

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

# Análisis proteómico de la pared celular del hongo Pseudocercospora fijiensis

Tesis que presenta

Yamily Yazmin Burgos Canul

En opción al título de

## DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México 2019

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



#### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Yamily Yazmin Burgos Canul** titulado **"Análisis proteómico de la pared celular del hongo** *Pseudocercospora fijiensis*" fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en la línea de investigación planta-patógeno, en el laboratorio 06 y en la Unidad de Biotecnología, en el laboratorio de Biotecnología de microorganismos del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Ignacio Islas Flores, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro

Atentamente.

Dra. Cíelia De la Peña Seaman Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 15 de julio 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 en 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 Científica 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:

M. en C. Yamily Yazmin Burgos Canul

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

#### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento al proyecto de ciencia básica número 6027800001 titulado "Enfoque agrogenómico en el estudio de la Sigatoka negra" del cual este trabajo formó parte.

Al CONACYT por la beca número 390730, otorgada a Yamily Yazmin Burgos Canul, para la realización de los estudios de Doctorado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY) por permitir el acceso y uso de sus instalaciones, particularmente a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP) y a la Unidad de Biotecnología (UBT).

Al Doctor Ignacio Islas Flores por su asesoría, apoyo en el laboratorio, sus consejos, amistad y por brindarme la confianza para equivocarme y aprender del error, durante la realización de este trabajo.

A la Doctora Blondy Canto Canché por la asesoría durante el Doctorado, el financiamiento, préstamo de equipos y reactivos de su laboratorio. Por la confianza, el apoyo, sus consejos para mejorar académicamente y como persona.

Al Doctor Víctor M. Loyola Vargas, por su orientación y apoyo durante el desarrollo del trabajo de tesis, por sus observaciones para mejorar el artículo, por compartir sus experiencias y por permitir mi integración a sus seminarios, muchas gracias.

A la Dra. Ileana Echevarría Machado, por estar pendiente de mi desempeño, por su apoyo, sugerencias y atención durante el desarrollo del trabajo de doctorado.

A los miembros del comité tutoral, Doctores Víctor Manuel Loyola Vargas, Ignacio Islas Flores, Ana Paulina Barba de la Rosa y Blondy Canto Canché, por sus sugerencias y correcciones para mejorar la calidad del trabajo experimental y escrito.

A los miembros del comité predoctoral, Doctores Marcela Gamboa Angulo, Ileana Echeverría Machado, Luis Alfonso Sáenz Carbonell, Jairo Cristóbal Alejo y José Juan Zúñiga Aguilar, quienes contribuyeron a mi crecimiento profesional.

A los miembros del comité revisor de tesis. Doctores, Ana Paulina Barba de la Rosa, Marcela Gamboa Angulo, Blondy Canto Canché, Víctor Manuel Loyola Vargas, Luis Alfonso Sáenz Carbonell, Jairo Cristóbal Alejo e Ignacio Islas Flores, quienes con sus observaciones y correcciones contribuyeron a mejorar la calidad y contenido del documento de tesis.

A los Maestros en Ciencias, Ligia Brito Argáez, Mildred Carrillo Pech y Miguel Tzec Simá, por todo el apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo.

A todos mis compañeros del "laboratorio 06" perteneciente a la unidad de Bioquímica y a mis compañeros del laboratorio de "Biotecnología microbiana" de la unidad de Biotecnología, por su amistad y compañerismo en el laboratorio.

A mis compañeros de CICY M.C. José Aarón Tamayo Sansores, M.C. Sergio Ramos, M.C. Dianeli Madera Piña, M.C. Ligia Brito Argáez y al I.B. Gilberto Andrés Muñoz, a todos ellos les agradezco de forma muy especial por ayudarme de una u otra manera en el desarrollo de este trabajo, por compartirme sus experiencias, por su confianza, por hacer más amena mi estancia en el CICY y principalmente, por su amistad.

A mis amigos, los Doctores Miguel Ángel Canseco Pérez, Roberto Vázquez y al M.C Miguel Alonso Tzec Simá, por su apoyo incondicional, por estar en las buenas y en las malas, por estar al pendiente y creer en mí, por brindarme su valiosa amistad y hacerme parte de su familia, gracias.

#### DEDICATORIAS

- A Dios por brindarme salud y por guiarme en cada paso.
- A mi familia por apoyarme a lo largo del transcurso del Doctorado, por sus consejos, atención, apoyo, por esperarme para compartir momentos tan especiales, por todo su amor y nunca dejarme sola.
- A mis hermanas, sobrinos y cuñado por brindarme alegrías, aprendizajes, consejos, apoyo y ayudarme a ser más fuerte con su ejemplo.
- A mi esposo Adrián José Enríquez Valencia, por estar siempre a mi lado afrontando cada reto que nos presenta la vida, por todo su amor, paciencia, por el apoyo brindado y sobretodo por alentarme y motivarme con su ejemplo y perseverar a mi lado no solo en lo personal sino también con su ejemplo acádemico.

## ÍNDICE

Abreviaturas	vii
Introducción	1
CAPÍTULO I	5
Antecedentes	5
1 Sigatoka negra	5
1.1 Pseudocercospora fijiensis	5
1.2 Composición de la pared celular fúngica	7
1.3 Proteínas presentes en la pared celular fúngica	9
1.4 Nitrógeno como inductor de genes que codifican proteínas de patogenicidad.	13
1.5 Genes que codifican proteínas de la pared celular fúngica	13
1.6 Proteómica de la pared celular fúngica	15
1.7 Estudios en <i>P. fijiensis</i>	.16
Justificación	18
Hipótesis	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	19
Estrategia experimental	20
	21
Evaluación <i>in vitro</i> de la virulencia de <i>P. fijiensis</i>	21
2 Introducción	21
2.1 Materiales y métodos	22
2.1.1 Reactivación y propagación de las cepas de P. fijiensis	.22
2.1.2 Ensayo de virulencia de las cepas de P. fijiensis sobre fragmentos foliares	de
banano	23
2.1.3 Detección del peróxido de hidrógeno en los fragmentos foliares inoculados c	on
P. fijiensis	24
2.2. Resultados	31
2.2.1 Reactivación de las cepas de <i>P. fijiensis</i>	.24
2.2.2 Infección in vitro de fragmentos foliares	.25
2.2.3 Microscopía de los fragmentos foliares inoculados con dos cepas de P. fijiens	sis
de virulencia contrastante	29
2.3 Discusión	.30
CAPÍTULO III	33
Establecimiento de un protocolo para el aislamiento y extracción de las proteínas	de
la pared celular de <i>P. fijiensis</i>	33
3 Introducción	33
3.1 Materiales y métodos	35
3.1.1 Colecta del micelio de <i>P. fijiensis</i>	.35
3.1.2 Aislamiento de la pared celular	.35
3.1.3 Liberación de las proteínas de la pared celular de <i>P. fijiensis</i>	.36
3.1.4 Precipitación de las proteínas	.37
3.1.5 Preparación de las muestras para proteómica	.37
3.1.6 Análisis bioinformáticos	20
	.50
3.2 Resultados	.30

3.2.2 Aislamiento de la pared celular de dos cepas de <i>P. fijiensis</i> con diferente virulencia41
3.2.3 Perfil peptídico de las proteínas unidas covalentemente a la pared celular de las cepas C1233 y Oz2b
3.2.4 Identificación de las proteínas liberadas de la pared celular por espectrometría
de masas43
3.2.5 Análisis in sílico de las proteínas encontradas en la pared celular de P.
fijiensis45
3.3 Discusión46
CAPÍTULO IV
The cell wall proteome from two strains of Pseudocercospora fijiensis with
differences in virulence
CAPÍTULO V
Discusión generaL
CAPÍTULO VI111
Conclusiones y perspectivas generales111
6.1 Conclusiones111
6.2 Perspectivas112
Apéndice113
Referencias hibliográficas 116

### LISTADO DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> 7
Figura 1.2 Esquematización de la estructura y composición de la pared celular
fúngica8
Figura 1.3 Componentes de la pared celular fúngica10
Figura 1.4 Esquematización de sitios característicos de las proteínas PIR11
Figura 1.5 Esquematización de una proteína con anclaje GPI12
Figura 2.1 Biomasa de cada una de las cepas de <i>P. fijiensis</i> en los fragmentos foliares de <i>M. acuminata</i> cv Enano gigante durante los días posteriores a la inoculación
Figura 2.2 Fragmentos foliares de banano cv Enano gigante mostrando el área de las lesiones causadas días después de la inoculación <i>in vitro</i> con los fragmentos de micelio de las diferentes cepas de <i>P. fijiensis</i>
Figura 2.3 Observación microscópica del micelio de las cepas C1233 y Oz2b en el área circular escindida de los fragmentos foliares de 30 dpi
Figura 3.1 Aislamiento de la pared celular de <i>P. fijiensis</i> , cepa C123340
Figura 3.2 Aislamiento de la pared celular de <i>P. fijiensis</i> cepas C1233 y Oz2b y análisis por microscopía42
Figura 3.3 Perfil de polipéptidos de las paredes celulares de <i>P. fijiensis</i> cepas C1233 y Oz2b, separados en geles desnaturalizantes de 12 % SDS-PAGE43
Figura 3.4 Diagrama de Venny que ilustra la distribución de las proteínas unidas por enlaces covalente a la pared44
Figura 3.5 Representación gráfica de la ontología de genes correspondientes a las proteínas covalentes comunes de la pared celular de las cepas C1233 (más virulenta) y Oz2b (menos virulenta)45

#### LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Lista de cepas de P. fijiensis utilizadas en los ensayos iniciales de
virulencia25
Tabla 2. Concentración de proteína obtenida de la pared celular con diferentes
métodos de
extracción41
Tabla 3. Número de proteínas identificadas a partir de los péptidos detectados por
Nano
HPLC/MS/MS44
Tabla 4. Características predichas mediante análisis bioinformático en la secuencia
de aminoácidos de las proteínas con identidad en las cepas C1233 y
Oz2b46

## ABREVIATURAS

A+A	Agar-agar
A+A-B	Agar-agar, sin benzimidazol y sin hongo
A+B	Agar más benzimidazol
A+B-H	Agar con benzimidazol sin hongo
Aa	Aminoácidos
CBM	Módulo de unión a carbohidratos
Cda2	Quitina desacetilasa 2
cv	Cultivar
CW	Pared celular
CWP	Proteínas de pared celular
DAB	3,3´-diaminobenzidina
DOC	Desoxicolato de sodio
dpi	Días posteriores a la infección
DTT	Ditiotreitol
DUF	Dominio de función desconocida
g	Gravedades
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GAG	Galactosaminogalactano
GAS	Glucanosiltransferasa
GLcNAC	N-Acetil-glucosamina
GO	Ontología génica
GPI	Glucosilfosfatidilinositol
h	Hora
HF-Piridina	Fluoruro de hidrógeno piridina
HR	Respuesta hipersensible
IDs	Identificadores
JGI	Joint Genome Institute
kDa	Kilodaltons
LRR	Repeticiones rícas en leucina
MALDI-TOF	Desorción/Ionización Laser Asistida por Matríz-Tiempo de Vuelo
MDH	Malato deshidrogenasa
MS	Espectrometría de masas
Nano-	Cromatografía líquida a nanoescala acoplada a espectrometría de
HPLC/MS/MS	masas en tandem
NBD	Dominios de union a nucleotido
	Reaccion en cadena de la polimerasa
PDA	Medio de papa, dextrosa y agar
PDB	Caldo de papa dextrosa
	FOSTATIONNOSITO
	Proteinas con Repeticiones Internas
	Receptor similar a cinasas
KLP O/T	Receptor similar a proteinas
3/1	Serina o Treonina
SDS	Dodecii sulfato de sodio

SDS-PAGE	Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida
SN	Sigatoka negra
SP	Péptido señal
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoracético
TMSF	Trifluorometano Sulfónico
TPS1	Trehalosa-6-fosfato sintasa
WEGO	Web anotación gráfica de la ontología génica (Web Gene Ontology
	Annotation Plot)
WSC	Integridad de la pared celular y componentes de respuesta al estrés
β-ΜΕ	2-β-mercaptoetanol
Ω	Sitio omega
<sub>dd</sub> H2O	Agua destilada doblemente desionizada
2D	Electroforesis en geles bidimensionales de poliacrilamida
2D-DIGE	Electroforesis en geles diferenciales de dos dimensiones

#### RESUMEN

A nivel mundial, la enfermedad foliar más destructiva del banano es la Sigatoka negra, también conocida como raya negra, es causada por el hongo hemibiotrófico Pseudocercospora fijiensis, (Mycosphaerella fijiensis). En este trabajo, bajo condiciones in vitro, se realizó el ensayo de patogenicidad de cinco cepas de *P. fijiensis* sobre fragmentos foliares de hojas de banano, y con base en la velocidad de aparición de los síntomas en el fragmento foliar, se eligió a la cepa más y menos virulenta. Además, se estableció un protocolo para el aislamiento de la pared celular y sus proteínas unidas covalentemente. Los péptidos resultantes de la digestión de las proteínas de la pared celular fueron separados en un nano-HPLC e identificados por MS-MS. Se determinó que ambas cepas comparten un número importante de proteínas relacionadas al rearreglo de la pared celular e.g. glucanosiltransferasas y de patogenicidad, como los efectores PfAVR4 y PfECP6; el primero protege a la pared celular del hongo contra el ataque de las guitinasas secretadas por el hospedero y el segundo secuestra los oligosacáridos de quitina que van liberándose de la pared del hongo, y eso evita la activación de las respuestas de defensa del hospedero. También se encontraron proteínas atípicas, es decir, que se esperaría que se localicen en el interior de la célula. Sin embargo, trabajos recientes en hongos patógenos de humanos han detectado también a este tipo de proteínas en la pared celular, lo que se sugiere la existencia de una vía alterna de secreción y que deberían ser analizadas en futuros estudios. Este es el primer estudio realizado sobre la pared celular de P. fijiensis por lo que contribuye al conocimiento de su proteoma.

#### ABSTRACT

The most destructive foliar disease of bananas is the black Sigatoka, also known as the banana black leaf streak, it is caused by the hemibiotrophic fungus Pseudocercospora fijiensis (Sinomia, Mycosphaerella fijiensis), which, worldwide, affects large areas of banana plantations. In this work in vitro pathogenicity test of five strains of P. fijiensis was carried out on foliar fragments of banana leaves and based on the speed of appearance of symptoms we chose the most and least virulent strains. Also, a protocol was established for the isolation of the cell wall and of the covalently linked proteins. The peptides resulting from the digestion of the cell wall proteins were separated by nano-HPLC and identified by MS-MS. Both strains share a significant number of proteins involved in the cell wall rearrangement, i.e., glucanosyltransferases and pathogenicity, such as effectors PfAVR4 and PfECP6; the first protects the fungal cell wall against the attack of the chitinases secreted by its host and the second capture the chitin-oligosaccharides released from the fungal cell wall, and this avoids the activation of the host defense. Were also found proteins identified were atypical, it means, they are expected to be located within the cell. However, recent works on human fungal pathogens have also detected this type of proteins in the cell wall, which suggests the existence of an alternative pathway of secretion and that should be analyzed in future studies. This is the first study performed over the cell wall of *P. fijiensis*, and thus it contributes to the knowledge of its proteome.

### **INTRODUCCIÓN**

A nivel mundial, *Pseudocercospora fijiensis* es el agente causal de la enfermedad foliar Sigatoka negra (SN), la cual afecta al cultivo de banano (Arango *et al.*, 2016; Friesen, 2016). El control de la SN mediante aplicaciones de fungicidas eleva el costo de producción por lo que solo los grandes productores pueden darse el lujo de utilizar este tipo de controles (Churchill, 2011). Además, las aplicaciones constantes de fungicidas tiene efectos negativos en el medio ambiente, *i.e.* contaminación del suelo, del manto freático, afectación de la flora y la fauna presente en las áreas de cultivo del banano y también selecciona cepas de *P. fijiensis* resistentes a los compuestos de control (Arango-Isaza *et al.*, 2016). Por lo tanto, la búsqueda de estrategias o alternativas que permitan combatir a este patógeno son de alta prioridad en la investigación (Vishnevetsky *et al.*, 2011; Kosky *et al.*, 2010).

Los estudios de la interacción planta-patógeno han permitido ampliar el conocimiento acerca de las estrategias que emplean los patógeno para evadir el sistema de defensa de las plantas (Selin *et al.*, 2016; Toruño *et al.*, 2016; Stergiopoulos *et al.*, 2010). El hongo *Cladosporium fulvum*, secreta la proteína efectora CfAVR4, la cual es reconocida por el cognado de resistencia CF-4 en el hospedero resistente; esta interacción proteica induce la respuesta hipersensible (HR) en el hospedero (Stergiopoulos *et al.*,2010). En *P. fijiensis*, la proteína efectora PfAVR4, ortóloga funcional de CfAVR4, genera una respuesta de este tipo cuando se infiltra en Calcutta IV, cultivar de banano resistente a la SN (Arango-Isaza *et al.*, 2016).

La pared celular fúngica es un componente indispensable para los hongos, dado que representa un escudo de protección en estrés tanto bióticos como abióticos, es la primer zona que entra en contacto con el hospedero y su composición puede variar en respuesta a las condiciones externas (Latgé y Beauvais, 2014). La pared celular de los hongos está compuesta principalmente por oligosacaridos, melanina y proteínas; estas últimas pueden actuar como adhesinas, receptores o enzimas que participan en la remodelación de la pared celular o en los procesos de patogénesis (Liang *et al.*, 2013; Sosinska *et al.*, 2011; Feofilova, 2010). Dado lo anterior, resulta de gran interés estudiar la composición de la pared celular fúngica durante la interacción planta-patógeno, para detectar proteínas clave para la patogénesis y que eventualmente pudieran ser blancos potenciales para controlar las enfermedades causadas por estos microorganismos. Cabe resaltar que la mayoría de los

estudios referentes al proteoma de la pared celular fúngica se han llevado a cabo en patógenos de humanos y solo unos cuantos en fitopatógenos (Araújo *et al.*, 2017; Liu y Free, 2016; Longo *et al.*, 2014; Kniemeyer *et al.*, 2011).

Existen diversos reportes en los que se plantea que condiciones limitantes de nitrógeno simulan el estado nutricional al que se enfrentan los fitopatógenos durante su interacción con sus hospederos. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que los hongos mantenidos *in vitro* o *in vivo* con una disponibilidad limitada de nitrógeno muestran inducción de la expresión de genes de patogenicidad (Fagard *et al.*, 2014; Snoeijers *et al.*, 2000; Van den Ackerveken *et al.*, 1994). Dado lo anterior, es posible suponer que los hongos cuando crecen *in vitro* y en condiciones de restricción de nitrógeno, pueden estar expresando proteínas fúngicas relacionadas con la patogenicidad.

En el caso de *P. fijiensis* existe un solo trabajo *in silico* sobre pared celular en el cual se identificaron 49 proteínas GPI, entre ellas 6  $\beta$ -1,3-glucosiltransferasas (GAS), como parte de los componentes de la pared celular de este hongo (Kantún-Moreno *et al.*, 2013). Sin embargo, esta propuesta no ha sido abordada experimentalmente. En este trabajo, utilizando la limitación de nitrógeno, se estudiaron dos cepas de *P. fijiensis* con diferencias en su nivel de virulencia. Se planteó una estrategia experimental que permitió analizar la composición proteica de la pared celular de este hongo con el objetivo de identificar el arsenal de proteínas que pueden emplear en la colonización de su hospedero, así como a aquellas proteínas que le permitan evadir las respuestas de defensa del hospedero.

Cabe resaltar que este es el primer estudio proteómico de la pared celular de *P. fijiensis*. Se determinaron proteínas de pared que predicen tener un anclaje GPI, péptido señal y sitios de glucosilación. Se detectaron 257 proteínas presentes en ambas cepas, además otras 30 proteínas fueron exclusivas para la cepa más virulenta y 80 proteínas correspondieron a la cepa menos virulenta; las proteínas identificadas participan en diferentes funciones celulares (procesos metabólicos, celulares, de biogénesis, estructural, etc). Entre las proteínas detectadas se encontraron los efectores PfAVR4 y PfECP6 descritos por Stergiopoulos *et al.* (2010) y las GAS 1, 3, 4 y 5 detectadas *in silico* por Kantún-Moreno *et al.* (2013). También se identificaron proteínas atípicas (proteínas de localización intracelular), *i.e.* gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa, isocitrato liasa y sucinato deshidrogenasa, las cuales han sido consistentemente encontradas en la pared celular de

otros hongos. Hasta hace algunos años, cuando alguna de estas proteínas se detectaba en el exterior de las células, se asumía que provenía de una contaminación resultante del o de los procesos de aislamiento de la pared y extracción de las proteínas. Sin embargo, en años recientes, y particularmete en hongos patógenos, el número de reportes que describen esta clase de "contaminantes" ha aumentado exponencialmente y ha puesto en duda que estas proteínas únicamente se localicen en el interior de la célula (Nimrichter *et al.*, 2016; Longo *et al.*, 2014).

Otro grupo de proteínas encontradas en el proteoma de la pared celular de *P. fijiensis* fueron aquellas "sin identidad", es decir tienen asignado el identificador del gen pero no tienen asignado un nombre, ni función probable. Algunas de estas proteínas novedosas pueden corresponder a factores de patogenicidad pero como no presentan identidad con proteínas conocidas ni dominios conocidos, al momento no pueden hacerse un mayor análisis con estas proteínas. En conclusión, en este trabajo se establecen las bases para el aislamiento de la pared celular de *P. fijiensis* y su estudio proteómico.

## CAPÍTULO I ANTECEDENTES

## **1 SIGATOKA NEGRA**

La Sigatoka negra (SN), también conocida como raya negra de la hoja, es la enfermedad foliar más destructiva de bananos y plátanos. Los bananos son aquellos consumidos como postre, maduran rápido y sus cadenas de almidón son cortas, por lo que no necesitan cocción. En contraste, los plátanos acumulan cadenas largas y complejas de almidón por lo que necesitan mayor tiempo de maduración o procesos de cocción para su consumo (Rodríguez-Caamal *et al.*, 2010).

La SN hasta el día de hoy, es un grave problema a nivel mundial para los países productores de bananos (Arango-Isaza *et al.*, 2016). Esta enfermedad afecta a los cultivares de banano económicamente más importantes; por ejemplo, Enano gigante (AAA), Valery (AAA), Macho (AAB) y Dominico (AAB), provenientes de la cruza entre los progenitores *Musa acuminata* (genoma AA) y *Musa balbisiana* (genoma BB) (Manzo-Sánchez *et al.*, 2001). Esta enfermedad daña el área foliar y reduce el área fotosintética, causa estrés a las plantas, como consecuencia de dicha condición, en la planta se induce la producción y acumulación de etileno, el cual, finalmente es el responsable de la maduración precoz de los frutos (Manzo-Sánchez *et al.*, 2001).

La enfermedad de la SN puede causar pérdidas superiores al 50% de la producción de banano, y en casos extremos la totalidad de las plantaciones (Noar y Daub, 2016). Hasta el momento y según las condiciones climáticas y del área geográfica, la SN es controlada con 30-50 aplicaciones anuales de fungicidas, lo cual puede representar hasta un 40% del costo total de producción de la fruta (De Bellaire *et al.*, 2010).

### 1.1 Pseudocercospora fijiensis

Dadas las dificultades que ocasiona el hecho de llamar al mismo hongo con dos nombres diferentes, dependiendo de la fase reproductiva en la cual se encuentra, *i.e. Mycosphaerella fijiensis* (teleomorfo o fase sexual) o *Pseudocercospora fijiensis* (anamorfo o fase asexual), en los últimos años se aceptó que la nomenclatura científica de los hongos se modifique y se les asigne un solo nombre, independientemente si son hongos perfectos o imperfectos (ProMusa, 2017). Dichos acuerdos se plasmaron en la declaración de Ámsterdam y también

incluyó modificaciones a la nomenclatura de las algas (Hawksworth, 2011). En el caso de los hongos y particularmente de los fitopatógenos, tales cambios son fundamentales porque minimizarán las dificultades en la asignación de la identidad fúngica y con ello se puede aplicar programas más específicos y eficientes de control. En el caso del hongo perfecto, *Mycosphaerella fijiensis* (teleomorfo), también conocido como *P. fijiensis* en su estado anamorfo o imperfecto, se determinó que, a partir de la declaración de Ámsterdam, este fitopatógeno debe ser identificado únicamente con el nombre de *P. fijiensis* (*P. fijiensis*).

*P. fijiensis* produce estructuras de reproducción tanto de tipo sexual (ascosporas) como asexual (conidios); ambos tipos son altamente infectivos. Es un hongo heterotálico por lo que para la reproducción sexual se necesita la coexistencia de cepas compatibles. Por su estilo de alimentación *P. fijiensis* se clasifica como un hongo hemibiotrófico, es decir, se alimenta adquiriendo los nutrientes del tejido vivo de su hospedero (fase biotrófica), y conforme lo coloniza incrementa su biomasa y también su demanda de nutrientes. Cuando los nutrientes del hospedero ya no son suficientes para soportar el crecimiento biotrófico del hongo, entonces el fitopatógeno cambia a su fase necrotrófica, mata a las células del hospedero y continúa alimentándose del tejido muerto hasta completar su ciclo de vida (Churchill, 2011).

En el campo, el ciclo de infección de *P. fijiensis* inicia cuando la lluvia, el viento o el rocío arrastran a las ascosporas o a los conidios hasta la superficie foliar de las hojas de banano (Figura 1.1). Bajo condiciones idóneas de temperatura y humedad, las esporas inician la germinación, alargan el tubo germinativo sobre el área foliar y tardan de 2 a 3 días en penetrar por los estomas (Marín *et al.*, 2003; Meredith y Lawrence, 1969). Una vez dentro de los estomas, *P. fijiensis* coloniza el espacio intercelular de la cavidad subestomática sin causar signos visibles hasta por 6 semanas. Sin embargo, conforme pasa el tiempo y la etapa necrotrófica ocurre, los signos de la enfermedad comienzan a manifestarse de forma visible en las hojas del hospedero y dan paso a una serie de síntomas que acompañan al ciclo de la enfermedad. Los síntomas han sido descritos y clasificados en 6 estadios denominados pizca, estrías, rayas, manchas, manchas con halo clorótico y necrosis (Fouré, 1982) y han sido empleados como escala de referencia para evaluar el daño foliar ocasionado por *P. fijiensis*.



**Figura 0.1 Ciclo de vida de** *Pseudocercospora fijiensis*. Se esquematiza el arribo de las esporas de *P. fijiensis* a la superficie foliar de banano, el desarrollo del tubo germinativo y su penetración por las estomas, el crecimiento del micelio en la cavidad subestomática, así como el desarrollo de las estructuras reproductoras, que son visibles en las últimas etapas de la infección. Modificado de Courier (2007).

#### 1.2 Composición de la pared celular fúngica

La pared celular fúngica es una estructura altamente dinámica en composición y organización (Ruiz-Herrera *et al.*, 2008). La pared celular de los hongos, funciona como barrera que protege a la célula de los cambios osmóticos, regula la morfogénesis, la reproducción y el ciclo de crecimiento, y su composición varía cuando el hongo se encuentra bajo diferentes condiciones de cultivo. Además, la pared celular es la primera zona que entra en contacto con el hospedero durante la interacción planta-patógeno (Beauvais *et al.*, 2014; Feofilova, 2010). Dichas funciones dependen de la composición bioquímica y estructural de la pared celular fúngica, la cual consiste básicamente en diferentes tipos de proteínas y polisacáridos, como quitina, glucano, manano o galactomanano (Figura 1.2).



Figura 1.2 Esquematización de la estructura y composición de la pared celular fúngica. Azul,  $\beta$ -1,3 glucano; rojo, galactosaminogalactano, amarillo galactomanano, morado,  $\alpha$  1,3 glucano y los espirales representan proteínas. Modificado de Beauvais *et al.*, 2014.

La quitina es un polímero de N-acetil-D-glucosamina (GLcNAc) unido por enlaces  $\beta$ -1,4, que es sintetizada por la enzima quitina sintasa localizada en la membrana plasmática. Las cadenas advacentes de guitina se mantienen unidas por puentes de hidrógeno entre los grupos amido, formando cadenas de quitina en su forma  $\alpha$  (Oka *et al.*, 2015). Otro de los polisacáridos esenciales de la pared fúngica es el glucano conformado por residuos de Dglucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,3, y es sintetizado por la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa. Las cadenas de este polímero son alargadas y reorganizadas por las  $\beta$ -1,3glucanosiltransferasas (Oka et al., 2015). El  $\beta$ -1,3-glucano también forma un complejo con quitina, dando lugar a la matriz principal de la pared celular a la cual se le unirán otros polisacáridos que varían según el tipo de enlace y los rearreglos que sufre la estructura de la pared celular del patógeno (Latgé, 2010). Por otra parte, los mananos que se asocian covalentemente a las proteínas, pueden enlazarse a la asparagina formando el enlace Nglicosídico o un enlace O-glicosídico al asociarse a los residuos de serina o treonina de la proteína; estas glucosilaciones pueden incluso llegar a definir la permeabilidad de la pared celular (Gozalbo et al., 2004). Los polisacáridos que componen la pared celular fúngica pueden clasificarse en dos clases: la primera es la de los esqueletos fibriles y comprende aquellos polisacáridos que son solubles en condiciones alcalinas y se encuentran cerca de la membrana plasmática. La segunda clase, está compuesta por los polisacáridos amorfos, insolubles en soluciones alcalinas y que se encuentran hacia el exterior de la pared (Gastebois *et al.*, 2010; Latgé, 2007). Por otra parte, los polisacáridos funcionan como andamios para las proteínas de pared celular, *i.e.* transglucosilasas, quitinasas y glucósido hidrolasas, las cuales también participan en la síntesis y remodelación de la pared celular. Además, contiene proteínas cuya función puede ser enzimas hidrolíticas, receptores, proteínas de adhesión, diferenciación, patogenicidad, virulencia o que participan en la señalización durante la interacción patógeno-hospedero (Elortza *et al.*, 2003).

#### 1.3 Proteínas presentes en la pared celular fúngica

Con respecto a las proteínas, se estima que la cantidad presente en la pared celular de hongos filamentosos es de ~10-30%, tal es el caso de *Neurospora crassa* y *Aspergillus fumigatus*; mientras que en los hongos levaduriformes *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* las proteínas de la pared celular representan 30-50% de su peso seco (Bowman y Free, 2006). Sin embargo, la composición de las proteínas en la pared celular varía no solo entre especies sino también de acuerdo con las condiciones ambiéntales (pH, temperatura, estrés biótico o abiótico), y las condiciones o estadios de crecimiento (levadura, hifa, conidio) (Pontón, 2008).

Las proteínas de la pared celular se encuentran asociadas de diferente manera a la estructura de los carbohidratos, por ejemplo, las proteínas que se asocian a los oligosacáridos por medio de interacciones electrostáticas o puentes disulfuro pueden ser liberadas con detergentes, *i.e.* dodecilsulfato de sodio (SDS), o agentes reductores como el ditiotreitol (DTT). Otras proteínas están ancladas directamente al glucano o quitina por medio de enlaces  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,6 y son sensibles al tratamiento alcalino; también se han encontrado proteínas unidas por enlaces covalentes (Figura 1.3) embebidas en la pared celular de los hongos y pudiendo estar o no glucosiladas (de Groot *et al.*, 2016).



**Figura 1.3 Componentes de la pared celular fúngica.** Proteínas unidas por diferentes tipos de enlaces a los oligosacáridos de la pared celular. Modificado de de Groot (2016).

Entre las proteínas unidas covalentemente a la pared celular se encuentran aquellas que poseen repeticiones internas de glutamina, también conocidas como proteínas PIR (por sus siglas en inglés, proteins with internal repetitions). Las proteínas PIR se unen directamente a la red de β-1,3-glucano a través de residuos de glutamina (Figura 1.4), y son sensibles a tratamientos alcalinos. Estas proteínas están O-glicosiladas y estructuralmente se caracterizan por tener un péptido señal en el extremo N-terminal, poseen un sitio de corte para la proteasa Kex2p, posteriormente se encuentra la región rica en glutamina y en el extremo C-terminal poseen un dominio de 4 cisteínas (Free, 2013; de Groot et al., 2005). Las proteínas que presentan todas las características arriba descritas son llamadas proteínas PIR canónicas (Figura 1.4a) y han sido detectadas en hongos levaduriformes como S. cerevisie. С. albicans, Candida glabatra, Kluyveromyces sp. У Schizosaccharomyces sp. (Kantún-Moreno et al., 2013). En contraste, en hongos filamentosos como Blumeria graminis, Gibberella zeae, N. crassa y Magnaporthe grisea se les ha denominado proteínas PIR-like (Figura 1.4b) debido a que poseen en el extremo Nterminal una secuencia rica en cisteína, precedida de la región rica en glutamina y pueden o no tener el sitio de corte de Kex2p y el sitio omega ( $\omega$ ). Las que presentan el sitio  $\omega$ parecen estár unidas más fuertemente a la pared celular (Klis et al., 2007; de Groot et al.,
2005). Estás proteínas desempeñan funciones fundamentales en diferentes procesos biológicos, sin embargo, no son esenciales para la viabilidad fúngica (Ecker *et al.*, 2006).



Figura 1.4 Esquematización de sitios característicos de las proteínas PIR. a) PIR canónicas contiene un péptido señal (SP) seguido de las unidades ricas en glutamina y cisteína. b) Las proteínas PIR-like después del péptido señal poseen el dominio de cisteína seguido de las unidades ricas en glutamina y el sitio omega ( $\omega$ ) probablemente para un anclaje GPI. Ambos tipos de proteínas pueden o no poseer un sito de corte de la proteasa Kex2p.

Otro tipo de proteínas presentes en la pared celular fúngica son las proteínas que se asocian covalentemente por medio del anclaje glucosilfosfatidilinositol (GPI). Estas proteínas son conocidas como "proteínas GPI" y están formadas por un grupo fosfatidilinositol unido por el enlace  $\alpha$ -1,6 a una molécula de *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) y está a su vez, se une a residuos de manosa. Este anclaje se enlaza a la fosfoetanolamina que se encuentra fusionada al grupo carboxilo de la proteína (Figura 1.5; Maeda y Kinoshita, 2011).

Las proteínas GPI se caracterizan por la presencia de un péptido señal de 20 aa en el extremo N-terminal, un dominio adyacente rico en serina/treonina por lo que posiblemente sea altamente glucosilado y puede o no presentar regiones repetidas, precedida del sitio ω, el sitio de corte para el anclaje GPI en el extremo carboxilo (Klis *et al.*, 2011). Las proteínas GPI son liberadas de la pared celular empleando tratamientos enzimáticos (glucanasas, quitinasas o fosfodiesterasas) o por metódos químicos por ejemplo, usando mezclas de fluoruro de hidrógeno-piridina (HF-piridina) o ácido trifluorometano (TMSF).



**Figura 1.5 Esquematización de una proteína con anclaje GPI**. Las proteínas con anclaje GPI tienen unido en su carboxilo terminal a un complejo de glucosamina trimanosilada (verde) mediante el enlace fosfodiéster de la fosfoetanolamina, un núcleo de manosas (R en rosado). El extremo reductor de la *N*-acetil glucosamina (GlcNAc en azul) está unido al fosfatidilinositol (PI). Luego, el PI se ancla a través de otro enlace fosfodiéster a la pared celular o membrana celular a través de su región hidrofóbica. Modificado de http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/11760/GPI-Anchor.jpg).

Como la pared celular fúngica es multidinámica, su composición varía, según la especie y la fase morfológica en la que se encuentre el hongo. Los constituyentes de la pared celular pueden diferir en concentración o composición de proteínas, polisacáridos o en los tipos de enlaces. Además, muchos de estos componentes pueden desempeñar importantes funciones durante la patogénesis del hongo (Latgé, 2007; Schoffelmeer *et al.*, 1999). En el caso de *C. albicans* la pared celular posee un enlace  $\beta$ -1,6 glucano. En contraste, en *Aspergillus fumigatus* este tipo de enlace está ausente en la pared celular y en su lugar, el hongo posee enlaces  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,4 glucano. Por lo que respecta al contenido de proteínas y carbohidratos *C. glabrata* contiene 50% más proteínas y una mayor relación de manosa/glucosa en su pared celular en comparación con *S. cerevisiae*. Sin embargo, *S. cerevisiae* posee una familia de proteínas con anclaje GPI unidas a aspartil proteasas llamadas yapsinas, que participan en la remodelación de la pared celular en la levadura y que no han sido reportadas hasta el momento en *C. glabrata* (Krysan *et al.*, 2005).

### 1.4 Nitrógeno como inductor de genes que codifican proteínas de patogenicidad

fluoruro de hidrógeno-piridina (HF-piridina) o ácido trifluorometano sulfónico (TMSF; Maddi *et al.*, 2009; Pitarch *et al.*, 2008).

Algunos grupos de investigación han propuesto que cuando el fitopatógeno interacciona con su hospedero, la primera condición a la cual se enfrenta es al estrés nutricional, específicamente de nitrógeno, debido a la baja concentración disponible de éste en el apoplasto (Snoeijers *et al.*, 2000; Talbot *et al.*, 1997).

Otros reportes también han mostrado que la limitación de nitrógeno *in vitro* induce la expresión de genes de patogenicidad (Fagard *et al.*, 2014; Snoeijers *et al.*, 2000), por ejemplo, el gen *Mpg1* de *Magnaporthe grisea* (Talbot *et al.*,1993) y los genes *pCgGS* y *cgDN* de *Colletotrichum gloeosporioides* (Stephenson *et al.*, 1998). Otros trabajos se han enfocado a evaluar y estudiar genes que codifican para proteínas efectoras como el AVR4, ECP6 y ECP2 de *Cladosporium fulvum*, entre éstos, el gen *Avr4* es el efector mejor caracterizado, en los ensayos *in vitro* se une específicamente a quitina y protege a la pared celular fúngica contra el ataque de las quitinasas secretadas al apoplasto por el hospedero. El gen *Avr4* de *P. fijiensis* (*PfAvr4*) es un ortólogo funcional del *Pf-Avr4* de *C. fulvum* (Stergiopoulos *et al.*, 2010).

### 1.5 Genes que codifican proteínas de la pared celular fúngica

Los estudios funcionales enfocados a genes que codifican proteínas de la pared celular de hongos patógenos se han realizado principalmente en hongos levaduriformes y solo unos cuantos en fitopatógenos (Caracuel *et al.*, 2005; Kitagaki *et al.*, 2002). Se ha determinado que algunas de las proteínas de la pared participan en la viabilidad o en los procesos patogénicos (Kuznetsov *et al.*, 2013; Shankar *et al.*, 2007), lo que las hace candidatas promisorias para el desarrollo de fármacos para el control del patógeno. A continuación, se describen algunos ejemplos.

En *Fusarium verticillioides,* un hongo que afecta al maíz, Shankar *et al.* (2007) estudiaron el gen *Gap1*, el cual codifica para una  $\beta$ -1,3-glucosiltransferasa (GAS); ésta participa en la elongación del  $\beta$ -1,3 glucano y en el remodelamiento de la pared celular, además se predice que dicha proteína tiene anclaje GPI. La eliminación del gen *Gap1* provocó defectos en el

desarrollo del micelio y en el número de microconidios con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, la mutante fue capaz de infectar los tallos y las espigas de maíz y los síntomas fueron similares a los desarrollados por la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que la proteína desempeña un papel esencial en el crecimiento y conidiación, pero no es indispensable para la patogénesis.

En *Botritys cinerea* el gen *Bcsun1* se expresa durante el cultivo *in vitro* y durante la infección, su interrupción afecta a las estructuras reproductivas del patógeno, *i.e.*, disminuye la capacidad del patógeno para adherirse a la superficie de su hospedero, afectando la virulencia de *B. cinerea*. Este gen codifica para una glucoproteína de 471 aminoácidos con péptido señal, es rica en serina y treonina, por lo que, se predice *O*-glucosilada (González *et al.*, 2012). BcSUN 1 está unida débilmente a la pared celular, similar a lo descrito para SUN 4 en *S. cerevisiae*, y ambas proteínas participan en el mantenimiento estructural de la pared celular (Pérez-Hernández *et al.*, 2017; Kuznetsov *et al.*, 2013; Velours *et al.*, 2002).

En *Magnaporthe oryzae* la mutación del gen *MoMyb1*, que codifica para una proteína de pared celular de 322 aminoácidos, resultó en la reducción del crecimiento micelial y afectó el desarrollo de las estructuras asexuales del hongo (Dong *et al.*, 2015). Por otra parte, en *C. albicans* se ha observado que la proteína PHR1, perteneciente a la familia de las  $\beta$ -1,3-glucanosiltransferasas (GAS), participa en la regulación de la morfología de la pared celular, la adhesión celular y regula el pH intracelular. La pérdida de función del gen afecta la habilidad de *C. albicans* para adherirse a las células epiteliales de su hospedero e invadirlo, lo cual demostró con ello la importancia de esta familia de proteínas (Calderón *et al.*, 2010).

Por otro lado, los análisis de la expresión de genes se han enfocado al proceso de patogénesis, pero no siempre existe una correlación entre el nivel de expresión del gen y la proteína sintetizada, ni entre los tiempos de transcripción-traducción. Estudiar el proteoma permite identificar las proteínas presentes bajo circunstancias específicas, tal es el caso de las proteínas de la pared celular las cuales pudieran ser blancos moleculares para el diseño de nuevos fármacos o vacunas dirigidos al control de estos patógenos (Karkowska-Kuleta y Kozic, 2015).

#### 1.6 Proteómica de la pared celular fúngica

En diversos trabajos ha estudiado el proteoma a partir de conidios, micelio o del secretoma fúngico (González-Fernández *et al.*, 2014; Suh *et al.*, 2012), sin embargo, los estudios proteómicos de la pared celular se han enfocado principalmente en patógenos de humanos como *C. albicans* (de Groot *et al.*, 2004), *A. fumigatus* (Kniemeyer *et al.*, 2011), *C.* 

neoformans (Longo et al., 2015), Paracoccidioides brasiliensis (Longo et al., 2014), Paracoccidioides lutzzi (Araújo et al., 2017), entre otros. Solo unos cuantos estudios han sido realizados en fitopatógenos como B. cinerea (Fernández-Acero et al., 2007), Ustilago maydis (Ruiz-Herrera et al., 2008), Fusarium oxysporum (Prados-Rosales et al., 2009) y Sclerotinia sclerotiorum (Liu y Free, 2016). Un primer acercamiento al proteoma del micelio de Botrytis cinerea, permitió resolver ~400 manchas de proteína en geles de 2D. Veintidós proteínas fueron analizadas por MALDI-TOF (Matrix Assisted Lasser Desorption/Ionization-Time of Flight)-espectrometría de masas y entre ellas se identificaron la malato deshidrogenasa (MDH), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), ambas relacionadas con la virulencia y una ciclofilina (Fernández-Acero et al., 2007).

Por otra parte, Manikandan *et al.* (2018) realizaron ensayos de patogenicidad de 20 aislados de *F. oxysporum* f. *sp. lycopersici* y de acuerdo con el índice de severidad de la enfermedad seleccionaron dos aislados, la cepa FOL-8 considerada la más virulenta y la FOL-20, la menos virulenta, con el objetivo de identificar los factores de virulencia del micelio. En el análisis por 2D se observaron 17 proteínas expresadas diferencialmente; en el análisis por MALDI-TOF se identificaron proteínas que participan en el crecimiento, esporulación y en el desarrollo de la enfermedad, entre otras.

Liu y Free en 2016, realizaron el análisis proteómico de la pared celular a partir de las hifas de *S. sclerotiorum*, cultivándolo en medio mínimo y en caldo papa dextrosa (PDB). Se determinó que, en ambos medios de cultivo, las paredes celulares presentaron proteínas relacionadas a la biosíntesis de la pared celular y en la patogénesis, *e.g.*, celulasas, pectina liasa, glucosidasas y proteasas. Las hifas cultivadas en PDB presentaron mayor cantidad de proteínas, como lacasas, oxalato descarboxilasa, peroxidasa y proteínas únicas, las cuales pueden estar relacionadas a la mayor velocidad de crecimiento del hongo en ese medio de cultivo, que es rico en nutrientes.

### 1.7 Estudios en *P. fijiensis*

Los trabajos realizados en *P. fijiensis* se han enfocado principalmente al análisis de la expresión génica del hongo cultivado *in vitro* bajo diferentes condiciones y durante la interacción con su hospedero (Noar y Daub, 2016; Kantún-Moreno *et al.*, 2013; Portal *et al.*, 2011).

Hasta el momento, existe un solo trabajo de proteómica realizado por Escobar-Tovar et al. (2015), quienes compararon el secretoma in vitro e in planta de dos cepas de P. fijiensis, una de ellas proveniente de un cultivar susceptible y la otra de un cultivar parcialmente resistente. Muchas de las proteínas identificadas, e.g., exo-glucanasas, cutinasas, pectato liasas, serina-proteasas, carboxipeptidasas, esterasas entre otras, participan en la hidrolisis de la pared celular de la planta. Kantún-Moreno et al. (2013), identificaron in silico una familia de proteínas ancladas a la pared celular de P. fijiensis, de la familia de las glucosilfosfatidilinositol (GPI), entre las cuales hay glucósido hidrolasas, aspartil proteasas y lisofosfolipasas. En ese trabajo se seleccionaron los genes MfGas1 y MfGas2 correspondientes a dos  $\beta$ -1,3-glucanosiltransferasas y mediante PCR en tiempo real se evaluaron sus niveles de expresión en medio papa-dextrosa-agar (PDA) y en hojas de banano con SN en diferentes etapas. Se determinó que MfGas1 es un gen de expresión constitutiva, ya que su expresión no mostró variación durante el análisis; es posible que participe en el remodelamiento de la pared celular. Por el contrario, MfGas2 se expresó en la fase biotrófica y alcanzó su nivel máximo al inicio de la fase necrotrófica, aunque posteriormente su expresión disminuyó a niveles basales; tal comportamiento permite suponer que este gen está participando en la patógenesis de P. fijiensis. Las proteínas GPIs de P. fijiensis parecen ser más abundantes que las proteínas PIR, dado que en un análisis de electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) se visualizaron mayor número de péptidos liberados con un tratamiento ácido, empleando HF-piridina (34.8 kDa, 33.7 kDa, 19.2 kDa, 17.3 kDa y 8.8 kDa) mientras que en la extracción con NaOH, solo se pudieron visualizar 4 péptidos (Chi-Chuc, 2011). No obstante, no se determinó la identidad de los polipéptidos aislados.

## JUSTIFICACIÓN

La pared celular de los hongos es una atractiva área de estudio dada su función como estructura de protección de los patógenos ante condiciones abióticas y bióticas desfavorables. Además, su composición proteica y de carbohidratos, al ser la primera zona que entra en contacto con el hospedero, cambian rápidamente en respuesta a cualquier tipo de estrés. Diversas proteínas de la pared celular fúngica también participan en la patogénesis o funcionan como adhesinas, aunque el número de estudios enfocados en dichos análisis aún son limitados.

En *P. fijiensis* solo se ha realizado un trabajo *in silico* en el que se identificaron algunas proteínas candidatas de la pared celular. Por tal razón, el presente trabajo es el primer acercamiento experimental al análisis de la composición proteínica de la pared celular de este hongo y se compararon dos cepas que difieren en virulencia. La proteómica de la pared celular de celular de *P. fijiensis* resulta en información básica sobre este tenaz patógeno.

Por otro lado, la manipulación de la concentración de nitrógeno para simular las condiciones limitantes en nutrientes que el patógeno enfrenta durante su interacción con la planta permitirá identificar potenciales factores de patogenicidad con base en los datos reportados en otras especies. Es probable que en el futuro el estudio de las proteínas que componen la pared celular de *P. fijiensis* permita identificar candidatos para implementar estrategias para el control de la enfermedad.

## PREGUNTA

¿Es posible identificar proteínas relacionadas a la patogenicidad si se compara el proteoma de la pared celular de dos cepas de *P. fijiensis* con virulencia contrastante?

## HIPÓTESIS

Si las proteínas presentes en la pared celular participan en la patogénesis y en su remodelación, entonces la cepa más virulenta de *P. fijiensis* tiene más factores de patogenicidad en comparación con la menos virulenta.

## **OBJETIVO GENERAL**

Análizar el proteóma de la pared celular de dos cepas de *P. fijiensis* que difieren en su nivel de virulencia.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Evaluar el grado de virulencia de cepas de *P. fijiensis* y seleccionar la más y menos virulenta.
- 2. Establecer un protocolo de extracción para la proteína total de la pared celular de *Pseudocercospora fijiensis.*
- 3. Analizar las proteínas por Nano-HPLC/MS/MS.
- 4. Realizar los análisis bioinformáticos para la identificación de proteínas únicas de cada cepa y de las comunes entre las cepas de *P. fijiensis* con virulencia contrastante.

## **ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**



## CAPÍTULO II EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA VIRULENCIA DE *P. FIJIENSIS*

## 2 INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de interacción planta-patógeno se desarrolla una compleja interacción bioquímico-molecular entre ambos organismos y la elucidación del proceso es de gran interés científico. El hospedero utiliza receptores extracelulares, e.g. RLK o RLP (por sus siglas en inglés receptor-like-kinases/receptor-like proteins) o intracelulares, por ejemplo, las proteínas poseen dominios de unión a nucleótido o repeticiones ricas en leucina (NB y LRR, por sus siglas en inglés: nucleotide-binding domain/leucine-rich repeat) para detectar al patógeno y evitar la infección. Por el contrario, el hongo secreta una multitud de componentes, *i.e.*, metabolitos secundarios y proteínas efectoras para evitar su reconocimiento y manipular y suprimir la respuesta inmune de su hospedero con la finalidad de establecerse exitosamente (Toruño et al., 2016). Los enfoques que se han utilizado para estudiar la interacción son diversos, e.g., bioquímicos, moleculares, histológicos. Por ejemplo, para evaluar la virulencia de las cepas se han implementado ensayos de infección en invernaderos, cámaras con condiciones controladas o ensayos in vitro. Los análisis in vitro permiten minimizar los efectos de las variables ambientales, e.g., temperatura, humedad, contaminación, luz, etc. que fluctúan naturalmente bajo condiciones de campo. Controlar las condiciones aumenta la reproducibilidad experimental y posibilita realizar análisis más detallados en plantas o en fragmentos foliares acerca de la patogénesis. Laveau et al. (2009) emplearon la inoculación in vitro de fragmentos foliares, para evaluar el grado de virulencia de diferentes hongos que afectan al cultivo de la vid, y con base en el tamaño de las lesiones pudieron clasificarlos y seleccionar a los más virulentos.

Otro ejemplo es el de Kumar *et al.* (2011) quienes infectaron *in vitro* fragmentos foliares de cultivares de cebada con el objetivo de identificar genotipos resistentes a *Fusarium graminearum*. El ensayo les permitió identificar uno de los cultivares en el que el periodo de latencia de *F. graminearum* fue más largo, las lesiones formadas fueron de menor tamaño y hubo menor producción de macroconidios. La presunta mayor tolerancia a la fusariosis de este cultivar se confirmó con el tamaño de las lesiones causadas por el patógeno en los cultivares en campo.

El ensayo de infección de fragmentos foliares también ha sido usado para evaluar la virulencia de cepas de *P. fijiensis* con base en el seguimiento visual de las lesiones causadas sobre los fragmentos de hoja de banano (Rodríguez-García *et al.*, 2016; Donzelli y Churchill, 2009; Abadie *et al.*, 2008; Peraza-Echeverría *et al.*, 2008).

En 2007 Donzelli y Churchill describieron un método para evaluar de manera cuantitativa la virulencia de *P. fijiensis*. Dicho ensayo se realizó inoculando fragmentos de micelio sobre un área foliar delimitada en las hojas de plantas de banano e incubándolas en una cámara con condiciones controladas; lo que permitió reducir el tiempo de visualización de los signos de la SN y aumentar el número de ensayos, pues se llevaban a cabo en una misma hoja de banano. Además, emplearon el software de análisis de imagen "Assess" 1.0 (American Phytopathological Society, St. Paul, MN) para estimar el tamaño de las lesiones y realizar el análisis estadístico. Por su parte, Rodríguez-García *et al.* (2016), validaron el uso de la infección *in vitro* de fragmentos foliares, mediante la cuantificicación de la expresión del gen *MfAvr4*.

Con base en que la inoculación *in vitro* de *P. fijiensis* en fragmentos foliares de *Musa* sp. induce el desarrollo de los síntomas de la SN, en este trabajo se empleó dicho ensayo para evaluar *in vitro* la virulencia sobre fragmentos foliares de *Musa* cv Enano gigante, de cinco cepas de *P. fijiensis*. Estas cepas son parte de una colección establecida en el año 2011 a partir de plantaciones de banano de los estados de Chiapas y Tabasco (Ramírez-Hernández, 2001); estados que son el primero y segundo productor de banano a nivel nacional (SIAP, 2015). Las cepas de *P. fijiensis* que contrastaron más en la virulencia se denominaron como "la más" y "la menos virulenta". Esas dos cepas fueron empleadas para realizar el aislamiento de la pared celular y la identificación de las proteínas presentes en las paredes celulares de ambas cepas.

## 2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.1 Reactivación y propagación de las cepas de P. fijiensis

Las cepas de *P. fijiensis* almacenadas en glicerol se reactivaron en medio sólido de papa dextrosa agar (PDA, Difco<sup>™</sup>), cultivándolas por tres semanas a 28° C y fotoperiodo de 12 h.

Posteriormente, de cada colonia reactivada se cortó 1 cm<sup>2</sup> y se maceró en un mortero con pistilo, en 1 mL de medio PDB. En cada caso el micelio macerado se inoculó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo de papa dextrosa (PDB, Difco<sup>™</sup>). Los cultivos líquidos se mantuvieron en agitación durante 12 días a 100 rpm y temperatura ambiente. A partir de los micelios obtenidos en los matraces de cultivo, se resembró nuevamente en medio PDB y se mantuvo en agitación por 12 días, bajo las condiciones de luz y agitación arriba descritas. Estos materiales fueron utilizados como los inóculos para los experimentos posteriores.

# 2.1.2 Ensayo de virulencia de las cepas de *P. fijiensis* sobre fragmentos foliares de banano

El micelio de cada cepa fue recuperado por centrifugación a 4,000 x *g*, se descartó el sobrenadante y al micelio se le adicionaron 25 mL de agua estéril. El micelio se desagregó con un politrón ultra-Turrax T25 (Janke and kunkel IKA<sup>®</sup>-labortechnik). Los fragmentos de micelio resultantes de cada una de las cepas fueron ajustados a una concentración de 1 x 10<sup>5</sup> fragmentos mL<sup>-1</sup> con gelatina al 1% y se inocularon sobre fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv Enano gigante, de acuerdo con Leiva-Mora (2010).

Los fragmentos foliares fueron generados a partir de la segunda y tercera hoja de plantas de *Musa acuminata* cv Enano gigante de tres meses de edad, considerando como la hoja número uno a la hoja cigarro. Brevemente, de cada planta de banano cv. Enano gigante se cortaron dos hojas, las cuales fueron sanitizadas y escindidas en 25 cm<sup>2</sup> para la preparación de los fragmentos foliares de acuerdo con Peraza-Echeverría *et al.* (2008). Los fragmentos foliares fueron depositados sobre los medios de soporte, preparados con agar-benzimidazol (A+B). La suspensión micelial (150  $\mu$ L) de cada una de las cepas fue inoculada individualmente en fragmentos foliares por triplicado y a cada tratamiento se le denominó "agar con benzimidazol más hongo" (A+B+H). Los testigos fueron fragmentos foliares de soporte (A+B), para determinar la viabilidad foliar aportada por el benzimidazol, o sobre medios de agar-agar (A+A), para determinar la senescencia del fragmento durante el ensayo *in vitro* (Yoshida, 1970). Ambos testigos de (A+A) o (A+B) fueron inoculados con 1% de gelatina, sin el hongo. Los fragmentos foliares se mantuvieron en un fotoperiodo de 12 h luz blanca y 12 h oscuridad, a 28° C. Los síntomas de SN causados por cada cepa fúngica en los fragmentos foliares fueron evaluados visualmente

a los 0, 10, 20 y 30 días posteriores a la inoculación (dpi). La virulencia de las cepas fue evaluada con base en la velocidad de aparición de los síntomas correspondientes a la SN de acuerdo con la escala reportada por Fouré (1982). Las cepas que causaron menor y mayor daño foliar fueron consideradas como las cepas menos y más virulenta, respectivamente. Los ensayos fueron realizados por triplicado y en dos experimentos independientes.

# 2.1.3 Detección del peróxido de hidrógeno en los fragmentos foliares inoculados con *P. fijiensis*

Las lesiones causadas por las cepas más y menos virulentas fueron escindidas de los fragmentos foliares 30 dpi y las muestras fueron utilizadas para determinar, mediante microscopía, la presencia de micelio y de peróxido de hidrogeno en el sitio de la lesión. Brevemente, el blanqueamiento de las muestras foliares se realizó en etanol en ebullición durante 10 minutos, repetido tres veces. Enseguida, los fragmentos se tiñeron con azul de algodón (Merck, Millipore) y se analizaron en el microscopio (Nikon Eclipse E200) a 20x y en campo claro, para detectar la presencia del micelio de *P. fijiensis*. La detección del peróxido de hidrógeno se realizó incubando las muestras con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) por 8 h en la oscuridad (Cavalcante *et al.*, 2011). Posteriormente, las muestras se colocaron en etanol-cloroformo (4:1 v/v) por 15 días a 4° C y después se depositaron en los portaobjetos con glicerol al 50%. La presencia del peróxido de hidrogeno en el área foliar se detectó en el microscopio como manchas marrones en el área de la lesión.

## 2.2 RESULTADOS

### 2.2.1 Reactivación de las cepas de P. fijiensis

Las cepas de *P. fijiensis* usadas en el análisis inicial de la virulencia se enlistan en la Tabla 1. La reactivación de las cepas en el medio de cultivo sólido mostró variación en la morfología, color rosa-negro de diferente tonalidad. Cuando las cepas se cultivaron en medio líquido, todas produjeron suficiente biomasa para la realización de los bioensayos de infección de los fragmentos foliares.

Сера	Manejo de fungicidas	Referencia		
Cr4a	Semi intensivo			
Cr6a	Semi intensivo	Ramírez-Hernández		
Ch63g	Intensivo	(2011)		
Oz2b	Rural			
*C1233	Rural	Dr. Jean Carlier		

Tabla 1.- Lista de cepas de *P. fijiensis* utilizadas en los ensayos iniciales de virulencia.

\*Aislada del INIFAP-campus Uxmal, Yucatán.

#### 2.2.2 Infección *in vitro* de fragmentos foliares

Los análisis iniciales de la virulencia de las cinco cepas de *P. fijiensis* en los fragmentos foliares de banano mostraron que, a los 30 dpi, las cepas desarrollaron micelio sobre el área foliar (Figura 2.1). Las cepas Ch63, C1233 y Cr4b presentaron menor crecimiento micelial en comparación con las cepas Oz2b y Cr6a, estas últimas desarrollaron abundante micelio, con textura algodonosa, color blanco y causaron signos de SN en los fragmentos foliares (Figura 2.1). En la replica biológica independiente la cepa Oz2b volvió a causar la lesión con mayor área (apéndices 1 y 2).



**Figura 2.1** Biomasa de cada una de las cepas de *P. fijiensis* en los fragmentos foliares de *M. acuminata* cv Enano gigante durante los días posteriores a la inoculación. **T**: Tiempo de muestreo a los 10, 20 y 30 dpi, **+** : Agar con benzimidazol sin hongo (A+B-H), **-** : Agar-agar, sin benzimidazol ni hongo (A+A-B).

El micelio se removió de la superficie foliar con el objetivo de observar el área de las lesiones causadas por cada cepa en los tiempos de muestreo 0, 10, 20 y 30 dpi (Figura 2.2). El daño causado por la cepa Oz2b en los fragmentos foliares correspondió a las etapas 3, 4 y 5 de la escala de Fouré; los signos de la SN se localizaron principalmente en los sitios donde el micelio proliferó. La formación de estrías se observó a los 10 dpi, las rayas y manchas se visualizaron a los 20 dpi y se intensificaron a los 30 dpi, cuando se observó un halo clorótico rodeando a las lesiones de tipo mancha. Los fragmentos foliares inoculados con la cepa Cr6a mostraron signos correspondientes a pizcas a los 10 dpi e indicios de estrías a los 20 dpi, mientras que a los 30 dpi adquirieron una coloración roja y algunas rayas. En lo que respecta a los fragmentos foliares inoculados con la cepa Ch63g, estos no mostraron signos de SN hasta los 20 y 30 dpi cuando se desarrollaron pizcas y estrías.

Los signos observados a los 10 y 20 dpi en los fragmentos foliares inoculados con las cepas C1233 y Cr4b fueron similares y correspondieron a pizcas. No obstante, la cepa C1233 causó lesiones tipo estría a los 30 dpi. El efecto de la cepa Cr4b a los 30 dpi no pudo ser evaluado debido a que los fragmentos foliares empezaron a senecer presentando una coloración amarilla y café (Figura 2.2). En lo que respecta a los fragmentos foliares mantenidos en los soportes de agar-agar; éstos presentaron senescencia de coloración amarillo-café desde los 10 dpi. En contraste, los fragmentos foliares mantenidos en soportes de agar-benzimidazol mantuvieron su viabilidad y coloración verde durante los 30 dpi (Figura 2.2), tales características permitieron descartar que los daños detectados en los fragmentos infectados correspondieran a la senescencia del tejido.

Dado que, en experimentos independientes, la cepa Oz2b causó lesiones correspondientes a pizca desde los 10 dpi y a que estas lesiones evolucionaron a lesiones tipo estría a los 20 dpi y a manchas de color negro a los 30 dpi, esta cepa se consideró la más virulenta entre las cepas evaluadas. Por el contrario, las cepas C1233 y Cr4b fueron las que causaron lesiones correspondientes a estrías al final del experimento, pero se seleccionó la cepa C1233 como la menos virulenta debido a que mostró resultados más consistentes sobre los fragmentos foliares *in vitro*. En resumen, las cepas Oz2b y C1233 fueron las seleccionadas para continuar con la investigación de este trabajo.

CAPÍTULO II



**Figura 2.2** Fragmentos foliares de banano cv Enano gigante mostrando el área de las lesiones causadas días después de la inoculación *in vitro* con los fragmentos de micelio de las diferentes cepas de *P. fijiensis*. **T** : Tiempo de muestro en días posteriores a la inoculación de los fragmentos de micelio, **+** : Agar con benzimidazol sin hongo (A+B-H), **-** : Agar-agar, sin benzimidazol ni hongo (A+A-B).

# 2.2.3 Microscopía de los fragmentos foliares inoculados con dos cepas de *P. fijiensis* de virulencia contrastante

Por medio del análisis microscópico se determinó que la cepa C1233 (menos virulenta), colonizó menor espacio intercelular (Figura 2.3 A). En contraste, la cepa más virulenta (Oz2b), creció en el tejido intercelular formando redes entre las hifas e invadiendo las células oclusivas de los estomas, colonizando por lo tanto mayor área foliar (Figura 2.3 B). El testigo negativo no mostró crecimiento de micelio en el espacio intercelular ni cerca de los estomas (Figura 2.3 C). Estos resultados apoyan la sugerencia de que los síntomas observados en los fragmentos inoculados fueron causados por *P. fijiensis*.

En la evaluación a los 30 dpi del contenido de peróxido de hidrógeno se observó que las áreas en donde se inocularon los fragmentos de micelio contenían depósitos de color rojocafé (Figuras 2.3 D-E), indicador positivo de la presencia de dicho compuesto. Por el contrario, en el área del tejido no infectado (testigo negativo) no se observaron los depósitos de peróxido de hidrógeno (Figura 2.3 F). Dicho resultado muestra que el hospedero tiene una respuesta de defensa mediada por ROS ante la inoculación de las cepas Oz2b y C1233.



**Figura 2.3 Observación microscópica del micelio de las cepas C1233 y Oz2b en el tejido escindido de los fragmentos foliares de 30 dpi.** Colonización del tejido foliar por las cepas C1233 (A) u Oz2b (B) en las áreas adyacentes a los estomas; testigo negativo sin infectar (C). Detección de peróxido de hidrógeno mediante diaminobencidina en los sitios de colonización de las cepas C1233 (D), Oz2b (E) o el tejido foliar no infectado (F). Las flechas blancas indican *m*: micelio, st: estoma, pm: penetración del micelio.

## 2.3 DISCUSIÓN

Los síntomas de SN que se han obtenido en los fragmentos foliares inoculados in vitro son similares a los efectos observados cuando la interacción se presenta en condiciones de campo (Abadie et al., 2008). Por ello, la inoculación in vitro de fragmentos foliares de banano ha sido una estrategia que ha facilitado el estudio de la interacción planta-patógeno, incluida la evaluación de resistencia a la SN de genotipos de banano (Leiva-Mora, et al., 2010) y la expresión génica (Rodríguez-García et al., 2016). Por ejemplo, la expresión génica del efector PfAvr4 se analizó tanto en fragmentos foliares inoculados in vitro con conidios de *P. fijiensis* así como en muestras de plantas de campo infectadas naturalmente; se encontró que el gen PfAvr4 se expresó en niveles similares en ambas condiciones (Rodríguez-García et al., 2016). Por otra parte, Leiva-Mora et al. (2010) inocularon in vitro plantas de banano con una suspensión micelial (10<sup>5</sup> ufc. mL<sup>-1</sup>) y obtuvieron respuestas homogéneas, hecho que les permitió diferenciar la resistencia de los genotipos ante la SN. Una probelmática que enfrentaron fue que se requirió de más espacio que el utilizado en los ensavos con fragmentos foliares (Leiva-Mora et al., 2010). En el presente estudio, la inoculación in vitro de los fragmentos foliares de Musa acuminata cv Enano gigante se realizó también utilizando una suspensión de fragmentos de micelio de las cepas de P. fijiensis, para evaluar la virulencia de las cepas mediante la velocidad de aparición de los síntomas de la SN reportados por Fouré (1982). Las lesiones causadas por la cepa Oz2b correspondieron progresivamente con los de las etapas 3 (raya), 4 (mancha) y 5 (mancha con halo clorótico). Estos resultados son similares a los reportados por Donzelli y Churchill (2007) quienes a partir de 43 dpi observaron lesiones tipo estría de color café-rojizo y manchas con halo clorótico en plantas de banano infectadas con micelio de las cepas 743, 301 y BB de P. fijiensis.

En el presente trabajo las cepas Oz2b y C1233 resultaron la más virulenta y la menos virulenta entre las cinco cepas analizadas, de acuerdo con la velocidad de aparición de los síntomas de SN. Los primeros síntomas de infección con la cepa Oz2b aparecieron a los 10 dpi mientras que con la cepa C1233 las primeras lesiones aparecieron hasta los 20 dpi. Las observaciones visuales fueron congruentes con lo detectado en los análisis de microscopía del tejido foliar, ya que en los fragmentos foliares infectados con la cepa C1233 no se observaron redes entre las hifas como sí se visualizó en Oz2b y también colonizó menos área que la cepa Oz2b. Esta última colonizó rodeando a los estomas e invadiendo

el tejido. Islas-Flores et al. (2015) y Peraza-Echeverría et al. (2008), también detectaron al micelio de P. fijiensis con redes en el espacio intercelular de tejido foliar infectado. Con respecto a la presencia de peróxido de hidrógeno, los sitios de acumulación de  $H_2O_2$  se observaron de color rojo-marrón, por ejemplo, alrededor de los estomas a los 30 dpi. No fue posible detectar diferencias en la inducción en la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre las cepas Oz2b o C1233, lo cual posiblemente se deba a que el análisis no se realizó en momentos más tempranos. La observación de sitios de acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los fragmentos de hoja de Enano gigante difieren de los resultados reportados por Cavalcante et al. (2011), quienes evaluaron la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tres genotipos de banano con diferente grado de resistencia a P. fijiensis y encontraron que en cultivar resistente el peróxido de hidrógeno se acumuló a los 10 dpi, pero no se observaron acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ni en el genotipo parcialmente resistente ni en el susceptible. Es posible que las diferencias entre ambos resultados se deban a que Cavalcante et al. (2011) evaluaron a los 10 dpi, un periodo temprano en la interacción, mientras que en el presente trabajo las cepas Oz2b y C1233 si indujeron la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el cultivar susceptible, pero esto ocurrió hasta los 30 dpi; no se observó en los fragmentos no inoculados (testigo). Se sabe que en los cultivares susceptibles el sistema vegetal de defensa inmune se activa mucho más lentamente que en las especies resistentes (Cavalcante et al., 2011) lo que apoya los resultados observados en la presente investigación.

## CAPÍTULO III ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO Y EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA PARED CELULAR DE *P. FIJIENSIS*

### **3 INTRODUCCIÓN**

La pared celular fúngica, además de actuar como una barrera de defensa ante el estrés biótico o abiótico, también representa un componente clave en la búsqueda de blancos moleculares para el control de los patógenos (Tada et al., 2013). Es una estructura altamente dinámica en la que la composición y distribución de sus componentes cambia constantemente. Tal dinámica permite que los hongos se adapten rápidamente a las condiciones ambientales, crezcan y establezcan interacciones exitosas (Arroyo et al., 2016). La pared celular fúngica está compuesta por melanina, lípidos, polisacáridos y proteínas (Karkowska-Kuleta y Kozik, 2015). En el caso de los fitopatógenos, los polisacáridos son considerados factores de virulencia, debido a que son reconocidos por los receptores del hospedero, lo que activa el sistema de defensa de la planta para contrarrestar al patógeno (Latgé y Beauvais, 2014; Malavazi et al., 2014). Las proteínas de la pared celular también son importantes debido a que participan en la biosíntesis y organización de la pared, pueden funcionar como receptores y desempeñar funciones clave en la patogénesis. No obstante, las proteínas de la pared son difíciles de obtener y analizar debido a su naturaleza hidrofóbica, baja solubilidad, poca abundancia, heterogeneidad y por la presencia o ausencia de glucosilaciones (Ruiz-Herrera et al., 2008; Klis et al., 2007; de Groot et al., 2005).

En la literatura, las estrategias empleadas para la obtención de las proteínas de la pared celular como primer paso realizan el aislamiento de la pared celular, seguida de procesos de fraccionamientos con detergentes, sales, tratamientos ácidos, alcalinos, cambios de temperatura, condiciones reductoras, etc. Cabe mencionar que el aislamiento de la pared celular es un proceso complejo y no necesariamente extrapolable a todos los fitopatógenos. Para el aislamiento de la pared celular se han empleado perlas de vidrio, combinaciones de desagregación con perlas de vidrio y politrón o el macerado con nitrógeno líquido (Maddi *et al.*, 2009; Schoffelmeer *et al.*, 1999; Ruiz-Herrera *et al.*, 1996). Una vez aislada la pared celular, el siguiente desafío es la liberación de las proteínas asociadas; dicho proceso dependerá de los tipos de enlace que las proteínas tengan con los componentes de la pared celular asocia-

das con enlaces no covalentes o por enlaces disulfuro se extraen con detergentes como el dodecilsulfato de sodio (SDS) o con agentes reductores como el ditiotreitol (DTT) y el 2- $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME). Por otra parte, las proteínas unidas mediante enlaces covalentes a la red de glucanos y quitina se extraen con tratamientos alcalinos como hidróxido de sodio, o enzimáticos, *e.g.*, glucanasas y quitinasas (Pitarch *et al.*, 2008; Klis,1994). Las proteínas unidas a través del anclaje glucosilfosfatidilinositol (GPI) se han extraído mediante tratamientos con fluoruro de hidrógeno piridina (HF-piridina) o ácido trifluorometansulfónico (TMSF) (Maddi *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2008; de Groot *et al.*, 2004). En ocasiones, la digestión directa de la pared celular con tripsina también ha permitido identificar proteínas en la pared celular fúngica, sin embargo, pocos trabajos han usado está última estrategia (Gil-Bona *et al.*, 2015; Olaya-Abril *et al.*, 2014). En resumen, la obtención de la pared celular, así como la astringencia del fraccionamiento, dependen del tipo de proteínas que se desea obtener de acuerdo con las preguntas de investigación abordadas.

Castillo *et al.* (2008) definieron que las verdaderas proteínas de pared celular son aquellas que por medio de análisis bioinformáticos se predice que poseen un péptido señal, sitios potenciales de *O* y *N* glucosilación y frecuentemente, pero no siempre, un anclaje GPI o una serie de repeticiones internas (PIR). No obstante, en un estudio realizado por De groot *et al.* (2004) encontraron en las proteínas unidas covalentemente a la pared celular del hongo *C. albicans* y liberadas previamente con NaOH y HF-piridina que no todas las proteínas cumplen con las características descritas como "típicas" de ese grupo. En dicho estudio y utilizando LC/MS/MS se identificaron 12 proteínas con anclaje GPI, dos proteínas sensibles al tratamiento alcalino, cinco enzimas activadas por carbohidratos (Cht2p, Crh11p, Pga4p, Phr1p, y Scw1p), dos proteínas de adhesión (Als1p y Als4p) y algunas proteínas con función desconocida. Sin embargo, el hecho de que se liberen solo con el tratamiento alcalino o ácido apoya que están estrechamente asociadas a la pared celular, en donde probablemente están participando activamente en la remodelación y expansión y en las interacciones patógeno-hospedero.

Hasta el momento, el conocer como los patógenos infectan a su hospedero sigue siendo un reto intelectual dado que poco es lo que se sabe acerca de los mecanismos y estrategías que utiliza el patógeno para lograr la infección en su hospedero. El estudio de la interacción planta-patógeno mediante enfoques "ómicos" ha permitido un acercamiento poderoso, *e.g.*, la secuenciación de genomas y la transcriptómica, que contribuyen a la predicción y desenmascaramiento de presuntos genes relacionados con la patogenicidad (Chang *et al.*, 2016). Por otra parte, la proteómica permite la identificación de las proteínas que están presentes en los organismos, ya sea en condición de homeostasis o sometidos a una determinada circunstancia y en un tiempo definido. Además permite un análisis de alta sensibilidad para diferentes compartimentos celulares y con ello se pueden conocer y definir los subproteomas. Así mismo, el proteoma de la pared celular fúngica representa un elemento clave para la comprensión de los eventos que acompañan a la interación planta-patógeno, debido a que en esta estructura podrían encontrarse los elementos proteicos que facilitan la colonización (Sosinska *et al.*, 2011).

Es de resaltar que en el caso de *P. fijiensis,* hasta el momento, solo se ha reportado un análisis proteómico del secretoma *in vitro* e *in planta* (Escobar-Tovar *et al.*, 2015) pero nada se conoce acerca del proteoma de su pared celular, por lo que en este trabajo se reporta por primera vez a las proteínas presentes en la pared celular de *P. fijiensis.* 

## 3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1.1 Colecta del micelio de P. fijiensis

Para producir suficiente biomasa de *P. fijiensis*, de las dos cepas en estudio fueron cultivadas en medio PDB durante 12 días en agitación constante. El micelio de cada cepa fue recuperado por centrifugación a 1,500 x *g*, se lavó dos veces con agua estéril bidestilada ( $_{dd}H_2O$ ), y se transfirió a matraces conteniendo 50 mL de medio mínimo (base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio), suplementado con dextrosa (10 g L<sup>-1</sup>). Cada cepa se incubó en el medio mínimo de cultivo por 1, 3 y 5 días, el micelio se filtró y cosechó en cada uno de estos tiempos, enseguida, la biomasa colectada se enjuagó dos veces con  $_{dd}H_2O$  y se almacenó a -80 °C. Todos los muestreos se realizaron por triplicado.

### 3.1.2 Aislamiento de la pared celular

El aislamiento y liberación de las proteínas de la pared celular de *P. fijiensis* se realizó siguiendo las metodologías descritas para *Neurospora crassa* (Maddi *et al.*, 2009) *Fusarium oxysporum* (Schoffelmeer *et al.*, 1999) y *Ustilago maydis* (Ruiz-Herrera *et al.*, 1996). La ruptura de la pared celular de *P. fijiensis* se realizó con nitrógeno líquido, perlas de vidrio y

sonicación. Las proteínas de la pared celular fueron liberadas con tratamientos ácidos y básicos (Chi-Chuc, 2011) y también mediante la digestión directa con tripsina; las proteínas fueron enviadas a la Universidad de Ottawa para su identificación por nano-HPLC-MS-MS.

Se realizaron múltiples intentos para el establecimiento de la metodología de aislamiento de la pared celular, para ello únicamente se utilizó la cepa C1233 de *P. fijiensis*, cultivada en el medio PDB. Solo se describe el protocolo final, el cual se basa en el método reportado por Maddi *et al.* (2009), con modificaciones. Brevemente, para cada tiempo de muestreo el micelio fue macerado en mortero con pistilo y en presencia de nitrógeno líquido. Enseguida, al macerado se le adicionaron 1.5 mL del amortiguador de extracción PPS (PBS 1x, PMSF 1 mM y SDS 1%) por cada gramo de micelio y se homogenizó. El PBS se preparó de acuerdo con el manual de Sambrook *et al.* (1989). La muestra fue transferida a tubos Eppendorf, se centrifugó a 4,000 x *g* por 5 min a 4 °C y el sobrenadante fue colectado y se le denominó proteína citosólica; la pastilla (pared celular) se lavó una vez más con el amortiguador de extracción y cinco veces más con PP (PBS 1x y PMSF 1 mM).

A los tubos individuales, conteniendo la pastilla de pared celular, se les adicionaron 500  $\mu$ L de PS (PBS 1x y SDS 1%), se calentaron a 95° C por 5 min, se incubaron en hielo 5 min y se centrifugaron a 10,000 x *g;* las proteínas recuperadas en este paso fueron denominadas proteínas iónicas. La pastilla fue lavada extensivamente con PP (6 veces) y 6 veces más con <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O. Finalmente, la pared celular (pastilla) de cada tiempo de muestreo y de cada cepa se congeló y liofilizó. La pared celular liofilizada de ambas cepas se tiñó con blanco de calcoflúor (Sigma) siguiendo las instrucciones del proveedor y se visualizó en los microscopios de campo claro y de fluorescencia. La extracción de las proteínas unidas covalentemente a la pared celular se realizó a partir de tres g de pared celular de cada una de las muestras.

### 3.1.3 Liberación de las proteínas de la pared celular de P. fijiensis

En cada caso la pared celular liofilizada fue tratada con 30 mM de NaOH a 4 °C por 4 h con agitación intermitente cada 30 min, para liberar las proteínas sensibles al tratamiento alcalino. La reacción fue detenida empleando un volumen igual de ácido acético glacial e incubando por dos horas en hielo y con agitación cada 30 min. Las proteínas se recuperaron centrifugando a 16,000 x *g* por 5 min a 4 °C y se almacenaron a -20 °C. Para liberar a las

proteínas con anclaje GPI, a las pastillas de la pared se les adicionó 1 mL de HF-piridina, se incubó por 2 h en hielo, con agitación cada 30 min; la reacción fue detenida con un volumen igual de <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O durante 90 min, en hielo. Las proteínas GPI liberadas de la pastilla (pared celular) fueron recuperadas centrifugando las muestras a 16,000 x *g* por 5 min a 4 °C. A las proteínas liberadas con el tratamiento alcalino y el tratamiento ácido se les denominó proteínas covalentes.

Las muestras de proteínas de cada cepa recuperadas en cada tiempo de muestreo (1, 3 y 5 días) provenientes de los tratamientos básico y ácido, fueron dializadas en membranas Slide-A-Lyzer con <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O por 24 h (Thermo Scientific). Después de la diálisis, las proteínas se recuperaron y precipitaron.

#### 3.1.4 Precipitación de las proteínas

Las muestras con las proteínas denominadas iónicas, así como las denominadas covalentes se precipitaron de manera independiente con 0.015% de desoxicolato de sodio (DOC) y se incubaron a 4 °C toda la noche. A las muestras se les adicionó ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 10% y se incubaron toda la noche a 4 °C. Los tubos se centrifugaron a 16,000 x *g*, 5 min, y la pastilla fue lavada dos veces con un mL de acetona fría al 100%. El sobrenadante se descartó, la pastilla se deshidrató a temperatura ambiente por 20 min, se resuspendió en amortiguador PBS 1x y se almacenó a -20 °C hasta la realización de los análisis proteómicos. Las proteínas covalentes se cuantificaron por el método de Bradford modificado (Ernst y Zor, 2010) y se analizaron en un gel de 12% SDS-PAGE. Las proteínas de cada tiempo de muestreo liberadas con los tratamientos ácido y básico correspondientes a la cepa C1233 se mezclaron en un solo tubo al que se le denominó proteínas covalentes de la pared celular de C1233. La cepa Oz2b también se sometió al mismo proceso y las proteínas se denominaron proteínas covalentes de la pared celular de C1233.

#### 3.1.5 Preparación de las muestras para proteómica

De manera independiente, 10  $\mu$ g de las proteínas iónicas o covalentes se reprecipitaron con una mezcla de metanol-cloroformo siguiendo el método descrito por Friedman (2007). Brevemente, las muestras se completaron a 400  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O grado proteómico; enseguida se les adicionaron cuatro volúmenes de metanol y un volumen de cloroformo, se agitó 1 min y se centrifugó a 14,000 x *g* por 5 min. A la pastilla se le adicionaron 400  $\mu$ L de metanol, se centrifugó a 17,000 x *g* por 5 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se deshidrató en una campana de extracción. Posteriormente, las pastillas de proteínas fueron resuspendidas en 8 M de urea (Sigma) y luego fueron reducidas con 10 mM de ditiotreitol (DTT) durante 1 h a temperatura ambiente. Enseguida, las proteínas fueron alquiladas con 5.5 mM de iodoacetamida por una h en la oscuridad y a temperatura ambiente. A las proteínas alquiladas se les adicionaron 4 volúmenes de agua y fueron digeridas durante toda la noche a 37 °C con tripsina (1 µg por cada 100 µg de proteína, Sigma). La digestión se detuvo con 0.1% de ácido fórmico (Sigma) y la muestra se centrifugó a 20,000 x *g* por 10 min.

Los péptidos digeridos (4 µg) se depositaron en tubos de 0.2 mL, se deshidrataron al vacío y resuspendieron en 10 µL de 0.1% de ácido trifluoracético (TFA); los péptidos fueron desalados con puntas Ziptip (Millipore) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, las puntas Ziptip se equilibraron con acetonitrilo al 100% y enseguida con 0.1% de TFA. Los péptidos se recuperaron de la resuspensión de 0.1% TFA aspirando 10 veces con la punta Ziptip recién humedecida. Inmediatamente la punta Ziptip se enjuagó 10 veces con la solución de TFA al 0.1%. Por ultimó los péptidos se eluyeron con 10 µL de la solución TFA 0.1% en acetonitrilo al 50%. Este proceso se repitió dos veces. Los péptidos obtenidos a partir de las proteínas iónicas y covalentes fueron deshidratados en un Savant (Thermo Fisher) por 10 min y enviados a la Universidad de Ottawa, Canadá, para su identificación por nano-HPLC-MS/MS. Se empleó el sistema nano-HPLC Dionex ultimate 3000 junto con el espectrómetro de masas Orbitrap Fusion para el análisis de péptidos, se usó una columna de separación Acclaim PepMap RSLC de 75 µm X 150 mm de longitud. La muestra fue separada en un gradiente (A – 0.1 % ácido fórmico en H<sub>2</sub>O, B – 80 % acetonitrilo, 0.1 % ácido fórmico en H<sub>2</sub>0) con un flujo de 200 nl min<sup>-1</sup>, el voltage de pulverización fue en modo positive y la temperatura del tubo de transferencia del ion fue 275°C.

#### 3.1.6 Análisis bioinformáticos

Los espectros de masa/carga generados para la identificación de los péptidos por nano-HPLC-MS-MS fueron procesados manualmente obteniendo los identificadores (IDs) proteínicos a partir de la base de datos del Uniprot; se agruparon las identidades con sus respectivas muestras. Por medio del sistema Linux se eliminaron los IDs redundantes y se seleccionaron los IDs comunes y los diferenciales de cada cepa y una vez más, se les ordenó con sus características iniciales, *i.e.*, la masa molecular, número de péptidos, accesión, etc. Una vez seleccionados, los IDs se analizaron en el programa Venny 2.1.0 (http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/) para generar una representación gráfica de los IDs comunes y únicos entre ambas cepas. Los IDs analizados en este trabajo fueron aquellos correspondientes a las proteínas que presentes en todas las réplicas biológicas y en el duplicado de los análisis MS-MS.

Los IDs de las proteínas enlistadas se utilizaron para encontrarlas en la base de datos de P. fijiensis (DOE Joint Genome Institute) y descargar sus secuencias completas de aminoácidos y para los análisis de asignación de ontología génica (GO). Los GOs resultantes fueron categorizados con el programa WEGO (por sus siglas en inglés, Web Gene Ontology Annotation Plot) disponible en un servidor web de acceso público (http://wego.genomics.org.cn/). Las secuencias descargadas fueron analizadas en los (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/), servidores TargetP 1.1 SignalP 4.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) y Phobius (http://phobius.sbc.su.se/) para detectar la presencia del péptido señal; también se analizaron con los programas Big PI (Pierleoni et al., 2008), GPI-SOOM (http://gpi.unibe.ch/) PredGPI У (http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/) para identificar el sitio de anclaje GPI y los programas NetNGlyc 1.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) y NetOGlyc 4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/) para identificar sitios de N- u O-glicosilación, respectivamente.

### **3.2 RESULTADOS**

#### 3.2.1 Aislamiento de pared celular de P. fijiensis

Para el aislamiento de la pared celular de *P. fijiensis* se seleccionaron los tres métodos descritos para los hongos fitopatógenos *Neurospora crassa, Fusarium oxysporum y Ustilago maydis* (Maddi *et al.*, 2009; Schoffelmeer *et al.*, 1999; Ruiz-Herrera *et al.*, 1996). El tratamiento basado en la desagregación del micelio mediante perlas de vidrio y sonicador Ruiz-Herrera *et al.* (1996) produjo fragmentos largos y gruesos de pared celular que se aglomeraron como una red (Figura 3.1 A). Resultados similares se obtuvieron con el segundo tratamiento descrito por Schoffelmeer *et al.* (1999) basado en el uso de perlas de vidrio, aunque en este caso los fragmentos de pared fueron más delgados y cortos (Figura 3.1 B). El tercer tratamiento ensayado se basa en la maceración del micelio con mortero y pistilo en presencia de nitrógeno líquido (Maddi *et al.*, 2009); este fue el método que mejor desagregó la pared celular de *P. fijiensis* (Figura 3.1 C). Bajo esta condición los fragmentos de la pared y por consiguiente mejor difusión del amortiguador para la liberación de proteínas.



**Figura 3.1 Aislamiento de la pared celular de** *P. fijiensis*, cepa C1233. Vista a través de microscopía de campo claro. A) tratamiento 1 con perlas de vidrio y sonicador, B) tratamiento 2 con perlas de vidrio, C) tratamiento 3 con mortero y nitrógeno líquido. Los aumentos corresponden a 20x.

Después de los primeros análisis se determinó que en *P. fijiensis* los métodos propuestos por Schoffelmeer *et al.* (1999) y Ruiz-Herrera *et al.* (1996), para la extracción de proteínas de la pared celular, no liberaron proteína suficiente para la identificación y tampoco desagregaron de manera adecuada a la pared celular. En contraste, el método de Maddi *et* 

*al.* (2009), modificado, permitió desagregar la pared celular y obtener proteína para identificar por MS (Tabla 2).

Tabla	2.	Concentración	de	proteína	obtenida	de	la	pared	celular	con	diferentes	métodos	de
extrace	ciór	۱.		-				-					

Concentración de proteína liberada de la pared celular de <i>P. fijiensis</i> (µg totales)								
Metodología Citosólicas Iónicas Básicas Ácidas								
Schoffelmeer <i>et al.</i> (1999)	200	110	5	12				
Ruiz-Herrera <i>et al.</i> (1996)	14.3	37	2	17.5				
Maddi <i>et al.</i> (2009) modificado	1,490	183.5	27.4	33.2				

La digestión directa con tripsina en la pared celular de la cepa C1233 permitió identificar por MS un total de 760 proteínas, de las que solo 196 tenían IDs asignados. Mientras que de las 845 proteínas iónicas obtenidas con el método de Maddi, 217 tenían IDs asignados y 636 no tenían identidad asignada. Basados en el grado de desagregación de la pared y el número de proteínas obtenidas por el método de Maddi *et al.* (2009), éste fue elegido para aislar la pared celular de *P. fijiensis* y las proteínas respectivas de las cepas C1233 y Oz2b.

## 3.2.2 Aislamiento de la pared celular de dos cepas *de P. fijiensis* con diferente virulencia

La pared celular aislada de la cepa C1233 (menos virulenta), presentó una estructura en forma de red de fragmentos entrecruzados y mucho más relajada cuando se analizó por microscopía de campo claro (Figura 3.2 A), con respecto a la cepa Oz2b (más virulenta) cuya pared celular fue compacta (Figura 3.2 B). No obstante, ambas paredes presentaron fluorescencia al teñirse con blanco de calcoflúor (Figura 3.2, C y D), colorante que se une al polímero de quitina contenido en la pared celular fúngica.



Figura 3.2 Aislamiento de la pared celular de *P. fijiensis* cepas C1233 y Oz2b y análisis por microscopía. Pared celular vista en campo claro A) C1233 y B) Oz2b y vista en con fluorescencia y teñida con blanco de calcofluor C) C1233 y D) Oz2b.

## 3.2.3 Perfil peptídico de las proteínas unidas covalentemente a la pared celular de las cepas C1233 y Oz2b

Las proteínas covalentes liberadas de la pared celular en las cepas C1233 y Oz2b, fueron visualizadas en geles desnaturalizantes de 12% de poliacrilamida. Presentaron un perfil de polipéptidos con masas moleculares entre 150 y 6 kDa, principalmente a los 3 y 5 días de cultivo (Figura 3.3). En contraste, la cepa menos virulenta presentó un perfil peptídico variable a los cinco días. Las proteínas que se liberaron con los tratamientos alcalino y ácido revelaron una proteína abundante de ~17 kDa. Es de hacer notar que la concentración de proteína para cada día de muestreo no fue suficiente para analizar en el gel concentraciones iguales de proteína. Es por ello por lo que para cada cepa las muestras de cada tiempo de muestreo fueron mezcladas para formar una solución con 20 µg de proteína total. Con dichas soluciones de proteína se realizó el análisis de identificación por espectrometría de masas.



Figura 3.3 Perfil de polipéptidos de las paredes celulares de *P. fijiensis* cepas C1233 y Oz2b separado en geles desnaturalizantes de 12% SDS-PAGE. Panel A) proteínas de pared celular liberadas con 10 mM de NaOH. Carril 1: Marcador de masa molecular; proteínas extraídas de la cepa Oz2b carriles: 2: 1 día, 3: 3 días y 4: 5 días; 5: amortiguador Laemmli 1x; proteínas extraídas de la cepa C1233 carriles: 6: 1 día, 7: 3 días y 8: 5 días. Panel B) proteínas de pared celular liberadas con el tratamiento de ácido fluorhídrico-piridina. Carril 1: marcador de masa molecular; Proteínas extraídas de la cepa C1233 carriles: 2: 1 día, 3: 3 días y 4: 5 días; 5: amortiguador Laemmli 1x; proteínas extraídas de pared celular liberadas con el tratamiento de ácido fluorhídrico-piridina. Carril 1: marcador de masa molecular; Proteínas extraídas de la cepa C1233 carriles: 2: 1 día, 3: 3 días y 4: 5 días; 5: amortiguador Laemmli 1x; proteínas extraídas de la cepa C1233 carriles: 2: 1 día, 3: 3 días y 4: 5 días; 5: amortiguador Laemmli 1x; proteínas extraídas de la cepa C1233 carriles: 2: 1 día, 3: 3 días y 4: 5 días; 5: amortiguador Laemmli 1x; proteínas extraídas de la cepa C1233 carriles: 2: 1 día, 3: 3 días y 4: 5 días; 5: amortiguador Laemmli 1x; proteínas extraídas de la cepa OZ2b carriles: 6: 1 día, 7: 3 días y 8: 5 días.

## 3.2.4 Identificación de las proteínas liberadas de la pared celular por espectrometría de masas

El análisis por medio de espectrometría de masas de las muestras de las proteínas iónicas y covalentes, provenientes de las paredes celulares de las cepas C1233 y Oz2b, cultivadas tanto en medio PDB como en medio mínimo, produjo una lista total de 6,010 proteínas identificadas. El primer escrutinio de esa lista se basó en la fiabilidad de los péptidos encontrados en el análisis por MS (espectros de masa/carga con señales mayores a la línea de base de detección y un 1% de tasa máxima de falsos positivos (FDR)). Este análisis resultó en una nueva lista de 1,710 y 1,360 proteínas para las cepas C1233 y Oz2b, respectivamente (Tabla 3).

Сера	Totales	Confiables	Sin identidad	Con identidad asignada	
*C1233 covalente	2,802	1,710	1,373	337	
*Oz2b covalente	2,767	1,360	1,073	287	
*C1233 iónicas	2846	168	125	43	
*Oz2b iónicas	2965	2,429	1,914	514	

**Tabla 3.** Número de proteínas identificadas a partir de los péptidos detectados porNanoHPLC/MS/MS.

\*Proteínas liberadas de la pared celular de las cepas C1233 y Oz2b cultivadas en el medio mínimo.

Dado el alto número de proteínas obtenidas y a que una gran cantidad de ellas no tienen una identidad asignada, los análisis se realizaron sólo con las proteínas covalentes de cada cepa que ya tienen un nombre y función asignada. En lo que respecta a las proteínas ionicas, éstas no fueron consideradas en el análisis bioinformático porque en la literatura se han considerado como proteínas intracelulares que se asocian a la pared celular debido a su carga eléctrica. Del número total de proteínas (624 IDs) analizadas en el sistema Linux, se obtuvieron 110 IDs diferenciales y 257 comunes entre ambas cepas, haciendo un total de 367 proteínas para analizar. El análisis de las 367 proteínas mediante el programa Venny 2.1.0 produjo un gráfico que diferenció los 257 IDs comunes y 80 exclusivos para C1233 y 30 exclusivos para Oz2b, respectivamente (Figura 3.4).



Figura 3.4 Diagrama de Venny que ilustra la distribución de las proteínas unidas por enlaces covalente a la pared celular de *P. fijiensis*. En azul las proteínas exclusivas de la cepa C1233 y en amarillo las exclusivas de la cepa Oz2b; en el intercepto se muestra el número de proteínas comunes entre ambas cepas.

### 3.2.5 Análisis in silico de las proteínas encontradas en la pared celular de P. fijiensis

Tanto para las proteínas comunes como para las diferenciales de las cepas C1233 y Oz2b se descargaron las secuencias completas del JGI, así como la ontología génica y se analizó con el WEGO. En dicho análisis los respectivos genes que codifican a dichas proteínas se clasificaron como componentes celulares (parte celular, región extracelular, organelos), función molecular (moléculas estructurales, regulador de transcripción, de unión) y en procesos biológicos (respuesta a estímulos, biogénesis, procesos metabólicos), tal como se muestra en la Figura 3.5.



Figura 3.5 Representación gráfica de la ontología de genes correspondientes a las proteínas covalentes comunes de la pared celular de las cepas C1233 (más virulenta) y Oz2b (menos virulenta). El panel A muestra la distribución génica y su participación celular. Los paneles B y C, ilustran categorías de las proteínas únicas significativamente enriquecidas.

En el análisis bioinformático 64 de las 367 secuencias de proteínas predicen poseer péptido de secreción, 27 predicen tener anclaje GPI (GPI), 291 tuvieron sitios de *N*-glicosilación (*N*Glyc) y 229 secuencias tuvieron sitios de *O*-glicosilación (OGlyc) (Tabla 4). Dado que las proteínas definidas como proteínas verdaderas de pared celular deben poseer péptido señal (SP), modificaciones de glucosilación y posiblemente un anclaje GPI, los análisis

bioinformáticos realizados con tres programas para el SP, permitieron detectar 17 proteínas con todas las características predichas para las proteínas verdaderas de pared (apéndice 3).

Proteínas	SP	GPI	NGlyc	OGlyc	
Comunes	43	19	201	132	
C1233	18	7	63	69	
OZ2b	3	1	27	28	

Tabla 4.- Características predichas mediante análisis bioinformático en las 367 secuencias de lasproteínas con identidad en las cepas C1233 y Oz2b.

## 3.3 DISCUSIÓN

Existen diferentes protocolos para el aislamiento de la pared celular fúngica los cuales se han usado principalmente para patógenos de humanos (Suh, 2012; Klis et al., 2007; Chaffin et al., 1998 y Cassanova et al., 1992) y solo unos cuantos se han descrito para hongos fitopatógenos (Schoffelmeer et al., 1999; Ruiz-Herrera et al., 1996). Aunque es factible pensar que los protocolos para el aislamiento de la pared celular fúngica y la extracción de proteínas podrían extrapolarse entre los diferentes géneros, esto no siempre es factible debido a la composición variable de la pared celular en cada fitopatógeno, e.g., algunos hongos poseen una capa de melaninas en su pared celular. Esto dificulta el aislamiento y la extracción de proteínas (Eisenman y Casadevall, 2012). P. fijiensis posee melanina y su pared celular parece ser mucho más resistente que la de otros fitopatógenos en los que se ha visto que la pared celular se desagrega con perlas de vidrio (Scholferme et al., 1999). En el presente trabajo tal procedimiento no fue eficiente, posiblemente porque P. fijiensis posee en su pared celular otros componentes o proteínas que facilitan su rápida agregación, por lo cual se empleó el macerado con nitrógeno líquido particularmente la cepa Oz2b, que fue la que menos se desagregó, de acuerdo con lo observado por microscopía de campo claro (Figura 3.2 A y C) y en la tinción con el blanco de calcofluor (Figura 3.2 B y D).

La determinación de la concentración de proteína obtenida de la pared celular de *P. fijiensis* fue de 0.15  $\mu$ g  $\mu$ L<sup>-1</sup> de la cepa C1233 y 0.14  $\mu$ g  $\mu$ L<sup>-1</sup> de la cepa Oz2b. Fernández-Acero *et al.* (2006) obtuvieron 2 mg de proteína total a partir de un g de peso seco de micelio de
*Botrytis cinerea.* Ese resultado permite sugerir que el pobre rendimiento de proteína se debe a que la pared celular es compleja y la extracción de las proteínas requiere de múltiples lavados, lo cual va eliminando contaminantes, pero disminuye el rendmiento para la obtención de proteína. Otra posibilidad es que la baja cantidad de proteína recuperada a partir de la pared celular se deba a la baja solubilidad de éstas tal como ha sido sugerido por múltiples autores (Ruiz-Herrera *et al.*, 2008; Klis *et al.*, 2006; de Groot *et al.*, 2005). En el caso de las proteínas liberadas mediante digestión con tripsina a partir de la pared celular de *P. fijiensis*el el método fue directo y rápido; sin embargo, en los resultados se identificaron una gran cantidad de proteínas de localización citosólica. Resultados similares se obtuvieron cuando la pared celular de *Candida albicans* (Gil-Bona *et al.*, 2015, Vialás *et al.*, 2012; Hernáez *et al.*, 2010) y *Saccharomyces cerevisiae* (Braconi *et al.*, 2011; Insenser *et al.*, 2010), fue digerida con tripsina y los péptidos resultantes fueron analizados por espectrometría de masas (Olaya-Abril *et al.*, 2014). Por esta razón se decidió no continuar con esta metodología.

El análisis SDS-PAGE de las proteínas aisladas a partir de las paredes celulares de las cepas C1233 u Oz2b mostró perfiles polipeptídicos diferentes. Tanto el tratamiento alcalino (Figura 3.3 A) como el ácido liberaron proteínas en cada uno de los tiempos muestreados (Figura 3.3 B); se observó que un polipéptido de 17 kDa estuvo presente en ambos tratamientos y que fue más abundante en las proteínas liberadas con el tratamiento ácido. Está proteína se ha identificado previamente en la pared celular de P. fijiensis aplicando un método diferente de extracción al usado en este trabajo (Chi-Chuc, 2011) y corresponde a MYCFIDRAFT\_70687, incluso, a esta proteínas Chi-Chuc la denominó HF1, por ser liberada únicamente con HF-piridina. Esta proteína pudiera ser una proteína de la pared celular de P. fijiensis, pero secretada por una vía alterna, dado que su análisis bioinformático no mostró predicción de péptido de secreción. Esta proteína posee el mismo número de accesión en las bases de proteínas del Uniprot, pero su anotación en el Uniprot menciona como localización el núcleo. Resultados similares se obtuvieron cuando se analizaron péptidos de otras proteínas sin identidad y cuya predicción las localiza como intracelulares o desconocida. Como se mencionó previamente, cada vez es más común encontrar proteínas atípicas en la pared celular, sugiriendo entonces que la pared celular de P. fijiensis es más compleja de lo que inicialmente se pensó.

Por otra parte, en los resultados de los análisis por espectrometría de masas se encontraron proteínas con y sin identidad. Las proteínas sin identidad no tienen asignado un nombre, es decir, no corresponden a proteínas que hayan sido analizadas funcionalmente, otra posibilidad es que la condición a la que fue sometida la cepa en este trabajo no expresa las mismas proteínas que la cepa de *P. fijiensis* que fue secuenciada y cuyo genoma se depositó en el JGI.

El diagrama de Venny agrupó a las proteínas con identidad asignada en tres secciones, las exclusivas de las cepas C1233 u Oz2b y las comunes (Figura 3.4); no obstante, el mayor número de proteínas identificadas que participan en la patogénesis se ubicaron en las proteínas comunes. Esto no es una sorpresa dado que ambas cepas son patogénicas y hasta el momento, en *P. fijiensis* no se ha aislado una cepa avirulenta. Por otra parte, la cepa Oz2b, además de ser la más virulenta también presentó un menor número de proteínas, sugiriendo entonces que su virulencia puede estar relacionada con la mayor expresión de proteínas particulares y no con el número de proteínas presentes.

De las 367 secuencias de proteínas analizadas, 64 predijeron tener péptido de secreción y solo unas cuantas cumplieron con todas las características para ser consideradas como "proteínas verdaderas de pared", término cada vez menos empleado en la literatura actual. Por el contrario, el término de proteínas atípicas es cada vez más frecuente de encontrar dado que este tipo de proteínas se aíslan con mayor frecuencia de la pared celular y por ello se sugiere que no deben ser consideradas como proteínas contaminantes (Nimrichter *et al.*, 2016; Longo *et al.*, 2014; Nickel, 2010; Nickel y Rabouille, 2009). Los resultados de este trabajo abonan a la discusión acerca de que muchas proteínas citosólicas se detectan e identifican en la pared celular fúngica y se pueden llegar a dicha estructura a través de vías no canónicas, ya que su análisis con las herramientas bioinformáticas no identifica un péptido señal en su estructura.

Consideraciones similares se han planteado en otras especies de fitopatógenos, *e.g.*, *C. albicans* (Castillo *et al.*, 2008), *Paracoccidioides brasiliensis* (Marcos *et al.*, 2012 y Brito-Wde *et al.*, 2011) y *P. lutzii* (Puccia *et al.*, 2011), en los que también se han identificado en la pared celular proteínas atípicas, pero aún no se cuenta con información sobre sus posibles funciones en la pared celular fúngica (Castillo *et al.*, 2008; Ebanks, *et al.*, 2006 y Nombela *et al.*, 2006).

El análisis por espectrometría de masas identificó péptidos que empalmaron con proteínas que participan en rutas metabólicas. En las proteínas comunes se encontró a la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS1), enzima clave en el primer paso de la ruta de biosíntesis para la trehalosa y que ha sido considerada como un factor de virulencia en ascomicetos como *M. oryzae* (Fernández y Wilson, 2011), *B. cinerea* (Doehlemann *et al.*, 2006) y *F. graminearum* (Song *et al.*, 2014). Estos fitopatógenos al tener el gen *tps1* mutado, resultaron en cepas con mayor sensibilidad a diferentes tipos de estrés, *e.g.*, osmótico, oxidativo o de calor; además, mostraron defectos en su desarrollo o tuvieron alteraciones en la síntesis de micotoxinas. En basidiomicetos existe un solo reporte sobre *Ustilago maydis*, en el que la interrupción del gen *tps1* generó una mutante sensible a estrés abiótico (Cervantes *et al.*, 2016). La TPS1 participa en más de un proceso celular y se ha encontrado en la pared celular de *C. parapsilosis* y de *C. albicans* (Sánchez-Frensada *et al.*, 2014 y Pedreño *et al.*, 2007).

También se encontró una GPI putativa con número de accesión N1Q9B7, de 221 aminoácidos y una masa molecular de 21.9 kDa: cuatro 1,3-β-glucanosiltransferasas con números de accesión M3ALT7, M3BBQ1, M2YRI1 y N1Q6A5, las cuales en el análisis in silico realizado por Kantún et al. (2013) fueron nombradas como MfGAS1, MfGAS3, MfGAS4 y MfGAS5, respectivamente, entonces el resultado experimental mostrado, confirmó la presencia de estas proteínas GAS en la pared celular de P. fijiensis. Otra de las proteínas identificadas en la pared celular de ambas cepas fue el efector PfAVR4 (accesión M3AZE0); este polipéptido pertenece a la familia 14 de proteínas con módulo de unión a carbohidratos, posee un total de 121 aminoácidos, masa molecular de 13.022 kDa y pl de 4.83 y se predice como proteína secretada. Se sugiere que PfAVR4 tiene la misma función que su homólogo Cf-AVR4 de Cladosporium fulvum. Stergiopoulos et al. (2010), demostraron que el efector CfAVR4 se une específicamente a quitina, pero no a otros polisacáridos y que a través de dicha unión esta proteína efectora protege a la pared celular del hongo contra la acción de quitinasas del hospedero. Los datos de este trabajo apoyan que PfAVR4 está unida a la pared celular. Además, se encontró también a la proteína efectora PfECP6 (accesión M3A6K9); dicha proteína posee 413 aa, una masa molecular de 40.1 kDa, posee 3 dominios LYS-M y mostró un 57% de identidad con la proteína CfECP6, previamente reportada como un efector que secuestra los oligosacáridos de quitina y

evitaque sean reconocidos por el sistema inmune del hospedero vegetal (Stergiopoulos *et al.*, 2010; Bolton *et al.*, 2008).

Cabe mencionar que en un estudio *in silico* realizado por Chang *et al.* (2016) compararon los genomas de *P. eumusae, P. musae* y *P. fijiensis* y se predijo que los efectores AVR4 y ECP6 estaban presente en las tres especies. Sin embargo, este es el primer trabajo proteómico donde experimentalmente se demuestra la presencia de PfAVR4 y PfAECP6 y en particular, se establece su liberación a partir de la pared celular de *P. fijiensis* cultivado bajo condiciones limitantes de nitrógeno. Su presencia se observó en las dos cepas, que, aunque son diferentes en virulencia, ambas son patogénicas. El primer trabajo en el que se reportó la expresión de un efector proteico bajo condiciones limitantes de nitrógeno fue el de Van den Acerveken *et al.* (1994), quienes en *C. fulvum* detectaron la expresión del gen *Avr9*, pero no la de otros genes que codifican otras proteínas efectoras. Tales resultados sugieren que bajas concentraciones de nitrógeno no inducen a otros efectores de *C. fulvum*. En contraste, en este trabajo si se encontraron estos dos efectores proteicos.

Entre las proteínas atípicas identificadas como asociadas a la pared celular de *P. fijiensis* se encontraron la malato deshidrogenasa, formato deshidrogenasa y la acetil-CoA, las cuales en *Colletotrichum acutatum* se ha reportado que participan en el metabolismo de lípidos y en la formación del apresorio (Brown *et al.,* 2008; Lorenz y Fink, 2001).

Otras proteínas atípicas identificadas fueron las subunidades 40 y 60S ribosomales, un factor de elongación, la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, la isocitrato liasa, la sucinato deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa. Estas proteínas también han sido reportadas por otros autores como proteínas atípicas de pared celular fúngicas y han sido obtenidas de forma reproducible al aplicar tratamientos tan diversos como aquellos que incluyen DTT y  $\beta$ -ME como agentes reductores; SDS en concentraciones mayores al 1%, HF-piridina e incluso en la proteína liberada mediante la digestión directa con tripsina (Gil-Bona *et al.*, 2015, Olaya-Abril *et al.*, 2014, Insenser *et al.*, 2010, Castillo *et al.*, 2008). Este conjunto de resultados apoya el hecho de que las proteínas atípicas son parte de la pared celular de *P. fijiensis* y posiblemente desempeñen un papel importante, pero ésto está aún por elucidarse en el futuro.

Otro grupo de proteínas atípicas que se detectaron en P. fijiensis son aquellas que presentan un módulo de unión a carbohidratos (CBM, por sus siglas en inglés Carbohydrate binding module), e.g., IDs 203826, 214273, 215233, 51402, 87294 y 88469; así como también proteínas relacionadas con el mantenimiento de la integridad de la pared celular y que también son componentes de respuesta al estrés (WSC por sus siglas en inglés, cell wall integrity and stress response components) (IDs 198572 y 51402). También se identificaron proteínas con dominio de función desconocida (DUF por sus siglas en inglés, Domain of unknown function) (IDs 153004, 55202 y 85811). El dominio DUF se ha observado en proteínas de otros patógenos por lo que es posible que estas proteínas estén involucradas en la patogenicidad de P. fijiensis, pero aún debe ser confirmado. Los actuales reportes fortalecen cada vez más el hecho de que las proteínas atípicas sean realmente proteínas de la pared celular, pero faltan análisis experimentales que permitan entender como son traslocadas hasta la pared celular del hongo ya que con base en la ausencia de péptido de secreción parece que no están incluidas en la ruta clásica de secreción mediada por el retículo endoplásmico y el paso por el aparato de Golgi. En resumen, este es el primer trabajo experimental en el que se reportan proteínas presentes en la pared celular de P. fijiensis y con ello se contribuye al mapeo general de la composición proteica de la pared celular de este hongo. Se analizaron dos cepas de diferente grado de virulencia y aunque se encontraron proteínas exclusivas de una cepa o de la otra, las proteínas conocidas que se relacionan con la patogenicidad estuvieron en el grupo de las proteínas comunes, congruente con el hecho de que ambas cepas son patogénicas. No obstante, el trabajo sí aporta novedad ya que es la primera vez que se demuestra la presencia de efectores en la pared celular fúngica, mientras que en la mayoría de los trabajos se han descrito como proteínas secretadas, presentes en el secretoma, cabe la redundancia (Escobar-Tovar et al., 2015; Suh et al., 2012). Aunque PfAvr4 y PfEcp6 son proteínas secretadas, se encontraron asociadas a la pared celular de P. fijiensis. No sorprende de PfAvr4, pero si de PfEcp6 que se esperaría que fuese una proteína que se mantiene en el secretoma. Los hallazgos descritos generan nuevas preguntas y abren la posibilidad para la identificación de proteínas nuevas en P. fijiensis.

# **CAPÍTULO IV**

Este capítulo ha sido aceptado para su publicación en la revista World Journal of Microbiology and Biotechnology

**Title:** The cell wall proteome from two strains of *Pseudocercospora fijiensis* with differences in virulence

**Authors:** Yamily Y. Burgos-Canul <sup>1</sup>, Blondy Canto-Canché <sup>2</sup>, Maxim V. Berezovski <sup>3</sup>, Gleb Mironov <sup>3</sup>, Víctor M. Loyola-Vargas <sup>1</sup>, Ana Paulina Barba de la Rosa <sup>4</sup>, Miguel Tzec-Simá <sup>1</sup>, Ligia Brito-Argáez <sup>1</sup>, Mildred Carrillo-Pech <sup>1</sup>, Rosa Grijalva-Arango <sup>5</sup>, Gilberto Muñoz-Pérez <sup>1</sup> and Ignacio Islas-Flores <sup>1\*</sup>

# Authors addresses:

<sup>1</sup> Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 X 32 y 34, Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205 Mérida, Yucatán, México; yazmin@cicy.mx (Y.B.C.); vmloyola@cicy.mx (V.M. L.V.); lbrito@cicy.mx (L.B.A.); mild@cicy.mx (M.C.P.), gilberto.munoz@cicy.mx (G.M.P.); tzecmyr@cicy.mx (M.T.S.)

<sup>2</sup> Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 X 32 y 34, Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205 Mérida, Yucatán, México; cantocanche@cicy.mx (B.C.C.)

<sup>3</sup> Department of Chemistry and Biomolecular Sciences, University of Ottawa, 10 Marie-Curie, Ottawa K1N 6N5, Canada; maxim.berezovski@uOttawa.ca (M.V.B.); ggmironov@gmail.com (G.M.)

<sup>4</sup> IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, S.L.P., México; apbarba@ipicyt.edu.mx (A.P.B.R.)

<sup>5</sup> Unidad de Recursos Naturales, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200, Mérida, Yucatán, México; rgarango@cicy.mx (R.G.A.)

### \*Corresponding Author: Ignacio Islas-Flores

**Address:** Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 X 32 y 34, Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205 Mérida, Yucatán, México.

Phone: +52-999-942-8330, Ext: 225

Fax: +52 (999)-942-83-00

E-mail: islasign@cicy.mx

#### **Authors ORCID-Number**

Yamily Y. Burgos-Canul 0000-0003-0063-5885

Maxim V. Berezovski 0000-0003-0514-599x

Blondy Canto-Canché 0000-0003-0446-9503

Gleb Mironov 0000-0001-9310-4949

Víctor M. Loyola-Vargas 0000-0001-5386-4265

Ana Paulina Barba de la Rosa 0000-0003-4999-036x

Miguel Tzec-Simá 0000-0003-1034-2509

Ligia Brito-Argáez 0000-0002-4742-6813

Mildred Carrillo-Pech 0000-0003-4754-4008

Rosa Grijalva-Arango 0000-0002-2524-922x

Gilberto Muñoz-Pérez 0000-0003-1166-5959

Ignacio Islas-Flores 0000-0002-5353-073x

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Dr. Marco A. Villanueva, for his critical reading, as well as to the three anonymous reviewers, whose comments have helped to improve the quality of the data analysis in the manuscript. We would also wish to acknowledge E. Góngora-Castillo and A. Enríquez-Valencia for their advice regarding bioinformatics analysis. Y. Burgos-Canul was supported by scholarship No. 255427 for Ph. D. studies from CONACYT México. This work was funded by grants 220957 from CONACYT and 247355 from FOMIX.

#### Abstract

Pseudocercospora fijiensis causes black Sigatoka disease, the most important threat to banana. The cell wall is crucial for fungal biological processes, including pathogenesis. Here, we performed cell wall proteomics analyses of two P. fijiensis strains, the highly virulent Oz2b, and the less virulent C1233 strains. Strains were starved from nitrogen to mimic the host environment. Interestingly, in vitro cultures of the C1233 strain grew faster than Oz2b in PDB medium, suggesting that C1233 survives outside the host better than the highly virulent Oz2b strain. Both strains were submitted to nitrogen starvation and the cell wall proteins were isolated and subjected to nano-HPLC-MS/MS. A total of 2686 proteins were obtained from which only 240 had a known function and thus, bioinformatics analyses were performed on this group. We found that 90 cell wall proteins were shared by both strains, 21 were unique for Oz2b and 39 for C1233. Shared proteins comprised 24 pathogenicity factors, including Avr4 and Ecp6, two effectors from P. fijiensis, while the unique proteins comprised 16 virulence factors in C1233 and 11 in Oz2b. The P. fijiensis cell wall proteome comprised canonical proteins, but thirty percent were atypical, a feature which in other phytopathogens has been interpreted as contamination. However, a comparison with the identities of atypical proteins in other reports suggests that the P. fijiensis proteins we detected were not contaminants. This is the first proteomics analysis of the P. fijiensis cell wall and our results expands the understanding of the fundamental biology of fungal phytopathogens and will help to decipher the molecular mechanisms of pathogenesis and virulence in *P. fijiensis*.

**Keywords:** Cell wall proteome; fungal cell wall isolation; pathogenicity factors; *Pseudocercospora fijiensis* 

#### Introduction

Banana is among the ten most important edible crops in worldwide agriculture, with a production of ~144 million metric tons of fruit per year in the tropical and subtropical regions of 135 countries (Crous et al. 2016). The principal threat to global banana production is the foliar black Sigatoka (BS) disease, which is found in nearly all the banana-growing regions worldwide. The BS is caused by the fungus *Pseudocercospora fijiensis* (previously called *Mycosphaerella fijiensis*). The most common strategy to control the BS is the use of fungicides, with up to 35 sprays annually; this extensive use of fungicides induces resistance in the pathogen against them and increases the risks for human, animal and environment health (Aguilar-Barragan et al. 2014). Therefore, a better understanding of *P. fijiensis* pathogenesis is mandatory to elucidate new control strategies.

The enormous advance of the technologies and informatics used to generate and process large biological data sets is remarkably improving our understanding of biological systems. Most of the knowledge on plant-pathogen interactions has been gained by transcriptomics (Chang et al. 2016). In the case of *P. fijiensis*, the first transcriptomics analysis was carried out on a suppression subtractive hybridization library constructed from the interaction between the susceptible *Musa acuminate* cv 'Grand Nain' and the pathogen (Portal et al. 2011). Recently, Noar and Daub (2016) identified 802 differentially expressed genes from *M. fijiensis* using RNA seq, where 483 were highly expressed in infected plants in comparison with those when the pathogen was grown on potato dextrose broth (PDB) culture medium. The transcripts encoded oxidoreductases, peptidases, transporters, enzymes in the CAZy family, hypothetical proteins with unknown functions, and homologs of Avr4, Ecp2, and Ecp6, these latter effectors of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* (Chang et al. 2016; Noar and Daub 2016). Despite the advantage provided by those new technologies, a correlation between gene expression and protein synthesis is not always straightforward.

To date, only one BS proteomics study has been reported (Escobar-Tovar et al. 2015). The authors compared the secreted proteome of *P. fijiensis in vitro* with its secreted proteome in compatible (successful infection leading to disease; host susceptible) and incompatible (the pathogen cannot colonize the host and cause disease; host resistant) pathogen-plant inte-

interactions. They identified glycosidases, glycosyl transferases, transaldolases, salicylate hydroxylase, cutinase, enzymes involved in reactive oxygen species (ROS) detoxification, and one virulence candidate, thus supporting the key role of the secretome in pathogenesis. Despite the progress made in recent times, much work remains to be done to understand the *P. fijiensis* pathogenesis thus proteomics can be considered as a powerful tool to achieve a better understanding of the biology and pathogeneicity of this fungus.

The cell wall is essential for fungal growth, as it is the first barrier to resist the host defense mechanism and it is also involved in pathogenesis. Studies on the cell wall of pathogens are important for crop protection since key enzymes involved in cell wall biosynthesis have been largely used as targets for drug design (Karkowska-Kuleta and Kozik 2015). Common cell wall proteins implicated in pathogenesis are chitinases, aspartic proteases and phospholipases (Karkowska-Kuleta and Kozik 2015; Li et al. 2015; Liu and Free 2016; Prados-Rosales et al. 2009), 1,3-beta-glucanosyltransferase (GH72), 1,3-β-glucanase (GH17), superoxide dismutase, and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Araújo et al. 2017; Karkowska-Kuleta and Kozik 2015; Longo et al. 2014; Maddi et al. 2009; Prados-Rosales et al. 2009), among others. Concerning the proteomics of the host-pathogen interaction, it has been successfully applied to study the cell walls of the human pathogens Candida albicans (Castillo et al. 2008) and Aspergillus fumigatus (Bruneau et al. 2001), as well as the plant pathogens Fusarium oxysporum (Prados-Rosales et al. 2009) and Neurospora crassa (Ao et al. 2016). Many fungal cell surface proteins such as adhesins, lectin-like adhesins, and the cysteine-rich hydrophobins have also been identified (de Groot et al. 2016). These proteins are involved in the initial physical interaction of the cell wall pathogen with the external surface and cell walls of the host.

It is worth to mention that pathogenesis and virulence are not the same in plant pathology, although they are frequently used as synonyms (Surico 2013). The former is a qualitative term (the ability of a microorganism to produce disease) while the latter is quantitative (the degree of severity of an infection). Plant pathologists have paid more attention on pathogenesis whereas the molecular mechanisms governing virulence are still poorly understood; furthermore, progress is even slower because the proteins involved in one or the other trait have been called indistinguishably.

Nitrogen starvation of *in vitro* cultures mimics the *in planta* environment and induces the synthesis of proteins involved in fungal pathogenesis (Oh et al. 2017; Snoeijers et al. 2000). We hypothesized that submitting two P. fijiensis strains with differences in virulence (less virulent C1233 and highly virulent Oz2b strains) to nitrogen starvation, would enable us to evidence cell wall pathogenicity factors (those necessary to cause disease/damage in the host), as well as virulence factors (those responsible for the severity of an infection) in this pathogen. Expected protein pathogenicity and virulence factors comprise 1,3-betaglucanosyltransferase (GH72), 1,3-β-glucanase (GH17), superoxide dismutase. hydrophobin, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, among others, and the protein Avr4, a very well-known effector of P. fijiensis that binds specifically to chitin on cell wall, and protects the pathogen against the action of chitinases from the host (Stergiopoulos et al. 2010). Using this approach, a total of 2686 proteins were obtained but only for 240 had assigned functions. For this reason, bioinformatics analyses were performed on this set of proteins. Both strains shared 90 proteins, while there were 39 differentially expressed proteins for the C1233 strain and 21 for the Oz2b strain. An isoenzyme of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase was detected exclusively in Oz2b. Many other potential pathogenicity factors (a total of 24 in the set of shared proteins) and potential virulence factors (16 in C1233 and 11 in Oz2b) were identified. To the best of our knowledge, this is the first description of a proteomics study for the cell wall from P. fijiensis. Ours findings proved that our hypothesis on finding virulence and pathogenicity factors upon nitrogen starvation was correct and highlight the importance of *P. fijiensis* cell wall in pathogenicity and virulence.

# **Materials and Methods**

# **Fungal strains**

Both monoascosporic strains were obtained from in-field, naturally infected and diseased leaves of *Musa acuminata* cv. Grand Nain, collected in Mexico from a plantation in Yucatan (C1233) and Chiapas (Oz2b).

# Fungal culture growth conditions

The strains C1233 and Oz2b, were grown for 12 d in 50 mL PDB (Difco<sup>™</sup> BD Sparks, MD, USA) medium, with agitation. Mycelia were individually recovered by centrifugation at 4,000x *g* and disaggregated in 25 mL <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O with an ultra-Turrax T25 (Janke and kunkel IKA<sup>®</sup>-labortechnik, Wilmington, NC, USA), according to Leiva-Mora (2010). Growth curves were determined after inoculating one mL of C1233 or Oz2b fungal disaggregates into fresh PDB medium, and the growth was evaluated by fungal biomass quantitation, every 2 d during 12 d. Fresh weight was recorded after mycelium harvesting and filtration for 1 min with negative vacuum at -15 inches of Hg. Fungal tissues were dried at 60 °C for 2 d and immediately weighed using an analytical balance (Radwag As220-C-2, Guadalajara, Mexico).

# Virulence assay on banana leaf fragments

*Pseudocercospora fijiensis* C1233 and Oz2b strains were *in vitro* evaluated for virulence on *Musa acuminata* AAA (cv. Grand Nain), a cultivar susceptible to black Sigatoka disease. Mycelial fragments (fragments/mL) were quantified with a Sedgewick Rafter Counting Chamber under an optic microscope (Nikon Eclipse E200, Westmont, IL, USA) and adjusted to  $1x10^5$  fragments/mL according to Leiva-Mora et al. (2010). Artificial *in vitro* infection of banana leaf fragments was performed according to Peraza-Echeverria et al. (2008). Leaf fragments were inoculated with 150 µL of mycelium fragments and incubated at 28 °C under a 12 h photoperiod (night/day). Development of BS symptoms according to Fouré (1982) was visually monitored at 0, 10, 20 and 30 d post-infection (dpi). Leaf fragments inoculated with 1% sterile gelatin (Sigma) were used as controls.

### Histological and histochemical analyses

Leaf fragments inoculated with *P. fijiensis* C1233 or Oz2b strains (30 dpi) were cleared by boiling in ethanol, 3 x 10 min each. After chlorophyll removal, samples were incubated for 30 min in 0.05% cotton-blue solution to stain fungal mycelium. Samples were observed under a microscope (Nikon Eclipse E200) at 20x in bright field, and images were recorded with a camera (Infinity 3-1UC; Ottawa, ON, Canada) coupled to the microscope. Production of  $H_2O_2$  resulting from leaf fragment infection with *P. fijiensis* was revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) solution (100 mg in 100 mL water and 50 µL HCl); leaf discs of areas with lesions were incubated in DAB for 8 h in the dark, and then transferred to ethanol-chloroform (4:1 v/v) (Sigma) for 15 d at 4 °C, mounted in 50% glycerol (Sigma), and observed under the microscope.

#### Isolation of fungal cell wall

The C1233 and Oz2b P. fijiensis strains were grown for 12 d in (PDB). Biomass was harvested by centrifugation at 1,500x g, washed twice with sterile  $_{dd}H_2O$  and then transferred into flasks with 50 mL of minimal culture medium (yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate) (Sigma), and supplemented with 10 g/L dextrose (Sigma). After incubation, for 1, 3 and 5 d, mycelia were harvested by filtration, washed twice with sterile <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O and immediately stored in liquid nitrogen until cell wall isolation. *P. fijiensis* cell wall was isolated following a modification of the method described by Maddi et al. (2009). Briefly, mycelium (8 g) harvested at days 1, 3 and 5 was independently ground with mortar and pestle in the presence of liquid nitrogen, until a fine powder was obtained. One half gram (0.5 g) of each mycelium powder was placed in individual 2 mL Eppendorf tubes and added with 1 mL of PPS extraction buffer (PBS 1x, PMSF 1 mM, SDS 1%), homogenized and centrifuged at 4,000x g for 5 min at 4 °C. The PBS 1x buffer was composed of (1L: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4). The supernatants containing the cytoplasmic proteins were discarded. The pellets were washed once more as above. The resulting pellets were washed five times with PP buffer (PBS 1x and PMSF 1 mM), centrifuged as described above and the supernatants from each wash discarded. The pellets were resuspended in 500 µL of PS buffer (PBS 1x, SDS 1%), heated at 95 °C for 5 min, incubated on ice for 5 min, centrifuged at 10,000x g for 5 min, and the supernatants containicontaining the cell wall associated ionic proteins discarded. The pellets (cell walls) were sequentially washed 6 times with 1 mL PP buffer and 6 times further with 1 mL H<sub>2</sub>O. After each wash, the pellets were recovered by centrifugation at 10,000x g for 5 min. The resulting pellets were considered as the cell wall fractions of the C1233 or Oz2b strains, and individually lyophilized.

### Releasing of the fungal cell wall proteins

The lyophilized cell walls were treated with 1 mL of 30 mM NaOH (Sigma) at 4 °C for 4 h and gentle agitation, to release the alkali sensitive proteins. The alkaline reaction was stopped with one volume of glacial acetic acid, incubating 2 h with agitation. The supernatants were collected by centrifugation, 5 min at 16,000x *g*, 4° C and then stored at - 20 °C until analysis. Alkaline treated pellets were subsequently treated with 1 mL hydrogen fluoride-pyridine (HF-Pyridine 70:30 v/v) (Sigma) for 2 h, to release GPI-(glucosylphosphatidylinositol) anchored proteins; the reaction was stopped with one volume of sterile water and incubation for 90 min on ice (Castillo et al. 2008). Released GPI-anchored proteins were recovered by centrifugation of the supernatants at 16,000x *g* for 5 min. Both, alkali and HF-pyridine protein preparations were independently dialyzed overnight against sterile <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O, using a Slide-A-Lyzer filter (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). After dialysis for each strain, alkali and HF-pyridine released proteins obtained from samples harvested at 1, 3 and 5 d were pooled and labeled "cell wall covalently bound proteins (CWPcb)."

CWPcb protein preparations were added with 0.015% sodium deoxycholate (DOC) (Sigma) and precipitated overnight at 4 °C with 10% of trichloroacetic acid (TCA) (Sigma). Proteins were pelleted by centrifugation at 16,000x *g*, washed twice with cold 100% acetone (1 mL by tube) (J.T. Baker, Ecatepec, Mexico), then dried briefly at 25 °C and re-suspended in 20  $\mu$ L 1x PBS buffer. Protein samples were stored at -20 °C until further analyses.

#### Protein preparation and digestion

The CWPcb samples (10  $\mu$ g each) were precipitated using the chloroform-methanol protocol described by Friedman (2007). Proteins were resuspended in 50  $\mu$ L 8 M urea (Sigma), and 10 mM dithiothreitol (Sigma) for 1 h at room temperature, alkylated with 5.5 mM iodoacetami-

iodoacetamide (NMR crystalline, Sigma) and then digested overnight at 37 °C with 1 µg trypsin (proteomic grade, Sigma). Proteolysis was stopped with 0.1% formic acid (Sigma) and centrifuged at 20,000x *g* for 10 min. Aliquots equivalent to 4 µg of digested peptides were placed in 0.2 mL PCR tubes and dehydrated in a Savant Speedvac concentrator (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) for 30 min, then resuspended in 10 µL of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma) and desalted with  $C_{18}$  Ziptip tips (Millipore) (Burlington, Massachusetts, USA). Tryptic peptides were eluted from Ziptip tips with 10 µL of 0.1% TFA and 50% acetonitrile (Sigma), following the supplier's instructions. Eluates were dried in Savant Speedvac concentrator for 10 min and sent for analysis by nano-HPLC-MS/MS to the mass spectrometry facility at the University of Ottawa, Canada.

### NanoHPLC-MS/MS analyses of peptides

A Dionex Ultimate 3000 nano-HPLC system coupled with an Orbitrap Fusion<sup>TM</sup> Trihybrid Mass Spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, Ca) was used for analysis of peptides with an Acclaim PepMap RSLC 75 µm ID x 150 mm length separation column (Thermo Scientific, San Jose, Ca). For each sample, 5 µl (2 µg of peptides) were injected and separated by the following gradient (A–0.1% formic acid in H<sub>2</sub>O, B–80% acetonitrile, 0.1% formic acid in H<sub>2</sub>O) with the flow of 200 nL/min: 0.0-80.0 min 0-40% B, 80.0-80.1 min 40-80% B, 80.1-90.0 min 80% B, 90.0-90.1 min 80-2% B, 90.1-115.0 min 2% B. Nano-ESI conditions: spray voltage in positive mode at 2000 V; ion transfer tube temperature at 275 °C; S-lens RF level–60. Survey scans of peptide precursors from 300 to 1500 *m/z* were performed at 60K resolution (at 200 *m/z*) with a 2 x 10<sup>5</sup> ion count target and maximum injection time of 50 ms.

The raw data were processed using Proteome Discoverer in the PEAKS bioinformatic package (Zhang et al. 2012). The MS<sup>2</sup> spectra were searched with the SEQUEST HT (Eng et al. 1994) engine against a UniProt (https://www.uniprot.org/) database for *P. fijiensis*. Peptides were generated from a tryptic digestion with up to two missed cleavages, carbamidomethylation of cysteines as fixed modifications, and oxidation of methionine and protein N-terminal acetylation as variable modifications. Precursor mass tolerance was 10 ppm and product ions were searched at 0.6 Da tolerances. Peptide spectral matches (PSM) were validated using a target-decoy validation with FDR of 1%.

### **Bioinformatics analysis**

The IDs from the proteins retrieved from the Uniprot and P. fijiensis databases were depurated by selecting only those IDs whose peptides were present in at least three out of four independent analyses carried out in two independent biological replicates. The resulting new depurated IDs lists for the C1233 and Oz2b strains were submitted to in silico analysis to download the complete full amino acid sequence from each protein. The Venny 2.1.0 program (Oliveros, 2007) was used to group the common and unique proteins for P. fijensis strains. The gene ontology (GO) was downloaded from the P. fijiensis database in the DOE (https://genome.jgi.doe.gov/pages/search-for-Joint Genome Institute genes.jsf?organism=Mycfi2) using the respective IDs as a query. The retrieved GOs were uploaded online to the Web Gene Ontology Annotation Plot (WEGO) 2.0 program (Ye et al. 2018), to visualize the biological processes where these proteins are involved. Amino acid sequences were analyzed for the presence of a signal peptide with TargetP 1.1 (Emanuelsson et al. 2000), SignalP4.1 (Petersen et al. 2011) and Phobius (Kall et al. 2004). The Big PI (Eisenhaber et al. 2004), GPI-SOOM (Fankhauser 2005) and PredGPI (Pierleoni et al. 2008) programs were used to detect the GPI anchoring site in protein sequences. The NetNGglyc (Gupta and Brunak 2002) and the NetOglyc (Steentoft et al. 2013) programs were used to determine protein glycosylation sites.

To identify pathogenicity and virulence factors in the sets of common and strain-specific proteins, the sequences were used as queries for Blastp in the Plant-Host interaction database (http://phi-blast.phi-base.org/) (Urban et al. 2016). Proteins that did not retrieve hits from PHI, were manually searched in the web using as keywords their function category identities, and "pathogenicity factor" or "virulence factor".

### Results

### Pseudocercospora fijiensis strains with differences in virulence

To distinguish if there is difference in virulence between *P. fijiensis* C1233 and Oz2b strains, they were submitted to an *in vitro* virulence assay on detached banana leaf fragments. This assay was recently validated as a reliable strategy to evaluate virulence and gene expression in this pathogen (Rodríguez-García et al. 2016). The *in vitro* virulence assay showed that the C1233 strain induced the appearance of small specks at the site of infection at 10 dpi, which enlarged slightly at 20 and 30 dpi (Fig. 1). In contrast, the Oz2b strain caused sparse brownish specks at 10 dpi but at 20 and 30 dpi, the lesions increased dramatically resulting in a large necrotic spot surrounded by a chlorotic halo while control leaf fragments remained green during the time of the experiment (Fig. 1). Based on these results, strain Oz2b was identified as highly virulent and C1233 as less virulent.

### **Position for Fig. 1**

#### Histological observations of artificially infected banana leaf fragments

To support the above results showing differences in visual damage caused on banana leaves by C1233 and Oz2b *P. fijiensis* strains, histological observations were conducted at 30 dpi to monitor their tissue colonization. Cotton blue stain evidenced the mycelia growing in the intercellular spaces of banana leaves, while 3,3'-diaminobenzidine evidenced the production of ROS species (Cavalcante et al. 2011). Oz2b strain colonized the banana leaf intercellular spaces better than C1233 (Fig. 2a and 2b), consistent with the differential damages observed on the banana leaf fragments. This result supports the existence of differences in virulence between both fungal strains. In the control leaf, mycelium was not detected (Fig. 2c). Evaluation of ROS production in banana leaf fragments infected with the less virulent and highly virulent *P. fijiensis* strains was carried out. At 30 dpi, a red-brown staining was observed on the cell walls of mesophyll cells, indicating ROS accumulation in response to both strains (Fig. 2d and 2e), while the control did not yield a color reaction (Fig. 2f).

# Position for Fig. 2

# In vitro growth of the C1233 and Oz2b strains in PDB culture medium

Differences in virulence between fungal strains are evaluated by different criteria, e.g., host damage, conidia production, and growth rate in host and *in vitro* (Fang and Barbetti 2014; Li et al. 2015; Plaumann et al. 2018). But correlation of growth *in planta* vs. *in vitro* is not a rule. In *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, a highly virulent strain on tomato plants showed an *in vitro* larger growth and conidia production than less virulent strains (Manikandan et al. 2018). On the contrary, the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum*, strains with different virulence towards *Arabidopsis thaliana* showed no differences when grown *in vitro* (Plaumann et al. 2018). To evaluate the growth *in vitro* of C1233 and Oz2b strains, they were cultured in PDB medium (Fig. 3). The fresh weight curve followed a similar growth rate in both strains, up to day 8. At this time-point, the Oz2b reached the stationary phase, while C1233 continued growing until day 12 (Fig. 3a). The dry weight curve followed a similar pattern to that of fresh weight in both strains (Fig. 3b).

# Position for Fig. 3

# Isolation of the cell wall from P. fijiensis strains

Fungal cell wall compactness is involved in tolerance to osmotic stress caused *in vitro* by culture medium or in the host environment (Bowman and Free 2006). To characterize the cell wall in the highly virulent Oz2b and the less virulent C1233 strains, we proceeded to isolate their cell walls and observe them under the microscope. *P. fijiensis* strains C1233 and Oz2b were first cultured in PDB medium to obtain biomass and then transferred into nitrogen-deficient minimal medium (Fig. 4a and 4d). Cell walls were observed as arranged in thread-like structures, but with a more relaxed appearance with spaces in the netting from the C1233 strain (Fig. 4b), while the cell wall of the high virulent strain was more compact (Fig. 4e). The successful isolation of cell walls was confirmed by staining with calcofluor white (Sigma), a specific chitin dye, which produced fluorescence on the net structure (Fig. 4c and 4f).

# Position for Fig. 4

# Cell wall proteomics of P. fijiensis

The main goal of this research was to elucidate the catalog of cell wall proteins involved in P. fijiensis pathogenicity and virulence. The strategy to achieve this goal included: a) the isolation of the cell walls (from two P. fijiensis strains with differences in virulence, both submitted to nitrogen starvation); b) the sequential extraction of their different types of cell wall proteins; c) protein preparation pooling for each strain; and d) analysis by MS. A total of 2686 fungal cell wall proteins were detected in the CW from both strains, but most of these proteins (2446, 91.07%) were unknown. The remaining 240 polypeptides (8.93%) were CWPcb with assigned identities in Uniprot and P. fijiensis databases. Therefore, further analyses were performed on those 240 proteins with assigned identities (129 from C1233 and 111 from Oz2b). We found that 90 of these 240 proteins were common to both strains; while 39 were unique for the C1233 strain and 21 were representative of the Oz2b strain (Fig. 5). After elimination of redundancy (90 common proteins), we came up with 150 proteins with different IDs: (90 common proteins + 39 C1233-specific proteins + 21 Oz2bspecific proteins); our analysis continued on these 150 proteins. The IDs for the gene loci of the identified proteins in the *P. fijiensis* genome are provided in Table S1. Bioinformatics analysis found that 32 of the 90 common proteins predict signal peptide (SP) and 7 GPI anchorage; both classes of proteins were validated with three different programs. An Nglycosylation (NGlyc) site was identified in 75 proteins, and an O-glycosylation site (OGlyc) was also predicted in 49 of them (Table S1).

#### Position for Fig. 5

#### Functional categories of the common proteome

Gene ontology (GO) (http://geneontology.org/) describes the properties of genes and their products within an organism using three main categories: "molecular function", "cellular component" and "biological process". To calculate the number and percentages of proteins belonging to each GO category, and to get a comprehensive interpretation of the common protein functions and their biological processes, the gene ontology assignments of the 90 proteins were submitted to WEGO (Ye et al. 2018). Our GO analysis identified 87 gene products, and the most represented GO terms were "metabolic process" and "catalytic activity". These were slightly less than 75% (65 proteins) which were the top values on the Y axis (Fig. 6). As mentioned, the top GO terms were "metabolic processes" (72.4%, 63

proteins) and "cellular process" (45.9%, 40 proteins); on the other hand, "catalytic activity" was the GO term most represented in the "molecular function" (73.5%, 64 proteins), followed by "binding" (33.3%, 29 proteins). Annotations of "cell", "cell part" and "organelle", were the top GO terms represented in the "cellular component" category (Fig. 6).

# Position for Fig. 6

To find a molecular relationship of pathogenicity in *P. fijiensis*, the 90 common proteins were analyzed by Blastp in the portal of Plant-Host Interaction. Twenty-six from this set of proteins retrieved hits (Table S3). Analysis in PHI identified two superoxide dismutases [Cu-Zn], two 1,3- $\beta$ -glucanases, two alpha-glucosidases II, two peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, and one of each of the following proteins: isocitrate lyase, chitin synthase class III, chitinase, 1,3beta-glucanosyltransferase, beta-hexosaminidase, glutathione peroxidase, 3isopropylmalate dehydrogenase, polyadenylate-binding protein, pyruvate kinase, sulfate adenylyltransferase, trehalose-6-phosphate synthase, and the effectors Avr4 and Ecp6. Interestingly, none of the queries corresponded to a hydrophobin.

# Unique proteins in the highly virulent and less virulent *P. fijiensis* strains

This study also revealed unique cell wall proteins present in either the C1233 or the Oz2b strain (Fig. 7). The number of unique cell wall proteins was higher (39) in the C1233 strain in comparison with the Oz2b strain (21) (Table S2). Likewise, to make the interpretation of these proteins more comprehensive, their GO categories were classified and graphed by WEGO. The GO analysis resulted in the identification of 52 proteins (36 from C1233 and 16 from Oz2b, which represented the 100% used for the calculations). The over-represented GO term was "organic substance metabolic process" (75%, 12 proteins) for Oz2b whose values were the top of the Y axis (Fig. 7).

The majority of the GO terms were assigned to molecular function (38 proteins, 92.7%), and biological process (37 proteins, 90.2%), followed by cellular compartment (12 proteins, 29.2%). Several GO terms were significantly over-represented within molecular function: small molecule binding (31.2%, 5 proteins in Oz2b vs. 5.6%, 2 proteins in C1233); organic cyclic compound binding and heterocyclic compound binding both with 31.2% (5 proteins) in Oz2b vs. 13.9% (5 proteins) in C1233; ion binding with 31.2% (5 proteins) vs. 11.1% (4

proteins); protein binding with 25% (4 proteins) vs. 5.6% (2 proteins). GO subcategories exclusively represented in Oz2b were: ligase activity (12.5%, 2 proteins), isomerase activity (6.25%, 1 protein), lyase activity (12.5%, 2 proteins), drug binding (25%, 4 proteins), and carbohydrate derivative binding (25%, 4 proteins). On the other hand, amide binding and peroxidase activity, each 2.8%, (1 protein), and oxidoreductase activity (8.3%, 3 proteins), were only represented in C1233. A hydrolase GO sub-category was similarly represented in both cell wall proteomes, with 25% and 27.7% (4 and 10 proteins respectively in Oz2b and C1233). In biological process, the majority of the sequences were assigned to the GO terms: organic substance metabolic process (75%, 12 proteins in Oz2b, and 47.2%, 17 proteins in C1233), primary metabolic process (68.8%, 11 proteins; 41.7%, 15 proteins), nitrogen compound metabolic process (50%, 8 proteins; 25%, 9 proteins), and cellular metabolic process (50%, 8 proteins).

### Position for Fig. 7

To show which protein functions can explain differences in virulence between C1233 and Oz2b strains, the specific proteins were analyzed to highlight functional enrichment. Twelve enriched categories were identified in C1233; the largest were hydrolase activity, carbohydrate metabolic process, endoplasmic retention sequence binding, proteolytic activity, urease activity, and phosphoglycerate kinase activity (Fig. 8a). In Oz2b, 10 enriched categories were evidenced (Fig. 8b). The top were carbohydrate metabolic process, orotidine 5'-phosphate decarboxylase (involved in *de novo* UMP biosynthetic process), adenylsuccinate synthase activity, lyase activity and COP1 vesicle coat (vesicle-mediated transport).

Surprisingly, almost identical number of virulence factors were found in the sets of strainspecific proteins: 16 proteins (41%) in C1233 and 11 proteins (52.3%) in Oz2b (Table S4). They matched over-represented GO terms (Fig.7) or enriched functions (Figs. 8a and 8b) for Oz2b: isomerase activity (1: one isoenzyme of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase), lyase [2: orotidine 5'-phosphate decarboxylase (OMP decarboxylase)], one isoenzyme of glutamate decarboxylase (GAD)], ligase (2: adenylosuccinate synthetase; glutathione synthetase), and drug binding (4: Ca<sup>2+/</sup>calmodulin-dependent protein kinase, ARK kinase, glutathione synthetase, glutamate decarboxylase); in the case of the C1233 strain, the GO sub-categories amide binding (1: ER retaining receptor), peroxidase activity (1: peroxidase), and oxidoreductase activity (3: succinate dehydrogenase, UDP-glucose 6-dehydrogenase, peroxidase), were identified.

### Position for Fig. 8

### Canonical cell wall proteins

Although cell wall proteins can be classified according to the interest of a particular study (in this case, common and specific proteins; pathogenicity and virulence factors), there is a very well-established classification where all the works on cell wall proteomes meet. Thus, the P. fijiensis cell wall proteins identified here were also classified according this orthodox organization. Seven and three GPI-anchored proteins from the common and strain-specific sets, respectively, met the criteria of Big PI, GPI-SOOM and PredGPI bioinformatics servers, however, the total number increased to 10 or 21 if proteins which are positive for two programs or at least one program are considered, respectively. Seventeen of the common proteins met all the characteristics of "true" cell wall proteins, i.e., having a predicted signal peptide, potential O- and N-glycosylation sites and frequently, but not always, a GPI signature or a series of internal repeats (Castillo et al. 2008). Only one of them the 1,3-betaglucanosyltransferase (GAS1) possessed the GPI motif. Two other canonical GAS proteins were identified in the common protein set, GAS3 and GAS5; these proteins beared predicted NGlyc and OGlyc sites, respectively. Besides these canonical cell wall proteins, GAS4, a putative 1,3-beta-glucanosyltransferase without a signal peptide was identified as a common protein in both strains (Table S1). We also identified one 1,3-beta-glucanosyltransferase (GAS7), which has not been previously reported in *P. fijiensis*; this protein lacks a signal peptide but has sites for NGlyc and OGlyc, and it is predicted as GPI-anchored by the Big PI, and GPI-SOM software (Table S1).

#### Atypical cell wall proteins

In this study, by applying an alkaline-acid treatment, atypical proteins were also identified in the cell wall proteins of *P. fijiensis*, including histones H3 and H4, 40S ribosomal protein S4, 60S ribosomal protein L27, ABC transporter, ammonium transporter, patatin-like phospholipase, thioredoxin, and superoxide dismutase (Tables S1 and S2). This group in-

included the Avr4 and the Ecp6. Other common atypical proteins identified in this study were glutathione peroxidase, peroxidase and thioredoxin, all associated with antioxidant activities to cope with the presence of ROS.

In summary, two strains with differences in virulence were submitted to nitrogen starvation. Covalently-bound cell wall proteome was fractionated, and the proteins were identified by nano-HPLC-MS/MS. A total of 2686 *P. fijiensis* proteins were obtained, from which 240 were found to have a known function. Upon bioinformatics analyses on them, we found that both strains shared 90 common cell wall-bound proteins. We found 39 differentially expressed proteins for the C1233 and 21 for the Oz2b strain, respectively. Both strains showed canonical and atypical cell wall proteins, but the former were present in higher number (55 proteins) than the latter (35 proteins) in the common proteome. Avr4, Ecp6, the best-known effectors of *P. fijiensis*, as well as other fungal pathogenicity factors were found in the common proteome. This is consistent with the fact that both strains are pathogenic, although with differences in virulence. More than 10 potential virulence factors were identified in the sets of specific proteins from each strain. To the best of our knowledge, this is the first description of a proteomics study for the cell wall from *P. fijiensis*.

#### Discussion

Nitrogen starvation of *in vitro* cultures mimics the *in planta* environment and induces the synthesis of proteins involved in fungal pathogenesis (Oh et al. 2017; Snoeijers et al. 2000). We hypothesized that submitting to nitrogen starvation two *P. fijiensis* strains with differences in virulence would enable us to evidence cell wall pathogenicity and virulence factors in this pathogen. We expected proteins such as 1,3-beta-glucanosyltransferase (GH72), 1,3- $\beta$ -glucanase, superoxide dismutase, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, among others, and the protein effector Avr4. Indeed, these proteins were present in the cell walls of Oz2b and C1233 (Table S1), in addition to one peptidyl-prolyl cis-trans isomerase isozyme that was exclusively detected in Oz2b (Table S2). These findings demonstrated that our hypothesis was correct. In total, 24 proteins (26.6%) related with pathogenesis (Table S3) were identified in the 90 common protein set, and probably involved in the establishment of the disease (pathogenicity factors). In the sets of strain-specific proteins, the 16 proteins (41%) from C1233 and the 11 proteins (52.3%) from Oz2b that gave a hit at

the PHI database (Table S4, Figs. 8a and 8b), could be part of the machinery responsible for virulence in *P. fijiensis*. Based on the speed of evolution of BS symptoms upon *in vitro* infection of banana leaf fragments with *P. fijiensis*, we selected C1233 and Oz2b as the less virulent and the highly virulent strains, respectively. Leaves infected with the Oz2b strain developed the typical symptoms of BS disease corresponding to the stage 5 according to the Fouré (1982) scale, while those infected with the C1233 strain produced symptoms corresponding to stage 3. Visual damages on the leaf fragments correlated with the intercellular colonization by C1233 (Fig. 2a) and Oz2b strains. At 30 dpi, both strains had invaded the apoplast and induced production of ROS (Fig. 2d-e). No differences in ROS were apparent in fragments inoculated with C1233 and Oz2b strains, but quantification was not performed.

Differences in virulence between fungal strains are evaluated by using different criteria like host damage and growth rate *in vitro* (Fang and Barbetti 2014; Li et al. 2015). In addition to artificial infection of banana leaf fragments, the C1233 and Oz2b strains were evaluated by their growth on PDB. Curiously, opposite to the growth *in planta*, C1233 grew faster *in vitro*. A possible explanation is that C1233 survives outside the host better than the highly virulent strain, or that Oz2b needs some chemical stimulus from the host. Sometimes, pathogens increase their virulence at the expense of suffering a fitness cost in some way (Sacristán and García-Arenal 2008), and this would be the case of *P. fijiensis* strain Oz2b.

The study of the fungal cell wall proteome is mandatory to better understand structure and virulence dynamics in fungi. To date, only one proteomics analysis has been carried out in *P. fijiensis*, which was focused on the secretome (Escobar-Tovar et al. 2015). In this study, for the first time, the cell wall covalently bound proteins (CWPcb) of the less virulent and highly virulent *P. fijiensis* strains grown in a low nitrogen medium are reported. A large number of proteins (2686) were detected in the CW from both strains, but functions were unknown for 2446 of them; however, we found functional assignment for 240 of them (Fig. 5). Further analyses were performed only on these 240 proteins (8.9%). Other current proteomics works have also paid attention to only a small fraction of the set of proteins due to similar limitations (Fang and Barbetti 2014; Li et al. 2015).

Furthermore, the 240 proteins under analysis were downsized to 150 different ones after elimination of redundancy. Ninety proteins (60%) were shared by both strains, while 39 proteins (26%) were unique for the C1233 and 21 (14%) for the Oz2b strain. A large number of common proteins among fungal strains which differ in virulence are usual, as described for *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (65%) (Fang and Barbetti 2014); similarly, 72% in *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Li et al. 2015) and 45% in *Paracoccidioides brasiliensis* (Longo et al. 2014) were also reported. When the 2446 proteins with unknown function were compared, their sequences and ID codes, showed that 58% was shared between both strains, 30.4% was specific for C1233 and 11.6% for Oz2b (data not shown). These were quite similar to the proportions found in the set of proteins with known function. Common cell wall proteins show that carbohydrate metabolism, nitrogen metabolism, and sulfur metabolism are important in the life of *P. fijiensis* (Table S1).

The goal of this work was to identify pathogenicity and virulence factors in the cell wall of *P. fijiensis*. Our search in the PHI database enabled us to identify 24 pathogenicity factors (26.6%) in the set of common proteins. Most of these are involved in carbohydrate metabolism and energy  $(1,3-\beta$ -glucanase, alpha-glucosidases II, isocitrate lyases, 3-isopropylmalate dehydrogenase, pyruvate kinase, trehalose-6-phosphate synthase), cell wall construction and remodeling (chitin synthase class III, chitinase, 1,3-beta-glucanosyltransferase), protein processes (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase), oxidative stress (superoxide dismutases [Cu-Zn], glutathione peroxidase). On the other hand, sulfate adenylyltransferase participates in purine and sulfur metabolism. Although hydrophobin is frequent in the cell wall of pathogens, our study did not detect any homologous protein. Since we used the protocol reported by Maddi et al. (2009) to recover the cell wall proteome, this lack of detection may be a bias of the method, as they did not find hydrophobins in the cell wall proteomes of *N. crassa* and *C. albicans* either.

The Avr4 protein, a known effector of *P. fijiensis*, was found in the common proteome of the less and highly virulent strains (Table S1). During the interaction *P. fijiensis-Musa* spp., Avr4 binds specifically to chitin on the fungus cell wall, thus protecting it against the action of chitinases from the host (Stergiopoulos et al. 2010). Avr4 is predicted as a secreted protein because of the presence of a signal peptide, but the Avr4 protein was not identified, either *in vitro* or *in planta* (apoplastic) during the secretome study (Escobar-Tovar et al. 2015).

Avr4 was found in the protein fraction released from the *P. fijiensis* cell wall, thus supporting its extracellular action and their binding to the cell wall. The Ecp6 protein, another effector that binds chitin oligomers was identified in both cell wall strains. This effector is thought to be secreted to the host apoplast, preventing chitin oligomers from reaching the host receptor (Sánchez-Vallet et al. 2015). Our results suggest that Ecp6 is primarily bound to the cell wall, similar to Avr4. Since the material for the proteome determination here was prepared from an *in vitro* culture, it is possible that, *in planta*, Ecp6 is indeed released to the apoplast to sequester chitin oligomers thus enabling the pathogen to prevent detection by the host.

Among the unique proteins detected, many were found related to carbohydrate metabolism and energy production in both strains. The percentage of proteins involved in these metabolic processes was higher in the unique proteome of C1233, the less virulent strain, which is consistent with its faster growth *in vitro*. Proteins involved in carbohydrate metabolism have been found more abundant in strains with stronger pathogenicity in *Curvularia lunata* (Xu et al. 2007), *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Li et al. 2015), as well as in *F. oxysporum* race 4 (Sun et al. 2014), opposite to our findings in this work. This discrepancy seems to support the existence of a fitness cost vs. virulence in *P. fijiensis*. The less compactness of the cell wall in the C1233 strain could enable it to grow faster and/or absorb more water than the highly virulent Oz2b strain, as observed in Fig. 3a, while the more compacted cell wall in Oz2b (Fig. 4e) could confer it with better capacity to overcome stress conditions in the host environment, thus growing faster in leaf fragments (Fig. 1).

Although several GO terms in the strain-specific proteins were over-represented in percentage in Oz2b, the actual number of proteins in many of them were identical to those from C1233 (cellular metabolic process, organic cyclic compound binding and heterocyclic compound binding); others were very similar (nitrogen compound metabolic process, ion binding), or even with larger number of proteins in C1233 (organic substance metabolic process, primary metabolic process). Over-representation occurred because the number of proteins with GO annotation in the specific sets were lower in the Oz2b (16) than in the C1233 strain (26).

As shown in Tables S2, S4 and Figs. 8a and 8b, there are qualitative differences at the proteomic level between C1233 and Oz2b, suggesting that some of these unique proteins

could play major roles in virulence, and enable Oz2b to cause higher damage on the host (Fig. 1).

It has been reported that pH is a very important regulator of fungal virulence (Alkan et al. 2013; Vylkova 2017). Interestingly, some of the strain-specific proteins are related with pH modulation; in fact, some fungi produce organic acids (oxalic acid, gluconic acid, etc) to acidify their surroundings, which activates the expression of virulence factors. On the other hand, some others alkalize their environment by producing ammonium from urea, or by deamination of amino acids, which also triggers the expression of virulence factors. Furthermore, other fungi combine both mechanisms, e.g., *Colletotrichum gloeosporioides* and *Magnaporthe oryzae* first acidify the environment to favor conidia attachment, germination and differentiation into appressorium. Once the appressorium penetrates the plant tissues, these fungi release ammonia, which alkalize the host surroundings, which triggers the expression of virulence factors.

With our data, it is tempting to speculate that *P. fijiensis* uses both mechanisms. Urease was among the enriched functions in C1233 (Fig. 8a). Urease alkalizes environment via excretion of ammonia in many human fungal pathogens such as *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix sckenchii*, and *Aspergillus* spp. (Karkowska-Kuleta and Kozik 2015). Consistently, an ammonium transporter was among the C1233 specific proteins (Table S2). In addition, alkalization of the host environment contributes to the secretion of enzymes needed for fast growth (Alkan et al. 2013), which agrees with a larger production of cell surface nutrition-related hydrolases found in C1233 than in Oz2b.

Hydrolases are also involved in pathogenesis and virulence. The GO term "hydrolases" revealed similar percentages in the Oz2b and C1233 *P. fijiensis* strains; however, the actual numbers were 4 and 10 proteins, respectively (Fig. 7). These data diverge from the fact that the number of hydrolases is usually larger in the highly virulent strains. Many of the hydrolases from the C1233 strain are glycoside hydrolases with the exception of the 17 and 28 families, which have critical roles in virulence (Sprockett et al. 2011); all other families are involved in nutrition and carbohydrate metabolism. The largest number of glycoside hydrolases in the C1233 strain (carbohydrate metabolism and energy) is in agreement with

its observed faster *in vitro* growth in comparison with the growth of the Oz2b strain (Fig. 3). Consistently, the number of proteins for C1233 was higher for primary metabolic process (15 vs 11 in Oz2b) and organic substance metabolic process (17 vs 12) than that for Oz2b. Succinate dehydrogenase (SDH), one of the key enzymes of the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) was among the exclusive cell wall proteins of C1233. Recently, Pan et al. (2017) demonstrated that silencing SDH in the oomycete *Phytophthora sojae* resulted in loss of virulence and thus, the exclusive presence of this protein could be a relevant feature for virulence in the C1233 strain. Very little information is available about the other potential virulence factor whose disruption produced defects in appressoria cell wall, and the mutant failed to penetrate into plant tissues in *M. oryzae* (Goh et al. 2017). Further research is needed to reveal the role of the ER retaining receptor at the cell surface of *P. fijiensis*. Other potential virulence factor is UDP-glucose 6-dehydrogenase as mutations on this protein have been shown to abolish the virulence in *C. neoformans* (Moyrand and Janbon 2004).

An important factor that may influence the higher virulence of the Oz2b strain could be acidification promotion by the enzyme glutamate decarboxylase (GAD) (Table S2), which produces a aminobutyric acid (GABA), a metabolite that strongly acidifies the environment to a pH<4 (Manteau et al. 2003). As mentioned above, a low pH can induce the expression of virulence factors. In line with the potential role of GAD on the virulence in P. fijiensis, Noar and Daub (2016) reported up-regulation of this enzyme during the infection of the banana host by this pathogen. The enzymes peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPlase), adenylosuccinate synthetase and glutathione synthetase, present in the specific proteins in Oz2b, are low pH-responsive virulence factors (Riccillo et al. 2000; Zilm et al. 2007). PPlase has been consistently identified in the cell wall proteomes of highly virulent strains of different fungi (Longo et al. 2014; Prados-Rosales et al. 2009), suggesting that this enzyme is important for virulence. It is likely that the acidic PPIase is involved in the proper folding and secretion of virulence factors in *P. fijiensis*, to help overcome the hostile conditions during the infection, as reported for other fungi (Ünal and Steinert 2014). Glutathione synthetase is involved in glutathione biosynthesis, and glutathion is other mechanism to induce the transcription of virulence factors, and it can also activate them by S-glutathionylation (Ku and Gan 2018); in addition, glutathione can protect P. fijiensis against the environmental

stress conditions. *De novo* purine and pyrimidine pathways seem critical for high virulence in *P. fijiensis*. This is suggested by the presence of adenylosuccinate synthetase (AdSS) and orotidine 5'-phosphate decarboxylase (OMP decarboxylase) in the highly virulent Oz2b strain. The enzyme AdSS is crucial for ATP production through the *de novo* purine synthesis pathway; for example, deletion of the corresponding gene in *C. albicans*, *C. neoformans* and *A. fumigatus*, abolishes their virulence (Chitty et al. 2017). Similarly, OMP decarboxylase is a key enzyme in the *de novo* biosynthesis of pyrimidines. To the best of our knowledge, this is the first identification of AdSS and OMP decarboxylase in the fungal cell wall, and for the latter, the first description as a potential virulence factor.

ARK kinase is a tyrosine kinase receptor that protects animal cells against apoptosis induced by nutrient deprivation (Bellosta el at. 1997). There are no reports relating ARK kinase with microbial virulence, but its detection in our study implies that this enzyme could help *P. fijiensis* to face nutrient limitation in the host's apoplast.

One of the exclusive hydrolases that deserve special attention in Oz2b is the glucosylceramide- $\beta$ -glucosidase (GluCerase), the enzyme that degrades the sphingolipid glucosylceramide (GluCer) to glucose and ceramide. The sphingolipid is a component of the cell wall in C. albicans and of the capsule of C. neoformans, and it plays an essential role in virulence in both. The loss of glucosylceramide synthase, the enzyme responsible to produce GluCer, largely decreases the infection capability (Almeida et al. 2015). The sphingolipid GluCer has been reported also in the cell wall of the yeasts H. capsulatum and S. schenckii, and the mycelia from P. brasiliensis and A. fumigatus. Surprisingly, in the highly virulent P. fijiensis Oz2b strain, no glucosylceramide synthase but GluCerase was identified. To date, there are no reports of the presence of cell wall lipids in this pathogen, but if GluCer is present, GluCerase would be critical for the cell wall remodeling. On the other hand, GluCer is one of the main sphingolipids in plants, abundant in photosynthetic tissues (a third part of the total sphingolipids), and it is a major component of the outer layer of the plasma membrane (Msanne et al. 2015). Thus, it is plausible to consider that the fungal GluCerase could also act on the host cell wall. In any case, GluCerase is a potential major virulence factor in this pathogen.

At this moment, it is not clear if C1233 and Oz2b seem to follow different pathways to develop infection and disease, or that their proteomes are the reflection of different stages of the infection process. Although fungal cultures were collected on the same days of the culture cycle, Oz2b induces a faster infection progress, causing more severe damages to the host (Fig. 1), than in the case of C1233. Thence, in the end, both strains induced similar symptoms of the black Sigatoka disease, though at different speeds. Some (or all) of the shared proteins identified in this work, may be part of the basic pathogenicity machinery (i.e., capacity of causing disease), but some of them may also be involved in virulence (i.e. their basal expression contributes to pathogenesis, and their over-expression to virulence).

Previously, some pathogenicity and virulence factors (Escobar-Tovar et al. 2015; Noar and Daub 2016), and effectors (Chang et al. 2016; Noar and Daub 2016) have been reported in *P. fijiensis*, but the present work contributes in discovering new potential virulence factors (such as glucosylceramide- $\beta$ -glucosidase, ARK kinase and orotidine 5'-phosphate decarboxylase). In addition, only 240 proteins (8.93% of the 2686 proteins obtained in this study) were analyzed. It is likely that more pathogenicity and virulence factors of this pathogen will be found in the large set of proteins with unknown function.

An orthodox classification of the cell wall proteins is mandatory. In this sense, GPIcontaining proteins are typically found in cell wall proteomes (Araújo et al. 2017; Liu and Free 2016), and they are linked to the  $\beta$ -1,6- or  $\beta$ -1,3-glucan or chitin (Karkowska-Kuleta and Kozik 2015). These proteins play important roles in skeletal cell wall structure, adhesion, defense and virulence, among others. Kantún et al. (2013) analyzed the deduced proteome of *P. fijiensis in silico*, identifying 49 GPI proteins, 6 of which were GAS proteins; these authors found that *P. fijiensis* GAS1 was expressed in conidia and in field black Sigatokainfected banana leaves. In addition, a new GAS protein was identified in this work, corresponding to GAS7. In comparison with the bioinformatics prediction, the number of GPIs found here was low, but it is within the range reported in other cell wall proteomes. Since not all GPI-linked proteins are abundant in the cell wall, it is possible that proteomics only identifies the most prominent ones; alternatively, some of them may be accumulated at different stages of the life cycle to deal with specific events (e.g., specific stress conditions). In the case of *N. crassa*, 12 GPI-anchored proteins were found (Maddi et al. 2009), 9 GPIlinked proteins were found in *A. fumigatus* (Bruneau et al. 2001), 19 in *C. albicans* (Castillo
et al. 2008), 7 in Paracoccidioides lutzii (Araújo et al. 2017) and 24 in Sclerotinia sclerotiorum (Liu and Free 2016), despite the fact that their genomes code for hundreds of GPI-linked proteins. Differences in the number of cell wall anchored proteins are likely the result of biological differences in different fungi, although we cannot rule out that it is a result of the different bioinformatics tools used in different works. Another subclass of important cell wall proteins is represented by those with internal repeats (PIR). PIR are cross-linked to the  $\beta$ -1,3-glucan network and can be released from the cell wall by mild alkali (Pitarch et al. 2008). In the deduced proteome of P. fijiensis, 5 proteins are annotated as PIR-like. In contrast, none were identified in the cell wall proteomes of P. fijiensis, even when analyses were conducted on pools containing the different cell wall fractions of proteins, including those proteins released with NaOH. This suggests that either PIR-like proteins are not expressed in *P. fijiensis* in the conditions used here, or their concentration is too low and we were not able to detect them. PIR proteins are predominant in the proteomes of the yeast Saccharomyces cerevisiae and C. albicans (Karkowska-Kuleta and Kozik 2015), but in filamentous fungi their identification has been elusive (Araújo et al. 2017; Liu and Free 2016; Longo et al. 2014).

In addition to canonical proteins, the cell wall proteome of *P. fijiensis* comprises proteins which have been previously identified as extracellular, or as members of pathways occurring intracellularly. In the earlier and many current reports these proteins have been considered as unavoidable contamination from the cytosol (Karkowska-Kuleta and Kozik 2015; Liu and Free 2016). However, atypical proteins have been identified in all fungal cell wall proteomic analyses (Castillo et al. 2008; Liu and Free 2016), and these proteins remain in the cell wall preparation even after extensive washes of the cell wall (Liu and Free 2016). A comparison of the identities of these "non-cell wall proteins" evidences that most of them can be found among cell wall proteomes, thus giving rise to doubts as to whether they are indeed products of contamination. Since they have been reproducibly identified in cell wall proteomes, they are currently known as atypical or non-classical proteins (Longo et al. 2014). Some of these atypical proteins have been related to pathogenicity in other fungi, e.g., glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase has been described as a cell wall bound protein that facilitates the adhesion to the host in *P. lutzi* (Araújo et al. 2017). Trehalose-6-phosphate synthase (TPS1), a key enzyme in trehalose biosynthesis, is a virulence factor in the ascomycetes

*Fusarium verticilliodes, Botrytis cinerea* and *Fusarium graminearum* (Fang and Barbetti 2014; González-Fernández et al. 2014). In *Candida parapsilosis* and *C. albicans* an acid trehalase is located at the cell wall, and its disruption resulted in strains with altered cell wall architecture and increased sensitivity to oxidative stress (Sánchez-Fresneda et al. 2014). Curiously, the highly virulent Oz2b strain has a trehalase in its set of specific proteins, and it seems that Oz2b acidifies its surroundings. In *M. oryzae*, disruption of glutathione reductase and thioredoxin genes reduced fungal growth in rice tissues (Xu et al. 2007). Glutathione reductase was necessary to neutralize ROS, while thioredoxin was involved in maintaining cell wall integrity (Xu et al. 2007). In this report we also identified the ER retaining receptor and UDP-glucose 6-dehydrogenase as potential virulence factors. Other atypical cell wall proteins playing roles in pathogenicity are glutathione reductase (Xu et al. 2007) and malate dehydrogenase (González-Fernández et al. 2014) and they were also found in this work. Therefore, atypical proteins are common in the fungal cell wall and many of them are involved in pathogenesis.

Nitrogen starvation, a condition that mimics the host environment, has been used to study the role of the secretome in pathogenesis (Chu et al. 2015). It has been also used to analyze the whole proteome in pathogenesis (Oh et al. 2017), or to study the regulation of particular genes/proteins (Snoeijers et al. 2000). To the best of our knowledge, this is the first time that this condition has been used to stimulate fungal cell wall pathogenicity and expression of virulence factors. The submission to nitrogen starvation of two *P. fijiensis* strains with different levels of virulence was a good strategy to discover new potential virulence factors in this pathogen and enabled us to highlight the importance of the cell wall in the pathogenicity and the virulence in *P. fijiensis*. In conclusion, this strategy improved our understanding on this pathogen, and can be a good avenue to disclose new virulence factors in other pathosystems. Further studies in *P. fijiensis* should be directed to elucidate the functional role of the cell wall pathogenicity and virulence factors identified in this proteomics study.

**Author Contributions:** Y. Burgos-Canul, I. Islas-Flores and B. Canto-Canché conceived, designed and wrote the paper; V. Loyola-Vargas and AP Barba gave support in the design of proteomic experiments; Y. Burgos-Canul, performed cell wall isolation and protein extractions; M. Berezovski and G. Mironov performed MS analysis, searched for protein IDs in the Uniprot database and edited the preliminary list of proteins; L. Brito-Argáez, M. Carrillo-Pech and G. Muñoz-Pérez, provided *P. fijiensis* strains and technically supported the research; R. Grijalva-Arango and M. Tzec-Simá assisted with infection experiments, photography and sample preparation, I. Islas-Flores and B. Canto-Canché; supervised all the work. All authors participated in the data analysis, wrote and read the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

## References

Aguilar-Barragan A, García-Torres AE, Odriozola-Casas O, Macedo-Raygoza G, Ogura T, Manzo-Sánchez G, James AC, Islas-Flores I, Beltrán-García MJ (2014) Chemical management in fungicide sensivity of *Mycosphaerella fijiensis* collected from banana fields in México. Braz J Microbiol 45:359-364

Alkan N, Espeso EA, Prusky D (2013) Virulence regulation of phytopathogenic fungi by pH. Antioxid Redox Signal 19:1012-1025. https://doi.org/10.1089/ars.2012.5062

Almeida F, Wolf JM, Casadevall A (2015) Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell 14:1173-1185. https://doi.org/10.1128/EC.00103-15

Ao J, Aldabbous ME, Notaro MJ, Lojacono M, Free SJ (2016) A proteomic and genetic analysis of the *Neurospora crassa* conidia cell wall proteins identifies two glycosyl hydrolases involved in cell wall remodeling. Fungal Genet Biol 94:47-53. https:// doi.org/10.1016/j.fgb.2016.07.003

Araújo DS, de Sousa Lima P, Baeza LC, Parente AFA, Melo Bailão A, Borges CL, de Almeida Soares CM (2017) Employing proteomic analysis to compare *Paracoccidioides lutzii* yeast and mycelium cell wall proteins. Biochim Biophys Acta 1865:1304-1314. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.08.016

Bellosta P, Zhang Q, Goff SP, Basilico C (1997) Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. Oncogene 15:2387-297.

https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201419

Bowman SM, Free SJ (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. BioEssays 28:799-808.

https://doi.org/10.1002/bies.20441

Bruneau JM, Magnin T, Tagat E, Legrand R, Bernard M, Diaquin M, Fudali C, Latge JP (2001) Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositolanchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. Electrophoresis 22:2812-2823. https://doi.org/10.1002/1522-2683(200108)22:13<2812::AID-ELPS2812>3.0.CO;2-Q

Castillo L, Calvo E, Martínez AI, Ruiz-Herrera J, Valentín E, Lopez JA, Sentandreu R (2008) A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. Proteomics 8:3871-3881. https://doi.org/10.1002/pmic.200800110

Cavalcante M de J, Escoute J, Madeira JP, Romero RE, Nicole M, Oliveira LC, Hamelin C, Lartaud M, Verdeil JL (2011) Reactive oxygen species and cellular interactions between *Mycosphaerella fijiensis* and banana. Trop Plant Biol 4:134-143. https://doi.org/10.1007/s12042-011-9071-8

Crous PW, Groenewald JZ, Slippers B, Wingfield MJ (2016) Global food and fibre security threatened by current inefficiencies in fungal identification. Philos Trans R Soc B 371:1-7. https://doi.org/ 10.1098/rstb.2016.0024

Chitty JL, Blake K, Blundell R, Andre YQ, Thompson M, Robertson AA, Butler M, Cooper M, Kappler U, Williams S, Kobe B, Fraser JA (2017) *Cryptococcus neoformans* ADS lyase is an enzyme essential for virulence whose crystal structure reveals features exploitable in antifungal drug design. J Biol Chem 292:11829 –11839 118. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.787994

Chang TC, Salvucci A, Crous PW, 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 Genet 12: e1005904. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005904

Chu J, Li WF, Cheng W, Lu M, Zhou KH, Zhu HQ, Li FG, Zhou CZ (2015) Comparative analyses of secreted proteins from the phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* in response to nitrogen starvation. Biochim Biophys Acta 1854:437-448. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.02.004 de Groot PWJ, de Boer AD, Brandt BW, Valentín E (2016) 5 The ascomycetous cell wall: from a proteomic perspective. growth, differentiation and sexuality. In: Wendland, J. (ed.) The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research), Springer, Switzerland, pp 81-101.

DOE Joint Genome Institute. https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf. Accessed on 15 November 2017

Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F (2004) A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans, Candida albicans, Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Am J Mol Biol 337:243-253. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.025

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. Am J Mol Biol 300:1005-1016.

https://doi.org/ 10.1006/jmbi.2000.3903

Eng JK, McCormack AL, Yates JR (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. J Am Soc Mass Spectrom 5:976-989.

https://doi.org/10.1016/1044-0305(94)80016-2

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

https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.01.002

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

https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.05.023

Fankhauser NMP (2005) Khogpi: Identification of gpi-anchor signals by a kohonen self organizing map. Bioinformatics 21:1846–1852. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti299

Fouré E (1982) Les Cercosporiose du bananier et leur traitemant. Comportament des varietés. Estude de la sensibilité varietale des bananiers et plantains a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (maladies de raises noires). I Incubation et evolution de la maladie. Fruits 37:749-771.

Friedman DB (2007) Quantitative proteomics for two-dimensional gels using difference gel electrophoresis. In: Matthiesen R (ed) Mass spectrometry data analysis in proteomics, Humana Press, New Jersey, pp 219-239.

Goh J, Jeon J, Lee YH (2017) ER retention receptor, MoERR1 is required for fungal development and pathogenicity in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. Sci Rep 7:1259.

https://doi.org/ 10.1038/s41598-017-01237-x

González-Fernández R, Aloria K, Valero-Galván J, Redondo I, Arizmendi JM, Jorrín-Novo JV (2014) Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. J Proteomics 97:195-221.

https//doi.org/10.1016/j.jprot.2013.06.022

Gupta R, Brunak S (2002) Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. Pac. Symp. Biocomput 7:310-322

Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL (2004) A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. Am J Mol Biol 338:1027-1036. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.016

Kantún-Moreno N, Vázquez-Eúan R, Tzec-Simá M, Peraza-Echeverría L, Grijalva-Arango R, Rodríguez-García C, James AC, Ramírez-Prado J, Islas-Flores I, Canto-Canché B (2013) Genome-wide *in silico* identification of GPI proteins in *Mycosphaerella fijiensis* and transcriptional analysis of two GPI-anchored beta-1,3-glucanosyltransferases. Mycologia

105:285-296. https//doi.org/10.3852/12-103

Karkowska-Kuleta J, Kozik A (2015) Cell wall proteome of pathogenic fungi. Acta Biochim Pol 62:339-351.

https//doi.org/10.18388/abp.2015\_1032

Ku JW, Gan YH (2018) Modulation of bacterial virulence and fitness by host glutathione. Curr Opin Microbiol 47:8-13.

https//doi.org/10.1016/j.mib.2018.10.004

Leiva-Mora M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Cruz Martín M, Sánchez-García C, Roque B (2010) Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitiológicas y componentes de la resistencia. Biotecnol Veg 10:79-88.

Li E, Ling J, Wang G, Xiao J, Yang Y, Mao Z, Wang X, Xie B (2015) Comparative proteomics analyses of two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that differ in pathogenicity. Sci Rep 5:13663. https://doi.org/10.1038/srep13663

Liu L, Free SJ (2016) Characterization of the *Sclerotinia sclerotiorum* cell wall proteome. Mol Plant Pathol 17:985-995. https://doi.org/10.1111/mpp.12352

Longo LVG, da Cunha JPC, Sobreira TJP, Puccia R (2014) Proteome of cell wall-extracts from pathogenic *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparison among morphological phases, isolates, and reported fungal extracellular vesicle proteins. EuPA Open Proteom 3:216-228. https://doi.org/ 10.1016/j.euprot.2014.03.003

Maddi A, Bowman SM, Free SJ (2009) Trifluoromethanesulfonic acid-based proteomic analysis of cell wall and secreted proteins of the ascomycetous fungi *Neurospora crassa* and *Candida albicans*. Fungal Genet Biol 46:768-781. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.06.005 Manikandan R, Harish S, Karthikeyan G, Raguchander T (2018) Comparative proteomic analysis of different isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* to exploit the differentially expressed proteins responsible for virulence on tomato plants. Front Microbiol 9:420. https//doi.org/10.3389/fmicb.2018.00420

Manteau S, Abouna S, Lambert B, and Legendre L (2003) Differential regulation by ambient pH of putative virulence factors secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiol Ecol 43:359–366. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01076.x

Moyrand F, Janbon G (2004) *UGD1*, encoding the *Cryptococcus neoformans* UDPglucose dehydrogenase, is essential for growth at 37 degrees C and for capsule biosynthesis. Eukaryot Cell 3:1601–1608.

https//doi.org/10.1128/EC.3.6.1601-1608.2004

Msanne J, Chen M, Luttgeharm KD, Bradley AM, Mays ES, Paper JM, Boyle DL, Cahoon RE, Schrick K, Cahoon EB (2015) Glucosylceramides are critical for cell-type differentiation and organogenesis, but not for cell viability in *Arabidopsis*. Plant J 84:188-201.

https//doi.org/ 10.1111/tpj.13000

Noar RD, Daub M.E, (2016) Transcriptome sequencing of *Mycosphaerella fijiensis* during association with *Musa acuminata* reveals candidate pathogenicity genes. BMC Genomics 17:690.

https//doi.org/ 10.1186/s12864-016-3031-5

Oh Y, Robertson SL, Parker J, Muddiman DC, Dean RA (2017) Comparative proteomicanalysis between nitrogen supplemented and starved conditions in Magnaportheoryzae.ProteomeSci15:1-12.https://doi.org/10.1186/s12953-017-0128-y

Oliveros JC (2007) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html. Accessed 2 February 2018 Pan Y, Ye T, Gao Z (2017) Cloning and functional analysis of succinate dehydrogenase gene *PsSDHA* in *Phytophthora sojae*. Microb Pathog 108:40-48. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.012

Peraza-Echeverría L, Rodríguez-García CM, Zapata-Salazar DM (2008) A rapid, effective method for profuse *in vitro* conidial production of *Mycosphaerella fijiensis*. Australas Plant Pathol 37:460-463. https://doi.org/10.1071/AP08042

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods 8:785-786. https//doi.org/10.1038/nmeth.1701

Pierleoni A, Martelli PL, Casadio R (2008) PredGPI: a GPI-anchor predictor. BMC Bioinf 9:392.

https//doi.org/10.1186/1471-2105-9-392

Pitarch A, Nombela C, Gil, C (2008) Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. In: Posch A (ed) 2D PAGE: Sample preparation and fractionation, Humana Press, New Jersey, pp 217-239.

Portal O, Izquierdo Y, De Vleesschauwer D, Sánchez-Rodríguez A, Mendoza-Rodríguez M, Acosta-Suárez M, Ocaña B, Jiménez E, Höfte M (2011) Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*-banana interaction. Plant Cell Rep 30:913-928. https://doi.org/10.1007/s00299-011-1008-z

Plaumann PL, Schmidpeter J, Dahl M, Taher L and Koch C (2018) A dispensable chromosome is required for virulence in the hemibiotrophic plant pathogen *Colletotrichum higginsianum*. Front Microbiol 9:1005. https//doi.org/10.3389/fmicb.2018.01005

Prados-Rosales R, Luque-Garcia JL, Martínez-López R, Gil C, Di Pietro A (2009) The *Fusarium oxysporum* cell wall proteome under adhesion-inducing conditions.

Proteomics https//doi.org/10.1002/pmic.200800950 9:4755-4769.

Riccillo PM, Muglia CI, de Bruijn FJ, Roe AJ, Booth IR, Aguilar OM (2000) Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. J Bacteriol 182:1748-1753. https://doi.org/10.1128/JB.182.6.1748-1753.2000

Rodríguez-García CM, Canché-Gómez AD, Sáenz-Carbonell L, Peraza-Echeverría L, Canto-Canché B, Islas-Flores I, Peraza-Echeverría S (2016) Expression of *MfAvr4* in banana leaf sections with black leaf streak disease caused by *Mycosphaerella fijiensis*: a technical evaluation. Austral Plant Pathol 45:481–488. https//doi.org/10.1007/s13313-016-0431-6

Sacristán S, García-Arenal F (2008) The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. Mol Plant Pathol 9:369-384. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00460.x

Sánchez-Fresneda R, Martínez-Esparza M, Maicas S, Argüelles JC, Valentín E (2014) In *Candida parapsilosis* the ATC1 gene encodes for an acid trehalase involved in trehalose hydrolysis, stress resistance and virulence. PLoS ONE 9: e99113. https//doi.org/10.1371/journal.pone.0099113

Sánchez-Vallet A, Mesters JR, Thomma BP (2015) The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. FEMS Microbiol Rev 39:171-183. https://doi.org/10.1093/femsre/fuu003

Sun Y, Yi X, Peng M, Zeng H, Wuang D, Tong Z, Chang L, Jin X, 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 9:1-20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113818 Surico G (2013) The concepts of plant pathogenicity, virulence/avirulence and effector proteins by a teacher of plant pathology. Phytopathol Mediterr 52:399–417. https//doi.org/10.14601/Phytopathol\_Mediterr-12077

Snoeijers SS, Pérez-García A, Joosten MHAJ, De Wit PJGM (2000) The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. Eur J Plant Pathol 106:493-506. https//doi.org/10.1023/A:1008720704105

Sprockett DD, Piontkivska H, Blackwood CB (2011) Evolutionary analysis of glycosyl hydrolase family 28 (GH28) suggests lineage-specific expansions in necrotrophic fungal pathogens. Gene 479:29-36. https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.02.009

Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Levery SB, Clausen H (2013) Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through simple cell technology. Embo J 32:1478-1488.

https//doi.org/10.1038/emboj.2013.79

Stergiopoulos I, van den Burg HA, Okmen B, Beenen HG, van Liere S, Kema GH, de Wit PJ (2010) Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. Proc Natl Acad Sci USA 107:7610-7615. https://doi.org/10.1073/pnas.1002910107

Ünal CM, Steinert M (2014) Microbial peptidyl-prolyl cis/trans isomerases (PPlases): virulence factors and potential alternative drug targets. Microbiol Mol Biol Rev 78:544-571.

https//doi.org/ 10.1128/MMBR.00015-14

Uniprot. http://www.uniprot.org/. Accessed on 7 November 2017

Urban M, Cuzick A, Rutherford K, Irvine A, Pedro H, Pant R, Sadanadan V, Khamari L, Billal S, Mohanty S, Hammond-Kosack KE (2016) PHI-base: a new interface and further additions for the multi-species pathogen-host interactions database. Nucleic Acids Res 45: D604-D610.

https//doi.org/ 10.1093/nar/gkw1089

Vylkova S (2017) Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. PLoS Pathog 13:e1006149. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006149

Xu S, Chen J, Liu L, Wang X, Huang X, Zhai Y (2007) Proteomics associated with virulence differentiation of *Curvularia lunata* in maize in China. J Integr Plant Biol 49:487-496.

https//doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00469.x

Ye J, Fang L, Zheng H, Zhang Y, Chen J, Zhang Z, Wang J, Li S, Li R, Bolund L, Wang J (2018) WEGO: A web tool for plotting GO annotations. Nucleic Acids Res 34:293-297. https://doi.org/ 10.1093/nar/gky400

Zilm PS, Bagley CJ, Rogers AH, Milne IR, Gully NJ (2007) The proteomic profile of *Fusobacterium nucleatum* is regulated by growth pH. Microbiol 153:148-159. https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001040-0

Zhang J, Xin L, Shan B, Chen W, Xie M, Yuen D, Zhang W, Zhang Z, Lajoie GA, Ma B (2012) PEAKS DB: *De novo* sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. Mol Cell Proteomics 11: M111.010587. https://doi.org/10.1074/mcp.M111.010587

## Figure legends

**Fig. 1** Virulence test for *P. fijiensis* strains in leaf fragments of *Musa acuminata* cv Grand Nain. Strains C1233 and Oz2b were used as a source of mycelial fragments for inoculation. Virulence was visually monitored by the progress of black Sigatoka disease symptoms at the abaxial surface of the leaf until 30 dpi. The control was inoculated with 1% gelatin and monitored at equivalent times

**Fig. 2** Microscopy observation at 30 dpi of *P. fijiensis* strains growing onto *M. acuminata* leaf fragments and detection of reactive oxygen species. Penetrating through the stomata and colonizing of the foliar tissue by (**a**) C1233 strain; (**b**) Oz2b strain; (**c**) control, leaf fragment with no fungal inoculation; (**d**) ROS induced by C1233 strain; and (**e**) by the Oz2b strain. (**f**) Control leaf fragment. Arrows indicate: *m*, mycelium; *st*, stoma; *pm*, penetration by mycelium

**Fig. 3** *In vitro* growth of C1233 and Oz2b *P. fijiensis strains.* (**a**) Fresh and (**b**) dry weight of C1233 ( $\diamond$ ) and Oz2b ( $\blacktriangle$ ) strains throughout a 12 d culture cycle. Bars denote standard error while asterisks indicate those days where significant differences in fresh or dry weight between strains were observed

**Fig. 4** Cell wall isolation from *P. fijiensis* C1233 and Oz2b strains. (**a**) C1233 and (**d**) Oz2b *P. fijiensis* strains cultured in minimal medium; (**b**) C1233 and (**e**) Oz2b cell walls analyzed under bright field; (**c**) C1233 and (**f**) Oz2b stained with calcofluor white and observed under fluorescence microscopy

**Fig. 5** Venn's diagram showing common and unique cell wall proteins between C1233 and Oz2b *P. fijiensis* strains. The purple color corresponds to the C1233 and the yellow circle to the Oz2b strains

**Fig. 6** Gene Ontology classification of the cell wall proteome of *P. fijiensis* strains. The plot corresponds to common proteins between C1233 and Oz2b *P. fijiensis* strains

**Fig. 7** Functional classification of unique cell wall proteins from C1233 and Oz2b *P. fijiensis* strains. The plot of gene ontology annotation of unique proteins is shown. Red bars, C1233; gray bars, Oz2b

**Fig. 8** Functional enrichment in unique proteins from the cell wall of *P. fijiensis*. Significantly enriched categories in unique proteins. (**a**) C1233 and (**b**) Oz2b strains

## Supplementary Materials:

**Table S1**: Common cell wall proteins of C1233 and Oz2b *P. fijiensis* strains. (+++) Predicted by three programs, (++) by two programs, (+) by a single program, (-) not predicted

**Table S2**: Unique cell wall proteins of C1233 and Oz2b *P. fijiensis* strains. (+++) Predicted by three programs, (++) by two programs, (+) by a single program, (-) not predicted. (\*) Represents the proteins that participate in carbohydrate energy metabolism

**Table S3**: Pathogenicity factors in the common cell wall proteins of C1233 and Oz2b *P. fijiensis* strains, identified by Blastp in the PHI database

**Table S4**: Virulence factors in unique cell wall proteins of C1233 and Oz2b *P. fijiensis* 

 strains, identified by Blastp in the PHI database



Fig. 1



Fig. 2







Fig. 4



Fig. 6

CAPÍTULO IV









### **Visual resume**

## Table S1

ID Gene	Accession	Description	# Pentides	# AAs	MW [kDa]	Isoelectric point	Signal peptide (SP)	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)	NetNGlyc	NetOGlyc
MYCFIDRAFT_140394	M2YT21	Glycosyltransferase family 24 protein	28	1480	166.46	5.52	+++	-	+	+
MYCFIDRAFT_144702	M2YKL8	Glycoside hydrolase family 92 protein	24	780	85.957	5.71	+++		+	+
MYCFIDRAFT_151823	M3A6V1	Trehalase	20	665	74.445	4.97	+++		+	+
MYCFIDRAFT_191284	M2YJP9	Glycoside hydrolase family 18 protein	13	469	52.174	7.93	+++		+	+
MYCFIDRAFT_198572 MYCFIDRAFT_201016	M2YR11 N10512	1,3-beta-glucanosyltransterase (GAS3)	4	618	46.758	4.//	+++	+++	+	-
MYCFIDRAFT 209517	N109B7	Putative GPI anchored protein	3	221	21.911	8.44	+++	+++	+	
MYCFIDRAFT_209620	N1Q6A5	1,3-beta-glucanosyltransferase (GAS5)	12	451	47.627	5.34	++++	+++	-	+
MYCFIDRAFT_211936	M3A5X0	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	22	208	22.918	7.64	+++	-	+	-
MYCFIDRAFT_212004	M3A6K9	Carbohydrate-binding module family 50 protein (Ecp6)	13	413	40.191	8.4	+++	-	+	-
MYCFIDRAFT_212146	M3ANV9	Glycoside hydrolase family 17 protein	11	441	45.014	6.44	+++		+	-
MYCFIDRAFT_212588	M2ZFI7	Glycoside hydrolase family 32 protein	9	660	72.362	6.16	+++	-	+	-
MYCFIDRAFT_214273	M3BB20	Glycoside hydrolase family 31 protein	15	1011	111.65	4.77	+++	+	+	+
MYCHDRAFT_21/1/5	NIQA48 M27WE0	ABC transporter, ABC-G family w BC-type	12	761	82 220	5.15	+++		+	-
MYCEIDRAFT_39128	M3R670	Olycoside ilydroiase fainily 5 protein Dolichyl-diphosphooligosaccharideprotein glycosyltransferase subunit WBP1	12	/01	51 747	6.73	+++		+	+
MYCFIDRAFT 49199	M2YTH3	Beta-hexosaminidase	25	569	63.982	6.42	+++		+	-
MYCFIDRAFT 51402	M3AE14	Glycoside hydrolase family 16 carbohydrate-binding module family 18 protein	6	448	46.797	4.84	+++	+++	-	-
MYCFIDRAFT_53765	M3B352	Glycoside hydrolase family 3 protein	28	820	88.742	4.96	+++	-	+	+
MYCFIDRAFT_54124	M2ZZY5	Glycoside hydrolase family 17 protein	7	373	39.049	6.18	+++		-	-
MYCFIDRAFT_55415	N1QC30	Glycoside hydrolase family 17 protein	21	308	33.045	5.14	+++		+	+
MYCFIDRAFT_55724	N1QB78	Beta-glucosidase	34	878	94.893	4.98	+++		+	-
MYCFIDRAFT_57358	M3AK23	Protein disulfide-isomerase	39	545	59.307	4.84	+++		+	+
MYCHDRAFI_57906	M2 Y MJ0 M2 A TI2	Peptide nydrolase	14	220	24.849	4.//	+++		+	+
MYCFIDRAFT 63137	M2Z010	Dolichyl-diphosphooligosaccharidenrotein alvoosultraneferase subunit 1	0 26	403	55 582	8.78	+++	-	+ +	+
MYCFIDRAFT 72243	M3B9G2	Carboxypeptidase	13	549	61.56	5.48	+++		+	+
MYCFIDRAFT 86210	N1QCA6	Peptidylprolyl isomerase	4	143	15.343	5.03	+++	-	-	+
MYCFIDRAFT_86684	M3AY01	Glycoside hydrolase family 2 protein	58	879	97.901	5.91	+++	-	+	+
MYCFIDRAFT_87167	M3AZE0	Carbohydrate-binding module family 14 protein (Avr4)	3	121	13.022	4.83	+++	-	-	-
MYCFIDRAFT_87294	M3ALT7	1,3-beta-glucanosyltransferase (GAS1)	9	546	57.356	4.87	+++	+++	+	+
MYCFIDRAFT_87525	N1QBN6	Glycoside hydrolase family 18 protein	8	388	42.725	5.9	+++	-	+	+
MYCFIDRAFT_134354	M3B3X0	Carboxylic ester hydrolase	9	573	62.957	4.64	++	-	+	+
MYCFIDRAFT_36169	M3B0Y7	Molybdopterin synthase sulfur carrier subunit	4	97	10.45	4.98	++		-	-
MYCFIDRAF1_58150	MSAZQI	Carboxypeptidase	8	541	60.29	6.09	++		+	+
MYCEIDRAFT 87187	M3A055	MICOS complex subunit	22	255	28 275	9.67	++		+	+
AC578 2033	A0A139H8S9	NADH-cvtochrome b5 reductase	12	301	32,919	7.52	+		+	-
MYCFIDRAFT 106416	N1Q8H6	Peptide hydrolase (Fragment)	19	974	107.93	6.37	+		+	+
MYCFIDRAFT_157570	M3AP24	NADPHcytochrome P450 reductase	28	694	77.804	5.35	+	+	+	+
MYCFIDRAFT_188930	M2YWQ3	Malate dehydrogenase	32	331	34.628	6.8	+	-	+	-
MYCFIDRAFT_39267	M2ZX10	Putative ABC transporter	31	1501	164.08	6.16	+		+	-
MYCFIDRAFT_83032	M3A1D9	MICOS complex subunit MIC12 (Fragment)	7	116	13.05	8.75	+		-	+
AC578_4899	A0A139HNP1	Histone H3	14	136	15.339	11.15	-		-	-
AC578_4914 MVCEIDRAFT_118380	AUA159HINNU M3AGW/	Histone H4 Glycoside hydrolase family 76 protein (Fragment)	24	386	11.303	5.12	-	-	-	-
MYCEIDRAFT 118560	M2YS90	Glycoside hydrolase family 70 protein (Fragment)	11	307	33 747	5.41			+	
MYCFIDRAFT 120453	M3B8I1	Peroxidase (Fragment)	17	274	28.615	6.77	-	+	+	+
MYCFIDRAFT 134119	M3A0Z7	Glycoside hydrolase family 29 protein	11	688	75.082	4.88	-	+++	+	-
MYCFIDRAFT_153168	M3A1N8	Superoxide dismutase	6	226	24.909	8.78	-		+	+
MYCFIDRAFT_154089	M3B255	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	20	189	20.132	7.37	-	-	+	+
MYCFIDRAFT_154747	M3AC82	Glycoside hydrolase family 31 protein	28	962	108.565	6.14	-	-	-	+
MYCFIDRAFT_158677	N1Q951	Glycerone kinase	16	563	60.012	6.37	-	+	+	+
MYCFIDRAFT_162640	M3AR39	40S nbosomal protein S4	55	262	29.628	10.13	-		+	+
MYCEIDRAFT_108270 MYCEIDRAFT_168793	M2TIL9 M2VHR8	Fukervotic translation initiation factor 3 subunit C	34	860	07 332	5 35	-		-	+
MYCFIDRAFT 201371	NIOAP2	D-3-nhosnhoglycerate dehydrogenase	16	599	63.37	6.89	-	+	+	
MYCFIDRAFT 201416	N1Q6P7	Glycosyltransferase family 8 protein	12	600	68.035	5.64	-	-	+	-
MYCFIDRAFT_202619	M3BBQ1	1,3-beta-glucanosyltransferase (GAS4)	10	478	50.705	4.42	-	+++	+	+
MYCFIDRAFT_202901	M3B444	Polyadenylate-binding protein	37	715	77.02	6.58	-	-	+	+
MYCFIDRAFT_203370	M3ADU3	Glycosyltransferase family 2 protein	13	902	100.696	8.07	-	-	+	+
MYCFIDRAFT_205026	M3ALS0	Thioredoxin	7	107	11.647	4.97	-	-	-	-
MTCFIDRAFT_206185	NIQAN7	Giycoside nydrolase family 3 protein	19	919	98.489	5.81	-	-	+	+
MYCEIDRAFT 210/21	M278T2	r yruvaic Kindse Glweeraldebude, 3-nhoenbate debudrogenace	3/	327	36.084	0.80	-	-	+	+
MYCFIDRAFT 210905	M3B5A0	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	4	154	15.85	6,61	-	T -	+	+
MYCFIDRAFT 211094	M3AZF9	Isocitrate lyase	13	536	59.593	6.55			+	-
MYCFIDRAFT 211279	M2Z085	Glutamine synthetase	25	382	42.231	6.04	-	-	+	-
MYCFIDRAFT_211605	M2ZTN1	Protein YOP1	7	173	19.391	7.23	-	-	+	-
MYCFIDRAFT_211897	M3ARZ8	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	22	380	41.285	8.57	-	-	+	+
MYCFIDRAFT_214425	M2ZAS4	Glycosyltransferase family 39 protein	12	951	106.589	6.86	-	-	+	
MYCHDRAFT_27255	NIQB89	Kan G I Pase-activating protein	17	417	45.803	4.72	-	-	-	+
MYCHDRAFT_31412	M3AMA8	1,3-beta-glucanosyltransferase (Fragment) (GAS7)	7	461	49.275	4.91	-	++	+	+
MUCEIDRAFT_4//82	MOVSUU	Unitatinone peroxidase	14	540	19.985	5.48	-	-	-	+
MYCFIDRAFT 51773	M3AS20	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_mitochondrial	17	299	33,857	3.71	-	-	+ +	+ +
MYCFIDRAFT 52473	M3A4P5	Elongation factor Tu	22	443	48.721	6.81	-	+	+	+
MYCFIDRAFT 53931	M2ZZM8	Histone H2B	32	139	14.948	10.15	-	-	-	+
MYCFIDRAFT_54813	N1Q7P2	Glycosyltransferase family 66 protein	14	763	85.15	8.53	-	-	+	-
MYCFIDRAFT_55940	M3A8J2	60S ribosomal protein L27	18	136	15.811	10.68	-		+	+
MYCFIDRAFT_56074	M2ZQ06	NAD-specific glutamate dehydrogenase	38	1062	119.271	6.77	-	+	+	+
MYCFIDRAFT_59110	M2Z0J6	40S ribosomal protein S0	9	306	32.759	4.86	-	-	+	+
MYCFIDRAFT_60055	M3A1U3	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	39	430	47.53	6.64	-	-	+	+
MYCEIDRAFT_03440	N106X1	rioteasonie subunit deta Transkotolaso	10	215	30.294 74.000	6.40	-	-	+	+
MYCFIDRAFT 71625	M3BBI 7	Sulfate adenvivitransferase	40 50	575	64.467	7.78	-	- ±	+	- T
MYCFIDRAFT 87318	M3AQ14	Glucose-6-phosphate isomerase	38	552	61.075	6.42	-	-	+	+
MYCFIDRAFT 87720	M2YZD4	Histidine biosynthesis trifunctional protein	23	884	94.758	5.74	-		+	+
MYCFIDRAFT_88245	M3A4J1	Malate dehydrogenase	42	344	36.287	8.92	-	-	+	-
MYCEIDRAFT 88469	M2A2N4	Channida hudanlara famila 12 andrahudanta hindina madula famila 48 metain	22	711	82.02	6.25				

## Table S2

<u> </u>				1	1	1	Icocloctric point	Signal nontido	Chaogal Bhogshotidal Inscital	NotNCly	
Straine	ID Cono	Accession	Description	# Pontidos	# 1 1 5	MW [k-Dol	isoelectric point	(SP)	(CPI)	neurony o	NotOCivo
C1222	MVCEIDDAET 120272	NIOCKO	*Cotion independent monnece 6 phosphoto recentor CLMDD (Encoment)		210	24 741	(pi) 8.07	(31)	(01)	L.	netOotyc
C1233	MYCEIDRAFT_1202/2	M2DODS	*Cation-independent mannose-o-phosphate receptor CI-MFK (Fragment)	12	510	70.155	8.07	+++	-	+	-
C1233	MUCEIDBAET 195527	NIDDUD8	*Orycoside hydrolase family 15 caroonydrate-oniding module family 21 protein	15	700	96.455	4.38	+++	-	+	+
C1233	MYCEIDRAFT_185557	M2D1D7	*Chycoside hydrolase family 5 protein	9	190	47.250	5.05	+++	-	÷	+
C1233	MYCEIDRAFT_32283	M2D775	*Chycoside hydrolase family 55 protein	10	423	47.239 84.841	5.44	+++	-	-	+
C1233	MUCEIDBAET 214684	M2D4L9	SChaeside hydrolase family 05 protein	13	017	04.041	5.11		-	т .	т .
C1233	MUCCIDRAFT_214084	M2D059	*Monnon ando 1.6 alaba monnosidase	23	491	69.J/0 51.510	3.11	+++	-	+	+
C1233	AC570 5015	M3D036	1.2 hata aluganggulteonofarese	1	401	16.662	4.73	+++	++++	+	+
C1233	MUCEIDPAET 22/66	M27C05	Carboyulic actar hydrolaca	6	5/18	40.003	4.79	+++	+++	+	+
C1233	MYCEIDRAFT 52001	M2AWP2	Carboxyne ester nyurolase	6	620	60.052	5.05	+++	-	т 	T
C1233	MVCEIDBAET 164241	M2D125	Carboxypeptidase	0	640	71.140	5.22	+++	-	т .	т .
C1233	MUCCIDRAFT_104541	MOVDC0	Carboxypeptidase	0	200	/1.149	5.16	+++	-	+	+
C1233	MYCEIDBAET 217057	M2TFC9	Derovideee	0	300	45.105	9.42	+++	-	+	+
C1233	MYCEIDBAET 167560	M27L41	Petoin DOT1	14	990	20.106	0.43	+++	-	+	+
C1235	MYCEIDBAET 55660	N122L41	Contilia	2	203	29.190	6.0	+++	-	+	+
C1233	MVCEIDBAET 52021	M2ALW0	ED human metain sataining sagantas (Escamont)	30	217	25.060	9.66		-	т .	т
C1233	MYCEIDRAFT_32931	MISALWU NIORO2	EK lunien protein-retaining receptor (Fragment)	5	217	20.100	6.00	++	-	+	-
C1233	MYCEIDBAET 54229	NIQBQ2	Fiotelli TOFT	5	175	10.202	0.23	+	-	+	+
C1233	MYCEIDBAET 215022	M2A7N2	Signal peptidase complex catalytic subunit SECTI	0	1/3	19.203	5.00	+	+	+	-
C1235	MYCEIDBAET 64002	MIGAZING NIORTO	*Glycosylitansierase family 2 protein	0	240	26 711	2.00	-	-	+	+
C1255	MICFIDRAFI_04093	N1QB10	*Olycosylitalisterase family 2 protein	14	240	20.711	6.92	-	-	+	-
C1233	MYCFIDRAFT_19/9/5	M2ZQ55	*Oycoside nydrolase family 28 protein	22	331	38.173	5./4	-	-	+	-
C1233	MTCFIDRAFT_/0549	N1Q014	*Prosphogiycerate kinase	33	420	45.390	1.42	-	-	+	+
C1233	MTCFIDRAFT_50482	MJADC2	Succinate denydrogenase [ubiquinone] cytochrome b small subunit	2	188	20.825	9.82	-	-	-	+
C1233	MTCFIDKAF1_238//	N1Q825	Coatomer subunit beta	33	900	100.891	5.48	-	-	+	+
C1233	AC578_2595	AUA159GTK5	CORO CON2 view documentaria	23	919	54,522	5.44	-	+	+	+
C1233	MYCFIDRAFT_155092	M2TUW0	COP9 CSN5 signalosome subunit 5	8	485	20.726	5.45	-	-	+	+
C1233	MTCFIDRAFT_03012	M2ZAP1	COP9 CSN/ signalosome subunit /	8	292	30.720	3.5	-	-	+	+
C1233	MTCFIDRAFT_33288	NIQB44	COP9 signalosome complex subunit 4	19	405	44.505	4.88	-	-	+	+
C1233	MUCEIDBAET 148055	NIDAWINO	Planentation protein	0	822	02 714	0.46	-	-	+	+
C1255	MICFIDRAFI_146955	N1Q942	A stin seleted pastein 2/2 conselere relevant 2	0	100	93./14	0.00	-	-	÷	+
C1233	MYCFIDRAFI_63/46	M2YV29	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	20	189	21.469	8.34	-	-	-	+
C1233	MTCFIDRAFT_88299	M3BAB4	Aminopeptidase	38	881	98.852	6.19	-	-	+	+
C1233	MTCFIDRAFT_34240	M2ZIZ/	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6, mitochondriai	10	4/9	00.72	6.99	-	-	+	+
C1233	MYCEIDBAET 204186	M2AUE5	Urease Soning budgenumenthyltronoferoge	15	839	90.72	5.99	-		+	+
C1235	MICFIDKAF1_204180	MISAUEJ	Serine nydroxymetrymansterase	10	465	33.043	0.9	-	-	÷	+
C1233	AC578_11024	AUA159H5CU	Nitogen-activated protein kinase	12	528	40.9	3.0	-	-	-	+
C1233	MYCFIDRAFT_/255/	NIQ5M4	Eukaryotic translation initiation factor 5 subunit D	10	3//	04.201 52.557	3.33	-	-	+	+
C1233	MTCFIDRAFT_00400	MOAN04	Ammonium transporter	3	485	50.071	0.10	-	-	+	+
0-21	MTCFIDKAF1_205115	M3A2L2	*Dute eleventidese	14	944	38.8/1	5.04	-	-	-	+
0Z20	AC578_0094	AUA139HVK3	*Beta-glucosidase	8	500	91.855	5.04	+++	•	+	+
0Z20	MYCFIDRAFT_210204	M3A011	*Giycoside nydrolase family 17 protein	2	208	58.715	4.84	+++	-	+	+
0Z20	MTCFIDRAFT_210480	M2Z992	*Giyeoside nydrolase family 30 protein	3	488	52.522	1.42	+++	-	+	+
0Z20	MTCFIDRAFT_18/282	M5B479	*Classeshere for the formula 20 protein	/	027	08.323	8.9	-	-	+	+
0220	MICTIDKAPI_338/0	1V1Q0V4	*Moloto debudeoconoco	22	220	89.124	9.19	-	-	+	+
0220	AC318_9332	AUA139HU95	*maate uenyurogenase	2.5	330	34.399	0.81	-	-	+	-
Oz2b Oz2b	AC3/8_303/ MYCEIDRAFT 1873960	B2CIW4	Actin (Fragment)	4	1206	154.585	6.4	-		+	+ +
Oz2h	MYCFIDRAFT 30300	M3AXS8	Glutathione synthetase	4	512	56 345	5.63	-		+	+
0z2b	MYCFIDRAFT 87130	M3AW25	*Adenvlosuccinate synthetase	15	421	46 725	6.48	-		+	+
0z2b	MYCFIDRAFT 32170	N10975	*Glycoside hydrolase family 3 protein	16	975	105.662	5.71	-		+	+
0z2b	MYCEIDRAFT 156284	M2YS96	*Glycoside hydrolase family 36 protein	9	732	80.633	5.52	-		+	+
0z2b	MYCEIDRAFT 214176	M3ANW5	*Glutamate decarboxylase	23	517	58 797	6.46	-		+	+
0z2b	AC578 3/87	A0A130HR45	*NADH debydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcompley subunit	6	177	20.514	0.40	-		+	+
0z2b	MYCEIDRAFT 201401	N10CV8	ARK kingse	6	966	106.411	9.77	-	-	+ +	- T
0z2b	MYCEIDRAFT 137805	M2VXW5	Co2+/colmodulin_dependent protein kinose	8	705	88 15/	6.8	-		-	- T
072h	MYCEIDRAFT 162341	M3A6I9	Coatomer subunit delta	12	521	57 224	5.45	-			, +
0z2b	MYCEIDRAFT 56149	M3RCI 6	Coatomer subunit commo	27	022	100.949	5.36	-	-	- T	- T
0z2b	MYCEIDRAFT 40608	M3B872	Orotidine 5'-nhoenhate decarboxylase	6	201	32 105	9.09	-	-	+	+
0z2b	MYCEIDRAFT 50020	M34074	Pentidul.nrolul ris.trans isomerase	2	177	19.837	7.05	-		+ +	+ +
0z2b	MYCEIDRAFT 55055	M27PH3	Tubulin, specific chaperone A	7	117	12.057	5.38	-		-	- T
01.20	micrib(ni1_55955	CIT PT	rubunit-specific endperone A	. /	11/	12.700	5.50	-	-	-	Ŧ

## Table S3

Protein ID P.	Description in <i>P</i> fillensis	CO Torm	Equation astagary protain identity	U;t
fijiensis portal	Description in P. jijiensis	GO Term	F unction category protein identity	Hit
87167	Carbohydrate-binding module family 14 protein	GO:0005576	Race-specific elicitor Avr4	Cladosporium fulvum
·		GO:0006030		
87294	1.3-beta-glucanosyltransferase	GO:0031225	1.3-beta-glucanosyltransferase	Fusarium oxysporum
0/2)1	1,5 oou gueunosyntaistetase	GO:0016740	1,5 beta gaeanosyntaisterase	and the oxysportant
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		GO:0016740		
49199	Beta-hexosaminidase	GO:0004553	Beta-hexosaminidase	Candida albicans
		GO:0005975		
		GO:0004563		
47782	Glutathione peroxidase	GO:0006979	Glutathione peroxidase	Alternaria alternata
·		GO:0004602		
54124	Glycoside hydrolase family 17 protein	GO:0005975	Glycoside Hydrolase Family 17	Magnanorthe orvzae
51121	olycoside nydroidse raining 17 protein	GO:0004553	olycoside Hydrolase Falling Fr	in agricipor ine or year
		GO:0005575		
55415	Glycoside hydrolase family 17 protein	GO:0005975	Glucan 1,3-beta-glucosidase	Candida albicans
		GO:0004553		
		GO:0004338		
212146	Glycoside hydrolase family 17 protein	GO:0005975	Glycoside Hydrolase Family 17	Magnaporthe oryzae
		GO:0004333		
118560	Glycoside hydrolase family 17 protein (Fragment)	GO:0003575	CELP0032 Effector like protein	Blumeria graminis
		GO:0005975		
		GO:0016787		
191284	Glycoside hydrolase family 18 protein	GO:0004553	Chitinase	Trichoderma virens
		GO:0004568		
		GO:0006032		
211897	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	GO:0004449	3-isopropylmalate dehydrogenase	Saccharomyces cerevisiae
		GO:0006099		
211094	Isocitrate lyase	GO:0003824	Isocitrate lyase	Leptosphaeria maculans
		GO:0004451		
		GO:0019752		
154089	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	GO:0003755	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Botrytis cinerea
		GO:0006457		
		GO:0000413		
211936	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	GO:0003755	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Fusobacterium nucleatum
		GO:0008437		
202901	Polyadenylate-binding protein	GO:0003676	Polyadenylate-binding protein, cytoplasmic and nuclear	Aspergillus fumigatus
		GO:0003723		1 0 9 0
		GO:0016071		
209751	Pyruvate kinase	GO:000287	Pyruvate kinase	Yersinia pseudotuberculosis
		GO:0004743		
		GO:0006096		
71635	Sulfate adenylyltransferase	GO:0000103	Sulfate adenylyltransferase	Cryptococcus neoformans
		GO:0004781 GO:0005524		
153168	Superoxide dismutase	GO:0003324 GO:0004784	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Cryptococcus gattii
		GO:0006801		
		GO:0046872		
210905	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	GO:0098869	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Botrytis cinerea
		GO:0006801		
	m 1 1 2 1 1 2 3	GO:0046872		
51116	Trehalose-6-phosphate synthase	GO:0003825	Trehalose-6-phosphate synthase	Fusarium oxysporum
		GO:0003992		
203370	Glycosyltransferase family 2 protein	GO:0016758	Chitin synthase class III	Botrytis cinerea
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GO:0006031	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
		GO:0004100		
214425	Glycosyltransferase family 39 protein	GO:000030	mannosyltransferase	Cryptococcus neoformans
		GO:0006493		
212004		GO:0097502	E con B have chi c	
212004	Caroonyurate-binding module ramily 50 protein	GO:0016998	Extracentuar protein o	Ciaaosporium julvum
188930	Malate dehydrogenase	GO:0000240	Malate dehydrogenase	Botrytis cinerea
		GO:0016491		and you chieved
		GO:0030060		
51773	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	GO:0006099	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Phytophthora sojae
ļ		GO:0016491		
		GO:0051536		
(Fang and Barbetti 2	014; Gonzalez-Fernández et al. 2014; Pan et al. 2017; Sprockett et al. 2011	<ol> <li>Stergiopoulos et</li> </ol>	t al. 2010 and Zilm et al. 2007)	

#### Table S4 Protein ID P. Strain Description in P. fijiensis GO Term Function category protein identity Hit fijiensis portal 1,3-beta-glucanosyltransferase GO:0071970 ProteinpH-responsive protein GO:0042124 Candida albicans 21233 5815 GO:0031505 21705 C1233 Peroxidase GO:0004601 Cytochrome c peroxidase, mitochondrial Magnaporthe oryzae GO:0006979 GO:0098869 197973 C1233 Glycoside hydrolase family 28 protein GO:0004650 Endopolygalacturonase Fusarium oxysporum GO:0005975 GO:0071555 88299 C1233 Aminopeptidase GO:0006508 Aminopeptidase Mycobacterium tuberculosis GO:0008237 GO:0008270 C1233 89342 Urease GO:0006807 Urease Cryptococcus gattii GO:0009039 GO:0016151 C1233 204186 Serine hydroxymethyltransferase GO:0004372 Magnaporthe oryzae Serine hydroxymethyltransferase GO·0006544 GO:0006563 C1233 \*11024 Mitogen-activated protein kinase GO:0004672 Mitogen-activated protein kinase Hog1 Zymoseptoria tritici GO:0004707 GO:0005524 C1233 60460 Ammonium transporter GO:0006810 Ammonium transporter Colletotrichum gloeosporioides GO:0016020 GO:0008519 C1233 52931 GO:0046923 ER lumen protein-retaining receptor ER lumen protein-retaining receptor (Fragment) Magnaporthe oryzae GO:0006621 GO:0016021 C1233 205113 UDP-glucose 6-dehydrogenase GO:0003824 UDP-glucose 6-dehydrogenase Cryptococcus neoformans GO:0005488 GO:0016616 C1233 52091 Carboxypeptidase GO:0008233 Carboxypeptidase Y homolog A Magnaporthe oryzae GO:0004185 GO:0006508 C1233 164341 Carboxypeptidase GO:0004185 Carboxypeptidase 2 Trichophyton rubrum GO:0006508 GO:0004181 C1233 51857 Peptide hydrolase GO:0006508 Peptide hydrolase Candida parapsilosis GO:0008233 GO:0030287 C1233 209870 GO:0003674 Protein YOP1 Candida albicans Protein YOP1 GO:0008150 GO:0005575 GO:0004618 Phosphoglycerate kinase C1233 70349 Vibrio parahaemolyticus Phosphoglycerate kinase GO:0006096 GO:0016740 C1233 148955 Patatin-like phospholipase domain-containing protein GO:0006629 Patatin-like phospholipase domain-containing protein Verticillium dahliae GO:0008152 GO:0004806 Oz2b 216204 Glycoside hydrolase family 17 protein GO:0004553 CELP0032 Effector like protein Blumeria graminis GO:0005975 GO:0016787 Oz2b 53876 Glycosyltransferase family 39 protein GO:0000030 O-mannosyltransferase Cryptococcus neoformans GO:0006493 GO:0016757 Oz2b 9532 Malate dehydrogenase GO:0016615 Malate dehydrogenase Botrytis cinerea GO:0016491 GO:0006099 87130 GO:0005525 Adenylosuccinate synthetase Oz2b Adenylosuccinate synthetase Salmonella enterica GO:0004019 GO:0006164 GO:0004672 ARK kinase Oz2b 201401 ARK kinase Pseudomonas aeruginosa GO:0004674 GO:0004713 137805 Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase Oz2b GO:0004672 Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase Parastagonospora nodorum GO:0004674 GO:0005524 Oz2b 40698 Orotidine 5'-phosphate decarboxylase GO:0003824 Orotidine 5'-phosphate decarboxylase Saccharomyces cerevisiae GO:0004590 GO:0006207 Oz2b 59920 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase GO:0005515 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Fusobacterium nucleatum GO:0016853 GO:0003755 Oz2b <sup>k</sup>6094 Beta-glucosidase GO:0004553 β-Glucosidase GO:0008422 Botrytis cinerea GO:0008152 Oz2b ⊧5637 Trehalase GO:0004555 Trehalase Candida parapsilosis GO:0005509 GO:0005993 30300 Oz2b Glutathione synthetase GO:0004363 Glutathione synthetase Burkholderia pseudomallei GO:0005524 GO:0006750 (Alkan et al. 2013; Bellosta et al. 1997; Chitty et al. 2017; Goh et al. 2017; González-Fernández et al. 2014; Karkowska - Kuleta and Kozik 2015; Ku and Gan 2019; Moyrand and Janbon 2004; Sánchez-Fresneda et al. 2014; Sprockett et al. 2011 and Zilm et al. 2007)

# CAPÍTULO V DISCUSIÓN GENERAL

La pared celular fúngica representa una estructura de protección ante las condiciones adversas a las que se enfrentan los hongos (Nimrichter *et al.*, 2016; Pontón, 2008). Esta estructura se compone de melaninas, polisacáridos y proteínas, las últimas participan en la biogénesis, remodelación y dinámica de la pared celular fúngica, así como en la adhesión, formación de biopelículas y es probable que también participen en la patogenicidad (Arroyo *et al.*, 2016). Algunas proteínas de la pared celular son sensibles a tratamientos alcalinos, otras poseen un anclaje GPI que les permiten unirse fuertemente a la pared celular, mientras que otras están asociaciadas débilmente a esta estructura (Pitarch *et al.*, 2008; Klis,1994).

Dadas las funciones de las proteínas de la pared celular y a que participan en la patogenicidad fúngica, entonces estas macromoléculas pueden ser consideradas como blancos moleculares para contrarrestar al patógeno. Por lo tanto, estudiar el proteoma de la pared celular fúngica resulta de gran interés. Su análisis no es sencillo y requiere de un método que permita aislar la pared celular de forma eficiente y posteriormente extraer eficientemente las proteínas asociadas.

En este trabajo, los ensayos de infección *in vitro* de fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv Enano gigante, permitieron evaluar la virulencia de cinco cepas de *P. fijiensis*. Se seleccionaron las cepas más y menos virulentas, dado que hasta el momento no se han reportado cepas avirulentas de *P. fijiensis*. Los ensayos mostraron que después de la infección las diferentes cepas de *P. fijiensis* tuvieron crecimiento epifílico y causaron lesiones correspondientes a la Sigatoka negra (SN) sobre sus respectivos fragmentos foliares, dicha característica confirmó la viabilidad del ensayo y la proliferación del hongo a partir de los fragmentos de micelio utilizados como inóculo. El crecimiento epifilico de *P. fijiensis* también fue observado en los trabajos realizados por Canché-Gómez (2013) y Burgos-Canul (2013), quienes inocularon fragmentos foliares de banano con conidios y por Alvarado-Capó *et al.* (2002), quienes infectaron con fragmentos de micelio. Lo importante de tales hallazgos es que con ambos tipos de inóculo se desarrollaron los síntomas de la SN semejantes a los descritos por Fouré (1982). Este hecho demuestra la capacidad

infectiva de ambas estructuras fúngicas. El análisis por microscopía de campo claro mostró que el micelio colonizó los espacios intercelulares de los fragmentos foliares, lo que coincide con lo reportado por Peraza-Echeverría *et al.* (2008) e Islas-Flores *et al.* (2015). El grado de colonización de los espacios intercelulares y el tiempo de aparición de las lesiones foliares permitió determinar que, en este estudio, las cepas Oz2b y Cr6a fueron las más virulentas y las cepas C1233 y Cr4b las menos virulentas. Con base en dichos resultados, las cepas Oz2b y C1233 fueron clasificadas como la más y la menos virulenta, respectivamente, para continuar con el presente trabajo.

El interés del trabajo fue evaluar si la virulencia de las cepas Oz2b (más virulenta) y C1233 (menos virulenta) está asociada a diferencias en la composición proteica de la pared celular, por lo que para obtener la pared celular de *P. fijiensis* se ensayaron diferentes protocolos, así como para la extracción de sus proteínas. El método final elegido consistió en la maceración en mortero en presencia de nitrógeno líquido, centrifugación y lavados secuenciales con amortiguadores de diferente composición, y finalmente agua; este proceso permitío el aislamiento de la pared celular altamente enriquecida, tal como lo demostró la asociación del blanco de calcofluor con el polímero de quitina. La pared celular fúngica aislada se sometió a tratamiento con diferentes amortiguadores y lavados con agua, mediante ellos se obtuvieron las proteínas unidas a la pared por interacciones iónicas. En contraste, las proteínas unidas covalentemente a la pared celular se liberaron mediante una modificación del protocolo desarrollado por Maddi (2009) basado en el tratamiento alcalino con NaOH y ácido con HF-piridina (70:30 p/v). Una vez liberadas las proteínas covalentes de la pared celular de las cepas Oz2b y C1233 se digirieron con tripsina y se identificaron mediante nanoHPLC MS/MS, una herramienta altamente confiable, sensible, rápida y de alto rendimiento en la identificación de proteínas (Iwamoto y Shimada, 2018). En las proteínas unidas covalentemente a la pared celular de las cepas Oz2b y C1233, se identificaron 367 péptidos que empalmaron con proteínas identificadas en la base de datos de P. fijiensis. Veintisiete proteínas predijeron poseer el sitio de anclaje GPI. Este número de proteínas GPI es similar al reportado por otros autores quienes han liberado proteínas GPI de la pared celular de Paracoccidioides lutzii (7 GPI) y Sclerotinia sclerotiorum (24 GPI) (Araújo et al., 2017; Liu y Free, 2016). En conclusión, el número de proteínas GPIs liberadas de la pared celular de *P. fijiensis* se encuentra dentro del rango descrito en otros hongos patógenos.

En el análisis de los datos de MS/MS de las proteínas de pared celular de P. fijiensis se identificaron proteínas que participan en distintas rutas metabólicas, así como proteínas exclusivas de alguna de las cepas y otras comunes entre ambas cepas. Por ejemplo, la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS1), es una enzima clave en la ruta de biosíntesis para la trehalosa, pero también ha sido considerada como un factor de virulencia en ascomicetos como M. oryzae (Fernández y Wilson, 2011), F. verticillioides (Boudreau et al., 2013) y F. et al., 2014). Además, se encontraron cuatro 1.3-βgraminearum (Song glucanosiltransferasas (MfGAS1, MfGAS3, MfGAS4 y MfGAS5), de las seis que Kantún-Moreno et al. (2013), habían deducido in silico a partir del genoma de P. fijiensis. Otra de las proteínas identificadas en este trabajo y asociadas covalentemente a la pared celular de las cepas Oz2b y C1233 fue el efector PfAVR4. Esto es congruente con su función de protección de la pared celular de P. fijiensis para evitar la digestión con las quitinasas del hospedero. PfAvr4 es homóloga funcional de CfAVR4 de Cladosporium fulvum (Stergiopoulos et al., 2010) en la cual se ha descrito esa función. Por otra parte, Chang et al. (2016) compararon in silico los genomas de P. eumusae, P. musae y P. fijiensis y encontraron que los efectores PfAVR4 y PfECP6 están presentes en las tres especies. Sin embargo, el presente trabajo es el primero en el que se demuestra experimentalmente la presencia de PfAVR4 y PfECP6 en la pared celular de uno de estos hongos (*P. fijiensis*).

En este estudio también se encontraron proteínas atípicas, *e.g.*, la malato deshidrogenasa, la formato deshidrogenasa y la acetil-CoA, asociadas a la pared celular de *P. fijiensis*, aunque su función en la pared celular se desconoce. No obstante, en la pared celular de *Colletotrichum acutatum* se ha visto que dichas proteínas participan en la formación del apresorio (Brown *et al.*, 2008) y también han sido reportadas como proteínas atípicas de pared celular en otros hongos (Karkowska-Kuleta y Kozik, 2015; Gil-Bona *et al.*, 2015; Marcos *et al.*, 2012). En el caso de *P. fijiensis* es posible que las proteínas liberadas de la pared celular desempeñen un papel importante en su proceso patogénico; sin embargo, esto aún debe ser demostrado. Cabe resaltar que, hasta el momento, este es el primer trabajo que describe el análisis proteómico de las proteínas unidas covalentemente a la pared celular de *P. fijiensis*. Por lo tanto, los hallazgos de este trabajo contribuyen al conocimiento fundamental de la biología de *P. fijiensis*.

## CAPÍTULO VI CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES

## **6.1 CONCLUSIONES**

Los ensayos de infección *in vitro* en fragmentos foliares del cultivar Enano gigante mostraron reproducibilidad en la inducción de los síntomas correspondientes a la SN, descritos por Fouré (1982). Los resultados de la infección con la suspensión de micelio de cada cepa, permitió seleccionar dos cepas con virulencia contrastante, la cepa Oz2b como la más virulenta y la C1233 como la menos virulenta.

Se estableció un método para desagregar eficientemente la pared celular de *P. fijiensis*, tal proceso facilitó el análisis de esta estructura por microscopía de campo claro. Es posible que *P. fijiensis* posea propiedades que le permiten resistir al fraccionamiento y/o posee componentes que le permiten agregarse rápidamente, con base en que la pared desagregada con nitrógeno líquido se aglutina formando una estructura compacta.

La maceración de *P. fijiensis* con mortero y pistilo en presencia de nitrógeno líquido desagregó la pared celular y permitió liberar a las proteínas asociadas con los tratamientos con NaOH y HF-piridina.

Por medio de la espectrometría de masas se identificaron péptidos que empalmaron con 367 secuencias de proteínas con identidad. Estas fueron agrupadas en proteínas exclusivas de cada cepa y comunes entre ambas cepas. El diagrama de Venny mostró 30 proteínas exclusivas para la cepa Oz2b (más virulenta) y 80 para la cepa C1233 (menos virulenta). Esto indica que la virulencia no está dada con base en el número de proteínas diferentes, sino posiblemente por la abundancia de algunas de ellas.

El análisis bioinformático de las proteínas de pared identificó a un grupo de proteína de pared consideradas como "verdaderas" proteínas de pared celular debido a que cuentan con SP, sitios probables de anclaje GPI y de modificación por glucosilación. También se identificaron proteínas atípicas cuya presencia no se esperaría en la pared celular. Este resultado no es extraño dado que en otros trabajos se han descrito resultados parecidos.

Será interesante estudiar como este grupo de proteínas llegan a la pared celular y que funciones desempeñan ahí. La posibilidad de la existencia de diferentes mecanismos de secreción alternos al del retículo endoplásmico-aparato de Golgi no pueden ser descartadas y actualmente hay mucho interés en estudiar su participación en el transporte y secreción de compuestos hacia el exterior celular.

## 6.2 PERSPECTIVAS

Este trabajo generó una lista de proteínas de la pared celular de *P. fijiensis* a partir del análisis de dos cepas. A dichas proteínas no se les ha asigando una identidad por ello se abre la posibilidad de que en el futuro se realicen escrutinios mediante bioinformática más avanzada para elucidar nuevos factores de virulencia o para caracterizarlas mejor.

Entre el total de las proteínas identificadas en la pared celular de ambas cepas, las proteínas atípicas son de gran interés dado que hasta el momento se desconoce cual es su vía de secreción; elucidar como llegaron a la pared celular abre oportunidades de estudio para establecer como alcanzan la pared celular de *P. fijiensis*.

Las proteínas identificadas con identidad y que ya tienen asignada su posible función en la pared celular y en la patogénesis deberán analizarse funcionalmente, *i.e.*, knockout, RNAi, con el propósito de confirmar o refutar su importancia en la patogénesis del hongo y también para la identificación de proteínas claves en el desarrollo de *P. fijiensis*.

Las proteínas que se identifiquen como indispensables para la viabilidad o patogénesis de *P. fijiensis*, podrán proponerse como blancos moleculares para el desarrollo de nuevos fungicidas que controlen a la SN.

## APÉNDICE



Apéndice 1. Biomasa de cada una de las cepas de *P. fijiensis* en los fragmentos foliares de *M*. acuminata cv Enano gigante durante los días posteriores a la inoculación.

T: Tiempo de muestro en días.

+: Agar con benzimidazol sin hongo (A+B-H).
-: Agar-agar, sin benzimidazol ni hongo (A+A-B).



**Apéndice 2.** Fragmentos foliares de banano cv Enano gigante mostrando el área de las lesiones causadas días después de la inoculación *in vitro* con los fragmentos de micelio de las diferentes cepas de P. fijiensis.

T: Tiempo de muestro en días.

+: Agar con benzimidazol sin hongo (A+B-H). -: Agar-agar, sin benzimidazol ni hongo (A+A-B).

ID Gono	Accession	Descripción	# Pontidos	# A A e	Mm [kDa]	nl	CD (	CDI	NGlve	OGlyc
	ALLESSION		# Feptidos	# AA3	wini [KDa]	pi t of	Jr (	GFI	Neiye	OBIYC
MYCFIDRAFT_8/294	M3AL17	1,3-beta-glucanosiltransferasa	9	546	57.356	4.87	+++ •	+++	+	+
MYCFIDRAFT_72243	M3B9G2	Carboxipeptidasa	13	549	61.56	5.48	+++ -	-	+	+
MYCFIDRAFT_63137	M2ZQ10	Dolicol-difosfooligosacaridoproteína glicosiltransferasa subunidad 1	26	493	55.583	8.78	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_41372	M3B679	Dolicol-difosfooligosacaridoproteína glicosiltransferasa subunidad WBP1	12	468	51.747	6.73	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_55415	N1QC30	Glicosido hidrolasa family 17 proteína	21	308	33.045	5.14	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_87525	N1QBN6	Glicosidasa hidrolasa familia 18 proteína	8	388	42.725	5.9	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_191284	M2YJP9	Glicosidasa hidrolasa familia 18 proteína	13	469	52.174	7.93	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_86684	M3AY01	Glicosidasa hidrolasa familia 2 proteína	58	879	97.901	5.91	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_39128	M2ZWF9	Glicosidasa hidrolasa familia 3 proteína	12	761	82.339	5.15	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_53765	M3B352	Glicosidasa hidrolasa familia 3 proteína	28	820	88.742	4.96	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_214273	M3BB20	Glicosidasa hidrolasa familia 31 proteína	15	1011	111.65	4.77	+++ •	+	+	+
MYCFIDRAFT_144702	M2YKL8	Glicosidasa hidrolasa familia 92 proteína	24	780	85.957	5.71	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_140394	M2YT21	Glicosiltransferasa familia 24 proteína	28	1480	166.46	5.52	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_201016	N1Q5J2	Lisofosfolipasa	6	618	66.157	4.65	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_57906	M2YMJ6	Peptido hidrolasa	14	506	54.849	4.77	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_57358	M3AK23	proteína disulfuro-isomerasa	39	545	59.307	4.84	+++ .	-	+	+
MYCFIDRAFT_151823	M3A6V1	Trehalasa	20	665	74.445	4.97	+++ .	-	+	+

Apéndice 3. Proteínas de pared celular en cepas de *P. fijiensis* predichas *in silico* como verdaderas.

Aas: Aminoácidos

Mm: Masa molecular pl: Punto isoeléctrico

SP: Péptido señal

GPI: Glicosilfosfaditilinositol

NGlyc: N glicosilación

OGlyc: O glicosilación

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abadie, C., M.F. Zapater, L. Pignolet, J. Carlier y X. Mourichon (2008). Artificial inoculation on plants and banana leaf pieces with *Mycosphaerella* spp., responsible for Sigatoka leaf spot diseases. Fruits, 63, 319-323.
- Alvarado-Capó, Y., L.M. Michel, M. Dita, M. Acosta, M. Cruz Martín, N. Portal, R. Gómez Kosky, L. García, I. Bermúdez y J. Padrón (2002). Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis*. Biotecnología Vegetal de Plantas, 3,169-175.
- Arango-Isaza, R.E., C. Diaz-Trujillo, B. Dhillon, A. Aerts, J. Carlier, C.F. Crane, T.V. de Jong, I. de Vries, R. Dietrich, A.D. Farmer, C. Fortes Fereira, S. García, M. Guzmán, R.C. Hamelin, E.A. Lindquist, R. Mehrabi, O. Quiros, J. Schmutz, H. Shapiro, E. Reynolds, G. Scalliet, M. Souza, I. Stergiopoulos, T.A.J. Van der Lee, J.G.M. De Wit, M.F. Zapater, L.H. Zwiers, I.V. Grigoriev, S.B. Goodwin y G.H.J. Kema (2016). Combating a global threat to a clonal crop: banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (Synonym *Mycosphaerella fijiensis*) genomes reveal clues for disease control. PLOS Genetics, 12, 1-36.
- Araújo, D.S., P. de Sousa Lima, L.C. Baeza, A.F.A. Parente, A. Melo Bailão, L.C. Borges y C.M. de Almeida Soares (2017). Employing proteomic analysis to compare *Paracoccidioides lutzii* yeast and mycelium cell wall proteins. Biochimica and Biophysics Acta, 1865, 1304-1314.
- Arroyo, J., V. Farkas, A.B. Sanz y E. Cabib (2016). Strengthening the fungal cell wall through chitin-glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity. Cell Microbiology, 18, 1239-1250.
- Beauvais, A., T. Fontaine, V. Aimanianda y J.P. Latgé (2014). *Aspergillus* cell wall and biofilm. Mycopathologia, 178, 371-377.
- Bolton, M.D., H.P. Van Esse, J.H. Vossen, R. de Jonge, I. Stergiopoulos, I.J. Stulemeijer, G.C. van den Berg, O. Borras-Hidalgo, H.L. Dekker, C.G. de Koster, P.J. de Wit, M.H. Joosten y B.P. Thomma (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. Molecular Microbiology, 69, 119-136.
- Boudreau B.A., T.M. Larson, D.W. Brown, M. Busman, E.S. Roberts, D.F. Kendra y K.L. McQuade (2013). Impact of temperature stress and validamycin a on compatible solutes and fumonisin production in *F. verticillioides*: role of trehalose-6-phosphate synthase. Fungal Genetic Biology, 57, 1-10.
- Bowman S.M. y S.J. Free (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. BioEssays, 28, 799-808.

- Braconi, D., Amato, L., Bernardini, G., Arena, S., Orlandini, M., Scaloni, A., Santucci y A., (2011). Surfome analysis of a wild-type wine *Saccharomyces cerevisiae* strain. Food Microbiology, 28, 1220-1230.
- Brito-Wde, A., T.C. Rezende, A.F. Parente, C.A. Ricart, M.V. Sousa, S.N. Bao y C.M. Soares (2011). Identification, characterization and regulation studies of the aconitase of *Paracoccidioides brasiliensis*. Fungal Biology, 115, 697–707.
- Brown, S.H., O. Yarden, N. Gollop, S. Chen, A. Zveibil, E. Belausov y S. Freeman (2008). Differential protein expression in *Collectotrichum acutatum*: changes associated with reactive oxygen species and nitrogen starvation implicated in pathogenicity on strawberry. Molecular Plant Pathology, 9, 171-190.
- Burgos-Canul, Y.Y. (2013). Comparación de la expresión de genes en cepas de *Mycosphaerella fijiensis* aisladas de plantaciones de banano con y sin manejo de fungicidas. Tesis de Maestro. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 116.
- Calderón, J., M. Zavrel, E. Ragni, W.A. Fonzi, S. Rupp y L. Popolo (2010). PHR1, a pHregulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion. Microbiology, 156, 2484–2494.
- Canché-Gómez, A.D. (2013). Validación de técnicas *in vitro* (fragmentos foliares y plántulas) en la interacción *Mycosphaerella fijiensis-Musa acuminata*. Tesis de Maestro. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 114.
- Caracuel, Z., A. Martínez-Rocha, Di Pietro, M. Madrid y M.I. Roncero (2005). *Fusarium oxysporum gas1* encodes a putative ß-1,3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. Molecular Plant Microbe Interaction, 18, 1140–1147.
- Casanova, M., J.L. López-Ribot, J.P. Martínez y R. Sentandreu (1992). Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labelling with biotin: comparison with other techniques. Infection and Immunity, 60, 4898-4906.
- Castillo, L., E. Calvo, A.I. Martínez, J. Ruiz-Herrera, E. Valentín, J.A. López y R. Sentandreu (2008). A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. Proteomics, 8, 3871-3881.
- Cavalcante, M.J.B., J. Escoute, J.P.E. Madeira, R. Romero, M. Nicole, L.C. Oliveira, C. Hamelin, M. Lartaud y J.L. Verdeil (2011). Reactive oxygen species and cellular interactions between *Mycosphaerella fijiensis* and banana. Tropical Plant Biology 4, 134-143.
- Cervantes-Chávez, J.A., L. Valdés-Santiago, G. Bakkeren, E. Hurtado-Santiago, C.G. León-Ramírez, E.U. Esquivel-Naranjo, F. Landeros-Jaime, Y. Rodríguez-Aza y J. Ruiz-Herrera (2016). Trehalose is required for stress resistance and virulence of the basidiomycota plant pathogen *Ustilago maydis*. Microbiology, 162, 1009-1022.

- Chaffin, W.L., J.L. López-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo y J.P. Martínez (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 130-180.
- Chang, T.C., A. Salvucci, P.W. Crous e I. Stergiopoulos (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, 1-35.
- Chi-Chuc, D. (2011). Estudio de las proteínas unidas de forma covalente a la pared celular de *Mycosphaerella fijiensis*. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 48.
- Churchill, A.C. (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, 307-328.
- Courier (2007). The Bayer Crop Science. Magazine for Modern Agriculture, 1,1-7.
- De Bellaire, L.d.L., E. Fouré, C. Abadie y J. Carlier (2010). Black leaf streak disease is challenging the banana industry. Fruits, 6, 327-342.
- de Groot, P.W., A.D. de Boer, J. Cunningham, H.L. Dekker, L. de Jong, K.J. Hellingwerf, C. de Koster y F.M. Klis (2004). Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. Eukaryotic Cell, 3, 955-965.
- de Groot, P.W.J., A.D. de Boer, B.W. Brandt y E. Valentín (2016). 5 The Ascomycetous Cell Wall: From a Proteomic Perspective. Growth, Differentiation and Sexuality, in: Wendland, J. (ed). The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research), Springer International Publishing Switzerland. pp. 81-101.
- de Groot, P.W.J., A.F. Ram y F.M. Klis (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. Fungal Genetics and Biology, 42, 657-675.
- Doehlemann, G. y C. Hemetsberger (2013). Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. The New Phytologist, 198, 1001-1016.
- Dong, Y., Q. Zhao, X. Liu, X. Zhang, Z. Qi, H. Zhang, X. Zheng y Z. Zhang (2015). MoMyb1 is required for asexual development and tissue-specific infection in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. BMC Microbiology, 15, 1-10.
- Donzelli, B.G. y A.C. Churchill (2009). A dose-response approach differentiating virulence of *Mycosphaerella fijiensis* strains on banana leaves uses either spores or mycelia as inocula Phytopathology, 28, 153-160.
- Donzelli, B.G. y A.C. Churchill (2007). A quantitative assay using mycelial fragments to assess virulence of *Mycosphaerella fijiensis*. Phytopathology, 97, 916-929.
- Ebanks, R.O., K. Chisholm, S. McKinnon, M. Whiteway y D.M. Pinto (2006). Proteomic analysis of *Candida albicans* yeast and hyphal cell wall and associated proteins. Proteomics, 6, 2147–2156.
- Ecker, M., R. Deutzmann, L. Lehle,V. Mrsa y W. Tanner (2006). Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β-1,3-glucan by a new proteincarbohydrate linkage. The Journal of Biological Chemistry, 281, 11523-11529.
- Eisenman, H.C. y A. Casadevall (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. Applied Microbiology and Biotechnology, 93, 931-940.
- Elortza, F., T.S Nuhse, L.J. Foster, A. Stensballe, S.C. Peck y O.N. Jensen (2003). Proteomic analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins. Molecular and Cellular Proteomics, 2, 1261-1270.
- Ernst, O. y T. Zor (2010). Linearization of the Bradford protein assay. Journal of Visualized Experiments, 12, 1-6.
- Escobar-Tovar, L., M. Guzmán-Quesada, J.A. Sandoval-Fernández y M.A. Gómez-Lim (2015). Comparative analysis of the *in vitro* and *in planta* secretomes from *Mycosphaerella fijiensis* isolates. Fungal Biology, 119, 447-470.
- Fagard, M., A. Launay, G. Clement, J. Courtial, A. Dellagi, M. Farjad, A. Krapp, M.C. Soulie y C. Masclaux-Daubresse (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. Journal of Experimental Botany, 65, 5643-5656.
- Feofilova, E.P. (2010). The fungal cell wall: modern concepts of its composition and biological function. Microbiology, 79, 723-733.
- Fernández, J. y R.A. Wilson (2011). The sugar sensor, trehalose-6-phosphate synthase (Tps1), regulates primary and secondary metabolism during infection by the rice blast fungus: Will *Magnaporthe oryzae's* "sweet tooth" become its "Achilles' heel". Mycology, 2, 46-53.
- Fernández-Acero, F.J., I. Jorge, E. Calvo, I. Vallejo, M. Carbu, E. Camafeita, J.A. López, J.M. Cantoral y J. Jorrín (2006). Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Proteomics, 6, 88-96.
- Fernández-Acero, F.J., I. Jorge, E. Calvo, I. Vallejo, M. Carbu, E. Camafeita, C. Garrido, J.A. Lopez, J. Jorrin y J.M. Cantoral (2007). Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research. Archives of Microbiology, 187, 207-215.

- Fouré, E. (1982). Les Cercosporiose du bananier et leur traitemant. Comportament des varietés. Estude de la sensibilité varietale des bananiers et plantains a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (maladies de raises noires). I Incubation et evolution de la maladie. Fruits, 37, 749-771.
- Free, S.J. (2013). Chapter two-fungal cell wall organization and biosynthesis, in: Friedmann, T., Dunlap, J.C., Goodwin, S.F. (eds.). Advances in Genetics. Academic Press. New York. pp. 33-82.
- Friedman, D.B. (2007). Quantitative proteomics for two-dimensional gels using difference gel electrophoresis. In Mass spectrometry data analysis in proteomics, Matthiesen R. (ed). Humana Press: New Jersey, Totowa. pp. 219-239.
- Friesen, T. (2016). Combating the Sigatoka disease complex on banana. PLoS Genetics, 12, 1-4.
- Gastebois, A., T. Fontaine, J.P. Latgé e I. Mouyna (2010). β(1-3) Glucanosyltransferase Gel4p is essential for *Aspergillus fumigatus*. Eukaryotic Cell, 9, 1294-1298.
- Gil-Bona, A., C.M. Parra-Giraldo, M.L. Hernáez, J.A. Reales-Calderón, N.V. Solis y S.G. Filler (2015). *Candida albicans* cell shaving uncovers new proteins involved in cell wall integrity, yeast to hypha transition, stress response and host-pathogen interaction. Journal Proteomics, 127, 340–351.
- González, M., N. Brito y C. González (2012). High abundance of Serine/Threonine-rich regions predicted to be hyper-O-glycosylated in the secretory proteins coded by eight fungal genomes. BMC Microbiology, 12, 213.
- González-Fernández, R., K. Aloria, J. Valero-Galvan, I. Redondo, J.M. Arizmendi y J.V. Jorrin-Novo (2014). Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. Journal Proteomics, 97, 195-221.
- Gozalbo D., P. Roig, E. Villamon y M.L. Gil (2004). *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. Current drug targets. Journal Infectious Disorders, 4, 117-135.
- Hawksworth D.L. (2011). A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. MycoKeys, 1, 7-20.
- Hernáez M.L, P. Ximénez-Embún, M. Martínez-Gomáriz, M.D. Gutiérrez-Blázquez, C. Nombela y C. Gil (2010). Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins *in vivo* by a rapid proteomic approach. Journal Proteomics, 73, 1404–1409.
- Insenser, M.R., M.L. Hernáez, C. Nombela, M. Molina, G. Molero y C. Gil (2010). Gel and gel-free proteomics to identify *Saccharomyces cerevisiae* cell surface proteins. Journal of Proteomics, 73, 1183-1195.

- Islas-Flores, I., C. Alcocer-Álvarez, Y.A. Sánchez-Rodríguez y B. Canto-Canche (2015). Recovery of active pathogenesis-related enzymes from the apoplast of *Musa acuminata* infected by *Mycosphaerella fijiensis*. African Journal of Biotechnology, 14, 1970-1981.
- Iwamoto N. y T. Shimada (2018). Recent advances in mass spectrometry-based approaches for proteomics and biologics: Great contribution for developing therapeutic antibodies. Pharmacology and Terapeutics, 185, 147-154.
- Kantún-Moreno, N., R. Vázquez-Eúan, M. Tzec-Simá, L. Peraza-Echeverría, R. Grijalva-Arango, C. Rodríguez-García, A.C. James, J. Ramírez-Prado, I. Islas-Flores y B. Canto-Canché (2013). Genome-wide *in silico* identification of GPI proteins in *Mycosphaerella fijiensis* and transcriptional analysis of two GPI-anchored β-1,3glucanosyltransferases. Mycologia, 105, 285-296.
- Karkowska-Kuleta, J. y A. Kozik (2015). Cell wall proteome of pathogenic fungi. Acta Biochimica Polonica, 62, 339-351.
- Kitagaki, H., H. Wu, H. Shimoi y K. Ito (2002). Two homologous genes, DCW1 (YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology, 46, 1011–1022.
- Klis, F.M. (1994). Review: Cell wall assembly in yeast. Yeast, 10, 851-869.
- Klis, F.M., A. Boorsma y P.W. de Groot (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 23, 185-202.
- Klis, F.M., C.G. de Koster y S. Brul (2011). A mass spectrometric view of the fungal wall proteome. Future microbiology, 6, 941-951.
- Klis, F.M., M. de Jong, S. Brul y P.W. de Groot (2007). Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells. Yeast, 24, 253-258.
- Kniemeyer, O., A.D. Schmidt, M. Vödisch, D. Wartenberg y A.A. Brakhage (2011). Identification of virulence determinants of the human pathogenic fungi Aspergillus fumigatus and Candida albicans by proteomics. International Journal of Medical Microbiology, 301, 368-377.
- Kosky, R. G., B. Chong Pérez, J. López Torres, M. Reyes, I. Bermúdez-Caraballoso, N. Montalvo Martín y M. Leiva-Mora (2010). Plantain (*Musa* spp. cv. Navolean AAB) transgenic plants from *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of embryogenic cell suspensions. Biotecnología Vegetal, 10, 209-218
- Krysan, D.J., E.L. Ting, C. Abeijon, L. Kroos y R.S. Fuller (2005). Yapsins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic Cell, 4, 1364-1374.

- Kumar, K., K. Xi, T.K. Turkington, A. Tekauz, J.H. Helm y J.P. Tewari (2011). Evaluation of a detached leaf assay to measure *Fusarium* head blight resistance components in barley. Canadian Journal of Plant Pathology, 33, 364-374.
- Kuznetsov, E., H. Kučerová, L. Váchová y Z. Palková (2013). SUN Family Proteins Sun4p, Uth1p and Sim1p are secreted from *Saccharomyces cerevisiae* and produced dependently on oxygen level. PLOS One, 8, 1-11.
- Latgé, J.P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. Molecular Microbiology, 66, 279-290.
- Latgé, J.P. (2010). Tasting the fungal cell wall. Cellular Microbiology, 12, 863-872.
- Latgé, J.P. y A. Beauvais (2014). Functional duality of the cell wall. Current Opinion in Microbiology, 20, 111-117.
- Laveau, C., A. Letouze, G. Louvet, S. Bastien y L. Guerin-Dubrana (2009). Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. Phytopathologia Mediterranea, 48, 32-46.
- Leiva-Mora, M., Y. Alvarado-Capó, M. Acosta-Suárez, M. Cruz-Martín, C. Sánchez-García y B. Roque (2010). Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitiológicas y componentes de la resistencia, Biotecnología Vegetal, 10, 79-88.
- Liang, L., H. Wu, Z. Liu, R. Shen, H. Gao, J. Yang y K. Zhang (2013). Proteomic and transcriptional analyses of *Arthrobotrys oligospora* cell wall related proteins reveal complexity of fungal virulence against nematodes. Applied Microbiology and Biotechnology, 97, 8683–8692.
- Liu, L. y S.J. Free (2016). Characterization of the *Sclerotinia sclerotiorum* cell wall proteome. Molecular Plant Pathology, 17, 985-995.
- Longo, L.V.G., E.S. Nakayasu, J.H.S. Pires, F. Gazos-Lopes, M.C. Vallejo, T.J.P. Sobreira, I.C. Almeida y R. Puccia (2015). Characterization of lipids and proteins associated to the cell wall of the acapsular mutant *Cryptococcus neoformans*. Journal Eukaryotic Microbiology, 62, 591-604.
- Longo, L.V.G., J.P.C. da Cunha, T.J.P. Sobreira y R. Puccia (2014). Proteome of cell wallextracts from pathogenic *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparison among morphological phases, isolates, and reported fungal extracellular vesicle proteins. EuPA Open Proteomics, 3, 216-228.
- Lorenz, M.C. y G.R. Fink (2001). The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. Nature, 412, 83-86.

- Maddi, A., S.M. Bowman y S.J. Free (2009). Trifluoromethanesulfonic acid-based proteomic analysis of cell wall and secreted proteins of the ascomycetous fungi *Neurospora crassa* and *Candida albicans*. Fungal Genetics and Biology, 46, 768-781.
- Maeda, Y. y T. Kinoshita (2011). Structural remodeling, trafficking and functions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. Progress in Lipid Research, 50, 411-424.
- Malavazi, I., G.H. Goldman y N.A. Brown (2014). The importance of connections between the cell wall integrity pathway and the unfolded protein response in filamentous fungi. Briefings in Functional Genomics, 13, 456-470.
- Manikandan, R., S. Harish, G. Karthikeyan y T. Raguchander (2018). Comparative proteomic analysis of different isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* to exploit the differentially expressed proteins responsible for virulence on tomato plants. Frontiers Microbiology, 9, 1-13.
- Manzo-Sánchez, G., M. Orozco Santos y S. Guzmán González (2001). Caracterización Morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región pacífico-centro de México y su desarrollo en medios líquidos. Revista Mexicana de Fitopatología, 19, 66-71.
- Marcos, C.M., J. de Fátima da Silva, H.C. de Oliveira, R.A. Morales da Silva, M.J. Mendes-Giannini y A.M. Fusco-Almeida (2012). Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of *Paracoccidioides brasiliensis* to host cells. Yeast Research, 12, 557–570.
- Marín, D.H., R.A. Romero, M. Guzmán y T.B. Sutton (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. Plant Disease, 87, 208-222.
- Meredith, D.S. y J.S. Lawrence (1969). Black leaf streak disease (*Pseudocercospora fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii and notes on the conidial state of the causal fungus. Transactions of the British Mycological Society, 52, 459-476.
- Nickel W. (2010). Pathways of unconventional protein secretion. Current Opinion in Biotechnology, 21, 621–626.
- Nickel, W. y C. Rabouille (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. Nature reviews. Molecular Cell Biology, 10, 148-155.
- Nimrichter, L., M.M. de Souza, M. Del Poeta, J.D. Nosanchuk, L. Joffe, P.D.M. Tavares y M.L. Rodrigues (2016). Extracellular vesicle-associated transitory cell wall components and their impact on the interaction of fungi with host cells. Frontiers in Microbiology, 7, 1-11.
- Noar, R.D. y M.E. Daub (2016). Transcriptome sequencing of *Mycosphaerella fijiensis* during association with *Musa acuminata* reveals candidate pathogenicity genes. BMC Genomics, 17, 1-25.

- Nombela, C., C. Gil y W.L. Chaffin (2006). Nonconventional protein secretion in yeast. Trends Microbiology,14, 15–21.
- Oka, T., T. Futagami y M. Goto (2015). Cell wall biosynthesis in filamentous fungi, Takagi H., Kitagaki H. (eds) Stress Biology of Yeasts and Fungi. Japan. pp. 151-168.
- Olaya-Abril, A., I. Jiménez-Munguia, L. Gómez-Gascón y M.J. Rodríguez-Ortega (2014). Surfomics: shaving live organisms for a fast-proteomic identification of surface proteins. Journal Proteomics, 97, 164-176.
- Pedreño, Y., P. González-Párraga, M. Martínez-Esparza, R. Sentandreu, E. Valentín y A.C. Argüelles (2007). Disruption of the *Candida albicans* ATC1 gene encoding a celllinked acid trehalase decreases hypha formation and infectivity without affecting resistance to oxidative stress. Microbiology, 153, 1372-1381.
- Peraza-Echeverría, L., C.M. Rodríguez-García y D.M. Zapata-Salazar (2008). A rapid, effective method for profuse *in vitro* conidial production of *Mycosphaerella fijiensis*. Australasian Plant Pathology, 37, 460-463.
- Pérez-Hernández, A., M. González, C. González, J.A.L., van Kan y N. Brito (2017). BcSUN1, a *B. cinerea* SUN-family protein, is involved in virulence. Frontiers in Microbiology, 8, 1-35.
- Pierleoni, A., P.L. Martelli y R. Casadio (2008). PredGPI: a GPI-anchor predictor. BMC Bioinformatics, 9, 1-11.
- Pitarch, A., C. Nombela y C. Gil (2008). Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. Methods in Molecular Biology, 425, 217-239.
- Pontón J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Revista Iberoamericana de Micologia, 25. 78-82.
- Portal, O., Y. Izquierdo, D. De Vleesschauwer, A. Sánchez-Rodríguez, M. Mendoza-Rodríguez, M. Acosta-Suárez, B. Ocaña, E. Jiménez y M. Höfte (2011). Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*– banana interaction. Plant Cell Reports, 30, 913-928.
- Prados-Rosales, R., J.L. Luque-García, R. Martínez-López, C. Gil y A. Di Pietro (2009). The *Fusarium oxysporum* cell wall proteome under adhesion-inducing conditions. Proteomics, 9, 4755-4769.
- ProMusa mobilizing banana science for sustainable livelihoods, 2017. One fungus, one name and the Sigatoka disease complex on banana, [Online] (Actualizado 19 diciembre 2017). Disponible en: http://www.promusa.org/blogpost532-One-fungus-one-name-and-the-Sigatoka-disease-complex-on-banana [Acceso 12 agosto 2018].

- Puccia, R., M.C. Vallejo, A.L. Matsuo y L.V. Longo (2011). The *Paracoccidioides* cell wall: past and present layers toward understanding interaction with the host. Frontiers in Microbiology, 2,1-7.
- Ramírez-Hernández, G. (2011). Determinación *in vitro* de la efectividad de dos fungicidas utilizados para el control de *Mycosphaerella fijiensis* en fincas plataneras del estado de Chiapas. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. México. pp. 75.
- Rodríguez-Caamal, D., J. Ruiz, I. Islas-Flores, G. Ramírez y B. Canto (2010). Un hongo mata plátanos. Memorias del primer foro científico juvenil 2010. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mérida, Yucatán, 2, 27-31.
- Rodríguez-García, C.M., A.D. Canché-Gómez, L. Sáenz-Carbonell, L., Peraza-Echeverría,
  B. Canto-Canché, I. Islas-Flores y S. Peraza-Echeverría (2016). Expression of *MfAvr4* in banana leaf sections with black leaf streak disease caused by *Mycosphaerella fijiensis*: a technical validation. Molecular Plant Pathology, 45, 481-488.
- Ruiz-Herrera, J., C.G. Leon, A. Carabez-Trejo y E. Reyes-Salinas (1996). Structure and chemical composition of the cell walls from the haploid yeast and mycelial forms of *Ustilago maydis.* Fungal Genetics and Biology, 20, 133-142.
- Ruiz-Herrera, J., L. Ortiz-Castellanos, A.I. Martínez, C. León-Ramírez y R. Sentandreu (2008). Analysis of the proteins involved in the structure and synthesis of the cell wall of *Ustilago maydis*. Fungal Genetic and Biology, 45, 71-76.
- Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, volume 3, appendix B.12
- Sánchez-Fresneda R., M. Martínez-Esparza, S. Maicas, J.C. Argüelles y E. Valentín (2014). In *Candida parapsilosis* the ATC1 gene encodes for an acid trehalase involved in trehalose hydrolysis, stress resistance and virulence. Plos One, 9, 1-14.
- Schoffelmeer, E.A., F.M. Klis, J.H. Sietsma y B.J. Cornelissen (1999). The cell wall of *Fusarium oxysporum*. Fungal Genetics and Biology, 27, 275-282.
- Selin, C., T. R. de Kievit, M. F. Belmonte y F. Dilantha (2016). Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: Progress and challenges. Frontiers in Microbiology, 7, 1-22.
- Shankar. U., B.D. Shaw y W. Shim (2007). *Fusarium verticillioides* GAP1, a putative glycolipid-anchored surface protein, participates in conidiation and cell wall structure but not virulence. Microbiology, 153, 2850–2861.
- SIAP. (2015). Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera [Online]. Disponible en: http://www.siap.sagarpa.gob.mx. [Acceso 20 noviembre 2015].

- Snoeijers, S., Pérez-García, A., Joosten, M. y P. De Wit (2000). The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens, European Journal of Plant Pathology, 106, 493–506.
- Song, X.S., H.P. Li, J.B. Zhang, B. Song, T. Huang, X.M. Du, A.D. Gong, Y.K. Liu, Y.N. Feng, R.S. Agboola y Y.C. Liao (2014). Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for development, virulence and mycotoxin biosynthesis apart from trehalose biosynthesis in *Fusarium graminearum*. Fungal Genetics and Biology, 63, 24-41.
- Sosinska G.J, L.J. de Koning, P.W. de Groot, E.M. Manders, H.L. Dekker, K.J. Hellingwerf, C.G. de Koster y F.M. Klis (2011). Mass spectrometric quantification of the adaptations in the wall proteome of *Candida albicans* in response to ambient pH. Microbiology, 157,136–146.
- Stephenson SA, D.J. Maclean y J.M. Manners (1998). Disruption of the essential pathogenicity gene *cgDN*3 of *Colletotrichum gloeosporioides* results in a hypersensitive response in the host *Stylosanthes guianensis*. 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland, Abstract 1.8.6S
- Stergiopoulos, I., H. A. van den Burg, B. Ökmen, H.G. Beenen, S. van Liere, G.H.J. Kema y P. J.G.M. de Wit (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107, 7610-7615.
- Suh, M.J., N.D. Fedorova, S.E. Cagas, S. Hastings, R.D. Fleischmann, S.N. Peterson, D.S. Perlin, W.C. Nierman, R. Pieper y M. Momany (2012). Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the *Aspergillus Fumigatus* conidial proteome. Proteome Science, 10, 1-13.
- Tada, R., Latgé, J.P. y V. Aimanianda (2013). Undressing the fungal cell wall/cell membrane the antifungal drug targets. Current Pharmaceutical Design, 19, 3738–3747.
- Talbot, N., D.J. Ebbole y J.E. Hamer (1993). Identification and characterization of *MPGI*, a gene Involved in pathogenicity from the rice blast, fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Cell, 5, 1575-1590.
- Talbot, N., H.R.K. McCafferty, M. Ma, K. Moore y J.E Hamer (1997). Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. Physiological and Molecular Plant Pathology, 50, 179-195.
- Toruño, T.Y., I. Stergiopoulos y G.L. Coaker (2016). Plan-Pathogen Effectors: Cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. Annual Review of Phytopathology, 54, 419-441.

- Van den Ackerveken G.F.J.M., R.M. Dunn; A. Cozijnsen, J. Vossen, H. Van den Broek y P.J.G. De Wit (1994). Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene aw9 in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. Molecular and General Genetic, 243, 277-285.
- Velours, G., C. Boucheron, S. Manon y N. Camougrand (2002). Dual cell wall/mitochondria localization of the 'sun' family proteins. FEMS Microbiology Letters, 207, 165-172.
- Vialás, V., P. Perumal, D. Gutiérrez, P. Ximénez-Embún, C. Nombela, C. Gil y W.L. Chaffin (2012). Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae, and yeast form cells. Proteomics, 12, 2331–2339.
- Vishnevetsky, J., T.L. White, A.J Palmateer, M. Flaishman, Y. Cohen, Y. Elad, M. Velcheva, U. Hanania, N. Sahar, O. Dgani y A. Perl (2011). Improved tolerance toward fungal disease in transgenic cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. grand nain. Transgenic Research, 20, 61-72.
- Yoshida, Y. (1970). Effect of benzimidazole on the senescence of wheat chloroplasts and their boat shape transformation. Plant and Cell Physiology ,11, 435-444.