina descarboxilasa	51.57	230.19	478.12	3399.18
FOXG_12915	Arginasa	6.47	62.45	228.23	101.59
FOXG_00706	Proteína de la familia AhpC /	4.76	54.44	184.71	147.52

	TSA				
FOXG_08409	Acil-CoA deshidrogenasa	8.71	48.07	53.28	62.2
FOXG_04892	Proteína asociada a la clasificación de proteína vacuolar vps13	5.47	26.06	25.73	78.5
FOXG_04152	P-450 bifuncional: NADPH-P450 reductasa	4.76	20.99	23.45	68.23
FOXG_03232	2-nitropropano dioxigenasa	4.17	20.18	38.11	29.97
FOXG_11482	Precursor de fosfatasa alcalina	3.15	12.71	30.43	19.9
FOXG_09098	Proteína de estrés general 39	2.33	21.51	12.87	29.69
FOXG_11443	Aldehído deshidrogenasa, precursor mitocondrial	2.09	10.7	41.12	21.2
FOXG_01304	2-metilcitrato sintasa, precursor mitocondrial	1.77	8.7	39.36	31.1
FOXG_08317	Esqueleto de proteína de unión	1.27	13.46	19.08	258.61
FOXG_08534	Fosfolipasa D PLD	1.93	9.05	26.75	50.64
FOXG_05382	3-oxoacilo-(proteína-transportadora-acilo) reductasa	0.98	4.77	11.7	6.59
FOXG_09820	Fosforilcolina fosfatasa	0.89	4.7	5.06	13.92
FOXG_15398	Proteína resistente a múltiples fármacos	1.05	18.85	8.25	8.92
FOXG_09028	Dehidrogenasa alcohol dependiente de NADP VI	0.32	1.77	2.53	114.35
FOXG_09770	Transferasa	0.09	0.77	21.01	90.05
FOXG_10443	Quitina sintasa 2	0.01	0.29	0.99	2.47
FOXG_01655	Proteína de la familia cinasa	0.07	0.62	1.39	2.91
FOXG_06086	Proteína cinasa nim-1 específica de G2	0.06	0.45	1.25	1.31
Las transcripciones con funciones definidas se tabularon de acuerdo con sus valores de FPKM (fragmentos por un millón de kilobase) en cuatro puntos de tiempo.					

En otro trabajo, se generaron tres bibliotecas de ADNc a partir de blastosporas, conidios aéreos y conidios sumergidos del hongo *Beauveria bassiana*, usado como agente de biocontrol contra algunas plagas de insectos. A estas bibliotecas se les hizo un análisis EST (Expressed Sequence Tag) donde se identificaron secuencias correspondientes al metabolismo celular, componentes celulares, catabolismo, transporte, división celular, etc. En la biblioteca de ADNc de los conidios aéreos se encontraron siete enzimas subtilisinas, las cuales representan una clase importante de factores de patogenicidad ampliamente estudiadas en la patogénesis de hongos sobre insectos. Además de las subtilisinas también se hallaron factores de virulencia, secuencias codificantes de hidrolasas, que incluyeron quitinasas, esterasas, peptidasas, fosfatasas, fosfolipasas y proteasas. De igual manera se encontraron una serie de proteínas que participan en la producción de metabolitos secundarios tóxicos, como la ennantina sintetasa, así como varios genes

cuyos productos proteicos parecen participar en la producción de esterigmatocistina (micotóxina) (Cho *et al*., 2006).

En *Metarhizium anisopliae*, hongo entomopatógeno, se analizaron varios genes con la técnica RT-PCR en tiempo real (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa); esta técnica es sensible, reproducible y cuantitativa para estudiar la expresión génica. Los genes estudiados fueron un gen regulador de proteínas G involucrado en la conidiogenésis (CAG8), un gen de una proteasa tipo subtilisina (PR1) y el gen SSGA que codifica una hidrofobina; y los genes de referencia fueron TEF (factor de elongación 1-α involucrado en la traducción), GPD (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y TRY que codifica un gen de la biosíntesis de triptófano. Como resultado de la investigación se estimaron aumento de los niveles de expresión de CAG8 en las últimas etapas de conidiogénesis sobre insectos muertos. También, el gen PR1 se expresó durante la conidiación fúngica en insectos muertos. Por otro lado, el nivel de expresión de SSGA fue significativamente mayor en los micelios durante su crecimiento en medios ricos en nutrientes. Este trabajo sirvió como base para investigar los niveles transcripcionales de genes expresados durante la germinación, conidiogénesis y patogénesis de *M. anisopliae* (Fang y Bidochka, 2006).

En *Fusarium graminearum* (hongo patógeno que infecta importantes cultivos de cereales como el trigo, la cebada y el maíz) se analizaron los mecanismos moleculares relacionados con la conidiogénesis basándose en reportes de *A*. *nidulans*. Se estudió el gen ABAA involucrado en la diferenciación de hifas en *A*. *nidulans*; para su evaluación se eliminó y se sobreexpresó en *F. graminearum*. La pérdida de función de ABAA llevó a una nula producción de conidios en *F. graminearum*, y su sobreexpresión produjo deterioro del desarrollo sexual y asexual, una germinación retardada de los conidios, y una reducción en la producción de tricoteceno, micotoxina capaz de inhibir la síntesis de proteínas. Aunque existen diferencias morfológicas entre los conidióforos de *A. nidulans* y *F. graminearum*, los resultados sugieren que el gen *ABAA* ha conservado su papel en la formación y la función de fiálide (estructura con forma de botella, ubicada en el extremo de un conidióforo, sobre la cual se producen las esporas) en ambos hongos. Se asumió que el gen ABAA, puede formar parte de la conidiación en otros hongos filamentosos (Hokyoung *et al*., 2013). En otro estudio enfocado en la conidiogenésis de *F*. *graminearum*, se caracterizó funcionalmente el gen WETA, previamente reportado en la conidiogénesis y la maduración del conidio en *A*. *nidulans*. Para conocer la función del

gen WETA éste se eliminó por “knock out”; la pérdida de función no alteró el crecimiento micelial ni el desarrollo sexual ni la virulencia, pero se produjeron conidios relativamente largos, con menos septos, más sensibles a tensiones agudas, como estrés oxidativo y estrés por calor. Además, se redujo la tasa de supervivencia de los conidios, y se produjeron conidios unicelulares a través de la conidiación por microciclos. Esto indicó que WETA mantiene la latencia de los conidios y suprime la conidiación por microciclos en *F. graminearum* (Hokyoung *et al*., 2014).

En *Erysiphe necator*, causante del mildiu polvoriento en la uva (enfermedad que puede atacar todos los órganos verdes de la vid) se estudió la conidiogénesis mediante ADNc-AFLP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados por ADNc), y se hizo un análisis comparativo de expresión génica con un transcriptoma de *E. necator*, en dicho análisis se identificaron genes con posible participación en la conidiogénesis (Wakefield *et al*., 2011). Entre estos se encontraron genes que codifican proteínas con dominio Pap2, las cuales podrían ser responsables de coordinar una señal lipídica que estimula la esporulación en condiciones de estrés nutricional. También, durante la conidiación se detectó un incremento en la expresión de la proteína estructural quitina sintasa 2. Asimismo, se regularon positivamente dos proteínas con motivo “caja F”, que podría actuar como receptores de sustratos para la ubiquitina ligasa, enzima necesaria para la división celular y el desarrollo de esporas. De igual manera se encontraron secuencias con dominios de caleosina, las cuales están involucradas en producir cuerpos de almacenamiento para las esporas en desarrollo. Igualmente se encontraron genes asociados con el sistema regulatorio de la proteína VEA y la señalización de proteína G, ambos genes son necesarios en la conidiación de *A. nidulans*. En resumen, este trabajo muestra que *E. necator* puede tener genes similares a los expresados en la conidiación de otros hongos.

El género *Pseudocercospora* comprende distintas especies anamórficas que son diferenciadas por la presencia o ausencia de pigmentación en los conidióforos y conidios, por lo que la mayoría de los trabajos de investigación sobre conidios de este género se han enfocado en estudiar la morfología. Para las especies de *Pseudocercospora* que afectan a *Musa*, de igual manera la morfología anamorfa se considera más informativa que la morfología teleomorfa, por lo que se utiliza para diferenciar a los principales patógenos: *P. fijiensis*, *P. eumusae* y *P. musicola*. Además de los trabajos de investigación enfocados en la morfología del estado conidial de las especies de

Pseudocercospora que atacan a *Musa,* hay investigaciones dirigidas a la obtención de conidios a partir de hojas de banano infectadas, las cuales pueden usarse para determinar la agresividad de los aislamientos de *Pseudocercospora*, comprender los aspectos citológicos y bioquímicos de la interacción planta-patógeno, determinar el efecto de la proliferación *Pseudocercospora* en diversos climas, identificar cultivares resistentes de *Musa* y generar bibliotecas de ADNc conidial (Ambawade *et al*., 2015; ; Conde *et al*., 2008; Peraza *et al*., 2008; Rodríguez *et al*., 2007; Jacome *et al*., 2003; Pérez, 2002; Meredith y Lawrence *et al*., 1970).

En nuestro grupo de investigación el Ing. Bioquímico Efrén Jesús Pech Balan generó un transcriptoma de conidios de *P*. *fijiensis*. Este transcriptoma se creó a partir de ARN de conidios germinados a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h. Como resultado solo se seleccionaron 100 transcritos diferentes para conocer su anotación funcional, entre las anotaciones funcionales se identificaron proteínas hipotéticas, genes relacionados con el metabolismo de proteínas, la biosíntesis, el metabolismo del fósforo, el metabolismo de ácidos nucleicos, el metabolismo de carbohidratos, el transporte y la comunicación celular (Pech, 2013).

A partir del trabajo realizado por Pech (2013), en el presente trabajo se realizó un análisis completo del transcriptoma obtenido de los conidios de *P*. *fijiensis*. Primero se realizó un análisis de calidad de los nucleótidos que conforman las secuencias del transcriptoma. Se trabajó con las secuencias que obtuvieron un valor Phred ≥ 20. Posteriormente, se ensamblaron las secuencias para obtener contigs de un tamaño mínimo de 250 nucleótidos y a partir de ellos se analizaron e identificaron transcritos relacionados con la germinación conidial, los cuales pueden ser importantes para la patogenicidad de *P. fijiensis*, así como genes relacionados con la conidiogénesis.

JUSTIFICACIÓN

Los plátanos y bananos son plantas cultivadas en al menos 120 países ubicados principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Son cultivos que tienen una importancia alimentaria muy alta y su producción contribuye a la captación de divisas.

En México, la importancia de los bananos y plátanos radica en que son frutas de consumo, poseen un alto valor nutritivo, tienen disponibilidad durante todo el año y su precio es relativamente bajo. Estos cultivos representan 12% del volumen de producción de frutas en el país, y del total de producción de bananos y plátanos más del 90% se destinan al consumo nacional.

La enfermedad más importante que afecta a las regiones productoras de plátano y banano del mundo es la Sigatoka negra. Esta enfermedad es causada por el hongo *P. fijiensis*, y si no se implementan medidas para su manejo, causan pérdidas de producción de hasta 100%, las cuales se centran principalmente en la aplicación intensiva de fungicidas químicos que tienen un impacto negativo sobre el ambiente y representan riesgos para la salud de los productores. La problemática de la Sigatoka negra va más allá de las pérdidas que ocasiona y de las consecuencias de su control, ya que también representa una amenaza para la seguridad alimentaria y la captación de divisas en los países en desarrollo.

Las plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS, de sus siglas en inglés Next-Generation Sequencing) permiten el estudio del transcriptoma de patógenos por lo que han mejorado la comprensión de los mecanismos genéticos de patogenicidad. Las esporas (conidios y ascosporas) del hongo son la principal fuente de infección, son diseminadas a través del viento y la lluvia. Las ascosporas se producen en las lesiones maduras cuando la enfermedad ha alcanzado las etapas más avanzadas y la hoja está necrótica, mientras que los conidios se producen durante todo el tiempo, desde que inician las primeras etapas visibles, por lo que los conidios juegan un papel importante en la dispersión de la enfermedad y el aumento de brotes epidémicos a nivel local.

Muchas investigaciones se han enfocado en entender la conidiogénesis. En *P. fijiensis* aún se desconocen los genes involucrados en la conidiogenésis y la germinación conidial, por ello es necesario investigar los genes que se expresan durante las primeras etapas de desarrollo de *P. fijiensis*. Existen pocos trabajos que se han enfocado en identificar genes

en los conidios que participan en la patogénesis, a pesar de que muchos efectores y factores de patogenicidad pueden ser particulares en cada etapa de desarrollo de los patógenos. Por dicha razón es interesante identificar los genes relacionados con la patogenicidad que son expresados durante la germinación de los conidios de *P. fijiensis*.

Se espera que el análisis del transcriptoma de conidios de *P. fijiensis* permita identificar genes no solamente involucrados en la germinación conidial sino también genes importantes para la infección del banano, tales como los efectores. Esto permitirá profundizar nuestro conocimiento sobre la enfermedad, además de que estos genes pueden ser eventualmente usados como blancos moleculares para desarrollar nuevas estrategias de control.

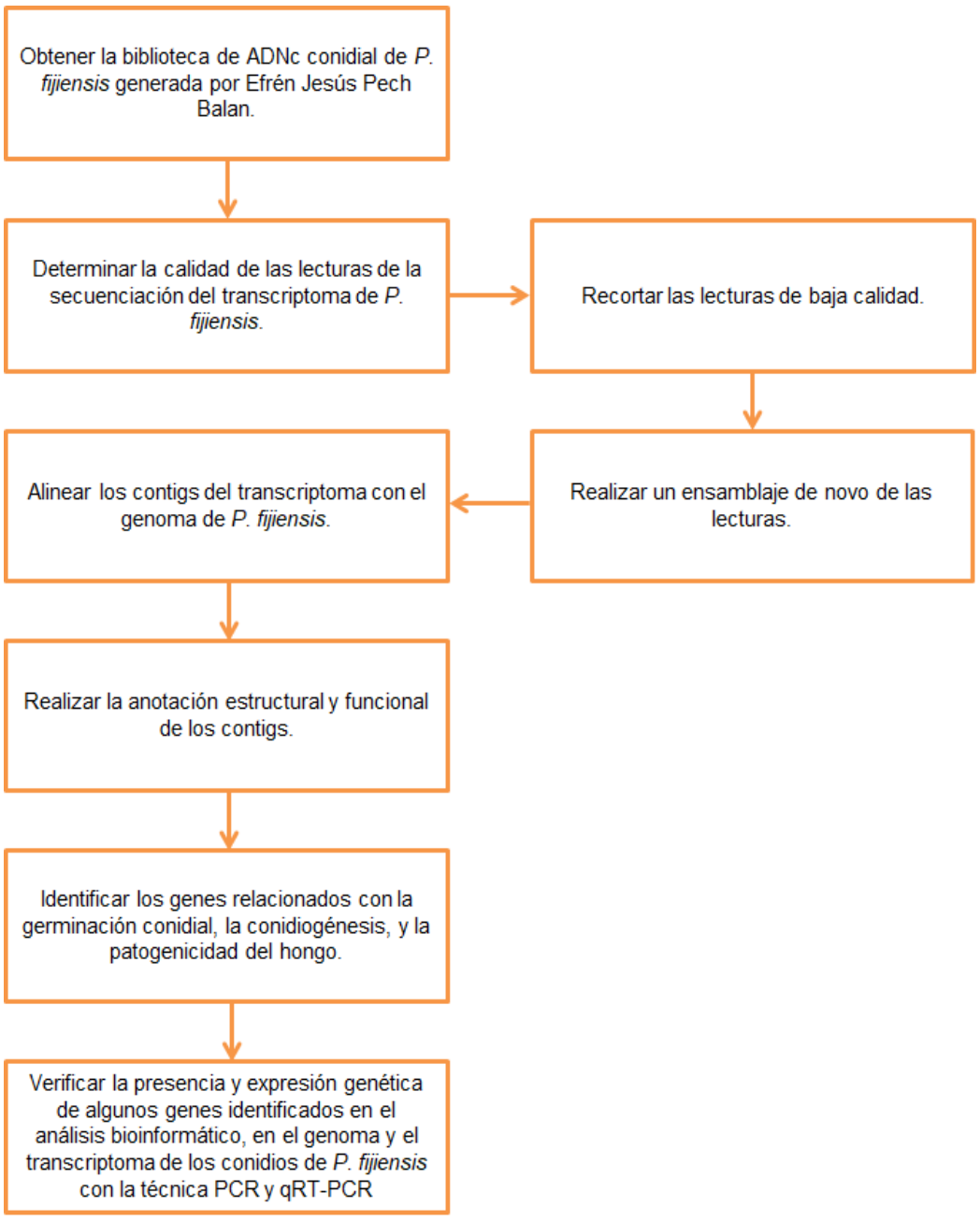
OBJETIVO GENERAL

Identificar los genes relacionados con la patogenicidad, la conidiogénesis y la germinación conidial en el transcriptoma de conidios de *P. fijiensis* producidos *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar el análisis bioinformático global del transcriptoma de conidios de *P. fijiensis.*
2. Analizar si los genes identificados en el transcriptoma de conidios de la cepa C1233 de *P*. *fijiensis* que no estén representados en el genoma secuenciado de la cepa CIRAD 86 de este hongo (cepa de referencia), son parte del genoma esencial o parte del dispensoma.
3. Identificar en el transcriptoma de conidios de *P. fijiensis* presuntos efectores.
4. Analizar la expresión de al menos tres genes relacionados con patogenicidad.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Secuenciación

Se usó la plataforma 454, conocida como pirosecuenciación, para llevar a cabo la secuenciación masiva de transcritos de cadena simple de los conidios de *P*. *fijiensis*. Este transcriptoma fue generado por el Ing. Bioquímico Efrén Jesús Pech Balan como se describe a continuación: se cultivó en medio PDA un aislado de *P*. *fijiensis* obtenido en el Campo Experimental Uxmal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), luego se cosecharon los conidios a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h. Se extrajo ARN de cada muestra de conidios y se trató con ADNasas para obtener ARN libre de ADN. Debido a que las cantidades de ARN obtenidas de cada tiempo fueron insuficientes para su análisis individual, hubo la necesidad de mezclar todos los ARNs para realizar la secuenciación masiva (Pech, 2013). Es importante señalar que a partir de este transcriptoma de conidios de *P*. *fijiensis* se realizó este trabajo de investigación.

2.2. Análisis bioinformático

Después del proceso de secuenciación se obtuvieron los datos en forma de lecturas contenidas en archivos fasta y fastq. Los pasos básicos en el análisis bioinformático fueron: (1) el análisis de calidad de las lecturas, (2) el ensamblaje y alineamiento y, (3) la identificación de genes expresados, los cuales se identificaron con los programas Blast del NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) (Rodríguez *et al*., 2014; Van-Verk *et al*., 2013). Para llevar a cabo estos pasos se utilizaron programas bioinformáticos de manera nativa, requiriendo del sistema operativo Linux/UNIX, el editor de texto plano VIM y el lenguaje de programación Perl. Cuando fue necesario, también se emplearon programas bioinformáticos disponibles en internet, esto para obtener la mayor cantidad de información posible de los genes identificados.

2.2.1. Preparación de las lecturas: análisis de calidad

El análisis de calidad de los nucleótidos que conforman las secuencias del transcriptoma se realizó con el programa bioinformático FastQC versión 0.11.5 (https://sites.google.com/site/b22carcabms/home/practica-1). Este programa otorgó un

puntaje Phred a cada nucleótido, los ordenó y aquellos que estuvieron por debajo del valor recomendado (valor Phred ≥ 20) se descartaron por considerarlos de mala calidad (Van-Verk *et al*., 2013; Blankenberg *et al*., 2010), para lo cual se usó la herramienta FastQ quality trimmer de la paquetería FastX Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/), de modo que solo se conservaron los nucleótidos con un valor Phred ≥ 20 para el ensamblado (Blankenberg *et al*., 2010).

2.2.2. Ensamblaje y alineamiento de los transcritos

Cuando se obtuvieron las lecturas con nucleótidos con valor Phred ≥ 20 se realizó el ensamblaje de las lecturas en "contigs" (segmentos de ADN superpuestos que en conjunto representan una región consenso de ADN) antes de alinearlos a secuencias genómicas para revelar las estructuras de las transcripciones (ensamblaje *de novo*). Lo anterior se realizó con el programa Trinity. Después los contigs se alinearon con el genoma *de P. fijiensis* reportado en JGI Genome Portal (alineamiento con base en un genoma de referencia) usando el programa bioinformático Bowtie2. Este programa de libre acceso permite analizar la expresión de genes, el descubrimiento de nuevos genes y nuevas variantes de "splicing" de los datos obtenidos mediante la secuenciación de alto rendimiento de ARNm (RNA-Seq) (Chu y Corey, 2012; Langmead y Salzberg, 2012). Los dos programas bioinformáticos anteriores se usaron para obtener mayor información de los transcritos.

2.2.3. Identificación de genes expresados: anotación génica

Después de un ensamblaje exitoso de las secuencias, el próximo reto consistió en interpretar la información que contenían. Para ello fue necesario identificar las principales características de las lecturas, proceso conocido como anotación (Aguilar y Falquet, 2015).

La anotación del transcriptoma comprende dos etapas fundamentales: la anotación estructural (predicción de regiones codificantes) y la anotación funcional (asignación de información biológica a los genes previamente predichos). Para llevar a cabo la anotación estructural y la anotación funcional se empleó la herramienta bioinformática Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) y todas sus opciones (Blastx, tBlastn, Blastp, etc.). Esta herramienta es capaz de comparar una secuencia problema (secuencia query) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentran en una base de datos (Altschul *et al*.,

1990). Otra metodología empleada es la búsqueda de motivos y dominios funcionales, para generar una idea de la familia génica a la que pertenece el gen, o indicar los tipos de procesos en los que puede estar involucrado (Aguilar y Falquet, 2015).

Las bases de datos que se usaron para la búsqueda de anotaciones fueron las del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/), base de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health de Estados Unidos), que contiene una colección de secuencias de ADN con disponibilidad pública. También se usó la base no redundante de UniProtKB/Swiss-Prot (http://www.uniprot.org/) y KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (http://www.genome.jp/kegg/) para asociar los genes expresados con rutas metabólicas y así esclarecer su posible función (Zou *et al*., 2015; Marchler *et al*., 2011).

Para finalizar la anotación génica se buscó la homología de las secuencias obtenidas en el transcriptoma con las secuencias de la base de datos Gene Ontology (GO) usando la herramienta Retrieve/ID mapping de la base de datos Uniprot, para determinar las funciones moleculares, los componentes celulares a los que pertenecen, y los procesos biológicos donde intervienen las secuencias (Davis *et al*., 2000).

Además de realizar la anotación global del transcriptoma, al final se buscaron en particular los genes que codifican proteínas que pueden ser significativas para la patogenicidad de *P*. *fijiensis*, así como genes relacionados con la conidiogénesis y la germinación conidial.

2.3. Selección de genes para análisis *in vitro*

A partir del alineamiento de los transcritos identificados en el trancriptoma de conidios de la cepa C1233 de *P*. *fijiensis* con el genoma de referencia de *P*. *fijiensis* (obtenida con la cepa CIRAD 86) se identificaron 77 secuencias que no alinearon. De éstos, se seleccionaron 12 genes; dos se escogieron para confirmar que son parte del genoma esencial (“core”) de *P*. *fijiensis* y diez para evaluar si son parte del genoma dispensable o parte del genoma esencial del hongo *P*. *fijiensis*.

2.3.1. Evaluación de genes para determinar si son parte del genoma esencial ("core") o parte del dispensoma

Esta evaluación se realizó mediante PCR para determinar presencia/ausencia de los genes en diez aislados de *P. fijiensis*. Para ello se obtuvo el ADN genómico a partir de micelio cultivado *in vitro*. Se utilizó el aislado C1233 (procedente de Uxmal, Yucatán colectado por el Dr. Andrew James Kay), y del cual se obtuvo el transcriptoma analizado en este trabajo, así como nueve aislados colectados por el Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores, los cuales fueron CR6A y CR6D que proceden de cultivos de manejo semi-intensivo del Campo Experimental Rosario Izapa de Tuxtla Chico, Chiapas; OZ5A, OZ1B y OZ2B procedentes de cultivos de manejo rural de Ocozocoautla, Chiapas, O9A procedente de cultivos de manejo rural de Ocosingo, Chiapas, CH1A, CH16A y CH63F procedentes de cultivos de manejo rural de Motozintla-Huixtla, Chiapas. Para el análisis se seleccionaron los siguientes genes: subunidad 1 del citocromo c oxidasa, y proteína 22 relacionada con la autofagia (Atg22). Se esperaba que estos genes amplificaran en los aislados, por ser necesarios para que el hongo sobreviva. Se seleccionaron diez genes que tuvieron homología con proteínas hipotéticas de hongos relacionados filogenéticamente como *P*. *eumusae*, *P*. *musae* y *Dothistroma septosporum*, y transcritos que no tuvieron homología con ninguna secuencia reportada en la base de datos no redundante de proteínas del NCBI, ni con las secuencias de la base no redundante de UniProtKB/Swiss-Prot. En caso de ser parte del dispensoma, se espera que amplifiquen en el aislado C1233 y posiblemente en algunos otros aislados, pero no en todos los aislados en estudio. Los que amplifiquen en los diez aislados posiblemente son parte del genoma esencial (core) del patógeno.

La extracción de ADN de los aislados de *P. fijiensis* se realizó de acuerdo a Pech (2013).

El Cuadro 2.1 muestra los 12 pares de cebadores utilizados en el análisis de PCR de punto final, sintetizados por la compañía T4 OLIGO ubicada en Irapuato, Guanajuato, México. Estos cebadores fueron diseñados a partir de las secuencias de los transcritos identificados en el transcriptoma de conidios de *P. fijiensis* usando PrimerQuest Tool, herramienta de la compañía Integrated DNA Technologies (IDT).

Cuadro 2.1 Cebadores utilizados en PCR punto final.

Cebador	Secuencia 5'→3'	Tamaño en pares de bases	Tm (temperatura de fusión)	Tamaño de amplificación esperado (fragmento)
Contig 929 Forward	TTC CAC TAC ACG AAC CGT ATT T	22	62.5	422 pb
Contig 929 Reverse	ACA GGG ATC AAG CAA GTC ATC	21	63.5	
Contig 625 Forward	TTC TGT CAA GTC ACC CAA CTC	21	62.3	366 pb
Contig 625 Reverse	CCA TCG TCA ACA GTG GAA ATT G	22	66.6	
Contig 754 Forward	CGT CGC AGG TAT TGT CCT AC	20	62.6	321 pb
Contig 754 Reverse	CGC CCT CAG GTC CAA TAT AC	20	63.6	
contig 1478 Forward	GTG AGC GCA GAT ATG CAA GA	20	64.5	214 pb
Contig 1478 Reverse	TTG CCT GCA TCG TCC TTT	18	64.9	
contig 1942 Forward	CAC GAC GAC TGG GTT GTT AG	20	63.6	439 pb
Contig 1942 Reverse	GGT CCA ATG AAG CTG GAA GT	20	63.5	
Contig 605 Forward	TGC TGT GTG TGA TCA AGT ATG T	22	61.2	360 pb
Contig 605 Reverse	AGG CGA AGT CAT GTG TAT GG	20	63	
Contig 379 Forward	ATC GAG GCC GGT TTC ATT C	19	66.5	453 pb
Contig 379 Reverse	CAA GCT CAC ACA GTT GAG TAG T	22	59.2	
Contig 81 Forward	GGT GCA GTG TTC GCT TTA TTT	21	63.3	322 pb
Contig 81 Reverse	GAA GTG TTG CTC AAG GGT ATC T	22	61.6	
Contig 612 Forward	GCA GCA CTA ACT CCG CAT T	19	63.4	373 pb
Contig	CCG ACT CTG GCT	18	64.5	

612 Reverse	GCA TTT			
Contig 1637 Forward	TTA ATC CTG AGT GGA TGT GAG TG	23	63.2	377 pb
Contig 1637 Reverse	CAT TGC TTT CTT CTT GCC TCT G	22	65.3	
Contig 1172 Forward	AGC TGC TCC AGC TGT TC	17	60	381 pb
Contig 1172 Reverse	GCC GTG CAA GCT ACA TTTC	19	63.8	
Contig 1009 Forward	AAC CCA AAT CGG AAG GTA AGT	21	62.8	351 pb
Contig 1009 Reverse	ACA CCA CGA CTG GAA TGT G	19	62.8	
Actina forward	CTC ATG AAG ATC TTG GCT GAG	21	62	478 pb
Actina reverse	GCA ATG ATC TTG ACC TTC AT	20	59.6	

2.3.2. Identificación *in silico* de efectores putativos en el transcriptoma de conidios en germinación de *P. fijiensis*

Se identificaron *in silico* los efectores putativos presentes en el transcriptoma de conidios de *P. fijiensis* usando la herramienta bioinformática tBlastn (versión 2.6.0+) de manera local, con los siguientes parámetros: valor esperado (e-value) 1e-5 y porcentaje de identidad 80%, empleando las bases de datos de efectores putativos reportados por Noar y Daub en 2016, y por Chang y colaboradores en 2016. La herramienta tBlastn realizó la búsqueda de efectores putativos en el transcriptoma de conidios traducido en aminoácidos comparando con las proteínas efectoras putativas reportadas en las bases de datos mencionadas anteriormente.

2.3.3. Evaluación por RT-PCR en tiempo real de la expresión de efectores putativos

Se seleccionaron tres de los efectores putativos identificados *in silico* en el transcriptoma de la germinación de los conidios de *P. fijiensis*. Sus niveles de expresión fueron evaluados mediante RT-PCR en tiempo real. Para ello se extrajo el ARN total a partir de conidios en germinación cosechados a los tiempos de 0, 8 y 16 h, así como de micelio de *P. fijiensis* de cuatro semanas. La expresión de estos genes también fue evaluada en la

interacción de *P. fijiensis* con el banano cultivar *M. acuminata* cv. Calcutta 4. Se infectaron las hojas 1 y 2 de plantas con cuatro meses de edad con un volumen de 0.150 mL de una solución de 1×10^6 de conidios.mL, y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero en el CICY. Para los análisis se usó una mezcla de ADNc procedente de los días 3, 4 y 9 (fase temprana), y una mezcla de ADNc procedente de los días 20, 21, 22 y 23 (post-infección). Se analizaron también en la interacción *in vitro* de *P. fijiensis* con *Trichoderma harzianum*; para ello en 50 mL de medio PDB se adicionaron 1 mL de micelio desagregado de cada hongo, a temperatura ambiente y agitación constante de 100 rpm. Se analizaron los días 1, 3 y 7. Las muestras de interacción de *P. fijiensis* con banano fueron proporcionadas por la estudiante de Doctorado Karla Gisel Carreón Anguiano y la de interacción de *P. fijiensis* con *T. harzianum* por el Br. Juan Timoteo Méndez Díaz, ambos del Laboratorio de Biotecnología Microbiana (Unidad de Biotecnología, CICY).

Se indujo la producción de conidios de *P. fijiensis*, y se observaron los tiempos de germinación de los conidios usando un microscopio óptico (Nikon Eclipse E2000) con aumento de 10×, 20× y 40× y se cosecharon a las 0, 8 y 16 h. Para el registro gráfico se fotografió usando la cámara Infinity 3 (Lumenera corporation) y el software INFINITY ANALIZE. La extracción de ARN de los conidios de *P. fijiensis* se realizó de acuerdo a Pech, 2013. Para determinar la integridad de los ARN obtenidos se realizó una electroforesis en gel de 2% de agarosa con amortiguador de corrida TAE 1×. Seguidamente, los ARN de las diferentes muestras se trataron con ADNasa (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, la ADNasa se inactivó añadiendo 1 μL de EDTA (25 mM) y calentando a 65 °C por 10 minutos. Para confirmar la ausencia de ADN en las muestras de ARN tratadas se realizó una PCR (en ausencia de la enzima transcriptasa reversa) con cebadores que amplifican un fragmento del gen de actina de *P. fijiensis*. Las muestras que no amplificaron se utilizaron para la síntesis de ADNc. Se usó 1 μg del ARN libre de ADN y para la síntesis de ADNc se siguió el protocolo de la Superscript^{TM}III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Para confirmar la síntesis de los ADNc se amplificó por PCR de punto final un fragmento del gen de actina de *P. fijiensis*.

Las reacciones de RT-PCR en tiempo real fueron llevadas a cabo en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) en placas de 96 pozos. Cada reacción contenía 15 μL de volumen total, compuesto de 7.5 μL de SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystem), 0.4 μL (10 μM) del cebador directo, 0.4 μL (10 μM) del

cebador reverso, 1 μL (10 ng) de ADNc (de conidios germinados, micelio o de las muestras de interacción de *P. fijiensis* con banano o con *T. harzianum*), y 5.7 μL de agua ultrapura libre de nucleasas. Todas las reacciones se realizaron por triplicado, incluyendo reacciones sin templado como controles negativos. Las condiciones de termociclado fueron: 1 ciclo de 10 minutos a 95 °C de desnaturalización inicial, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C de desnaturalización y 1 minuto a 60 °C de alineamiento y extensión. Posteriormente se analizaron las curvas de disociación para cada gen y se verificó la amplificación de productos únicos usando el programa StepOne model, Applied Biosystems, no observándose productos inespecíficos. La expresión relativa de los tres efectores putativos fue calculada con base al modelo matemático descrito por Michael W. Pfaffl (Pfaffl, 2001), usando actina como gen de referencia. También se realizó un análisis estadístico de los resultados del nivel de expresión con el programa Minitab® 18.1. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si la expresión de los tres efectores putativos era constante o significativamente diferente en las condiciones evaluadas. Además se realizó la prueba de Fisher ($P \leq 0.05$) y Tukey ($P \leq 0.05$) para determinar diferencias de expresión entre las diferentes condiciones.

El Cuadro 2.2 se enlistan los pares de cebadores utilizados para el análisis por RT-PCR de tres genes efectores putativos identificados en el presente trabajo. Los cebadores fueron sintetizados por la compañía T4 OLIGO ubicada en Irapuato, Guanajuato, México. Estos cebadores fueron diseñados a partir de las secuencias de los transcritos identificados en el transcriptoma de conidios de *P. fijiensis* usando PrimerQuest Tool, herramienta de la compañía Integrated DNA Technologies (IDT).

Cuadro 2.2 Cebadores utilizados para el análisis de RT-PCR en tiempo real de algunos efectores potenciales de *P. fijiensis*.

Cebador	Secuencia 5'→3'	Tamaño en pares de bases	Tm (temperatura de fusión)	Tamaño del amplicón	% de eficiencia
373 Forward	GTA GCG CAA ACT CGT TCA ATA TG	23	64.7	100 pb	92.50
373 Reverse	CTC AGT GTT AGC GTT GGA TCT T	22	62.6		
376 Forward	CTG CGC TTC TTC TTC CTT CT	20	63.1	113 pb	96.42
376 Reverse	AGA CGG CAT CAC GCA TTT	18	64.8		

649 Forward	TTG TGG GCT GTA GAG GAG A	19	61.6	115 pb	98.48
649 Reverse	GAC GAC TTC ACT CGC TTG AT	20	62.5		
Actina forward	CAT CAC CAT TGG CAA CGA GC	20	68.8	182 pb	101.93
Actina reverse	CCT GGA TAC ATG GTA GTA CC	20	55.7		

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Análisis de calidad de las secuencias de nucleótidos

A continuación se describen los resultados obtenidos en el análisis.

- En el transcriptoma se obtuvo un total de 23,429 secuencias.
- La longitud de las secuencias estuvo entre 40-724 nucleótidos.
- El porcentaje del contenido de G/C (guanina y citosina) fue de 53%.
- La calidad media de las secuencias fue igual a un valor Phred de 36, calidad que supera el valor Phred ≥ 20 (que se acepta como mínimo) para llevar a cabo un análisis bioinformatico.
- Los nucleótidos de las secuencias dentro del intervalo 1-400 se agregaron con un valor de Phred ≥ 20.
- La calidad de las secuencias en el transcriptoma de *P*. f*ijiensis* disminuyó conforme las secuencias son más largas. Esto es normal y se debe principalmente a que las lecturas largas “se salen de fase”, contaminando la señal luminosa que tiene que leer la cámara del secuenciador, lo que provoca lecturas erróneas y degrada la calidad de la secuenciación.
- En el intervalo de 40-400 nucleótidos en las secuencias existió una relación equiparable de GC y AT.
- Los nucleótidos en las posiciones 500-639 no fueron confiables. Esos nucleótidos estuvieron representados con la letra N porque en la secuenciación no se pudieron determinar con precisión.
- Distribución del tamaño de las secuencias: la longitud de las secuencias fue variable; la mayoría tenía un intervalo de longitud entre 320 y 459 nucleótidos.
- El nivel de repetición de secuencias: un 85.16% de las lecturas presentaron repeticiones. El nivel de repetición promedio estuvo entre 2 y 4 veces.
- Secuencias sobrerrepresentadas. No se encontraron secuencias sobrerrepresentadas, es decir, secuencias que representen más de un 0.1%

respecto al numero total de secuencias. Esto indica que es una biblioteca con secuencias diversas.

- Porcentaje de secuencias conteniendo adaptadores. La compañía donde se realizó la secuenciación entregó las lecturas de la secuenciación sin adaptadores, por lo que fue 0%.

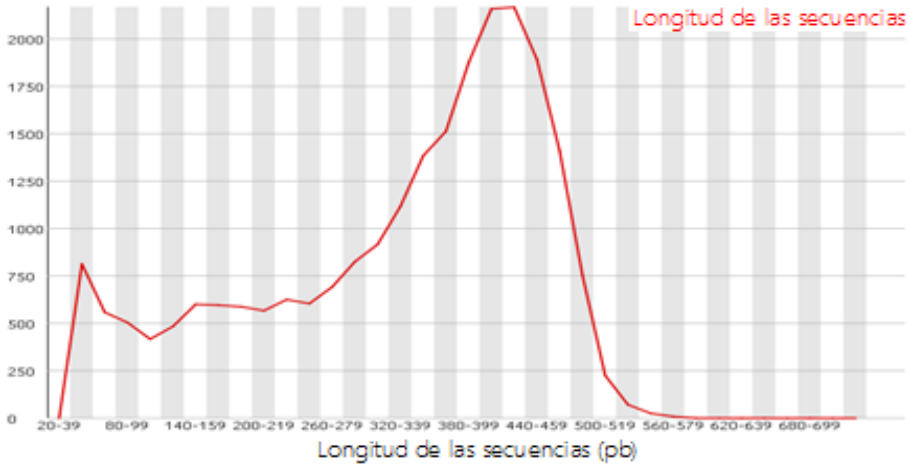


Figura 3.1 Gráfico de la distribución del tamaño de las lecturas de la secuenciación del transcriptoma de conidios de *Pseudoercospora fijiensis*. Secuenciación realizada por la técnica Roche 454.

Posteriormente se realizó un recorte de las secuencias con baja calidad, usando la herramienta FastQ quality trimmer (versión 0.0.14). Al observar que las secuencias tenían una longitud de 40-724 nucleótidos y sobretodo un valor Phred < 20 en los extremos 5' y 3', se dispuso como primera tarea recortar los nucleótidos del extremo 3' para obtener secuencias con una máxima longitud de 500 nucleótidos. Es decir, no se eliminó ninguna secuencia de las 23,429 sino sólo se recortaron los extremos 3' de las secuencias más largas de 500 nucleótidos. Después se realizó el recorte de los primeros 50 nucleótidos de los extremos 5'. Como resultado se eliminaron 489 secuencias (2% del total) de las 23,429 secuencias, permaneciendo 22,940 secuencias con calidad aceptable para las siguientes acciones. Esas secuencias presentaron un intervalo de longitud de 50 a 500 nucleótidos. En el Cuadro 3.1 se muestra un resumen del análisis de calidad de las secuencias del transcriptoma de los conidios de *P. fijiensis*.

Cuadro 3.1 Resumen del análisis de calidad de las secuencias del transcriptoma de los conidios de *P. fijiensis*.*

Total de secuencias del transcriptoma FastQC (versión 0.11.5)	Recorte de los nucleótidos del extremo 3' (máxima longitud de 500 nucleótidos)	Recorte de los primeros 50 nucleótidos del extremo 5'	Secuencias descartadas del transcriptoma de *P. fijiensis* (valor Phred < 20 después del Trimmer)	Total de las secuencias con calidad aceptable
23,429	23,429	22,940*	489	22,940

*Rango de longitud de 50-500 nucleótidos.

3.2. Ensamblaje y alineamiento de los transcritos

Una vez obtenidas las secuencias de buena calidad (22,940), se verificó sus homologías con las secuencias del transcriptoma global deducido de la cepa de referencia (CIRAD 86) de *P*. *fijiensis* reportado en JGI Genome Portal (descargado el 12 de junio de 2017). Para ello se usó el programa Blastn (versión 2.2.31) de manera local, con los siguientes parámetros: valor esperado (e-value) 1e-10, porcentaje de identidad (perc_identity) 90%, porcentaje de cobertura (qcov_hp_perc) 90%. Como resultado 12,961 (56.4%) encontraron homología con secuencias del transcriptoma global deducido de la cepa de referencia de *P*. *fijiensis* mientras 9,979 (43.5%) secuencias no obtuvieron homología. Posteriormente se evaluó la homología de las 9979 secuencias con secuencias reportadas en la base de datos no redundante de nucleótidos del NCBI, realizando un Blastn (versión 2.7.0+) en línea el 21 de septiembre de 2017, usando el algoritmo blastn con los parámetros de default: (porcentaje de identidad 85%, puntuación de concidencia/desajuste (Match/Mismatch Scores) de 2 y -3, etc.), y un valor esperado de 1e-10. Como resultado se encontró homología a 9914 secuencias con secuencias de *P. fijiensis* (con anotaciones hipotéticas), y con secuencias pertenecientes a otras especies de hongos filogenéticamente cercanas a *P. fijiensis* como *P*. *eumusae*, *P*. *musae*, *D*. *septosporum*, etc. y también homología con 65 secuencias de *E. coli*. Es decir, las 9,979 secuencias tuvieron homología con las secuencias de la base de datos no redundante de nucleótidos del NCBI. La discrepancia de encontrar sencuencias de *P*. *fijiensis* en el GenBank que no se encontraron en el genoma de referencia de este hongo se debe al menos a dos razones: la existencia en el GenBank de secuencias reportadas por trabajos de investigación que han estudiado al patógeno de la Sigatoka negra de manera independiente al proyecto de secuenciación masiva. Otra posibilidad es que en la

búsqueda que se realizó mediante órdenes en la terminal se usaron parámetros más estrictos o simplemente diferentes de los que usa el Blast automático, y por ello el análisis Blast en el GenBank encontró hits con secuencias de *P. fijiensis* que no se encontraron en el otro análisis. Dado los resultados anteriores se consideró aplicar un filtro de las secuencias del transcriptoma de conidios de *P. fijiensis*, descartando 65 secuencias que tuvieron homología con secuencias de *E. coli*, usándose las 12,961 secuencias con homología con las secuencias del transcriptoma global deducido de la cepa de referencia de *P. fijiensis* más las 9,914 secuencias con homología con secuencias de *P. fijiensis* y con secuencias de otras especies de hongos filogenéticamente cercanas a *P. fijiensis*. De esta manera quedaron 22,875 secuencias que continuaron el proceso, el siguiendo paso fue el ensamblaje *de novo*, con el propósito de obtener secuencias con mayor longitud para encontrar alineamiento en el genoma e identificar sus posibles funciones moleculares.

El ensamblaje *de novo* de las 22875 se realizó con el programa Trinity (versión v2.4.0) usando los parámetros de default (k-mer= 25) del programa. Como resultado se generaron 2501 contigs. Posteriormente se ejecutó un script proporcionado por la Dra. Elsa Beatriz Góngora Castillo (Unidad de Biotecnología, CICY) para determinar la longitud de los 2501 contigs. La Figura 3.2 presenta los resultados de distribución de longitud de los contigs obtenidos.

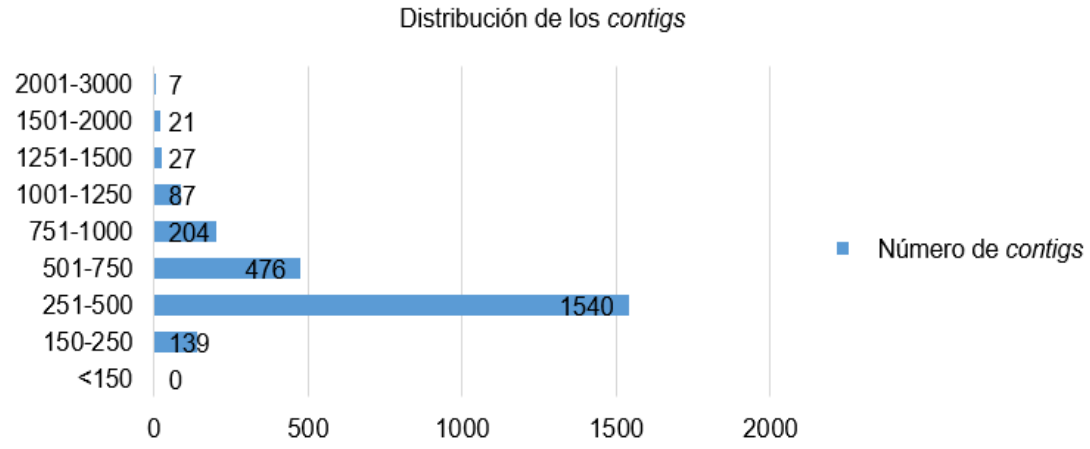


Figura 3.2 Número y longitud de los contigs generados con el programa Trinity.

Después con el programa Bowtie2 (versión 2.3.2) con los parámetros de default del programa se alinearon los 2501 contigs con el genoma *de P. fijiensis* reportado en JGI

Genome Portal (alineamiento con base en un genoma de referencia). Se identificaron 1950 contigs (77.97%) que alinearon exactamente una vez, 474 contigs (18.95%) que alinearon más de una vez y 77 contigs (3.08%) que alinearon 0 veces. En resumen, un total de 2424 contigs (96.92%) alinearon con el genoma reportado de *P. fijiensis*. En el Cuadro 3.2 se muestra un resumen del ensamblaje *de novo* y el alineamiento de los transcritos con el genoma de *P. fijiensis* reportado.

Cuadro 3.2 Resumen del ensamblaje *de novo* y el alineamiento de los transcritos con el genoma de *P. fijiensis* reportado.

Actividad 1		Actividad 2		Actividad 3		Actividad 4		Actividad 5	
Determinación de la homología de las secuencias con el transcriptoma global deducido de la cepa de referencia (CIRAD 86) de *P. fijiensis*		Verificación de la homología de las secuencias del transcriptoma con secuencias reportadas en otros hongos		Unión de las secuencias que tuvieron homología con el transcriptoma global deducido de la cepa de referencia de *P. fijiensis* y con secuencias de otros hongos		Ensamblaje *de novo* de las secuencias del transcriptoma		Alineamiento de los contigs con el genoma de *P. fijiensis* reportado	
Número de secuencias total	Descripción de las secuencias	Número de secuencias total	Descripción de las secuencias	Número de secuencias total	Descripción de las secuencias	Número de contigs	Descripción de las secuencias	Número de contigs	Descripción de las secuencias
22940	12961 secuencias con homología al transcriptoma global deducido de la cepa de referencia de *P. fijiensis* reportado Blastn (versión 2.2.31)	9979	9914 secuencias con homología con secuencias de hongos en la base no redundante de nucleótidos del NCBI Blastn (versión 2.7.0+)	22875	12961 secuencias con homología al transcriptoma global deducido de la cepa de referencia de *P. fijiensis* reportado	2501	De las 22875 secuencias se generaron 2501 contigs Trinity (versión v2.4.0)	2501	2424 contigs alinearon al genoma de *P. fijiensis* Bowtie2 (versión 1.2.1)

	9,979 secuencias sin homología con el transcriptoma global deducido de la cepa de referencia de *P. fijiensis* reportado		65 secuencias con homología con secuencias de *E. coli*		9914 secuencias con homología con secuencias de hongos en la base no redundante de nucleótidos del NCBI				77 contigs no alinearon con el genoma de *P. fijiensis*

3.3. Identificación de genes expresados: anotación génica

Usando el programa Blastx (versión 2.7.0+) en línea con los parámetros de default: (matriz Blosum62, costo de abertura (Gap Costs) si existe 11 y de extensión 1, etc.), y un valor esperado (e-value) de 1e-5. Se realizó la anotación génica de los 2,424 contigs que alinearon con el genoma de *P. fijiensis* con la base de datos no redundante de proteínas del NCBI (10 de octubre de 2017) y la base no redundante de UniProtKB/Swiss-Prot (6 de noviembre de 2017), encontrándose homología con 2,205 secuencias y 1,181 secuencias respectivamente. También se compararon con el proteoma global deducido de *P. fijiensis* reportado en JGI Genome Portal, empleando el programa Blastx (versión 2.6.0+) de manera local, con parámetros de default: valor esperado de 1e-5 y porcentaje de cobertura 55%. Como resultado 1,627 secuencias de las 2,424 mostraron homología con el proteoma global deducido. De igual manera se investigó cual era la homología de los 2,424 contigs con las secuencias del transcriptoma global deducido de la cepa de referencia de *P. fijiensis* reportado en JGI Genome Portal, utilizando el programa Blastn (versión 2.6.0+) de manera local, con parámetros de default y los siguientes parámetros: valor esperado de 1e-10, porcentaje de identidad 70% y porcentaje de cobertura 60%; como resultado se halló homología con 1,976 secuencias de las 2,424 con las secuencias del transcriptoma global deducido de la cepa de referencia de *P. fijiensis*.

El proceso de anotación se aplicó también a 77 contigs que no alinearon con el genoma de *P. fijiensis*, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior. Se encontró homología para 71 contigs en la base de datos del NCBI y y para 54 contigs en

la base no redundante de UniProtKB/Swiss-Prot. En la Figura 3.3 se muestra un resumen de los resutados obtenidos.

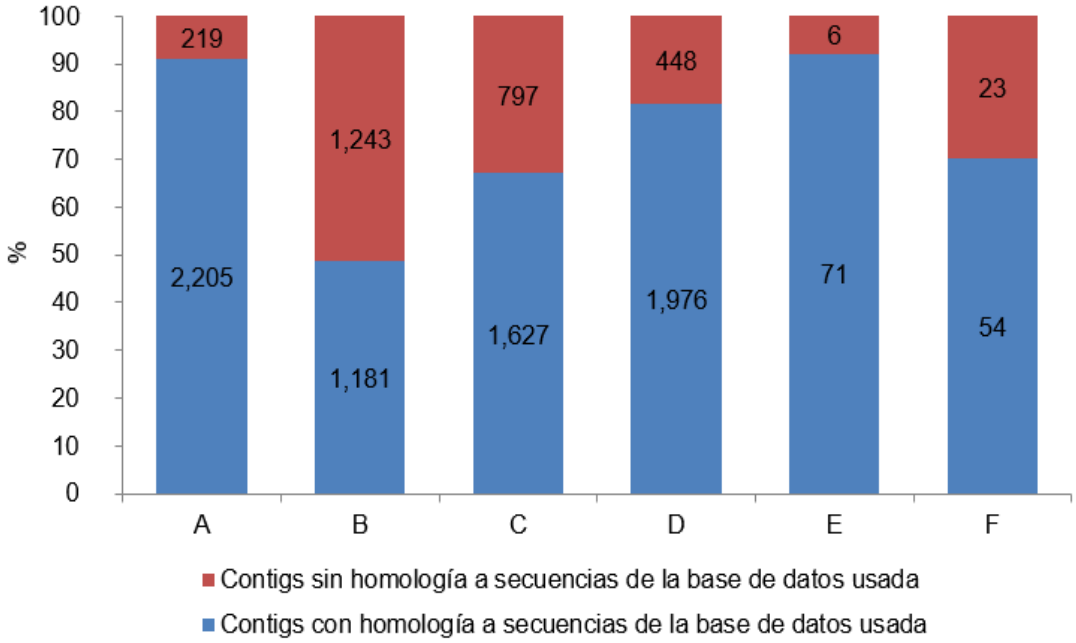


Figura 3.3 Identificación de homólogos para los 2,424 contigs y 77 contigs del transcriptoma de conidios de *Pseudocercospora fijiensis*. La barra A representa a los 2,424 contigs comparados con las secuencias de la base no redundante de proteínas del NCBI. La barra B representa a los 2,424 contigs comparados con las secuencias de la base no redundante de UniProtKB/Swiss-Prot. La barra C representa a los 2,424 contigs con las secuencias del proteoma global deducido de *P. fijiensis* reportado en JGI Genome Portal. La barra D representa a los 2,424 contigs comparados con las secuencias del transcriptoma global deducido de la cepa de referencia de *P. fijiensis* en JGI Genome Portal. La barra E representa los 77 contigs que no tuvieron homólogos en *P. fijiensis*, estos fueron comparados con las secuencias de la base no redundante de proteínas del NCBI. La barra F representa a los 77 contigs comparados con las secuencias de la base no redundante de UniProtKB/Swiss-Prot.

Usando la herramienta Retrieve/ID mapping y los números de acceso de los 2,205 contigs (los que presentaron homología con las secuencias de la base no redundante de proteínas del NCBI) se determinó su ontología génica. Las funciones moleculares más representativas fueron la actividad catalítica, unión, actividad transportadora, etc (Figura 3.4). Los componentes celulares más representados fueron parte celular (pared celular, parte intracelular, etc.), parte membrana, complejo macromolecular, organelos, etc., y con respecto a los procesos biológicos más representativos fueron ciclo celular, homeostasis celular, exocitosis, autofagia, etc., proceso metabólico, localización, etc.

La Figura 3.4 detalla los resultados de la ontología génica de los 2,205 contigs que tuvieron homólogos en la base de datos no redundante de proteínas del NCBI, estos contigs forman parte de los 2,424 contigs que tuvieron homología con las secuencias del genoma de *P. fijiensis* (cepa referencia CIRAD 86).

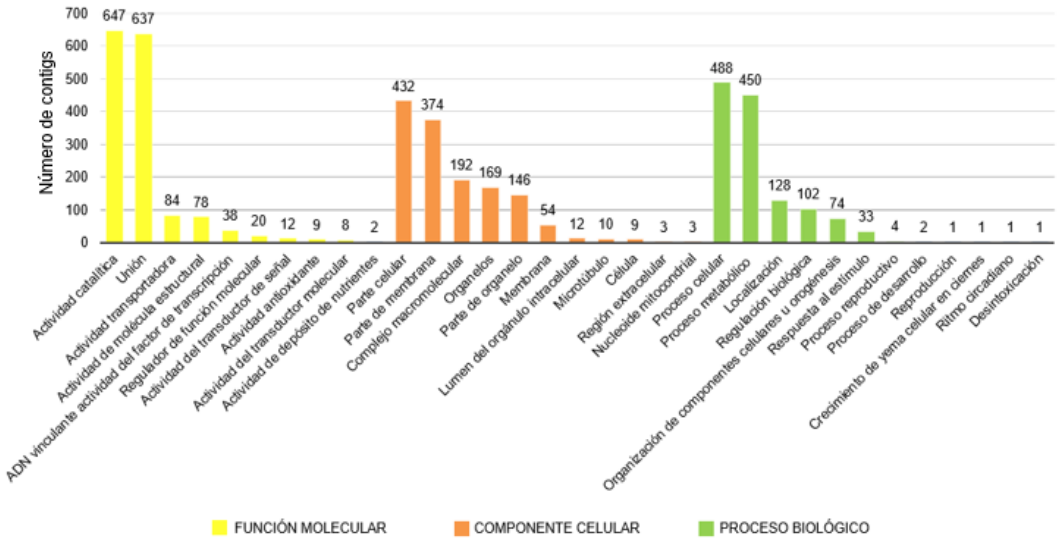


Figura 3.4 Ontología génica de los 2205 contigs que alinearon con el genoma de *P. fijiensis* y tuvieron homólogos en la base de datos no redundante de proteínas del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Se realizaron los mismos análisis para los 71 contigs que no encontraron homología con proteínas de *P. fijiensis*, pero sí con proteínas en el NCBI. Las funciones moleculares más representadas fueron actividad catalítica, unión, actividad de transporte transmembranal, etc. Los componentes celulares más representativos fueron parte celular (pared celular, parte intracelular, etc.), complejo macromolecular, parte de organelo, etc. Y con respecto a los procesos biológicos más representativos fueron proceso celular (ciclo celular, biosíntesis y organización de la pared celular, autofagia, etc.), proceso métabolico, localización, etcétera (Figura 3.5).

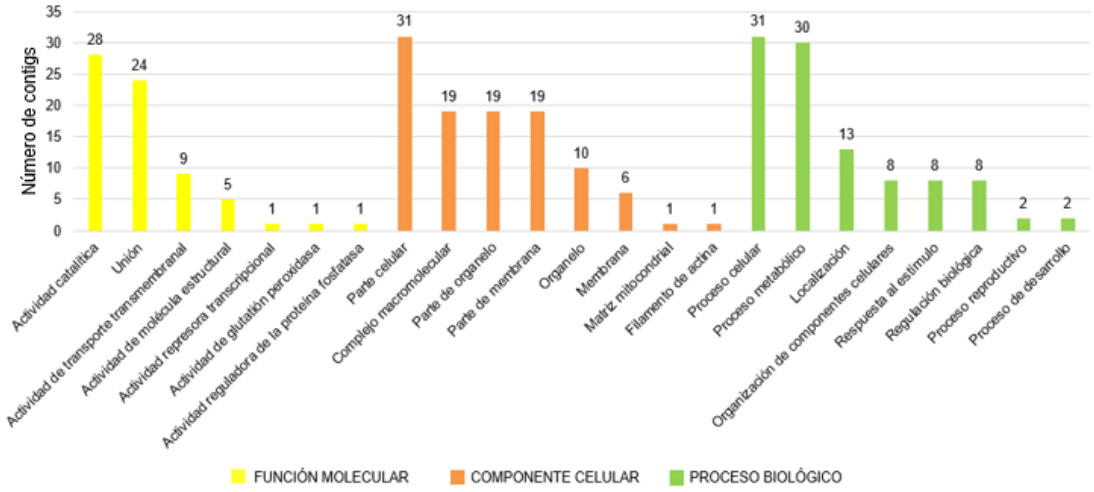


Figura 3.5 Ontología génica de los 71 contigs que no alinearon con el genoma de *P. fijiensis*, pero sí tuvieron homólogos en la base de datos no redundante de proteínas del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

El Cuadro 3.3 presenta genes encontrados en el transcriptoma de conidios de *P. fijiensis*, pero que no están representados en el genoma secuenciado de *P. fijiensis*. Estos genes corresponden a funciones vitales.

Cuadro 3.3 Genes no representados en el genoma reportado de *P. fijiensis*.

Histona H3.1/H3.2
Histona H2B
Actina
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
Subunidad 1 del citocromo c oxidasa
Subunidad 3 del citocromo c oxidasa
Transportador de amonio
Subunidad a de la ATP sintasa
Subunidad beta de la ATP sintasa
Subunidad gamma de la ATP sintasa
Subunidad 6 de la ATP sintasa

Los Cuadros 3.4 y 3.5 enlistan genes encontrados en el transcriptoma de conidios de *P. fijiensis* y relacionados con funciones en la conidiogénesis o germinación de conidios; estos también están representados en el genoma secuenciado de *P. fijiensis* reportado y y depositado en la base de datos del JGI.

Cuadro 3.4 Genes relacionados con la conidiogénesis de *P. fijiensis*.

Proteína de pared celular PhiA
Proteína asociada a la formación de proteína StuA
Proteína *WetA*

Cuadro 3.5 Genes relacionados con la germinación conidial de *P. fijiensis*.

Proteína 8 relacionada con la autofagia (Atg8)
Proteína 15 relacionada con la autofagia (Atg15)
Proteína 7 relacionada con la autofagia (Atg7)
Proteasa alcalina 2
Proteína quinasa Hog1 activada por mitógeno
Proteína 22 relacionada con la autofagia (Atg22)

El Cuadro 3.6 enlista los presuntos efectores identificados en el transcriptoma de conidios de *P*. *fijiensis*. Además de los conocidos Avr4 y Ecp2, se encontraron algunos de función desconocida, pero que previamente fueron encontrados en el transcriptoma de la interacción *P*. *fijiensis-Musa acuminata* (Noar y Daub, 2016) y a partir de un análisis *in silico* utilizando el genoma de *P*. *fijiensis* (Chang *et al*., 2016).

Cuadro 3.6 Genes relacionados o potencialmente relacionados con la patogenicidad de *P. fijiensis*.

Avr4
Ecp2
2 genes de función desconocida: Mycfi_181415 y Mycfi_211521 (Noar y Daub, 2016)
5 genes de función desconocida: Mycfi_102479, Mycfi_52972, Mycfi_205343, Mycfi_184243 y Mycfi_211533 (Chang *et al*., 2016)
Proteína hipotética que contiene domino CFEM y un sitio putativo anclado a GPI.

3.4. Evaluación de algunos genes para determinar si son parte del genoma esencial ("core") o parte del dispensoma

A partir de ADN genómico de diferentes aislados de *P*. *fijiensis* se amplificó una banda de 322 pb que corresponde al gen de la subunidad 1 del citocromo c oxidasa (contig 1942) (Figura 3.6) y una banda de 439 pb del gen de la proteína 22 relacionada con la autofagia (contig 81) (Figura 3.7); los amplicones se observaron en todos los aislados de *P. fijiensis* analizados por lo que se concluye que probablemente ambos son parte del genoma esencial de *P. fijiensis*.

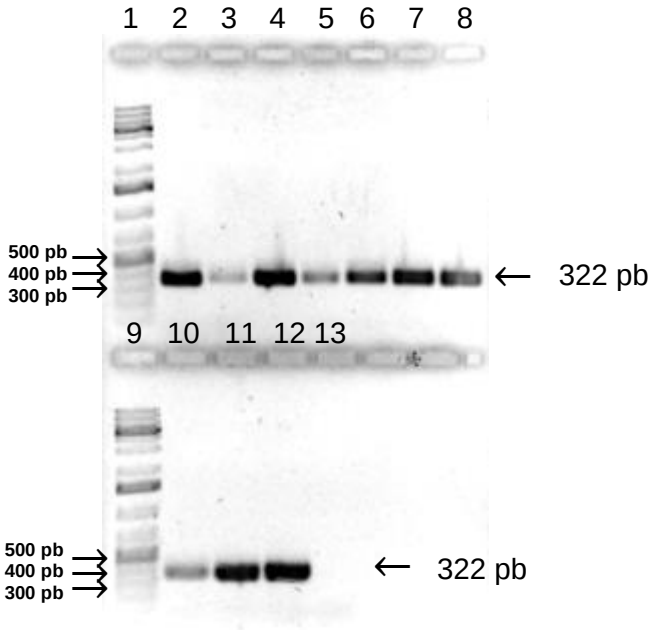


Figura 3.6 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 81) con homología con una subunidad 1 del citocromo c oxidasa a partir de ADN genómico. Los carriles 1 y 9, muestran al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. Los carriles 2 (aislado C1233), 3 (aislado CR6A), 4 (aislado CR6D), 5 (aislado OZ5A), 6 (aislado OZ1B), 7 (aislado OZ2B), 8 (aislado O9A), 10 (aislado CH1A), 11 (aislado CH16A) y 12 (aislado CH63F). Se observa la amplificación de la banda de 322 pb esperada, que corresponde a un fragmento de la subunidad 1 del citocromo c oxidasa. El carril 13 muestra un control negativo.

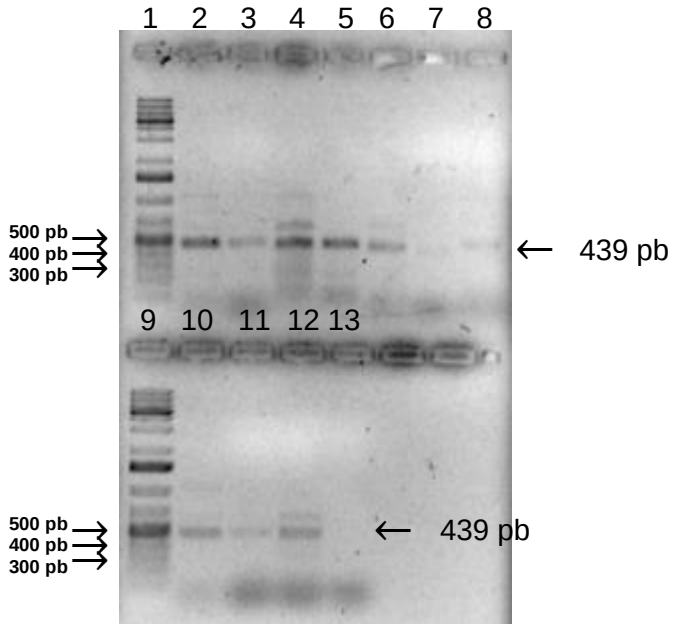


Figura 3.7 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 1942) con homología con una proteína 22 relacionada con la autofagia (Atg*22*) a partir de ADN genómico. Los carriles 1 y 9, muestran al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. Los carriles 2 (aislado C1233), 3 (aislado CR6A), 4 (aislado CR6D), 5 (aislado OZ5A), 6 (aislado OZ1B), 7 (aislado OZ2B), 8 (aislado O9A), 10 (aislado CH1A), 11 (aislado CH16A) y 12 (aislado CH63F). Se observa la amplificación de la banda de 439 pb esperada, que corresponde a un fragmento de la proteína 22 relacionada con la autofagia (Atg*22*). El carril 13 muestra un control negativo.

De igual manera a partir de ADN genómico de diferentes aislados de *P*. *fijiensis* se amplificó un fragmento de 422 pb (contig 929) (Figura 3.8), de 366 pb (contig 625) (Figura 3.9), de 373 pb (contig 612) (Figura 3.10), de 377 pb (contig 1637) (Figura 3.11), de genes que no presentan homología con genes depositados en la base no redundante de proteínas del NCBI, ni con proteínas de la base no redundante de UniProtKB/Swiss-Prot. También se aplificaron fragmentos, de 360 pb (contig 605) (Figura 3.12), de 214 pb (contig 1478) (Figura 3.13), de 321 pb (contig 754) (Figura 3.14), de 381 pb (contig 1172) (Figura 3.15), de 351 pb (contig 1009) (Figura 3.16), de 453 pb (contig 379) (Figura 3.17), de genes que codifican transcritos con homología con proteínas hipotéticas de hongos relacionados filogenéticamente como *P*. *eumusae*, *P*. *musae* y *D*. *septosporum*. De los 12 genes analizados, 11 genes amplificaron en todos los aislados evaluados. Únicamente el contig 379 (fragmento de 453 pb) de los 12 genes analizados amplificó en el aislado C1233 y en otros 5 aislados, pero no en todos los aislados analizados. Este fragmento (de

453 pb) amplificó en el aislado C1233 a la longitud esperada, así como en el aislado CH16A. Pero en los aislados CR6A, CR6D, OZ5A y OZ1B, este fragmento amplificó a una menor longitud posiblemente a deleciones ocurridas en el gen que codifica a este transcrito.

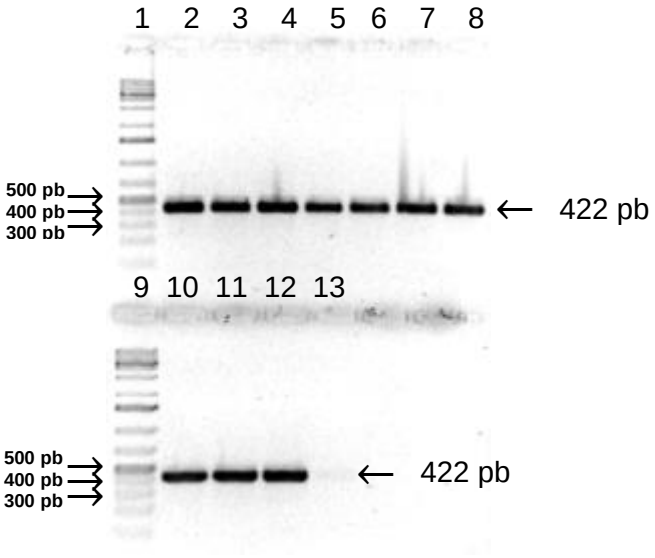


Figura 3.8 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 929) sin homología con ninguna secuencia reportada a partir de ADN genómico. Los carriles 1 y 9, muestran al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. Los carriles 2 (aislado C1233), 3 (aislado CR6A), 4 (aislado CR6D), 5 (aislado OZ5A), 6 (aislado OZ1B), 7 (aislado OZ2B), 8 (aislado O9A), 10 (aislado CH1A), 11 (aislado CH16A) y 12 (aislado CH63F). Se observa la amplificación de la banda de 422 pb esperada, que corresponde a un fragmento de un transcrito sin homología. El carril 13 muestra un control negativo.

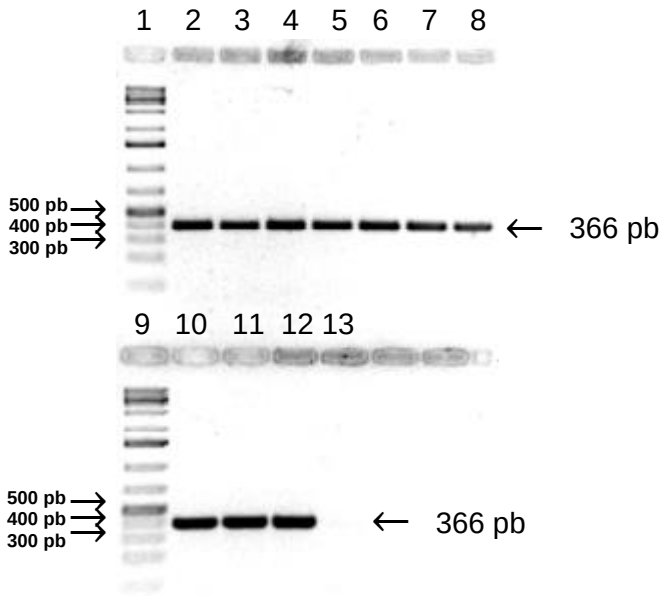


Figura 3.9 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 625) sin homología con ninguna secuencia reportada a partir de ADN genómico. Los carriles 1 y 9, muestran al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. Los carriles 2 (aislado C1233), 3 (aislado CR6A), 4 (aislado CR6D), 5 (aislado OZ5A), 6 (aislado OZ1B), 7 (aislado OZ2B), 8 (aislado O9A), 10 (aislado CH1A), 11 (aislado CH16A) y 12 (aislado CH63F). Se observa la amplificación de la banda de 366 pb esperada, que corresponde a un fragmento de un transcrito sin homología con ninguna secuencia reportada. El carril 13 muestra un control negativo.

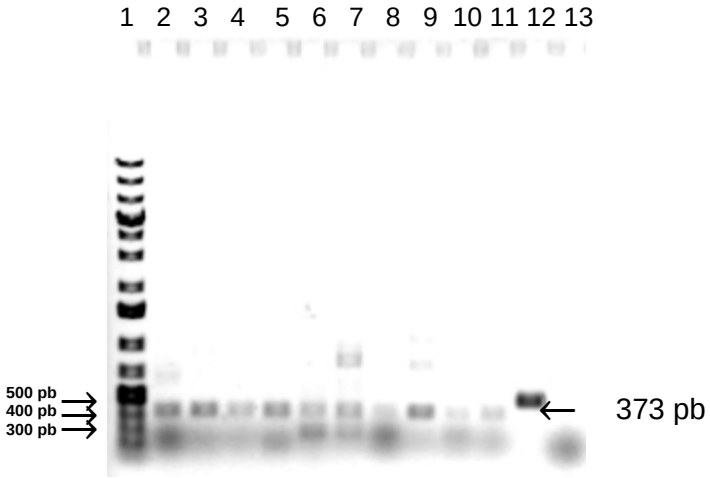


Figura 3.10 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 612) sin homología con ninguna secuencia reportada a partir de ADN genómico. El carril 1, muestra al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. Los carriles 2 (aislado C1233), 3 (aislado CR6A), 4 (aislado CR6D), 5 (aislado OZ5A), 6 (aislado OZ1B), 7 (aislado OZ2B), 8 (aislado O9A), 9 (aislado CH1A), 10 (aislado CH16A) y

11 (aislado CH63F). Se observa la amplificación de la banda de 373 pb esperada, que corresponde a un fragmento de un transcrito sin homología con ninguna secuencia reportada. El carril 12 muestra un control positivo, la amplificación de un fragmento de 478 pb del gen que codifica actina de *P. fijiensis*. El carril 13 muestra un control negativo.

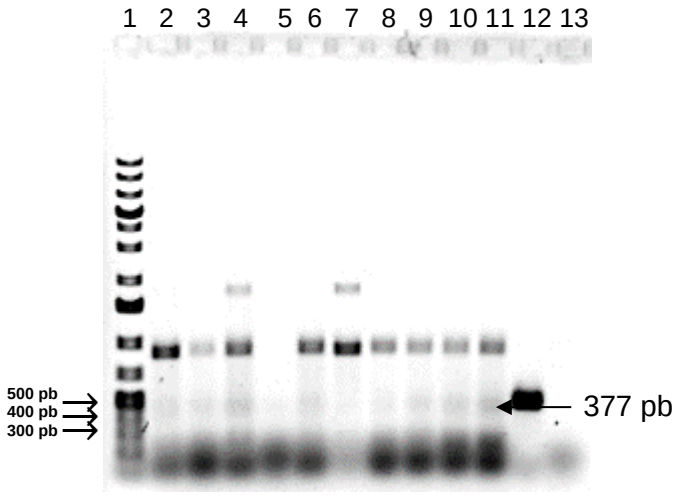


Figura 3.11 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 1637) sin homología con ninguna secuencia reportada a partir de ADN genómico. El carril 1, muestra al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. Los carriles 2 (aislado C1233), 3 (aislado CR6A), 4 (aislado CR6D), 5 (aislado OZ5A), 6 (aislado OZ1B), 7 (aislado OZ2B), 8 (aislado O9A), 9 (aislado CH1A), 10 (aislado CH16A) y 11 (aislado CH63F). Se observa la amplificación de la banda de 377 pb esperada, que corresponde a un fragmento de un transcrito sin homología con ninguna secuencia reportada. El carril 12 muestra un control positivo, la amplificación de un fragmento de 478 pb del gen que codifica actina de *P. fijiensis*. El carril 13 muestra un control negativo.

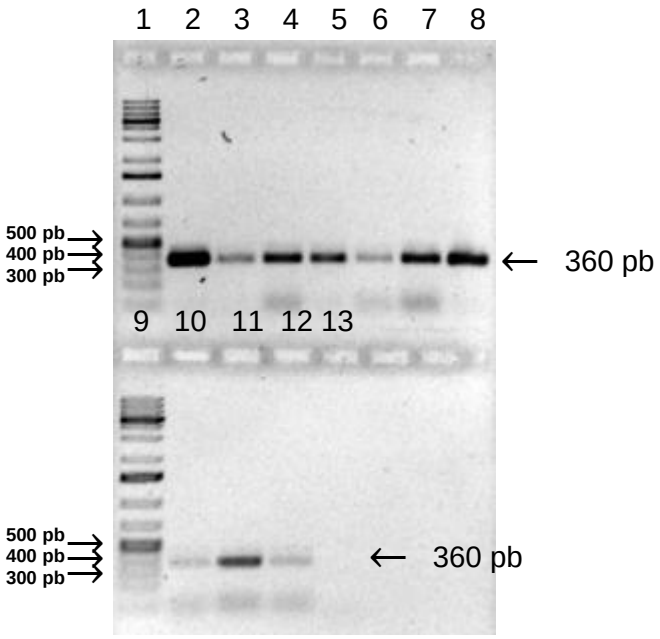


Figura 3.12 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 605) con homología con una proteína hipotética a partir de ADN genómico. Los carriles 1 y 9, muestran al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. Los carriles 2 (aislado C1233), 3 (aislado CR6A), 4 (aislado CR6D), 5 (aislado OZ5A), 6 (aislado OZ1B), 7 (aislado OZ2B), 8 (aislado O9A), 10 (aislado CH1A), 11 (aislado CH16A) y 12 (aislado CH63F). Se observa la amplificación de la banda de 360 pb esperada, que corresponde a un fragmento de una proteína hipotética. El carril 13 muestra un control negativo.

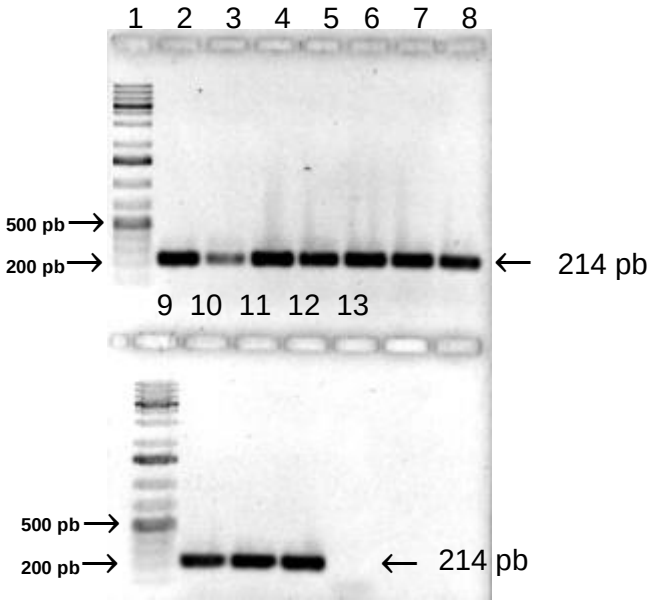


Figura 3.13 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 1478) con homología con una proteína hipotética a partir de ADN genómico. Los carriles 1 y 9, muestran al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. Los carriles 2 (aislado C1233), 3 (aislado CR6A), 4 (aislado CR6D), 5 (aislado OZ5A), 6 (aislado OZ1B), 7 (aislado OZ2B), 8 (aislado O9A), 10 (aislado CH1A), 11 (aislado CH16A) y 12 (aislado CH63F). Se observa la amplificación de la banda de 214 pb esperada, que corresponde a un fragmento de una proteína hipotética. El carril 13 muestra un control negativo.

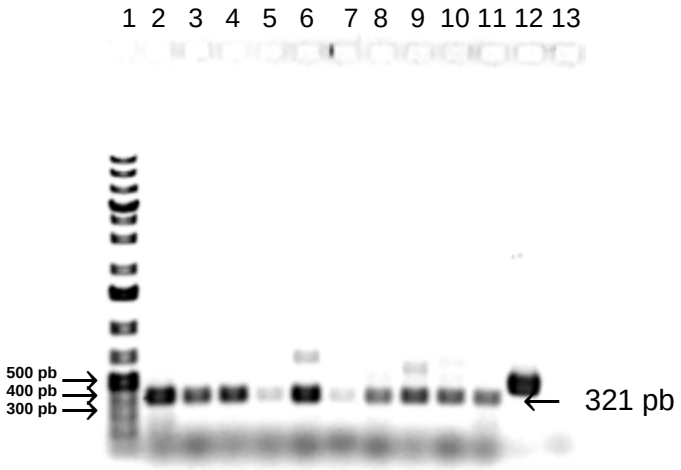


Figura 3.14 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 754) con homología con una proteína hipotética a partir de ADN genómico. El carril 1, muestra al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. Los carriles 2 (aislado C1233), 3 (aislado CR6A), 4 (aislado CR6D), 5 (aislado OZ5A), 6 (aislado OZ1B), 7 (aislado OZ2B), 8 (aislado O9A), 9 (aislado CH1A), 10 (aislado CH16A) y 11 (aislado CH63F). Se observa la amplificación de la banda de 321 pb esperada, que

corresponde a un fragmento de un transcrito sin homología con ninguna secuencia reportada. El carril 12 muestra un control positivo, la amplificación de un fragmento de 478 pb del gen que codifica actina de *P. fijiensis*. El carril 13 muestra un control negativo.

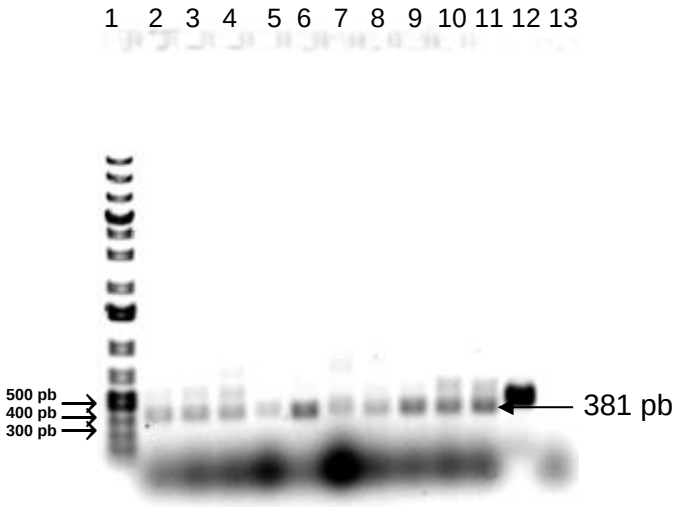


Figura 3.15 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 1172) con homología con una proteína hipotética a partir de ADN genómico. El carril 1, muestra al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. Los carriles 2 (aislado C1233), 3 (aislado CR6A), 4 (aislado CR6D), 5 (aislado OZ5A), 6 (aislado OZ1B), 7 (aislado OZ2B), 8 (aislado O9A), 9 (aislado CH1A), 10 (aislado CH16A) y 11 (aislado CH63F). Se observa la amplificación de la banda de 381 pb esperada, que corresponde a un fragmento de un transcrito sin homología con ninguna secuencia reportada. El carril 12 muestra un control positivo, la amplificación de un fragmento de 478 pb del gen que codifica actina de *P. fijiensis*. El carril 13 muestra un control negativo.

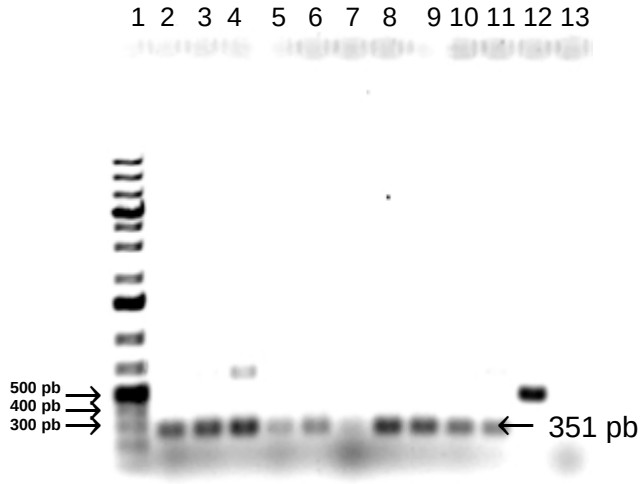


Figura 3.16 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 1009) con homología con una proteína hipotética a partir de ADN genómico. El carril 1, muestra al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. Los carriles 2 (aislado C1233), 3 (aislado CR6A), 4 (aislado CR6D), 5 (aislado OZ5A), 6 (aislado

OZ1B), 7 (aislado OZ2B), 8 (aislado O9A), 9 (aislado CH1A), 10 (aislado CH16A) y 11 (aislado CH63F). Se observa la amplificación de la banda de 351 pb esperada, que corresponde a un fragmento de un transcrito sin homología con ninguna secuencia reportada. El carril 12 muestra un control positivo, la amplificación de un fragmento de 478 pb del gen que codifica actina de *P. fijiensis*. El carril 13 muestra un control negativo.

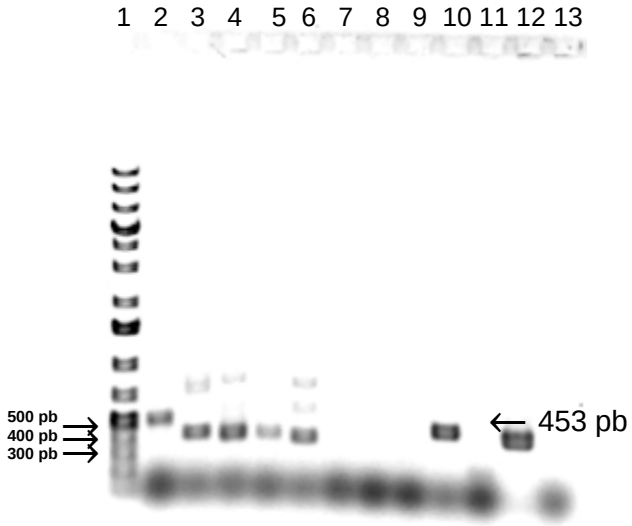


Figura 3.17 Electroforesis en gel de 1.5% de agarosa de las muestras de PCR que amplificaron un fragmento (contig 379) con homología con una proteína hipotética a partir de ADN genómico. El carril 1, muestra al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. Los carriles 2 (aislado C1233), 3 (aislado CR6A), 4 (aislado CR6D), 5 (aislado OZ5A), 6 (aislado OZ1B), 7 (aislado OZ2B), 8 (aislado O9A), 9 (aislado CH1A), 10 (aislado CH16A) y 11 (aislado CH63F). Se observa la amplificación de la banda de 453 pb esperada en los aislados C1233 y CH16A, que corresponde a un fragmento de un transcrito sin homología con ninguna secuencia reportada. En los aislados CR6A, CR6D, OZ5A y OZ1B se observa la amplificación de una banda de aproximadamente 400 pb menor a la que se esperaba. En los aislados OZ2B, O9A, CH1A y CH63F no se observa amplificación. El carril 12 muestra un control positivo, la amplificación de un fragmento de 478 pb del gen que codifica actina de *P. fijiensis*. El carril 13 muestra un control negativo.

3.5. Expresión de tres efectores putativos en diferentes condiciones de crecimiento de *P. fijiensis*

De los siete posibles efectores encontrados en el transcriptoma de conidios de *P*. *fijiensis* se escogieron tres efectores para evaluar su nivel de expresión. Estos fueron seleccionados porque poseen características de un efector de acuerdo con el programa bioinformático EffectorP.

Se indujo la producción de conidios *in vitro* (Pech, 2013). La Figura 3.18 muestra los tiempos de germinación de los conidios 0, 8 y 16 h.

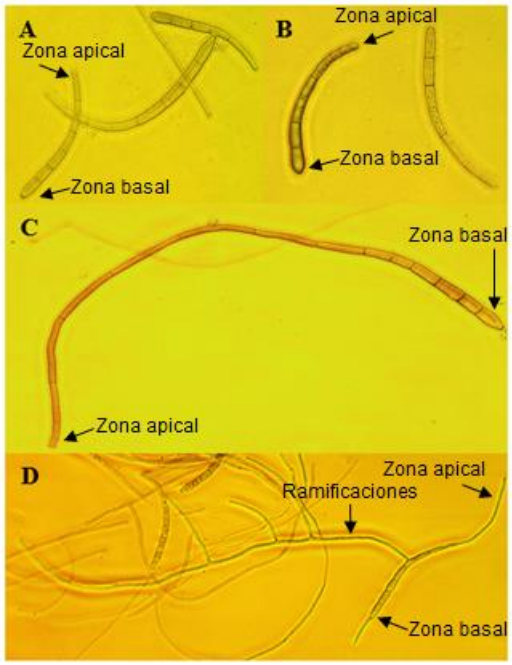


Figura 3.18 Fotografías del microscopio óptico de conidios de *P. fijiensis* en germinación. Las letras A y B muestran micrografías tomadas a 40× de conidios recién cosechados (0 h). La letra C muestra una micrografía (40×) de conidio a las 8 h del proceso de germinación. La letra D muestra una micrografía (20×) a las 16 h.

Posteriormente se extrajo los ARNs y se evaluó la integridad de los mismos en un gel de 2% de agarosa con amortiguador de corrida TAE 1×. En la Figura 3.19, se observa las bandas que corresponden a los ARN ribosomales 28S y 18S de las extracciones de ARN de los conidios germinados a las 0, 8 y 16 h. Las extracciones de los ARNs de la interacción de *P. fijiensis*-*T. harzianum* de los días 1, 3 y 7, fueron realizadas por el Br. Juan Timoteo Méndez Díaz (figura no presentada) y las extracciones de los ARNs de la interacción de *P*. *fijiensis*-*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 de los días 3, 4, 9, 20, 21, 22 y 23, fueron realizadas por la Ing. Karla Gisel Carreón Anguiano (figura no presentada).

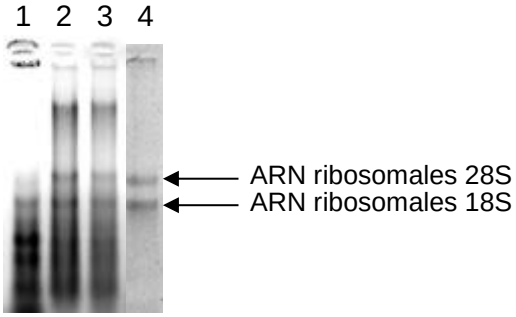


Figura 3.19 Electroforesis en gel de 2% de agarosa de las extracciones de ARNs. El carril 1 muestra la extracción de ARN a partir de conidios sin germinar (0 h). El carril 2 muestra la extracción de ARN a partir de conidios germinados las 8 h. El carril 3 muestra la extracción de ARN a partir de conidios germinados las 16 h. El carril muestra la extracción de ARN a partir de micelio de *P. fijiensis* crecido en PDB. Las flechas indican las bandas que corresponden a los ARN ribosomales 28S y los ARN ribosomales 18S.

Para confirmar que el ADNc se sintetizó apropiadamente se realizó una PCR punto final utilizando como templado 500 ng de ADNc de las diferentes muestras y los cebadores diseñados para amplificar el gen de la actina de *P*. *fijiensis*. En la Figura 3.20, se observa la amplificación del fragmento de actina. Se obtuvo un fragmento de 428 pb que es menor al amplicón genómico (478 pb), porque los cebadores flanquean un intrón de 50 pb. Estos resultados indicaron que se llevó a cabo la síntesis del ADN complementario de las diferentes muestras y que no existe contaminación de ADN genómico. Los ADNc se usaron como templados en los análisis por RT-PCR en tiempo real.

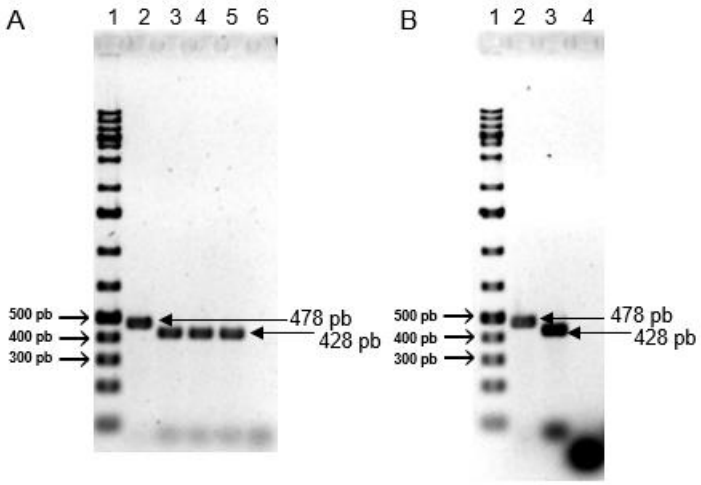


Figura 3.20 Electroforesis en gel de 2% de agarosa de muestras de PCR que amplificaron un fragmento de actina a partir de ADN genómico y ADNc. (A). El carril 1, muestra al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. El carril 2 muestra un control positivo, la

amplificación de un fragmento de 478 pb del gen que codifica actina a partir de ADN genómico de *P. fijiensis*. Los carriles 3, 4 y 5 representan la amplificación de un fragmento de 428 pb del transcrito de actina a partir de ADNc de conidios sin germinar (0 h), conidios germinados a las 8 h, conidios germinados a las 16 h, respectivamente. En el carril 6 se visualiza un control negativo. (B). El carril 1, muestra al marcador molecular O´GeneRuler 1 kb Plus. El carril 2 muestra un control positivo, la amplificación de un fragmento de 478 pb del gen que codifica actina a partir de ADN genómico de *P. fijiensis*. El carril 3 representa la amplificación del fragmento de 428 pb de actina a partir de ADNc de micelio de *P. fijiensis* crecido en PDB. En el carril 4 se visualiza un control negativo.

El efector putativo del contig 373 (Mycfi_211533) identificado en el transcriptoma de conidios de *P. fijiensis*, se detectó en el micelio de *P*. *fijiensis* crecido en PDB, en los conidios sin germinar (0 h), en los conidios germinados a las 8 h, en los conidios germinados a las 16 h, en los días 1 y 3 de la interacción de *P. fijiensis* con *T. harzianum*, en la interacción de *P*. *fijiensis*-*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 mezcla de los días 3, 4 y 5, y mezcla de los días 20, 21, 22 y 23. No se detectó el efector putativo del contig 373 en el día 7 de la interacción de *P. fijiensis*-*T. harzianum* (Figura 3.21). Se observó que el efector putativo 373 se expresa más en conidios sin germinar (~189 veces), en los conidios germinados a las 8 h (~117 veces), en los conidios germinados a las 16 h (~18 veces), en comparación con el micelio (muestra calibradora). En la interacción de *P. fijiensis*-*T. harzianum* la expresión de este presunto efector disminuyó con respecto al inicio del micelio (~0.3 veces en el día de interacción), y aumentó (~13 veces) en el día 3 de la interacción de *P. fijiensis*-*T. harzianum*. En cuanto a la interacción *P*. *fijiensis*-*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 (mezcla de ADNc de los días 3, 4 y 5) la expresión de este gen fue cerca de 11 veces mayor que el micelio del hongo *in vitro*; y 35 veces mayor en la interacción *P*. *fijiensis*-*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 (mezcla de ADNc de los días 20, 21, 22 y 23) en comparación con el micelio del hongo *in vitro*.

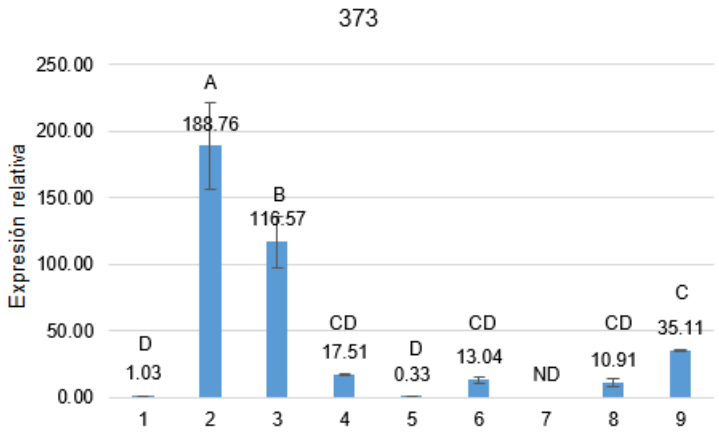


Figura 3.21 Análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real del efector putativo del contig 373 en *P. fijiensis* crecido en diferentes condiciones. La cuantificación relativa de la expresión de 373 fue calculada por el método Pfaffl. Las barras 1 (ADNc de micelio de *P. fijiensis* crecido en PDB), 2 (ADNc de conidios sin germinar a la 0 h), 3 (ADNc de conidios germinados a las 8 h), 4 (ADNc de conidios germinados a las 16 h), 5 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis-T. harzianum* del día 1), 6 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis-T. harzianum* del día 3), 7 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis-T. harzianum* del día 7), 8 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis-M. acuminata* cv. Calcutta 4 mezcla de los días 3, 4 y 9) y 9 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis-M. acuminata* cv. Calcutta 4 mezcla de los días 20, 21, 22 y 23), representan el nivel de expresión del efector putativo 373 de *P. fijiensis* crecido en diferentes condiciones. Los valores fueron normalizados con la expresión del constitutivo actina de *P. fijiensis*. Como muestra calibradora se utilizó micelio de *P. fijiensis* crecido en PDB. En la gráfica se presentan los datos de la media $\pm$ DE de dos experimentos independientes con 3 réplicas cada uno (excepto en los experimentos de la interacción de *P. fijiensis-T. harzianum* y de la interacción de *P. fijiensis-M. acuminata* cv. Calcutta 4, se presentan los datos de la media $\pm$ DE de un experimento con 3 réplicas). Las barras que no comparten una letra son significativamente diferentes, $p \leq 0.05$ (prueba de Fisher y Tukey).

El efector putativo del contig 376 (Mycfi_ 205343) identificado en el transcriptoma de conidios de *P. fijiensis*, se detectó en el micelio crecido en PDB de *P. fijiensis*, en los conidios sin germinar (0 h), en los conidios germinados a las 8 h, en los conidios germinados a las 16 h, en la interacción de *P. fijiensis-M. acuminata* cv. Calcutta 4 mezcla de los días 3, 4 y 5, y mezcla de los días 20, 21, 22 y 23. No se detectó el efector putativo 376 en ninguna de las interacciones de *P. fijiensis-T. harzianum* (Figura 3.22). Se observó que el efector putativo 376 se expresa más en conidios sin germinar (~5 veces), así como en los conidios germinados a las 8 h (~9 veces), pero disminuyó su expresión en los conidios germinados a las 16 h (~0.5 veces), en comparación con el micelio (muestra calibradora). En la interacción de *P. fijiensis-M. acuminata* cv. Calcutta 4 mezcla de los

días 3, 4 y 9 (~160 veces), y mezcla de los días 20, 21, 22 y 23 (~163 veces) la expresión de este presunto efector aumentó respecto al micelio (calibrador).

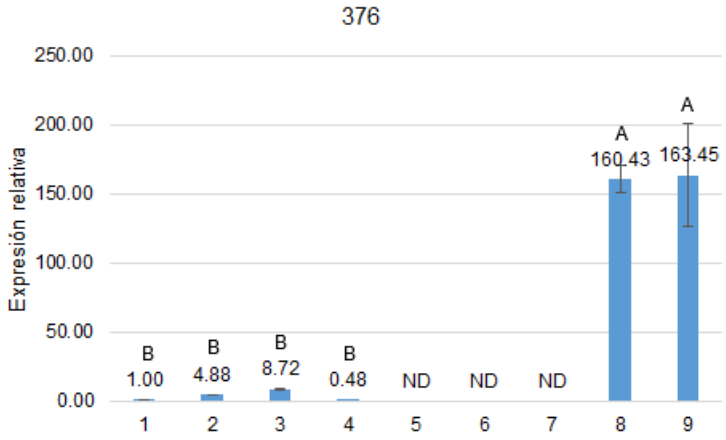


Figura 3.22 Análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real del efector putativo del contig 376 en *P. fijiensis* crecido en diferentes condiciones. La cuantificación relativa de la expresión de 376 fue calculada por el método Pfaffl. Las barras 1 (ADNc de micelio de *P. fijiensis* crecido en PDB), 2 (ADNc de conidios sin germinar a la 0 h), 3 (ADNc de conidios germinados a las 8 h), 4 (ADNc de conidios germinados a las 16 h), 5 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis-T. harzianum* del día 1), 6 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis-T. harzianum* del día 3), 7 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis-T. harzianum* del día 7), 8 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis-M. acuminata* cv. Calcutta 4 mezcla de los días 3, 4 y 9) y 9 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis-M. acuminata* cv. Calcutta 4 mezcla de los días 20, 21, 22 y 23), representan el nivel de expresión del efector putativo 376 de *P. fijiensis* crecido en diferentes condiciones. Los valores fueron normalizados con la expresión del constitutivo actina de *P. fijiensis*. Como muestra calibradora se utilizó micelio de *P. fijiensis* crecido en PDB. En la gráfica se presentan los datos de la media $\pm$ DE de dos experimentos independientes con 3 réplicas cada uno (excepto en los experimentos de la interacción de *P. fijiensis-T. harzianum* y de la interacción de *P. fijiensis-M. acuminata* cv. Calcutta 4, se presentan los datos de la media $\pm$ DE de un experimento con 3 réplicas). Las barras que no comparten una letra son significativamente diferentes, $p \leq 0.05$ (prueba de Fisher y Tukey).

El efector putativo del contig 649 (Mycfi_184243) identificado en el transcriptoma de conidios de *P. fijiensis*, se detectó en la interacción de *P. fijiensis-M. acuminata* cv. Calcutta 4 mezcla de los días 20, 21, 22 y 23. No se detectó el efector putativo 649 en el micelio de *P. fijiensis* crecido en PDB, en los conidios sin germinar (0 h), en los conidios germinados a las 8 h, en los conidios germinados a las 16 h, en los días 1, 3 y 7 de la interacción de *P. fijiensis* con *T. harzianum*, ni en la interacción de *P. fijiensis-M. acuminata* cv. Calcutta 4 mezcla de los días 3, 4 y 9 (Figura 3.23). Se observó que el efector putativo 649 se expresa en la interacción de *P. fijiensis-M. acuminata* cv. Calcutta

4 mezcla de los días 20, 21, 22 y 23 (0.15 veces), pero no se detectó su expresión en el micelio (muestra calibradora). El resultado del nivel de expresión se obtuvo al sustituir en la fórmula de cálculo los datos obtenidos en la RT-PCR en tiempo real, dando como resultado 0.15 veces.

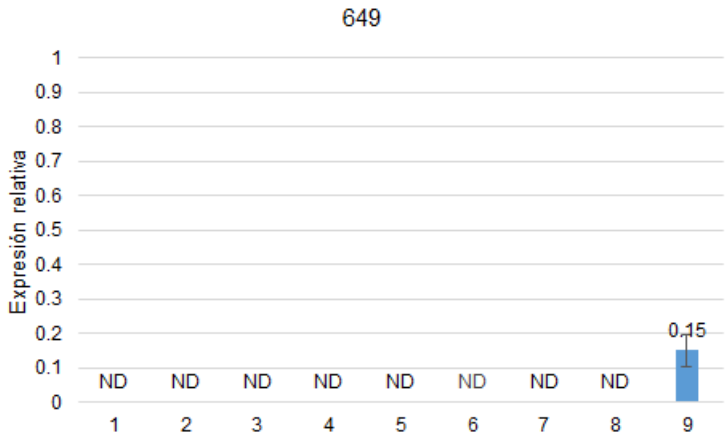


Figura 3.23 Análisis de expresión por RT-PCR en tiempo real del efector putativo del contig 649 en *P. fijiensis* crecido en diferentes condiciones. La cuantificación relativa de la expresión de 649 fue calculada por el método Pfaffl. Las barras 1 (ADNc de micelio de *P. fijiensis* crecido en PDB), 2 (ADNc de conidios sin germinar a la 0 h), 3 (ADNc de conidios germinados a las 8 h), 4 (ADNc de conidios germinados a las 16 h), 5 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis*-*T. harzianum* del día 1), 6 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis*-*T. harzianum* del día 3), 7 (ADNc de la interacción de *P. fijiensis*-*T. harzianum* del día 7), 8 (ADNc de la interacción de *P*. *fijiensis*-*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 mezcla de los días 3, 4 y 9) y 9 (ADNc de la interacción de *P*. *fijiensis*-*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 mezcla de los días 20, 21, 22 y 23), representan el nivel de expresión del efector putativo 649 de *P. fijiensis* crecido en diferentes condiciones. Los valores fueron normalizados con la expresión del constitutivo actina de *P. fijiensis*. Como muestra calibradora se utilizó micelio de *P. fijiensis* crecido en PDB. En la gráfica se presentan los datos de la media ± DE de dos experimentos independientes con 3 réplicas cada uno (excepto en los experimentos de la interacción de *P*. *fijiensis*-*T*. *harzianum* y de la interacción de *P*. *fijiensis*-*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4, se presentan los datos de la media ± DE de un experimento con 3 réplicas).

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Al realizar la anotación génica de los contigs se encontró mayor predicción de sus posibles funciones usando la base no redundante de proteínas del NCBI; no obstante, dicha predicción fue menos informativa en comparación con la descripción obtenida de la base no redundante de UniProtKB/Swiss-Prot. Esto se debe a qua la última es una base de datos de proteínas caracterizadas funcionalmente (proteínas a las que se les conoce su estructura tridimensionale, función, modificaciones post-traduccionales, etc). En cambio, la anotación de la mayoría de los contigs considerando únicamente la descripción de la secuencia con mayor identidad en la base no redundante de proteínas del NCBI fueron “proteínas hipotéticas”.

Una menor cantidad de contigs tuvo homología con las secuencias reportadas del proteoma global deducido de la cepa de referencia CIRAD 86, porque el programa Blastx usa como entrada (query) las secuencias de nucleótidos de los contigs, y traduce las secuencias en sus seis posibles marcos de lectura y compara estas secuencias traducidas contra las secuencias de aminoácidos del proteoma global deducido de la cepa de referencia. Esto resulta en que el programa Blastx puede encontrar en los contigs aminoácidos idénticos, aminoácidos con características fisicoquímicas similares y aminoácidos totalmente diferentes a los reportados en las proteínas deducidas. Por lo anterior es más complicado que los contigs encuentren homología con las proteínas de dicha base de datos. En cambio, se encontró mayor cantidad de contigs con homología con las secuencias reportadas del transcriptoma global deducido de la cepa de referencia CIRAD 86, porque el programa Blastn compara las secuencias de nucleótidos de los contigs contra una base de datos que también contiene secuencias nucleotídicas.

De acuerdo a la anotación y a la ontología génica de las secuencias del transcriptoma de conidios de *P. fijiensis*, se encontraron varios genes relacionados con el proceso biosintético de ácidos grasos, fosfolípidos, carbohidratos, etc. Los ácidos grasos son esenciales para la formación de membranas plasmáticas (Feduchi, 2014). También se encontraron diversos genes relacionados con la degradación de las reservas de almacenamiento, genes involucrados en el catabolismo de carbohidratos (α- glucosidasa, β-glucosidasa, glucósido hidrolasas de la familia 13, etc.), lípidos (acil-coenzima A

oxidasa/deshidrogenasa, lisofosfolipasa, 2-metilcitrato deshidratasa, etc.) y aminoácidos (indoleamina 2,3-dioxigenasa, glicina descarboxilasa, aminopeptidasa, etc.). En la mayoría de los estudios de germinación conidial, se ha determinado que los carbohidratos son la fuente de carbono que se oxida con mayor rapidez y proporcionan una fuente de energía durante la germinación conidial (Griffin, 1970; Cochrane *et al*., 1963). En el trabajo realizado por Ah-Fong y colaboradores en 2017, se reportó que en las zoosporas *Phytophthora infestans*, los ARN mensajeros involucrados con la glucólisis, la β-oxidación y el proteosoma están menos expresados. En esta investigación se encontraron genes involucrados con el catabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, lo que es congruente porque son metabolitos clave para el crecimiento y la patogenicidad (Fang y Barbetti, 2014; Sun *et al*., 2014; Costal y Nahas, 2012). También se encontraron genes relacionados con la actividad de transporte, los cuales son esenciales para la importación de nutrientes, y la exportación de metabolitos secundarios y compuestos tóxicos, por ejemplo, transportadores ABC (Gou *et al*., 2014). Con respecto a la organización de la pared celular, estructura compleja compuesta típicamente de quitina, 1,3-β-glucano, 1,6-β-glucano, manano y proteínas, se encontró la enzima pectinesterasa asociada con la modificación y organización de la pared celular fúngica (Sharma *et al*., 2016), así como los genes quitina sintasa 4 y quitina sintasa 6, implicados en el crecimiento de hifas, genes reportados en abundancia en los trabajos de investigación donde se estudió la germinación conidial (Hagiwara *et al*., 2016; Van-Leeuwen *et al*., 2013; Werner *et al*., 2007).

La germinación conidial es un proceso con funciones biológicas conservadas, pero capaz de expresar genes específicos relacionados con la patogenicidad según la especie (Noar y Daub, 2016). En los procesos de germinación conidial y conidiogénesis se ha demostrado que la autofagia, proceso catabólico en el cuál la célula ingiere su propio contenido, juega un papel esencial por llevar a cabo el reciclaje del contenido celular, usado durante el crecimiento celular y la diferenciación celular (Khan *et al*., 2012). En el transcriptoma de los conidios de *P*. *fijiensis* se identificaron varios transcritos relacionados con el proceso autofágico, por ejemplo: proteína 7 relacionada con la autofagia (Atg7), proteína 8 relacionada con la autofagia (Atg8), proteína 15 relacionada con la autofagia (Atg15), proteína 22 relacionada con la autofagia (Atg22), etc. Las mutaciones de las proteínas relacionadas con la autofagia ocasionan diversos efectos negativos (Khan *et al*., 2012). Por ejemplo, la mutación de Atg7 tuvo como consecuencia la pérdida de

patogenicidad en *Magnaporthe oryzae* y en *Sordaria macrospora*, también afectó la germinación y la morfología de los conidios. La mutación de Atg8 causó una esporulación defectuosa en *Aspergillus oryzae*, y en *M*. *oryzae* afectó la patogenicidad debido a que la presión de turgencia del apresorio disminuyó y generó defectos en la germinación conidial y el catabolismo de glucógeno. En *Ustilago maydis* la pérdida de Atg8 afectó la patogenicidad, la morfogénesis y la supervivencia del hongo en condiciones de inanición de nutrientes. En *Podospora anserina* y *A*. *fumigatus* la falta de Atg8 afectó la germinación de las esporas. Por su parte la mutación de Atg15 causó una esporulación defectuosa en *A*. *oryzae*, *Podospora anserina* y *Trichoderma reesei* mientras que en *M*. *oryzae* causó pérdida de patogenicidad, y en *Fusarium graminearum,* afectó la esporulación, la germinación de los conidios, el crecimiento fúngico, el recambio lipídico y ocasionó la pérdida de patogenicidad (Khan *et al*., 2012). La identificación de estas proteínas en el transcriptoma de los conidios de *P. fijiensis* resulta por tanto congruente. Futuras investigaciones deberán evaluar las funciones de estas proteínas en esta estructura del patógeno. También se hallaron otros genes relacionados con la conidiogénesis como WETA, gen que en *F*. *graminearum* mantiene la latencia de los conidios suprimiendo la conidiación por microciclos (Hokyoung *et al*., 2014), y STUA, gen necesario para establecer el patrón espacial de conidióforos en *A*. *nidulans* (Clutterbuck, 1969).

Asimismo, se identificaron varios transcritos con homología con genes relacionados con metabolismo secundario, como una péptido sintetasa no ribosomal 3, multicobre oxidasa aurL2, citocromo P450 monooxigenasa (Apf7), ácido norsolorínico reductasa B, citocromo P450 monooxigenasa PsoD, citocromo P450 monooxigenasa (SdnE), etc. Las proteínas citocromo P450 desempeñan un papel importante en la biosíntesis de metabolitos secundarios que se relacionan con la esporulación. La producción de metabolitos secundarios generalmente comienza al entrar el hongo en una fase estacionaria y, a menudo, juega un papel en el desencadenamiento de la muerte y la enfermedad de las células vegetales (Sharma *et al*., 2016; Calvo *et al*., 2002).

Según la anotación génica (función) algunos genes que no alinearon con el genoma reportado de *P. fijiensis*, se espera que sean parte del genoma esencial o imprescindible (core) del patógeno por ser necesarios para la sobrevivencia del hongo y únicamente no están representados en el genoma secuenciado de CIRAD86 porque el genoma está incompleto. La profundidad de cobertura (número de veces que una región de ADN es secuenciado) en la secuenciación del genoma de CIRAD 86 fue de 7.11X, en

comparación con otros hongos como *P*. *musae*, *P*. *eumusae*, *F. oxysporum* f. sp *cubense* raza 1 y *F. oxysporum* f. sp *cubense* raza 4, donde la profundidad de cobertura usada en la secuenciación de su genoma ha sido de 122×, 165×, 106× y 132×, respectivamente (Chang *et al*., 2016; Guo *et al*., 2014). Algunos de estos genes codifican para histonas, actina, subunidades de citocromo, subunidades de ATP sintasa, etc. (Cuadro 3.3).

Algunos de los genes encontrados y que no alinearon con el genoma reportado de *P. fijiensis* posiblemente formen parte del dispensoma del hongo. El dispensoma es el conjunto de cromosomas prescindibles de una especie. Un cromosoma prescindible o supernumerario se caracteriza por ser pequeño, tener una menor densidad de genes, un menor contenido de guanina y citosina, una mayor proporción de ADN repetitivo y un uso diferente de codones (Noar y Daub, 2016; Rodríguez *et al*., 2006). Como su nombre lo indica un cromosoma prescindible no es necesario para la sobrevivencia del hongo, pero si otorga funciones adicionales que les dan ventajas. Rodríguez y colaboradores (2006) analizaron diez aislados de *P. fijiensis*, encontrando variación con respecto al número de bandas cromósomicas de menos de 1.5 Mpb, las cuales se señalaron como posibles cromosomas prescindibles, lo que evidencia la presencia de ADN dispensable en *P*. *fijiensis*. En los cromosomas de *P*. *fijiensis* recientemente se han identificado genes relacionados con patogenicidad (Noar y Daub, 2016). Para determinar si algunos genes forman parte del dispensoma de este hongo, en este estudio se empleó la técnica PCR punto final y los cebadores sintetizados a partir de los transcritos identificados, así como el ADN genómico de 10 aislados de *P*. *fijiensis* colectados en diferentes lugares de Chiapas. Los aislados de *P*. *fijiensis* estudiados probablemente son genéticamente variables porque fueron colectados en condiciones de manejo semi-intensivo de fungicidas o sin aplicación de dichos compuestos. Dados los resultados obtenidos en las reacciones de PCR, existe la posibilidad que 11 de los 12 genes analizados formen parte del genoma esencial del patógeno, esto porque amplificaron en todos los aislados analizados, pero no están representados en el genoma secuenciado de la cepa de referencia CIRAD 86. Los resultados obtenidos de las PCRs mostraron amplificaciones de acuerdo al tamaño aproximado del fragmento de ADN esperado, porque los cebadores sintetizados flanquean las regiones de ADN correspondientes, por ejemplo, las amplificaciones de los fragmentos de ADN de 322 pb (contig 81), 422 pb (contig 929), 366 pb (contig 625), 360 (contig 605), y 214 pb (contig 1478). Asimismo, se encontraron amplificaciones de acuerdo al tamaño aproximado del fragmento de ADN esperado, pero

también amplificaciones no esperadas de fragmentos de ADN en ciertos casos, posiblemente porque los cebadores se sintetizaron de acuerdo al transcrito encontrado en el transcriptoma de conidios de la cepa C1233 de *P*. *fijiensis* y no de acuerdo a las regiones de ADN genómicas de los nueve aislados empleados, o simplemente los cebadores sintetizados carecieron de especificidad. Este último fue el caso de los fragmentos de ADN de 439 pb (contig 1942), 373 pb (contig 612), 321 pb (contig 754), 381 pb (contig 1172) y 351 pb (contig 1009). También se encontró amplificación tenue de un fragmento de ADN de un tamaño esperado a 377 pb (contig 1637) en los 10 aislados de *P*. *fijiensis*, pero al mismo tiempo se visualizó un fragmento de ADN de mayor tamaño con amplificación más intensa, posiblemente porque dicho fragmento de ADN incluye intrones. Para confirmar que todos los fragmentos de ADN amplificados corresponden a lo esperado, es necesario que más adelante dichos fragmentos sean secuenciados. Únicamente el contig 379 (fragmento de 453 pb) de los 12 genes analizados posiblemente forme parte del dispensoma de *P. fijiensis*, porque como se esperaba amplificó en el aislado C1233 y en otros cinco aislados, pero no en el resto de los aislados analizados. El fragmento de ADN de 453 pb amplificó en el aislado C1233 y CH16A con el tamaño esperado, pero en los aislados CR6A, CR6D, OZ5A y OZ1B, este fragmento de ADN amplificado mostró un tamaño menor al esperado, debido posiblemente a deleciones ocurridas en el gen que codifica a este transcrito. Los patógenos de las plantas secretan proteínas de virulencia conocidas como efectores que modulan las funciones del hospedero y mantienen la colonización del patógeno (Lo *et al*., 2017; Petre *et al*., 2015; Win *et al*., 2012). Los 12 contigs anteriormente mencionados fueron evaluados con el programa EffectorP y se encontró que *in silico* los contigs 612, 754, 1478, 605 y 379, se identificaron como presuntos efectores.

Con respecto a otros genes relacionados con la patogenicidad de *P. fijiensis* se encontraron los genes Avr4 y Ecp2, homólogos de los efectores de *Cladosporium fulvum* ya reportados en *P. fijiensis*. El efector Avr4 tiene la función de proteger la quitina de las hifas contra la degradación por las quitinasas presentes en la planta. Al efector Ecp2, se le desconoce su función, pero es considerado un factor de virulencia, ya que su eliminación reduce la virulencia de *C. fulvum* (Stergiopoulos *et al*., 2010). De igual manera se encontró homología con 2 efectores putativos (Noar y Daub, 2016), y homología con cinco efectores putativos (Chang *et al*., 2016). De acuerdo a los resultados obtenidos a partir del programa Bowtie2, seis de los siete presuntos efectores identificados alinearon

con scaffolds nombrados como cromosomas esenciales de *P*. *fijiensis*, por ejemplo el contig 658 mapeó con el scaffold 1, el contig 2179 y 373 maperon con el scaffold 5, el contig 361 mapeó con el scaffold 3, el contig 369 mapeó con el scaffold 2 y el contig 376 mapeó con el scaffold 10, solo el contig 649 mapeó con el scaffold 18, nombrado como cromosoma dispensable de *P*. *fijiensis*. En ese scaffold, durante el crecimiento *in vitro* de *P*. *fijiensis*, se ha encontrado una sobreexpresión de ARN mensajeros (Noar y Daub, 2016). Para elucidar las posibles funciones de estos siete efectores putativos, sus secuencias deducidas de aminoáciodos se compararon con las secuencias de la base de datos CDD (Conserved Domains Database) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) y con las secuencias de la base de datos Pfam (Protein Families Database) para predecir dominios. A la isoforma uno del posible efector contig 376 se le encontró un dominio de tiorredoxina. La expresión de este contig se verificó en los conidios germinados (0, 8 y 16 h) utilizando cebadores para tiempo real sintetizados de la isoforma dos, ya que dicha isoforma presentó 100% de similitud con el efector putativo Mycfi_ 205343 (Chang *et al*., 2016). Ninguno de los otros seis candidatos posee en su estructura dominios conocidos. Las proteínas de la familia tiorredoxina (TRX) desempeñan papeles importantes en la defensa contra el estrés oxidativo al reducir directamente el peróxido de hidrógeno y otros radicales, y al servir como un reductor para las peroxirredoxinas (Lee *et al*., 2013). Es posible que esta proteína participe en los conidios de *P. fijiensis* en la adaptación a las condiciones de estrés oxidativo. Usando el programa EffectorP (http://effectorp.csiro.au/) se determinó que cuatro de los siete contigs poseen características de un efector. Con el programa Wolf psort (https://wolfpsort.hgc.jp/) se predijo los sitios de localización subcelular hacia donde se dirigen los siete efectores putativos; algunos se predicen en citoplasma, mitocondria, núcleo y tres de vía secretora. Hadwiger y Polashock en 2013, reportaron ADNasas mitocondriales de levadura con actividades efectoras capaces de activar la defensa de las plantas, lo cual demuestra que existe una variedad de proteínas efectoras. Por último, se utilizó el programa Phobius (http://phobius.binf.ku.dk/) para predecir si los efectores putativos tenían dominio transmembranal y péptido señal. Como resultado se encontró que ninguno de los efectores putativos tenía dominio transmembranal, y que cuatro de ellos no predicen tener péptido señal (Cuadro 4.1).

El Cuadro 4.1 indica las características encontradas en los efectores putativos en el transcriptoma de conidios de *P*. *fijiensis*.

Cuadro 4.1 Características de los efectores putativos encontrados en el transcriptoma de conidos de *P. fijiensis*.

Efector putativo	CDD	Pfam	EffectorP	Wolf psort	Phobius	
					Dominio transmembranal	Péptido señal
Contig 658 Mycfi_18 1415 (Noar y Daub, 2016)	X	X	No efector	Citoplasma	No	No
Contig 2179 Mycfi_21 1521 (Noar y Daub, 2016)	X	X	No efector	Vía secretora	No	Si
Contig 361 Mycfi_10 2479 (Chang *et al*., 2016)	X	X	Efector	Mitocondria	No	No
Contig 369 Mycfi_52 972 (Chang *et al*., 2016)	X	X	No efector	Núcleo	No	No
Contig 376 Mycfi_20 5343 (Chang *et al*., 2016)	Dominio tiorredoxina	Dominio tiorredoxina	Efector	Mitocondria	No	No
Contig 649 Mycfi_18 4243 (Chang *et al*., 2016)	X	X	Efector	Vía secretora	No	Si

Contig 373 Mycfi_211533 (Chang *et al*., 2016)	X	X	Efector	Vía secretora	No	Si
La letra X simboliza que no se predijo dominio.						

La característica que cumplieron los presuntos efectores reportados por Noar y Daub (2016), y Chang *et al*. (2016), fueron las siguientes: predicción de péptido señal en las proteínas al emplear el programa *SignalP* (Petersen *et al*., 2011), una longitud menor a 300 aminoácidos y contener por lo menos cuatro residuos de cisteína. Adicionalmente en este trabajo de investigación se usó el programa EffectorP, para determinar cuáles de los presuntos efectores poseen características de un efector, es por ello que se observan diferencias en el número de efectores identificados. Usando el programa Phobius se predijo que cuatro de los siete efectores putativos analizados no presentaron péptido señal, esto posiblemente se debió a las diferencias de longitud debido al número de aminoácidos predichos para los efectores putativos analizados con el programa ORFfinder (contig 658: 226 aminoácidos, contig 2179: 190 aminoácidos, contig 361: 36 aminoácidos, contig 369: 170 aminoácidos, contig 376: 244 aminoácidos, contig 649: 111 aminoácidos y contig 373: 162 aminoácidos) en comparación a los presuntos efectores reportados por Noar y Daub (2016) (Mycfi_181415: 193 aminoácidos y Mycfi_211521: 198 aminoácidos), y Chang *et al*. (2016) (Mycfi_102479: 89 aminoácidos, Mycfi_52972: 161 aminoácidos, Mycfi_205343: 171 aminoácidos, Mycfi_184243: 58 aminoácidos y Mycfi_211533: 162 aminoácidos).

Comparar el nivel de expresión de los efectores putativos en las diferentes muestras analizadas de *P. fijiensis* permite apoyar o refutar su posible función como efectores, además de obtener información, asociada con la germinación de conidios, o si también ocurre en el micelio crecido en PDB y/o en las interacciones con otros organismos como *T*. *harzianum* y *M*. *acuminata* cv. Calcutta 4. La expresión del efector putativo codificado en el contig 373 (Mycfi_211533) fue más abundante durante la germinación de los conidios respecto al micelio crecido en PDB, lo que sugirió que este gen podría ser importante durante la etapa inicial del ciclo de vida del patógeno. También se identificó la expresión de este efector putativo en la interacción de *P. fijiensis*-*T*. *harzianum* (día 1 y 3) y en la interacción de *P*. *fijiensis*-*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 (mezcla de los días 3, 4 y 9,

y mezcla de los días 20, 21, 22 y 23). Esto sugirió que el efector putativo codificado en el contig 373 (Mycfi_211533) es importante para la protección del hongo. Aunque su expresión en el hongo cuando está interaccionando con *M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 es menor que en los conidios producidos *in vitro*, cabe resaltar que durante la interacción con la planta la expresión es superior en comparación con el micelio del hongo cultivado *in vitro*. *M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 es un cultivar resistente a la Sigatoka negra, es decir, no se establece la interacción compatible. Esto sugiere que este gen es efectivamente inducido durante la interacción, posiblemente para sobrevivir en las condiciones tan desfavorables que ocurren en el huésped resistente, el cual acumula localmente especies reactivas de oxígeno y metabolitos antimicrobianos (Sánchez *et al*., 2010).

Paradójicamente, la proteína del efector putativo codificado en el contig 373 (Mycfi_211533) puede ser una proteína efectora que el hospedero resistente reconozca y en consecuencia dispare sus mecanismos de defensa.

Similarmente, el efector putativo del contig 376 (Mycfi_205343) se expresa más en conidios que en micelio. La expresión del efector putativo del contig 376 fue más abundante en los tres tiempos de germinación de conidios (0, 8 y 16 h) que en micelio crecido en PDB, lo que permite asociar que este gen podría ser importante durante las primeras horas de desarrollo del hongo. En este caso su expresión durante la interacción con el hospedero es mucho más alta que en los conidios o micelio, lo cual apoya fuertemente que también sea una proteína efectora. A esta proteína se le encontró un dominio de tiorredoxina, por lo que posiblemente su función sea contrarrestar las condiciones de estrés oxidativo. No se detectó la expresión del efector putativo del contig 376 (Mycfi_205343) en la interacción de *P. fijiensis*-*T*. *harzianum* (día 1 , 3 y 7). *T. harzianum* es un antagonista de *P. fijiensis* (Castro *et al*., 2015); es probable que parte de su estrategia sea suprimir la expresión de genes importantes de *P*. *fijiensis* para que éste no pueda defenderse o no pueda contra-atacar. Deberá profundizarse el análisis del presunto efector “376” para elucidar su función en *P. fijiensis* y su importancia en la interacción *P*. *fijiensis*-*Musa* spp.

Es importante resaltar que se cree que en la interacción *P. fijiensis* con la variedad resistente *M*. *acuminata* cv. Calcutta 4, el hongo es rápidamente detectado mediante proteínas cognado de la planta (proteínas de resistencia) que reconocen a alguna de las proteínas efectoras del patógeno, dicho reconocimiento dispara la reacción de

hipersensibilidad en el hospedero para matar localmente las células y con ello eliminar o limitar la proliferación del patógeno (Arango *et al*., 2016). Cabe hacer notar que el análisis de expresión de los genes “373” y “376” traen a la luz un conocimiento nuevo: que, aunque *P*. *fijiensis* no logra infectar efectivamente a *M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 después de 20 días, estos efectores putativos son utilizados por el hongo posiblemente para evadir las defensas del hospedante. En un estudio con la inoculación de *P*. *fijiensis* en *M*. *acuminata* cv. Calcutta 4, a los 15 días afectó aproximadamente un 25 a 30% del área de la hoja, y a los 30 días no observaron más progreso de la enfermedad, lo que sugiere que el avance de la enfermedad se detuvo, por ello es posible que los efectores putativos de *P*. *fijiensis* sean empleados después de 20 días en *M*. *acuminata* cv. Calcutta 4.

No se detectó la expresión del efector putativo del contig 649 (Mycfi_184243) en los tiempos de germinación de conidios analizados (0, 8 y 16 h), en el micelio crecido en PDB, ni en la interacción de *P*. *fijiensis*-*T*. *harzianum* de los días 1, 3 y 7. Solo en la interacción de *P*. *fijiensis*-*M*. *acuminata* cv. Calcutta 4 (mezcla de los días 20, 21, 22 y 23) se detectó una baja expresión de este efector. El resultado fue sorpresivo y al momento no se tiene una explicación clara. Posiblemente este gen se exprese en algunos de los tiempos de germinación de conidios no analizados en el presente trabajo pero que sí fueron incluidos en la preparación del material con el que se obtuvo el transcriptoma (4, 12, 20 y 24 h). La ventana de tiempo de expresión de este gen puede ser muy angosta y por eso no fue detectado en ninguna de las muestras analizadas en el presente trabajo. Hasta el momento no existen datos en otros reportes del análisis de expresión de los efectores putativos de los contig 373 (Mycfi_211533), contig 376 (Mycfi_205343) y contig 649 (Mycfi_184243) que permitiera comparar los resultados aquí obtenidos. Los genes Mycfi_211533 (contig 373), Mycfi_205343 (contig 376) y Mycfi_184243 (contig 649) fueron reportados por Chang *et al*. (2016) basada en la identificación *in silico* de efectores potenciales, a partir del genoma de referencia de *P*. *fijiensis* y propusieron que dichos efectores pueden estar involucrados en la patogénesis de *P*. *fijiensis*. El análisis del transcriptoma de conidios de *P. fijiensis* indica que estos tres genes se expresan durante ese estadio del ciclo de vida del hongo y al menos dos de ellos se expresan durante la interacción con el hospedero, lo que apoya dicha hipótesis. Se requiere generar mutantes que pierdan la función de estos genes para deducir su posible función.

Por otra parte, se encontró homología con una proteína hipotética que contiene domino CFEM y un sitio putativo anclado a glucosilfosfatidilinositol (GPI). Los anclajes GPI están

formados por glicolípidos que se unen de forma covalente al extremo carboxilo terminal de una proteína mediante una modificación post-traduccional. Las proteínas ancladas a GPI, son esenciales en las células eucariotas para el crecimiento celular, la biogénesis de la pared celular, la morfogénesis, la adhesión superficial, etc. El dominio CFEM se caracteriza por contener ocho cisteínas en el extremo amino y es común en varias proteínas de membrana extracelular fúngica (Zhu *et al*., 2017). Se ha encontrado este dominio en algunas proteínas relacionadas con la patogénesis fúngica (Noar y Daub, 2016). Zhu y colaboradores 2017, identificaron una proteína que contiene dominio CFEM con un sitio putativo anclado a GPI en el hongo *Botrytis cinerea*, patógeno necrotrófico de amplio espectro. Para conocer los procesos en los que se involucra esta proteína se realizó la eliminación por “knock out” del gen que la codifica; la pérdida de esta proteína afectó la patogenicidad, la producción de conidios y la tolerancia al estrés oxidativo. Los autores mencionaron que la virulencia reducida de la mutante puede ser debido a una mayor sensibilidad a las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en la defensa de la planta. Futuras investigaciones deberán evaluar los procesos con los que se involucra esta proteína hipotética identificada en el transcriptoma de conidios de *P*. *fijiensis*.

En resumen, el presente trabajo se identificaron genes que no están anotados en el genoma de referencia de *P*. *fijiensis* (cepa CIRAD 86) y la información que se obtuvo, sugieren que son parte del genoma “core”, lo que contribuye al pangenoma de este hongo. La discrepancia puede deberse al nivel de profundidad en la secuenciación del genoma de la cepa CIRAD 86 y que por ello dichos genes no se hayan detectado. Asimismo, en el transcriptoma de los conidios se identificaron genes involucrados en los procesos de germinación de los conidios, y datos de expresión que apoyan la identificación de potenciales nuevos efectores, ampliando el efectoroma de este hongo y aporta información para entender la patogénesis de este hongo.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

A pesar de tener un transcriptoma de secuenciado con baja profundidad, conteniendo 23,429 secuencias, se encontraron genes interesantes que participan en la conidiogenésis y la germinación conidial (por ejemplo, genes involucrados en autofagia), y otros que probablemente participan en la patogénesis (efectores).

La germinación conidial es un proceso con funciones biológicas conservadas, pero capaz de expresar genes específicos de la especie: la anotación génica y la ontología génica de las secuencias del transcriptoma de los conidios de *P. fijiensis* fueron similares a las reportadas en otros trabajos donde se estudió la germinación conidial. También se identificaron seis genes que no tienen homología con ningún gen conocido.

Una gran proporción de los transcritos expresados se relacionan con el metabolismo energético, la biosíntesis de ácidos grasos, fosfolípidos, carbohidratos, etc., actividad catalítica y transporte.

También se identificaron transcritos cuyos genes no están representados en el genoma de *P*. *fijiensis* previamente reportado, por lo tanto, este trabajo contribuye a aumentar el pangenoma de *P*. *fijiensis*.

Con base en la anotación de algunos genes que no alinearon con el genoma reportado de *P. fijiensis*, se espera que estos sean parte del genoma esencial o imprescindible (core) del patógeno, ejemplo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, histonas, actinas, subunidades de citocromo, subunidades de ATP sintasa, etc.

Doce genes que no alinearon con el genoma reportado de *P. fijiensis* fueron analizados. Once de ellos amplificaron cuando se usó como templado los ADNg de 10 cepas diferentes de *P. fijiensis*, sugiriendo que son parte del genoma esencial. Su ausencia en el genoma de referencia apoya el que dicho genoma no contiene el genoma básico completo.

Uno de los genes analizados estuvo ausente en cuatro de los 10 aislados de *P. fjiensis* analizados, lo que sugiere que es parte del dispensoma.

Los presuntos efectores del contig 373 (Mycfi_211533) y contig 376 (Mycfi_205343) se expresan diferencialmente en conidios y en la interacción con el banano respecto a la expresión en micelio del hongo cultivado *in vitro*. Sus perfiles de expresión apoyan que estos dos genes pueden codificar efectores de *P. fijiensis*.

No se detectó expresión del gen del contig 649 (Mycfi_184243). Posiblemente este gen tenga una ventana de tiempo de expresión muy corta y ocurra en momentos diferentes en la germinación de los conidios a los evaluados en el presente trabajo.

El transcriptoma de conidios de *P. fijiensis* será un recurso genético útil para investigar más genes involucrados en los procesos biológicos y patogénicos de este hongo.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Barragan, A., García-Torres, A., Odriozola-Casas, O., Macedo-Raygoza, G., Ogura, T., Manzo-Sánchez, G., Andrew, J., Islas-Flores, J. y Beltrán-García, M. (2014). Chemical management in fungicide sensivity of *Mycosphaerella fijiensis* collected from banana fields in México. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 359-364.

Aguilar, L. y Falquet, L. (2015). Sequencing and *de novo* assembly of bacterial genomes: an approach to study new pathogens. *Revista de Salud Animal*, 37(2), 125-132.

Ah-Fong, A.M., Kim, K.S. y Judelson, H.S. (2017). RNA-Seq of life stages of the oomycete *Phytophth infestans* reveals dynamic changes in metabolic, signal transduction, and pathogenesis genes and a major role for calcium signaling in development. *BMC Genomics*, 18(1), 1-21.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.

Ambawade, M.S. y Pathade, G.R. (2015). Isolation, characterization and ultrastructure of *Mycosphaerella musicola* etiological agent of yellow Sigatoka isolated from banana (*Musa* spp). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(1), 659-671.

Arango-Isaza, R.E., Diaz-Trujillo, C., Dhillon, B., Aerts, A., Carlier, J., Crane, C.F., Jong, T., de Vries, I., Dietrich, R., Farmer, A.D., Fortes-Fereira, C., Garcia, S., Guzmán, M., Hamelin, R.C., Lindquist, E.A., Mehrabi, R., Quiros, O., Schmutz, J., Shapiro, H., Reynolds, E., Scalliet, G., Souza, M., Stergiopoulos, I., Van der Lee, T.A., De Wit, P.J., Zapater, M.F., Zwiers, L.H., Grigoriev, I.V., Goodwin, S.B. y Kema, G.H. (2016). Combating a global threat to a clonal crop: banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (synonym *Mycosphaerella fijiensis*) genomes reveal clues for disease control. *PlOS Genetics*, 12(8), 1-36.

Beltrán-García, M.J., Manzo-Sánchez, G., Orozco-Santos, M. y Ogura, T. (2009). Sigatoka negra: el cáncer de la producción de banano. *Revista Ciencia y Desarrollo*, 35(232), 60–63.

Biblioteca Virtual de Pronatura Sur, 2015. Análisis de la producción de plátano, su mercado y las acciones de mitigación y adaptación al cambio climático en Chiapas.

Disponible en: http://www.pronatura-sur.org/web/docs/ANALISIS_DE_LA_PRODUCCION_DE_PLATANO.pdf

[Acceso 1 octubre 2017].

Birkenbihl, R.P., Liu, S. y Somssich, I.E. (2017). Transcriptional events defining plant immune responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 1-9.

Blankenberg, D., Gordon, A., Von-Kuster, G., Coraor N., Taylor J. y Nekrutenko, A. (2010). Galaxy Team. Manipulation of FASTQ data with galaxy. *Bioinformatics*, 26(14), 1783-1785.

Bolio-López, G., Valadez-González, A., Veleva, L. y Andreeva, A. (2011). Cellulose whiskers from agro–industrial banana wastes: Isolation and characterization. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 291-299.

Boylan, M.T., Mirabito, P.M., Willett, C.E., Zimmerman, C.R. y Timberlake, W.E. (1987). Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Celular Biology*, 7(9), 3113-3118.

Bullard, J., Purdom, E., Hansen, K. y Dudoit, S. (2010). Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC bioinformatics*, 11(94), 1-13.

Calberto, G., Staver, C. y Siles, P. (2015). An assessment of global banana production and suitability under climate change scenarios, en: Climate change and food systems: global assessments and implications for food security and trade. (ed). Food Agriculture Organization of the United Nations. Roma. pp. 266-291.

Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W. y Keller, N.P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447-459.

Carlier, J., De-Waele, D. y Escalant, J. (2003). Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por Fusarium, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nematodos. *Bioversity International*, pp. 37.

Carrasco Carmona, Álvaro-Biología Molecular de Sistemas, 2015.

[Online] (Actualizado 2 enero 2016).

Disponible en: https://sites.google.com/site/b22carcabms/home/practica-1.

[Acceso 30 abril 2017].

Castro, E. y García E. (2009). La inmunidad innata en las plantas: Una batalla molecular entre receptores y estimuladores. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 11, 43–47.

Castro, R., Pesántez, M., Lema, P., Quevedo, J., Arichabala, P. y Alvarado-Capó, Y. (2015). Potential use of *Trichoderma*-based bioproduct for black leaf streak disease (*Mycosphaerella fijiensis*) management in the field. *Biocontrol Science and Technology*, 25(4), 481-486.

Chagas, F.O., Pessotti, R.C., Caraballo-Rodríguez, A.M. y Pupo, M.T. (2018). Chemical signaling involved in plant-microbe interactions. *Chemical Society Reviews*, 47(5), 1652-1704.

Chang, T.C., Salvucci, A., Crous, P.W. y Stergiopoulos, I. (2016). Comparative genomics of the Sigatoka disease complex on banana suggests a link between parallel evolutionary changes in *Pseudocercospora fijiensis* and *Pseudocercospora eumusae* and increased virulence on the banana host. *PLOS Genetics*, 12(8), 1-35.

Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., y Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803-814.

Cho, E.M., Boucias, D. y Keyhani, N.O. (2006). EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. II. Fungal cells sporulating on chitin and producing oosporein. *Microbiology*, 152(9), 2855-2864.

Chu, Y. y Corey, D. (2012). RNA Sequencing: Platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Therapeutics*, 22(4), 271–274.

Churchill, A. (2011). *Mycosphaerella 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.

Clutterbuck, A.J. (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 63(2), 317-327.

Cochrane, V.W., Cochrane, J.C., Vogel, J.M. y Coles, R.S. (1963). Spore germination and carbon metabolism in *Fusarium solani*. *Journal of Bacteriology*, 86(2), 312-319.

Cobos, P., Hernández, A., Muñoz, C., Pérez, V. y Sánchez, G. (2011). Sanidad Forestal: Guía de Imágenes de Plagas, Enfermedades y Otros Agentes Presentes en los Bosques. Ediciones Mundi-Prensa, pp. 519.

Conde-Ferráez, L., Grijalva-Arango, R., Raigoza-Flores, N. y James-Kay, A. (2008). A Simple method to obtain single conidium isolates directly from banana (*Musa* sp.) leaves infected with *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Mexican Journal of Phytopathology*, 26(1), 76-78.

Contreras-Martínez, M. (1983). El chamusco negro (Sigatoka) una nueva enfermedad de la hoja de los plátanos. *Revista de Geografía Agrícola*, 4, 61-102.

Costal, B. y Nahas, E. (2012). Growth and enzymatic responses of phytopathogenic fungi to glucose in culture media and soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1), 332-340.

Couto, D. y Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 537–552.

Crous, P., Braun, U. y Groenewald, J. (2007). *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology*, 58, 1-32.

Cruz-Cruz, C.A., Ramírez-Tec, G., García-Sosa, K., Escalente-Erosa, F., Hill, L., Osbourn, A.E., Peña-Rodríguez, L.M. (2010). Phytoanticipins from banana (*Musa*

acuminata cv. Grande Naine) plants, with antifungal activity against *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black Sigatoka. *European Journal of Plant Pathology*, 126(4), 459–463.

Cuéllar-Quintero, A., Álvarez-Cabrera, E. y Castaño-Zapata, J. (2011). Evaluation of resistance of plantain and banana genotypes to black Sigatoka (*Myscosphaerella fijiensis* Morelet). *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín,* 64(1), 5853-5865.

Curtis, H., Barnes, N., Schnek, A. y Massarini, A. (2003). Curtis Biología. Editorial Médica Panamericana, pp. 526.

Dadzie, B.K. y Orchard, J.E. (1997). Evaluación Rutinaria Postcosecha de Híbridos de Bananos y Plátanos: Criterios y Métodos. Bioversity International. Francia. pp. 3.

Dangl, J.L., Horvath, D.M. y Staskawicz, B.J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 341(6151), 746-751.

Davis, A., Dolinski, K., Dwight, S., Eppig, J., Harris, M., Hill, D., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J., Richardson, J., Ringwald, M., Rubin, G. y Sherlock, G. (2000). Gene ontology: Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*, 25(1), 25-29.

Dean, R., Lichens-Park y Kole, C. (2014). The Genomes of *Mycosphaerella graminicola* and *M. fijiensis,* en: Genomics of Plant-Associated Fungi*:* Monocot Pathogens. Springer-Verlag Berlín Heidelberg. Berlín. pp. 123-140.

De-Jonge, R., Van-Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., Van-der-Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H. y Thomma, B.P. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science*, 329(5994), 953-955.

Dens, K., Vargas, M., Matton, G., Coessens, S., Van den Houwe, I. y Swennen, R. (2002). Introducción y multiplicación de bananos y plátanos mejorados en Nicaragua y su distribución a los agricultores. *InfoMusa*, 11(1), 44-47.

Dodds, P.N. y Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11, 539–548.

Fan, C., Chang, A. y Liu, T. (2019). Role of autophagy in the reproduction of pathogenic fungi. *Acta Microbiologica Sinica*, 59(2), 224-234.

Fang, W. y Bidochka, M.J. (2006). Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycological Research*, 110(10), 1165-1171.

Fang, X. y Barbetti, M.J. (2014). Differential protein accumulations in isolates of the strawberry wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* differing in virulence. *Journal of Proteomics*, 108, 223-237.

Fang, Z., Martin, J.A. y Wang, Z. (2012). Statistical methods for identifying differentially expressed genes in RNA-Seq experiments. *Cell Bioscience*, 2(26), 1-8.

Feduchi, E. (2014). Bioquímica: Conceptos Esenciales. Editorial Médica Panamericana, pp. 256.

Fouré, E. (1985). Black Leaf Streak Disease of Bananas and Plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), Study of the Symptoms and Stages of the Disease in Gabon. IRFA, pp. 23.

Fouré, E. (1982). Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés.1: Incubation et évolution de la maladie. *Fruits*, 37, 749-766.

García-Mata, R., González-Machorro, M.F., García-Sánchez, R.C., Mora-Flores, J.S., González-Estrada, A. y Martínez-Damian, M.A. (2013). Banana (*Musa paradisiaca*) market in México, 1971-2017. *Agrociencia*, 47(4), 399-410.

Griffin, G. J. (1970). Carbon and nitrogen requirements for macroconidial germination of *Fusarium solani*: dependence on conidial density. *Canadian Journal of Microbiology*, 16(8), 733-740.

Guo, L., Han, L., Yang, L., Zeng, H., Fan, D., Zhu, Y., Feng, Y., Wang, G., Peng, C., Jiang, X., Zhou, D., Ni, P., Liang, C., Liu, L., Wang, J., Mao, C., Fang, X., Peng, M. y Huang, J. (2014). Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* causing banana vascular wilt disease. *PLOS One*, 9(4), 1-17.

Hadwiger, L.A. y Polashock, J. (2013). Fungal mitochondrial DNases: Effectors with the potential to activate plant defenses in nonhost resistance. *Phytopathology*, 103(1), 81-90.

Hagiwara, D., Takahashi, H., Kusuya, Y., Kawamoto, S., Kamei, K. y Gonoi, T. (2016). Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: An essential role for AtfA in conidial dormancy. *BMC Genomics*, 17(358), 1-18.

Hernández-Gómez, E., Garrido Ramírez, E., Iracheta-Donjuan, L., Escobedo-GraciaMedrano, R., Canto-Cache, B. y Hernández-García, P. (2016). Field evaluation of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) tolerance of banana genotypes at Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 3(1), 15-25.

Hernández, R. (1995). Selección *in vitro* e invernadero de clones de *Musa* sp. para la evaluación de su resistencia a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Tesis en opción del grado científico de Master en ciencia. CATIE. Costa Rica. pp 97.

Hokyoung, S., Myung-Gu, K., Kyunghun, M., Jae-Yum, L., Gyung-Ja, C., Jin-Cheol, K., Suhn-Kee, C. y Yin-Won, L. (2014). WetA is required for conidiogenesis and conidium maturation in the ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *Eukaryot Cell*, 13(1), 87-98.

Hokyoung S., Myung-Gu, K., Kyunghun, M., Young-Su, S., Jae-Yum, L., Gyung-Ja, C., Jin-Cheol, K., Suhn-Kee, C., y Yin-Won, L. (2013). AbaA regulates conidiogenesis in the ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *PLOS One*, 8(9), 1-11.

Hoss, R., Helbig, J. y Bochow, H. (2000). Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black Sigatoka disease pathosystem (*Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis*). *Journal of Phytopathology*, 148, 387-394.

Jacome, L., Lepoivre, P., Marín, D., Ortiz, R., Romero, R. y Escalant, J. (2003). *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases of Bananas: present status and Outlook. *Bioversity International*, pp. 45.

Jacome, L., Schuh, W. y Stevenson, R. (1991). Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis var. difformis*. *Phytopathology*, 81(12), 1480-1485.

Khan, I.A., Lu, J.P., Liu, X.H., Rehman, A. y Lin, F.C. (2012). Multifunction of autophagy-related genes in filamentous fungi. *Microbiological Research*, 167(6), 339-345.

Kikuma, T., Arioka, M. y Kitamoto, K. (2007). Autophagy during conidiation and conidial germination in filamentous fungi. Autophagy. *Autophagy*, 3(2), 128-129.

Kogenaru, S., Yan, Q., Guo, Y. y Wang, N. (2012). RNA-Seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. *BMC Genomics*, 13(629), 1-16.

Langmead, B. y Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359.

Lazniewska, J., Milowska, K. y Gabryelak, T. (2012). Dendrimers-revolutionary drugs for infectious diseases. Wiley interdisciplinary reviews. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 4(5), 469-491.

Lee, S., Kim, S.M. y Lee, R.T. (2013). Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(10), 1165-1207.

Liang, S., Wang, B., Pan, L., Ye, Y., He, M., Han, S., Zheng, S., Wang, X. y Lin, Y. (2012). Comprehensive structural annotation of *Pichia pastoris* transcriptome and the response to various carbon sources using deep paired-end RNA sequencing. *BMC Genomics*, 13(738), 1-14.

Lo-Presti, L., Zechmann, B., Kumlehn, J., Liang, L., Lanver, D., Tanaka, S., Bock, R. y Kahmann, R. (2017). An assay for entry of secreted fungal effectors into plant cells. *New Phytologist*, 213(2), 956-964.

Lurá, M., Gonzáles, A., Basílico, J., Sarsotti, P., Gómez, R. y Freyre, L. (1997). *Introducción al estudio de la Micología*. Ediciones UNL (Universidad Nacional del Litoral), pp. 11.

Lysák, M., Dolezelová, E., Swennen, R. y Dolezel, J. (1999). Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(8), 1344-1350.

Madriz-Ordeñana, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas*, 63, 22-32.

Manzo, G., Guzmán, S. y Rodríguez, C. (2005). La biología de *Mycosphaerella fijiensis* y su interacción con *Musa* spp. *Mexican Journal of Phytopathology*, 23(1), 87–96.

Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M., DeWeese-Scott, C., Fong, J., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N., Gwadz, M., Hurwitz, D., Jackson, J., Ke, Z., Lanczycki, C., Lu, F., Marchler, G., Mullokandov, M., Omelchenko, M., Robertson, C., Song, J., Thanki, N., Yamashita, R., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C. y Bryant, S. (2011). CDD: A conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, 39, D225-D229.

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

Mendoza, M. (2014). Avances en los estudios sobre la interacción *Musa* spp. *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biotecnología Vegetal*, 14(3), 131-144.

Meredith, D.S. y Lawrence, J.S. (1969). Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella 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.

Meredith, D.S. y Lawrence, J.S. (1970). Morphology of the conidial state of *Mycosphaerella musicola* in the Pacific región. *Transactions of the British Mycological Society*, 54(2), 265-281.

Molina, A., Sánchez-Vallet, A. y Sánchez-Rodríguez, C. (2007). Inmunidad innata en plantas y resistencia a patógenos: nuevos conceptos y potenciales aplicaciones en protección vegetal. *Phytoma*, 192, 43-46.

Morales-Yáñez, M.G. (2002). Evaluación de la eficiencia de productos alternativos para el control de lancha *Phytophth infestans* (Mont. de Bary) en papa, Cutuglahua-Pichincha. Tesis Profesional de Licenciatura. Universidad Central del Ecuador. Ecuador. pp. 8-13.

Nadal-Medina, R., Manzo-Sánchez, G., Orozco-Romero, J., Orozco-Santos, M. y Guzmán-González, S. (2009). Genetic diversity of bananas and plantains (*Musa* spp.) determined by RAPD markers. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(1), 1-7.

Nair, R. y Kumar, D. (2013). Plant Diseases-Control and Remedy Through Nanotechnology. In: Tuteja N., Gill S. (eds) Crop Improvement Under Adverse Conditions. *Springer*, New York. pp. 231-243.

Noar, R. y Daub, M. (2016). Transcriptome sequencing of *Mycosphaerella fijiensis* during association with *Musa acuminata* reveals candidate pathogenicity genes. *BMC Genomics*, 17(1), 690-715.

Nookaew, I., Papini, M., Pornputtapong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlen, M. y Nielsen, J. (2012). A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and crosscomparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 40(20), 10084-10097.

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

Orozco-Santos, M., Orozco-Romero, J., Pérez-Zamora, O., Manzo-Sánchez, G., Farías-Larios, J. y da Silva Moraes, W. (2008). Cultural practices for the management of black Sigatoka in bananas and plantains. *Tropical Plant Pathology*, 33(3), 189-196.

Ozsolak, F. y Milos, P. (2010). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 87-98.

Passos, M., Oliveira, C., Emediato, F., Camargo, C., Rennó, V., Brasileiro, A., Amorin, E., Ferreira, C., Martins, N., Togawa, R., Pappas, G., Orzenil, S. y Miller, R. (2013). Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development. *BMC Genomics*, 14(78), 1-17.

Pech, E. (2013). Expresión de genes en conidios de *Mycosphaerella fijiensis* en cultivo *in vitro*. Tesis profesional. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 93.

Peraza-Echeverría, L., Rodríguez-García, C. y Zapata-Salazar, D. (2008). A rapid, effective method for profuse *in vitro* conidial production of *Mycosphaerella fijiensis*. *Australasian Plant Pathology*, 37(5), 460-463.

Pérez, L. (2002). Morfología de las especies de *Mycosphaerella* asociadas a manchas de las hojas en *Musa* spp. *Fitosanidad*, 6(2), 3-9.

Petersen, T.N., Brunak, S., Von-Heijne, G. y Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785-786.

Petre, B., Saunders, D.G.O., Sklenar, J., Lorrain, C., Win, J., Duplessis, S. y Kamoun, S. (2015). Candidate effector proteins of the rust pathogen *Melampsora larici-populina* target diverse plant cell compartments. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(6), 689-700.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 2002-2007.

Ploetz. R. (2004). Enfermedades y plagas: Un análisis de su importancia y manejo. *InfoMusa*, 13(2), 11-16.

ProMusa, 2017. Fungicides used in banana plantations.

Disponible en: http://www.promusa.org/Fungicides+used+in+banana+plantations

[Acceso 23 enero 2019].

Red por una América Latina Libre de Transgénicos (RALLT). (2002). Una mirada al banano transgénico desde la ecología política. Boletín de Acción Ecológica, número 166. Ecuador, pp. 13-14.

Rivas, G. y Rosales. F. (2003). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Bioversity International, pp. 11.

Rocha, R., Lozano, P. y Martínez, Y. (2004). Mecanismos de Patogenicidad e Interacción: Parásito-Hospedero. Benemérita Universidad Autónoma de puebla, pp. 202.

Rodríguez-Cubillos, A.E., Perlaza-Jiménez, L. y Bernal-Giraldo, A.J. (2014). RNA-Seq data analysis in prokaryotes: A review for non-experts. *Acta Biológica Colombiana*, 19(2), 131-142.

Rodríguez-García, C.M., Navarrete-Mapen, R. y Peraza-Echeverría, L. (2007). Characterisation of the *in vitro* conidial morphology of *Mycosphaerella fijiensis*, a major pathogen of banana. *Australasian Plant Pathology*, 36(4), 369-372.

Rodríguez-García, C.M., Raigosa-Flores, N., Conde-Ferráez, L., Peraza-Echeverría, L., Canto-Canché, B. y James-Kay, A. (2006). Variation in electrophoretic karyotype among Mexican isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28(2), 236-241.

Rodríguez, H.A., Rodríguez-Arango, E., Morales, J.G., Kema, G. y Arango, R.E. (2016). Defense gene expression associated with biotrophic phase of *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet infection in banana. *Plant Disease*, 100(6), 1170-1175.

Samuel, J.P., Samboju, N.C., Yau, K.Y., Webb, S.R. y Burrough, F. (2014). Use of dendrimer nanotechnology for delivery of biomolecules into plant cells. Patent: US20110093982 A1.

Sánchez-García, C., Alvarado-Capó, Y., Acosta-Suárez, M., Leiva-Mora, M., Cruz-Martín, M. y Roque, B. (2013). Quantification of phenols in lesions caused by

Mycosphaerella fijiensis Morelet in 'Cavendish naine'. *Revista de Protección Vegetal*, 28(2), 149-152.

Sánchez-García, C., Alvarado-Capó, Y., Cruz-Martín, M., Acosta-Suárez, M., Leiva-Mora, M. y Roque, B. (2010). Detección de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta defensiva en plantas de *Musa* spp. inoculadas artificialmente con *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotecnología Vegetal*, 10(2), 89-97.

Sánchez-Rodríguez, R., Pino-Algora, J., Vallin-Plous, C., Pérez-Rodríguez, M., Iznaga-Sosa Y. y Malpartida-Romero, F. (2002). Efecto del fungicida natural F20 contra la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano (AAB) y banano (AAA). *InfoMusa*, 11(1), 14-16.

Sánchez, A.V., Fouché, S., Fudal, I., Hartmann, F.E., Soyer, J.L., Tellier, A. y Croll, D. (2018). The genome biology of effector gene evolution in filamentous plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 21-40.

Sánchez, A.V., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D.J., Thomma, B.P. y Mesters, J.R. (2013). Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *Elife*, 2(e00790), 1–16.

Sandoval, J.A., Brenes, G. y Pérez-Sánchez, L. (1991). Micropropagación de Plátano y Banano (*Musa* AAB y AAA) en el CATIE. Orton IICA/CATIE, pp. 2.

Secretaría de Economía, 2012. Monografía del sector plátano en México: Situación actual y oportunidades de mercado.

Disponible en: http://www.2006-2012.economia.gob.mx/files/Monografia_Platano.pdf

[Acceso 1 octubre 2017].

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018. Producción Agrícola.

Disponible en: https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119

[Acceso el 1 de mayo de 2018]

Sharma, M., Sengupta, A., Ghosh, R., Agarwal, G., Tarafdar, A., Nagavardhini, A., Pande, S. y Varshneyb, R.K. (2016). Genome wide transcriptome profiling of *Fusarium oxysporum* f sp. *ciceris* conidial germination reveals new insights into infection-related genes. Scientific Reports, 6(37353), 1-11.

Simmonds, N.W. y Shepherd, K. (1955). The taxonomy and origins of the cultivated bananas. Journal of the Linnean Society of London, *Botany*, 55(359), 302–312.

Soto, M. (2011). World situation and advances of banana production and technology. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(1), 13-29.

Stergiopoulos, I., Van den Burg, H.A., Okmen, B., Beenen, H.G., Van Liere S., Kema, G.H. y Wit, P.J. (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 of the United States of America*, 107(16), 7610-7615.

Stergiopoulos, I. y Wit P.J. (2009). Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 233-263.

Stover R.H. y Dickson J.D. (1976). Banana leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola and M. fijiensis* var. *difformis*: a comparison of the first Central American epidemics. FAO Plant Protection Bulletin, 24, 36-42.

Sun, Y., Yi, X., Peng, M., Zeng, H., Wang, D., Li, B., Tong, Z., Chang, L., Jin, X. y Wang X. (2014). Proteomics of *Fusarium oxysporum* race 1 and race 4 reveals enzymes involved in carbohydrate metabolism and Ion transport that might play important roles in banana fusarium wilt. *PLOS One*, 9(12), 1-20.

Tan, K., Oliver, R., Solomon, P. y Moffat, C. Proteinaceous necrotrophic effectors in fungal virulence. (2010). *Functional Plant Biology*, 37(10), 907-912.

Torres, J.M., Calderón, H., Rodríguez-Arango, E., Morales, J.G. y Arango, R. (2012). Differential induction of pathogenesis-related proteins in banana in response to

Mycosphaerella fijiensis infection. *European Journal of Plant Pathology*, 133(4), 887-898.

Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L. y Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-Seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3), 562-578.

Trujillo-Sierra, J.E. y Rodríguez-García, C.M. (2009). Un hongo, el peor enemigo del plátano. *Ciencia*, 80-83.

Tsai, H.F., Wheeler, M.H., Chang, Y.C. y Kwon-Chung, K.J. (1999). A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6469-6477.

Tsuda, K. y Somssich, I.E. (2015). Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist*, 206(3), 932-947.

Van-Leeuwen, M.R., Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., Menke, H., Stam, H., Stark, J., Wösten, H.A. y Dijksterhuis, J. (2013). Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in Mycology*, 74(1), 59-70.

Van-Verk, M., Hickman, R., Pieterse, C. y Van-Wees, S. (2013). RNA-Seq: Revelation of the messengers. *Trends Plant in Science*, 18(4), 175-179.

Vázquez, R., Tzec, M., Islas, I., Hérnandez, E., Canto, B., Hénandez, I., Chi, B., Martínez, L. y Garrido, E. (2012). Presencia de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra, en desechos vegetales en las plantaciones. Identificación de reservorios, en: Innovaciones para el manejo integrado en campo de la Sigatoka negra en México. Aportaciones de la investigación básica. (ed). Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida. pp. 7-20.

Vlot, A.C., Dempsey, D.A. y Klessig, D.F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177-206.

Wakefield, L., Gadoury, D., Seem, R., Milgroom, M., Sun, Q. y Cadle-Davidson, L. (2011). Differential gene expression during conidiation in the grape powdery mildew pathogen, *Erysiphe necátor*. *Phytopathology*, 101(7), 839-846.

Wang, Z., Gerstein, M. y Snyder, M. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63.

Wawra, S., Fesel, P., Widmer, H., Timm, M., Seibel, J., Leson, L., Kesseler, L., Nostadt, R., Hilbert, M., Langen, G. y Zuccaro, A. (2016). The fungal-specific β-glucan-binding lectin FGB1 alters cell-wall composition and suppresses glucan-triggered immunity in plants. *Nature Communications*, 7(13188), 1–11.

Werner, S., Sugui, J.A., Steinberg, G. y Deising, H.B. (2007). A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(12), 1555-1567.

White, B.T. y Yanofsky, C. (1993). Structural characterization and expression analysis of the *Neurospora* conidiation gene con-6. *Developmental Biology*, 160(1), 254-264.

Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D.G.O., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S.A. y Kamoun, S. (2012). Effector biology of plant-associated organisms: Concepts and perspectives. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 77, 235-247.

Xiao-Hong, L., Hui-Min, G., Fei, X., Jian-Ping, L., Rodney, D.J. y Fu-Cheng, Lin. (2012). Autophagy vitalizes the pathogenicity of pathogenic fungi. *Autophagy*, 8(10), 1415-1425.

Zhu, W., Wei, W., Wu, Y., Zhou, Y., Peng, F., Zhang, S., Chen, P. y Xu, X. (2017). BcCFEM1, a CFEM domain-containing protein with putative GPI-anchored site, is involved in pathogenicity, conidial production, and stress tolerance in *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 8(1807), 1-11.

Zou, D., Ma, L., Yu, J. y Zhang, Z. (2015). Biological databases for human research. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 13(1), 55-63.