



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS BIOQUÍMICO-MOLECULAR DE LA
INTERACCIÓN DE *Pseudocercospora fijiensis* Y
*Trichoderma harzianum***

Tesis que presenta

JEWEL NICOLE ANNA TODD

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2019

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



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Jewel Nicole Anna Todd**, titulado “**Análisis bioquímico-molecular de la interacción de *Pseudocercospora fijiensis* y *Trichoderma harzianum***”, fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Agrobiotecnología, bajo la dirección de la Dra. Blondy Canto Canché y el Dr. Ignacio Islas Flores, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 19 de noviembre de 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



Lic. Jewel Nicole Anna Todd

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán y forma parte del proyecto de ciencia básica "Enfoque agrogenómico en el estudio de la Sigatoka negra" con clave CB2013-01 220957, financiado por el CONACYT y bajo la dirección de la Dra. Blondy Canto Canché.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por la oportunidad de estudiar la maestría haciendo uso de la mayoría de sus instalaciones, equipos y facilidades académicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 291236) durante el periodo 2017-2019 y también por el apoyo económico que proviene del proyecto “ENFOQUE AGROGENOMICO EN EL ESTUDIO DE LA SIGATOKA NEGRA” CB-2013 (clave 220957).

A mis directores de tesis, la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché, por su apoyo tanto técnico-académico como moral, y al Dr. Ignacio Islas Flores, por su atención a detalle y enseñanzas sobre las técnicas de manejo de moléculas biológicas (ARN y proteínas). Mis directores de tesis me han ayudado a crecer, creer y cambiar mi forma de pensar, por esto les agradezco infinitamente.

A los integrantes de mi comité tutorial, el Dr. Max Mizraim Apolinar y el Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela, por sus aportaciones en cada examen para el mejoramiento de la investigación.

Al Dr. Roberto Vázquez Euán, por sus aportaciones y ayuda en la técnica de tiempo real.

A los técnicos, M.C. Miguel Tzec-Simá, por su apoyo invaluable en técnicas de cultivo de los hongos, microscopía y PCR en tiempo real, y al M.C. Bartolomé Chí-Manzanero, por el apoyo técnico y aclarar las dudas cotidianas durante mi desarrollo en el laboratorio.

Al Dr. Miguel Ángel Canseco Pérez, por su ayuda en el desarrollo inicial del trabajo de investigación y su amistad durante este proceso. A la Ing. Karla Gisel Carreón Anguiano, por ser una amiga, una hermana y una maestra por dos años, su apoyo ha sido invaluable

AGRADECIMIENTOS

e inolvidable. A la M.C. Gemaly Elisama Ek Hernández, por su ayuda en la técnica de PCR en tiempo real y sus palabras de motivación.

A la M.C. Inés Arana Guevara, por su aportación de cebadores y ayuda general en el trabajo de investigación.

A mi sistema de apoyo en México, M.C. Miguel Tzec-Simá y su esposa, Rosalba, el Ing. Eddy Jovanny Turrent Robles y mis compañeros del laboratorio, Ing. Ricardo Barahona Cortés, Lic. José Rufino Gómez Tah, M.C. Osvaldo Jhosimar Couoh Dzul, la M.C. Denise Esther Gutiérrez Domínguez y la estudiante de licenciatura Celina Asteria Ayil Naal. Agradezco también a los compañeros del laboratorio del Dr. Islas, Dra. Yamily Burgos Canul y el M.C. Gilberto Andrés Muñoz, por su apoyo durante el desarrollo del tema de investigación.

A UNU-BIOLAC y BioAli-CYTED, por la oportunidad de asistir el curso corto “Producción Biotecnológica de Bioinsumos para el Control de Enfermedades en Emergentes en Plantas” de la Universidad de Antioquia y la Universidad CES en Colombia.

DEDICATORIAS

A Dios, porque al igual que muchas otras etapas en mi vida, ésta también ha sido posible gracias a su dirección.

A mi madre, Esther Elizabeth, que ha soñado, sacrificado y rezado por su hija

A mi abuelo que espera el regreso de su nieta, la científica.

A mis hermanas, Kessy y Tracey, muchísimas gracias por sus palabras de aliento durante las semanas duras. Gracias por todo.

A mi amiga, M.C. Analesa Olinda Skeete, gracias por ser mi ancla durante mi tiempo de adaptación en México y por tu apoyo moral y emocional.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ABREVIATURAS	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 Especies de <i>Musa</i>	3
1.2 Sigatoka negra y <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	4
1.3 Control biológico y <i>Trichoderma</i> sp.....	7
1.4 Genes y proteínas de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> relacionados con la patogenicidad	11
1.5 Genes y proteínas de <i>Trichoderma</i> sp. relacionados con el micoparasitismo	12
1.6 El secretoma	14
1.7 Los efectores.....	17
1.7.1 Los efectores en interacciones microbianas	21
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
CAPÍTULO II	27
MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1 Identificación de candidatos a efectores.....	27
2.2 Ensayo de interacción <i>Trichoderma harzianum</i> - <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	27
2.2.1 Ensayo de interacción en medio sólido	27
2.3 Obtención del secretoma y su secuenciación	28
2.4 Búsqueda de las proteínas secuenciadas a partir del secretoma de la interacción fúngica en las bases de datos de proteínas.....	29
2.5 El proceso de identificación de los posibles candidatos a efectores.....	29
2.6 Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	33
2.7 Diseño de cebadores	33
2.8 Análisis de expresión de los genes con qPCR	33
2.9 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido (SEM).....	34

CAPÍTULO III	35
RESULTADOS	35
3.1 Selección pre-proteómica de candidatos a efectores a partir de la revisión bibliográfica	35
3.2 Análisis proteómico de la interacción	36
3.3.1 El secretoma: una vista global de las proteínas	37
3.3.2 Proteínas identificadas en la interacción	41
3.3.3 Proteínas específicas de la interacción <i>T. harzianum</i> - <i>P. fijiensis</i>	45
3.3.4 Candidatos a efectores identificados	48
3.4 Análisis de expresión génica de los candidatos efectores pre y post- proteómicos	55
3.5 Análisis por RT-PCR de los candidatos post-proteómicos de efectores de <i>P. fijiensis</i> en la interacción en medio líquido.....	58
3.6 Amplificación por RT- PCR de los candidatos pre-proteómicos de <i>P. fijiensis</i> a partir del ADNc sintetizado de la interacción en medio líquido	59
3.7 Amplificación por RT-PCR de los efectores candidatos post-proteómicos de <i>T. harzianum</i> a partir de la interacción en medio líquido	62
3.8 Amplificación de los candidatos pre-proteómicos de efectores de <i>T. harzianum</i> en la interacción en medio líquido.....	63
3.9 Análisis de expresión usando la técnica qPCR.....	65
3.10 Observación por microscopía de la interacción <i>T. harzianum</i> - <i>P. fijiensis</i>	72
CAPÍTULO IV	79
DISCUSIÓN GENERAL	79
4.1 El análisis pre-proteómico	79
4.2 El estudio por RT-PCR de la expresión de los candidatos pre-proteómicos.....	83
4.3 Análisis post-proteómico: las proteínas presentes en el secretoma.....	83
4.4 Candidatos post-proteómicos a efectores	87
4.5 Candidatos post-proteómicos con dominios conocidos de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	87
4.6 Candidatos post-proteómicos con dominios conocidos de <i>Trichoderma harzianum</i>	88
4.7 Análisis de expresión por qPCR de los candidatos a efectores seleccionados	91
CAPÍTULO V	95
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	95
5.1 CONCLUSIONES	95
5.2 PERSPECTIVAS.....	96
BIBLIOGRAFÍA.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Ciclo de vida de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	6
Figura 1.2. Localización mediante microscopía electrónica de barrido del micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> (blanco) durante su interacción con <i>Rhizoctonia solani</i> (tomado de Almeida <i>et al.</i> , 2007).....	9
Figura 1.3 Las etapas fundamentales para los estudios de los proteomas/secretomas (modificado de De Jesus <i>et al.</i> , 2014).....	16
Figura 1.4 Modelo de inmunidad activada por la planta en la interacción planta-microorganismo (Win <i>et al.</i> , 2012).	18
Figura 2.1 Criterios utilizados para la selección de posibles candidatos a efectores	30
Figura 3.1 SDS-PAGE del secretoma de cinco días obtenido a partir de monocultivos de <i>T. harzianum</i> y <i>P. fijiensis</i> , así como de la interacción entre ambos hongos cultivados en medio mínimo..	37
Figura 3.2 Pasos seguidos para el procesamiento de las muestras de proteínas y su identificación.....	38
Figura 3.3 Distribución de las proteínas del secretoma de los monocultivos de <i>P. fijiensis</i> y <i>T. harzianum</i> así como de su interacción.....	39
Figura 3.4 Análisis GO mostrando la distribución de proteínas totales (de los monocultivos y la interacción) en relación a sus procesos biológicos	39
Figura 3.5 Análisis GO mostrando la distribución de proteínas totales (de los monocultivos y la interacción) en relación a sus funciones moleculares.....	40
Figura 3.6 Análisis GO mostrando la distribución de proteínas totales (de los monocultivos y la interacción) en relación a su localización celular.	41
Figura 3.7 Distribución de las familias InterPro para las secuencias procedentes de <i>P. fijiensis</i> en el secretoma de la interacción.	43
Figura 3.8 Distribución de las familias InterPro para las secuencias procedentes de <i>T. harzianum</i> en el secretoma de la interacción.	43
Figura 3.9 Distribución de las funciones asignadas por GO para las secuencias procedentes de <i>T. harzianum</i> en el secretoma de la interacción.....	44
Figura 3.10 Distribución de las funciones asignadas por GO para las secuencias procedentes de <i>P. fijiensis</i> en el secretoma de la interacción.	44
Figura 3.11 Proporción de proteínas específicas de la interacción, secretadas por <i>P. fijiensis</i> o <i>T. harzianum</i>	46

Figura 3.12 Bandas ribosomales de ARN total en un gel nativo de agarosa al 1%. Se analizó 3-4 µl de ARN por carril y se tiñó con bromuro de etidio	55
Figura 3.13 Amplicones de actina de <i>P. fijiensis</i> obtenidos a partir de ADNc de la interacción en un gel de agarosa de 1.5%	56
Figura 3.14 Análisis por RT-PCR de tres candidatos de <i>P. fijiensis</i> seleccionados con el enfoque post-proteómico	58
Figura 3.15 Análisis por RT-PCR de candidatos MFW28 y MF580 de <i>P. fijiensis</i> del enfoque post-proteómico en la interacción pool ADNc de los días 1,3,5 y 7.	59
Figura 3.16 Análisis por RT-PCR de candidatos pre-proteomicos de <i>P. fijiensis</i> y del enfoque post-proteómico en la mezcla de ADNc de la interacción de los días 1, 3, 5 y 7 y los controles o monocultivos	60
Figura 3.17 Amplicones de los candidatos pre-proteomicos en ADNg de <i>P. fijiensis</i>	60
Figura 3.18 Análisis por RT-PCR y visualización en gel de agarosa del efector candidato Avr4 de <i>P. fijiensis</i> seleccionado con el enfoque pre-proteómico.....	61
Figura 3.19 Análisis por RT-PCR y visualización en gel de agarosa del efector candidato Ecp6 de <i>P. fijiensis</i> seleccionado con el enfoque pre-proteómico	62
Figura 3.20 Análisis por RT-PCR de los tres candidatos de <i>T. harzianum</i> seleccionados con el enfoque post-proteómico (TH1, TH2, TH3) usando ADNc de la interacción	63
Figura 3.21 Análisis por RT-PCR de cuatro de los cinco candidatos de <i>T. harzianum</i> seleccionados con el enfoque pre- proteómico	63
Figura 3.22 Imagen de un gel de agarosa mostrando los amplicones de los candidatos pre-proteomicos obtenidos a partir de ADNg (150 ng/ul) de <i>T. harzianum</i>	64
Figura 3.23 Gráficas de barra mostrando los promedios de Cts observados para Actina durante los días 1,3,5 y 7 en el control (azul) y la interacción (rojo).	65
Figura 3.24 Curva estándar para MFW28 usando una dilución de 1:10 a partir de una concentración inicial de 100 ng/ul de ADNc	66
Figura 3.25. Gráfica de expresión relativa de los transcritos de MFW28 de <i>P. fijiensis</i> . ..	67
Figure 3.26 Curva estándar para <i>Pf-Avr4</i> usando una dilución de 1:5 a partir de una concentración inicial de 100 ng.	68
Figura 3.27 Gráfica de expresión relativa de Avr4 de <i>P. fijiensis</i> (PfAvr4)	68
Figure 3.28 Curva estándar para MF580 usando una dilución 1:5 a partir de una concentración inicial de 100 ng de ADNc.	69
Figura 3.29 Gráfica de expresión relativa de MF580 de <i>P. fijiensis</i>	70

Figura 3.30 Gráfica de expresión relativa de Pf-Ecp6 de <i>P. fijiensis</i> en interacción con <i>T. harzianum</i> o como monocultivo	71
Figura 3.31 Micrografía de microscopía electrónica de barrido de la interacción de las hifas de <i>T. harzianum</i> y <i>P. fijiensis</i> después de 7 días de cocultivo (magnificación: 1700x).	73
Figura 3.32 Micrografía de microscopía electrónica de barrido de las hifas y la producción de conidios de <i>T. harzianum</i> a los 7 días de interacción con <i>P. fijiensis</i> (magnificación:500x).....	73
Figura 3.33 Observación por microscopía óptica de la interacción de <i>T. harzianum</i> - <i>P. fijiensis</i>	74
Figura 3.34 Micrografías de microscopía óptica de la interacción al quinto día entre <i>T. harzianum</i> - <i>P. fijiensis</i> . El aumento de la imagen es de 40x.....	75
Figura 3.35 Observación por medio de microscopía de contraste de fase de la interacción <i>T. harzianum</i> - <i>M. fijiensis</i> . El aumento es de 400x.....	75
Figura 3.36 Imágenes de los monocultivos y de la interacción al día 5 de <i>T. harzianum</i> - <i>P. fijiensis</i> en medio líquido.....	76
Figura 3.37 Registro fotográfico de diversas etapas de la interacción <i>T. harzianum</i> - <i>P. fijiensis</i> en medio sólido durante los días 1, 3, 5 y 7 de su interacción.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Clasificación taxonómica de <i>P. fijiensis</i>	4
Cuadro 1.2. Clasificación taxonómica de <i>T. harzianum</i>	8
Cuadro 2.1 Las herramientas bioinformáticas usados en la identificación de candidatos.	31
Cuadro 3.1. Selección de efectores candidatos y otras proteínas relacionados con la patogenicidad después de la revisión bibliográfica.....	35
Cuadro 3.2 Familias de proteínas presentes específicamente en la interacción <i>P. fijiensis</i> - <i>T. harzianum</i>	46
Cuadro 3.3 Características de los trece candidatos a efector encontrados en <i>P. fijiensis</i> (1).....	49
Cuadro 3.4 Características de los trece efectores candidatos encontrados en <i>P. fijiensis</i> (2).....	50
Cuadro 3.5 Características de los diez efectores candidatos encontrados en <i>T. harzianum</i> (1).....	52
Cuadro 3.6 Características de los diez efectores candidatos encontrados en <i>T. harzianum</i> (2).....	53
Cuadro 3.7 Candidatos de efectores elegidos en el enfoque post-proteómico para <i>P. fijiensis</i> y <i>T. harzianum</i>	54
Cuadro 3.8 Temperaturas medias y secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en la amplificación por RT-PCR de los candidatos a efectores	56
Cuadro 3.9. Candidatos seleccionados para análisis de expresión por qPCR.....	65

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Avr	Factor de avirulencia
BIC	Complejo de interfaz biotrófico
BLAST	Herramienta básica de búsqueda para alineamiento local (de sus siglas en inglés, Basic Local Alignment Search Tool)
BSA	Albúmina de suero bovino
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico (de sus siglas en inglés, Cyclic adenosine monophosphate)
CAZy	Base de datos de enzimas activa en carbohidratos (de sus siglas en inglés, Carbohydrate-Active Enzyme database)
CBM	Motivo de unión a carbohidratos (de sus siglas en inglés, Carbohydrate-binding motif)
CFEM	Comunmente encontradas en membranas extracelulares (de sus siglas en inglés, Commonly found in extracellular membranes)
Cont	Control
DUF	Dominio de función desconocida (de sus siglas en inglés, Domain of Unknown Function)
Ecp	Proteína extracelular (de sus siglas en inglés, Extracellular protein)
EROS	Especies reactivas de oxígeno

ETI	Inmunidad activada por efectores (de sus siglas en inglés, Effector Triggered Immunity)
e.g.	Por ejemplo (latín)
et al	Y otros (latín)
E.U.A	Estados Unidos de América
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (de sus siglas en inglés, Food and Agriculture Organization of the United Naciones)
FDR	Tasa de falsos descubrimientos (de sus siglas en inglés, False Discovery Rate)
<i>g</i>	Fuerza de gravedad <i>g</i>
GH	Glicosil hidrolasa (de sus siglas en inglés, Glycoside hydrolase)
GO	Ontología de genes (de sus siglas en inglés, Gene Ontology)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HR	Respuesta hipersensible (de sus siglas en inglés, Hypersensitive response)
IDT	Tecnologías integradas de ADN (de sus siglas en inglés, Integrated DNA Technologies)
Int	Interacción
JGI	Joint Genome Institute
kDA	Kilodaltón
MAMP	Patrones moleculares asociados a microorganismos (de sus siglas en inglés, Microbe-associated molecular patterns)
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos (de sus siglas en inglés, Mitogen-activated protein kinase)
MM	Medio Mínimo
mM	Milimolar

ABREVIATURAS

NBS-LRR	Dominio de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina (de sus siglas en inglés, Nucleotide binding site-leucine rich repeat)
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (de sus siglas en inglés, National Centre for Biotechnology Information)
ng	Nanogramos
NRPS	Sintasa de péptidos no ribosomales (de sus siglas en inglés, Non-ribosomal peptide synthase)
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos (de sus siglas en inglés, Pathogen-associated molecular patterns)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (de sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction)
PDA	Medio de cultivo de papa-dextrosa-agar (de sus siglas en inglés, Potato dextrose agar)
Pf	<i>Pseudocercospora fijiensis</i>
Pfam	Base de datos de familias de proteínas (de sus siglas en inglés, Protein families database)
PHI	Base de datos de la interacción patógeno-hospedero (de sus siglas en inglés, Pathogen-Host Interaction database)
PKS	Policétido sintasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares (de sus siglas en inglés, Pattern recognition receptor)
PTI	Inmunidad activada por patógenos (de sus siglas en inglés, Pathogen-triggered immunity)
qPCR	PCR cuantitativa (de sus siglas en inglés, Quantitative PCR)
RT-PCR	Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (de sus siglas en inglés, Reverse Transcriptase coupled to polymerase chain reaction)
RALF	Factor de alcalinización rápido (de sus siglas en inglés, Rapid alkalization factor)

rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (de sus siglas en inglés, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)
Th	<i>Trichoderma harzianum</i>
TM	Dominio transmembranal
var.	variedad
µg	Microgramos
µL	Microlitros

RESUMEN

Las interacciones microbio-microbio se han explorado mucho menos que las interacciones planta-microbio debido a la importancia económica de muchas de las plantas hospederas y a las pérdidas causadas por los patógenos. Las proteínas efectoras desempeñan un papel clave en la interacción planta-patógeno, pues influyen en el desarrollo de la enfermedad. Es probable que estas proteínas también sean importantes en las interacciones entre los microorganismos. Este trabajo tuvo como objetivo identificar candidatos de efector en la interacción entre el agente de control biológico *Trichoderma harzianum* y *Pseudocercospora fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra que afecta los cultivos de *Musa*. Para ello, primero se realizó una búsqueda bioinformática en los genomas de ambos hongos *in silico*, para seleccionar candidatos de efectores de tipo pre-proteómico. Enseguida, a partir de la interacción en medio de cultivo líquido de *P. fijiensis*-*T. harzianum*, se realizó una precipitación de las proteínas secretadas por ambos hongos al medio de cultivo líquido. La secuenciación de las proteínas secretadas resultó en la identificación de un total de 363 proteínas, 145 procedentes de *P. fijiensis* y 218 de *T. harzianum*. La búsqueda en las bases de datos de UniProt y NCBI para la identificación de cada proteína, así como de un escrutinio utilizando las características descritas en la literatura para los efectores proteicos permitió la identificación post-proteómica de candidatos a efectores. Se encontraron 13 candidatos para *P. fijiensis* y 10 para *T. harzianum*. A partir de las listas de los candidatos a efectores pre- y post-proteómicos, se seleccionaron los candidatos que amplificaron en ADNg de los dos hongos, esto con el objetivo de estudiar su expresión génica por RT-PCR y posteriormente se seleccionaron cuatro candidatos para analizar su expresión por medio de RT-qPCR. El análisis de expresión de los candidatos se realizó en los días 1,3,5 y 7 de la interacción en medio líquido. En el análisis de RT-qPCR, los candidatos mostraron varios niveles de expresión génica, pero en su mayor parte, los transcritos de *P. fijiensis* tuvieron baja expresión en la interacción con *T. harzianum* en relación al control. El efector proteico PfAvr4 (pre-proteómico) y un candidato llamado 'MFW28' (post-proteómico) mostraron niveles y perfiles similares con sobreexpresión en el día 3 de la interacción en relación al control. Los candidatos MF580 (post-proteómico) y PfEcp6 (pre-proteómico) mostraron baja expresión en todos los días de la interacción con respecto al control. La expresión de los candidatos estudiados en *P. fijiensis* mostró regulación de la expresión debido a la presencia de *T. harzianum* en la interacción. También

se detectaron efectores proteicos descritos en la literatura como componentes de la interacción *Musa* sp- *P. fijiensis*; sin embargo, MF580 no se encontró en ninguno de los reportes previos, por lo tanto, se consideró un nuevo candidato a efector que posiblemente es específico de esta interacción hongo-hongo. Los resultados del trabajo de investigación indican que algunos efectores que desempeñan funciones importantes en la interacción planta-patógeno también pueden ser encontrados en interacciones microbianas.

ABSTRACT

Microbe-microbe interactions have been investigated to a lesser extent than the interactions involving the plant host and the microorganism or pathogen. This is due to the agro-economic importance of said interaction as plant infection by pathogens can result in devastating losses for those involved in the cultivation and processing of these crops. Certain proteins called effectors play a key role in disease development in plants caused by microorganisms, but it is likely that these proteins are also important in microbial interactions. We hypothesize that a microbe-microbe interaction can induce effector expression in the fungus, *P. fijiensis*. This investigation seeks to identify *P. fijiensis* effectors in *in vitro* interaction with a common biological control agent, *Trichoderma harzianum*. First, bioinformatic screening of the genomes of both organisms allowed for the identification of effector candidates that were denominated 'pre-proteomic' candidates. Subsequently, candidates were selected based on experimental evidence and were called 'post-proteomic' candidates due to them being found in the sequenced proteome (secretome) of the two fungi in interaction after 5 days. The sequencing of these proteins by LC-MS/MS resulted in the identification of 363 proteins, 145 belonging to *P. fijiensis* and 218 to *T. harzianum*. Using UniProt and NCBI, the identities of some of the proteins were found and the lists of proteins were screened for effector candidates using characteristics commonly reported in previous articles. Thirteen (13) candidates were found for *P. fijiensis* and 10 for *T. harzianum* after the analysis and candidates from these lists as well as the 'pre-proteomic' candidates list were selected for further study. All effector candidates that amplified in DNA were chosen to study gene expression by RT-PCR and then four candidates were short-listed for analysis by RT-qPCR for 1,3,5 and 7 days of the two fungi in interaction in liquid medium. In the analysis of gene expression using RT-qPCR, the *P. fijiensis* candidates showed various expression profiles but for the most part, the transcripts were downregulated in the interaction with *T. harzianum*. Characterized effector, PfAvr4, and a candidate identified as 'MFW28' showed similar profiles with up-regulation in the third day of interaction. New candidate 'MF580' and PfEcp6 were downregulated in all interaction days with respect to the control. The expression of the candidates of *P. fijiensis* studied seem to be regulated by the presence of *T. harzianum* but the molecule or set of molecules responsible remains to be investigated. Certain effectors in this study were also found in the *Musa sp.*-*P. fijiensis* interaction secretome (MFW28), transcriptome (PfEcp6, PfAvr4) and *in vitro* growth of *P.*

ABSTRACT

fijiensis in liquid media with banana extract (PfEcp6, PfAvr4). One candidate (MF580) is a new effector, never reported in biological interactions, that is possibly specific to this microbial interaction studied. The results of this investigation show that some effectors that play a role in plant-pathogen interaction can be uncovered in microbial interactions.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de la Sigatoka negra, causada por el hongo hemibiotrófico, *Pseudocercospora fijiensis*, afecta a plátanos y bananos (*Musa* sp.), causando daño foliar generalizado y, por ende, reducción en la producción de frutos. *P. fijiensis*, se dispersa por medio del viento o de la lluvia por medio de esporas resultantes de su reproducción sexual (ascosporas) o asexual (conidios). A medida que en la planta la enfermedad se desarrolla hacia etapas tardías, también destruye el área fotosintética de la hoja, lo que resulta en su marchitamiento y en la maduración prematura de los frutos. Plátanos y bananos poseen características genéticas y fisiológicas que los distinguen entre sí; sin embargo, para propósitos de este estudio ambos serán incluidos en el término banano.

El manejo de la enfermedad generalmente se realiza mediante la aplicación repetida de fungicidas sistémicos y de contacto durante todo el año. Esto no solo es costoso, sino que tiene implicaciones indeseables para el medioambiente y la inocuidad de los frutos, debido a la contaminación y los efectos residuales de los productos químicos. Por lo tanto, es imperativo buscar nuevas alternativas para el manejo de la Sigatoka negra; por ejemplo, mediante el uso de agentes de control biológico, cuyo efecto contra *P. fijiensis* ha sido escasamente estudiado. Las especies del hongo *Trichoderma* son agentes de control biológico capaces de antagonizar varios fitopatógenos. El mecanismo de antagonismo de *Trichoderma* sp. puede atribuirse a la competencia por nutrientes y a la secreción de una amplia gama de proteínas relacionadas con la virulencia *i.e.*, efectores, enzimas que degradan la pared celular fúngica y metabolitos secundarios. Por otra parte, *P. fijiensis* utiliza proteínas similares para la infección de especies de *Musa*, es por ello que en la interacción con *T. harzianum*, proponemos que *P. fijiensis* secretará proteínas de virulencia para contraatacar a su antagonista y para defenderse.

Entre las proteínas que conforman el secretoma de los hongos, las proteínas de virulencia llamadas efectores desempeñan un papel importante en las interacciones microbianas y en la infección del hospedero y su colonización. Estas proteínas facilitan el desarrollo de la enfermedad ya sea suprimiendo las defensas del hospedero o interfiriendo con el reconocimiento del patógeno por parte del hospedero; no obstante, el mecanismo por el cual los efectores fúngicos estimulan la virulencia de los hongos no es del todo conocido.

INTRODUCCIÓN

Se espera que con un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de estas proteínas se puedan desarrollar nuevos métodos de control de los fitopatógenos. La identificación de los efectores fúngicos de tipo proteico es el primer paso para caracterizar estas moléculas en las diversas interacciones. Hasta el momento, no se conoce ningún estudio donde se haya analizado la expresión o la identificación de los efectores que pudieran estar presentes en la interacción entre *P. fijiensis* y *T. harzianum*. Este estudio tiene como objetivo investigar la interacción entre estos dos hongos para identificar a candidatos de efectores proteicos que cada hongo podría estar empleando para atacar o defenderse de su contraparte.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Especies de *Musa*

Los bananos son plantas monocotiledóneas del género *Musa* (Familia: *Musaceae*, Orden: Zingiberales) que se originaron en el sudeste asiático. Son hierbas gigantes, comúnmente de hasta 3 m de altura, sin la lignificación o engrosamiento secundario de los tallos característicos de los árboles (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2007). Anualmente, 140 países de las regiones tropicales y subtropicales producen cerca de 144 millones de toneladas de frutos de banano, convirtiendo al banano en el sexto cultivo más importante del mundo en valor de producción (Alakonya *et al.*, 2018). La planta de banano se propaga de forma vegetativa a partir de la planta madre; los cormos se plantan por separado para desarrollar nuevas hojas y sistemas de raíces.

La mayoría de los bananos comestibles pertenecen a la sección Eumusa (subsección de *Musa* que tiene 22 cromosomas), y son híbridos diploides o triploides de *Musa acuminata* (genoma A) o producto de hibridación con *Musa balbisiana* (genoma B). La evolución de los bananos silvestres a los comestibles implicó la supresión de semillas y el desarrollo de partenocarpia. La fusión de gametos diploides con gametos haploides generó genotipos triploides estériles. La selección humana a través de la propagación vegetativa ha producido los triploides cultivados actualmente, incluidas las variedades puras de *M. acuminata* (AAA) y las variedades interespecíficas de *M. acuminata* × *M. balbisiana* (AAB, ABB) (Perrier *et al.*, 2011).

En la actualidad, la variedad de banano más cultivada es el cultivar Cavendish, pero su poca variabilidad genética debido a las extensas áreas de monocultivo y su susceptibilidad a la Sigatoka negra y otras enfermedades lo ponen en alto riesgo. En gran medida, la popularidad actual en el consumo del banano Cavendish se debe a que la variedad Gros Michel, hasta hace algunas décadas la más consumida, resultó altamente susceptible al hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, agente causal de la enfermedad conocida como mal de Panamá y que devastó a este cultivo. Otra enfermedad fúngica importante es la enfermedad de la Sigatoka negra, causada por el hongo *P. fijiensis* y que puede causar

pérdidas de entre 35-100% de la producción de banano sino se le controla (Marín *et al.*, 2003; Alakonya *et al.*, 2018)

1.2 Sigatoka negra y *Pseudocercospora fijiensis*

La Sigatoka negra, es una enfermedad causada por el hongo hemibiotrófico, *Pseudocercospora fijiensis*, que afecta el área foliar del hospedero. La enfermedad es parte del complejo Sigatoka, que involucra a otros dos patógenos evolutivamente relacionados con *P. fijiensis*: *Pseudocercospora musae*, agente causal de la Sigatoka amarilla; y *Pseudocercospora eumusae*, causante de la enfermedad de la mancha foliar del banano (Arango-Isaza *et al.*, 2016). Entre las tres especies, *P. fijiensis* es el miembro más virulento y predominante del complejo de Sigatoka en todo el mundo (Arango-Isaza *et al.*, 2016). La clasificación taxonómica de *P. fijiensis* se describe en el Cuadro 1.1.

Cuadro 1.1. Clasificación taxonómica de *P. fijiensis*

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Dothidiomycetes
Orden	Capnodiales
Familia	Pseudocercosporaceae
Género	<i>Pseudocercospora</i>
Especie	<i>P. fijiensis</i> Morelet

P. fijiensis se reproduce asexualmente a través de conidios, y sexualmente a través de ascosporas, dichas estructuras se depositan sobre la superficie de las hojas de banano mediante el aire o el agua. En condiciones de alta humedad o presencia de agua en las hojas, las esporas germinan y en un plazo de 2-3 horas posteriores al contacto forman micelio que inicialmente crece de manera epifítica en la superficie de la hoja. Posteriormente, el micelio penetra al espacio intercelular de la hoja a través de los estomas (Figura 1.1). Una vez en el interior, *P. fijiensis* coloniza los espacios intercelulares sin causar daño aparente al hospedero (fase biotrófica), posteriormente, el hongo cambia a una etapa

altamente agresiva (fase necrotrófica) donde aparecen las primeras lesiones de la enfermedad, las cuales rápidamente progresan para matar al tejido foliar. El periodo de aparición de los síntomas de la enfermedad es variable y en el campo puede abarcar desde los 30 hasta los 72 días, dependiendo del cultivar y de las condiciones climáticas (Churchill, 2011).

Las condiciones óptimas para la germinación de las esporas de *P. fijiensis* son los climas cálidos y húmedos y, como tal, la enfermedad es predominante en los países tropicales cerca del ecuador. El primer reporte de la enfermedad se originó en el sudeste asiático en 1963, luego se documentó en América Central (Honduras) en 1972 y para 1998 ya estaba presente en todas las regiones productoras de banano de América Latina (Henderson *et al.*, 2006).

El cultivo comercial de banano generalmente se realiza a través de monocultivo a gran escala de la variedad Cavendish, un cultivar susceptible a la Sigatoka negra. Existen variedades resistentes como Calcutta 4 y Yangambi km 5 (Escobar-Tovar *et al.*, 2015), sin embargo en Camerún y Costa Rica se reportó la pérdida de la resistencia en Yangambi km 5 (Moulim-Pefoura, 1999; Escobar-Tovar *et al.*, 2015). El hecho de que la mayoría de estos cultivares sean estériles e inadecuados para la producción de líneas resistentes requiere el uso intensivo de fungicidas como el principal medio para el control de la Sigatoka negra (Churchill, 2011). La aplicación de fungicidas de contacto y sistémicos a menudo debe realizarse más de 60 veces al año para alcanzar el control suficiente (Ganry *et al.*, 2012) lo cual aumenta el costo de producción de 25 hasta 30% (Alakonya *et al.*, 2018). Esto no solo es costoso, sino que tiene implicaciones para la seguridad alimentaria y ambiental debido a la contaminación y los efectos residuales de los productos químicos en alimentos y fuentes de agua. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas para el manejo de la enfermedad de la Sigatoka negra; una posibilidad consiste en el control biológico.

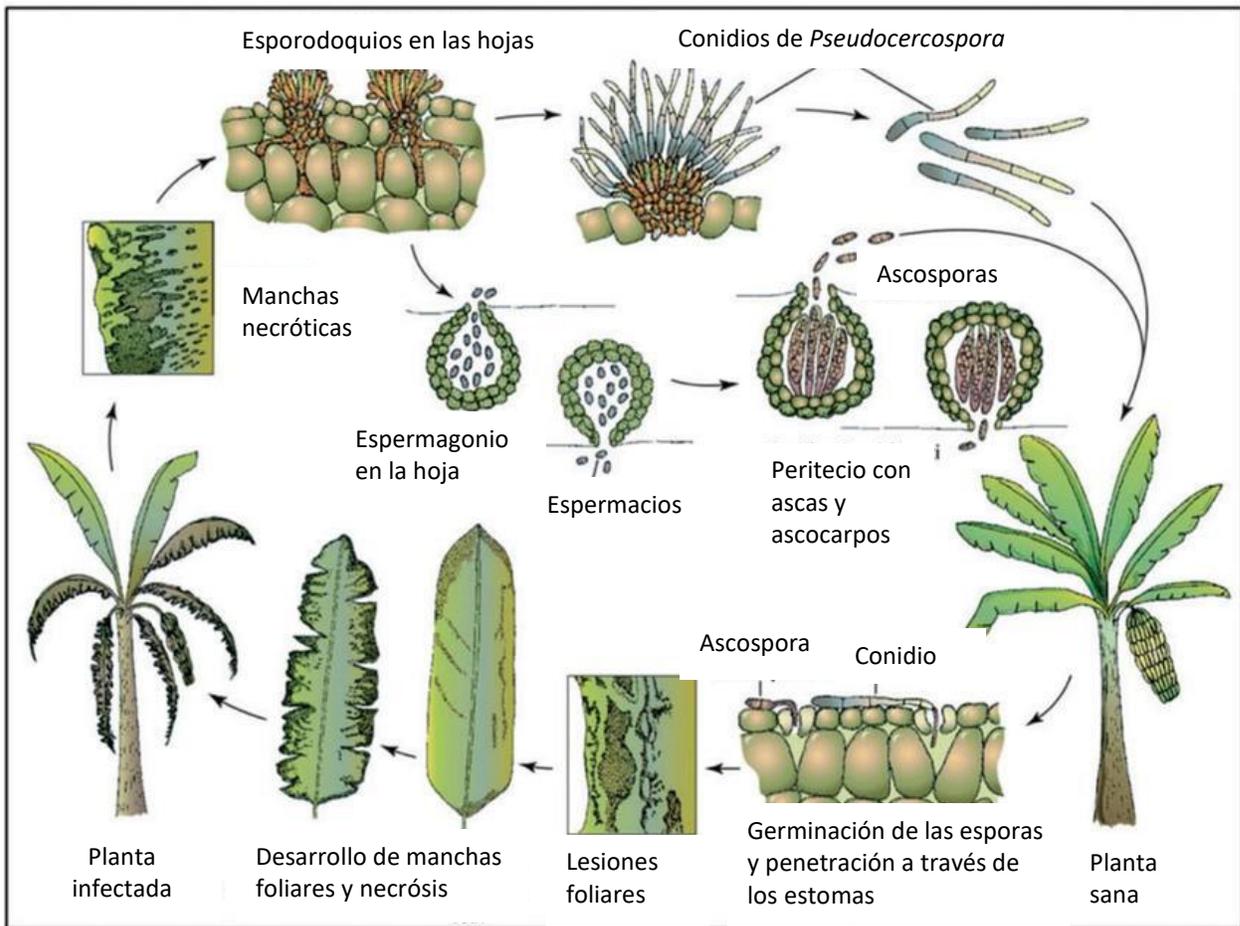


Figura 1.1 Ciclo de vida de *Pseudocercospora fijiensis*. El ciclo de la enfermedad consta de cuatro etapas: llegada y germinación de las esporas en la planta sana, penetración del hospedero, proliferación y desarrollo de signos de la enfermedad en el hospedero (manchas foliares) y la producción de esporas nuevas a partir de los sitios de infección. Las esporas sexuales (ascosporas) y asexuales (conidios) se dispersan por aire y lluvia para propagar la enfermedad en las plantas sanas vecinas (Modificado de Churchill *et al.*, 2011).

1.3 Control biológico y *Trichoderma* sp.

La domesticación de las plantas y la mecanización de la agricultura dieron lugar a la producción a gran escala. La presión para alimentar a miles de millones de personas ha resultado en una mayor superficie cultivada y en el aumento correlativo de plagas que aprovechan esta abundancia de alimento. Como resultado, ha aumentado el uso de pesticidas para controlar las plagas que causan pérdidas en el rendimiento de las cosechas. La FAO reportó que, en el mundo, en 1990 la cantidad de pesticidas utilizada por hectárea era de 1.5 kilogramos mientras que en el 2016 dicha cantidad se incrementó a 2.57 kilogramos (FAOSTAT, 2019). Los residuos de pesticidas se acumulan en el suelo, el aire, y en las aguas superficiales y subterráneas, representando riesgos significativos para el medioambiente, organismos no patógenos y los microorganismos benéficos del suelo (Aktar *et al.*, 2009). El control biológico involucra el uso de organismos como insectos, bacterias y hongos para el control de plagas, malezas y agentes causales de enfermedades. El término “control biológico” también se ha aplicado al uso de productos naturales extraídos o fermentados de diversas fuentes. Howell (2003), definió el control biológico como una combinación de diferentes mecanismos que trabajan en sinergia para lograr el control de una enfermedad. Por lo general, los agentes de control biológico tienen una alta especificidad por sus hospederos y limitan los riesgos para la salud y la pérdida de biodiversidad para el medioambiente. Los micoparásitos conforman un tipo de agente de control biológico y son hongos que se alimentan de otros hongos. Los mecanismos comunes que utilizan incluyen la secreción de antibióticos y enzimas líticas, inducción de la resistencia del hospedero, competencia por los nutrientes y la alimentación directa a partir del hongo hospedero (Pal y McSpadden Gardener, 2006). Uno de los agentes de control biológico más utilizados es el micoparásito, *Trichoderma* sp.

El género *Trichoderma* (Cuadro 1.2) comprende a hongos filamentosos aislados a partir del suelo o de asociaciones con las raíces de las plantas donde cohabitan como endófitos. Bajo tales condiciones pueden actuar como antagonistas de los hongos patogénicos de las plantas (Kubicek *et al.*, 2011). *Trichoderma* se encuentra en el filum Ascomycota con más de 250 especies de hongos en el género (Bissett *et al.*, 2015). Hoy en día se considera que *Trichoderma harzianum* es un complejo de especies que presentan morfologías similares pero son filogenéticamente distintos (Chaverri *et al.*, 2015). Varias especies comunes han

perdido su capacidad de reproducirse sexualmente y se han convertido en especies clonales, por ejemplo, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma reesei* (Druzhinina *et al.*, 2012) y es raro encontrar el estado sexual (Chaverri *et al.*, 2015). La etapa sexual (teleomorfa) se conoce con el nombre genérico de *Hypocrea*, mientras que la etapa asexual (anamorfa o mitospórica) se llama *Trichoderma*.

Cuadro 1.2. Clasificación taxonómica de *T. harzianum*.

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Genero	<i>Trichoderma</i>
Especie	<i>T. harzianum</i>

Los micoparásitos más comunes del género son *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma harzianum* (Harman *et al.*, 2004). *Trichoderma* sp. es el agente de control biológico más exitoso debido a su capacidad de utilizar un conjunto diverso de mecanismos para micoparasitar y representa más del 60% de los biofungicidas registrados y disponibles (Waghunde *et al.*, 2016). En muchas interacciones micoparasitarias, *Trichoderma* se une al hospedero enrollando sus hifas, formando estructuras tipo apresorio en la superficie, penetrando en las células y colapsando las hifas del hospedero (Steyaert *et al.*, 2003). Se ha demostrado que los hongos del género *Trichoderma* son agentes de control biológico adecuado para algunos de los hongos más destructivos en la agricultura, tal es el caso de los necrotrófos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani* (Dubey *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2011; Freeman *et al.*, 2004) pero su amplio rango de control llega hasta los hemibiotrofos como *Pseudocercospora fijiensis*. La Figura 1.2 muestra el enrollamiento de las hifas de *Trichoderma harzianum* sobre *Rhizoctonia solani* como parte del proceso de micoparasitismo en una interacción *in vitro*. Cabe mencionar

que la interacción entre *Trichoderma* y su contraparte en la interacción es específica (Sharma *et al.*, 2017).

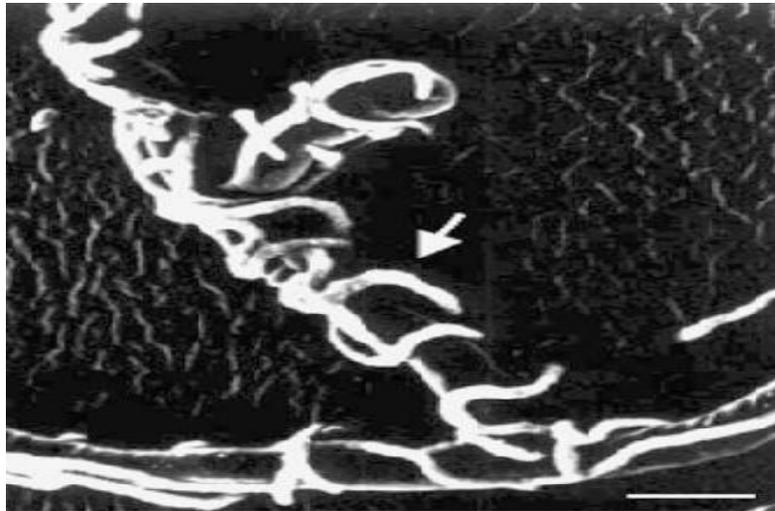


Figura 1.2. Localización mediante microscopía electrónica de barrido del micelio de *Trichoderma harzianum* (blanco) durante su interacción con *Rhizoctonia solani* (tomado de Almeida *et al.*, 2007).

En la búsqueda de mecanismos para controlar a *P. fijiensis*, se ha evaluado el efecto antagónico de varias especies de *Trichoderma* y algunas especies fueron capaces de reducir el crecimiento de *P. fijiensis in vitro*, así como el porcentaje de infección en plantas cultivadas en invernadero (Arzate-Vega *et al.*, 2006). Además, *Trichoderma harzianum* T3 inhibió *in vitro* el crecimiento del micelio de *P. fijiensis* (62.2-67.8%), tan solo 4 días después de la inoculación (Galarza *et al.*, 2015). Por otra parte, en Brasil, en un estudio en campo, se probaron 29 aislamientos de *Trichoderma* sp. para el control de la Sigatoka negra y *Trichoderma atroviride* fue tan eficaz como el fungicida Azoxystrobin para controlar la enfermedad (Cavero *et al.*, 2015).

Desde 1920 se sabía que *Trichoderma* sp. tenía potencial para el control biológico (Harman *et al.*, 2006) y más recientemente los diversos mecanismos para llevar a cabo el micoparasitismo de los fitopatógenos han sido descritos. Benítez *et al.* (2004) resaltaron la competencia por la nutrición, el micoparasitismo a través de la producción de enzimas hidrolíticas, tales como quitinasas, glucanasas y proteasas, metabolitos como toxinas y

antibióticos y la modificación del ambiente del hospedero, y todo ello resulta en el control biológico del patógeno. Waghunde y colaboradores (2016) describieron los mecanismos de control biológico como: 1) el antagonista puede crecer más rápido o usar más eficientemente una fuente de alimentación con respecto al patógeno, 2) el antagonista puede secretar un compuesto que disminuye la velocidad o inhibe completamente el crecimiento del patógeno (antibiosis), 3) el antagonista puede alimentarse directamente del patógeno (parasitismo), 4) el antagonista puede estimular a una planta u otro organismo para producir una sustancia química que lo proteja del patógeno, (resistencia sistémica inducida) y, 5) el antagonista puede crecer de forma endofítica en otras especies (plantas, por ejemplo) y apoya su crecimiento.

Es muy probable que *Trichoderma* reconozca señales del hongo hospedero y provoque la transcripción de genes relacionados con el micoparasitismo (Omann & Zeilinger, 2010). El crecimiento *in vitro* de *Trichoderma* sp. hacia el patógeno primero ocurre por la quimiotaxis debido a las señales difusibles secretadas por el patógeno que empieza la interacción antes de que ocurra un contacto físico (Chet *et al.*, 1981). La percepción de esas señales da lugar a la secreción de moléculas como enzimas líticas tipo quitinasas que ayudan en la penetración de la pared celular del patógeno. Zeilinger & Omann (2007), mencionaron que el micoparasitismo por *Trichoderma* sp., resulta en la penetración de la pared celular del hongo hospedero y el uso de su contenido celular, característica que se favorece en gran parte debido a la presencia de las enzimas hidrolíticas (quitinasas, glucanasas y proteasas) que se inducen antes del contacto con el hospedero. Aparte, la alta capacidad reproductiva, la capacidad de sobrevivir en condiciones desfavorables, la eficiencia en la utilización de nutrientes y la fuerte virulencia contra hongos fitopatógenos, convierten a *T. harzianum* en un hongo altamente exitoso para el control biológico (Benítez *et al.*, 2004). Hoy en día, se sabe que esta virulencia en parte se debe a la secreción de moléculas de tipo efectores que incluyen proteínas, metabolitos secundarios y posiblemente ARNs (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2018; Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019).

Las especies de *Trichoderma* son útiles no solo para la agricultura, sino también para la biotecnología. Sus enzimas líticas como las celulasas y hemicelulasas se utilizan en la industria alimentaria y textil, así como en la producción de biocombustibles, dado que se utilizan para degradar desechos orgánicos (Kubicek *et al.*, 2011). Además, *Trichodema* sp.

es fuente de amilasas (Mohamed *et al.*, 2011; Mahmood & Rahman, 2008) y las quitinasas (Kovacs *et al.*, 2004; Nampoothiri *et al.*, 2004; Sandhya *et al.*, 2004). Por otra parte, algunos aislados de *Trichoderma* tienen tolerancia a los metales pesados como níquel, arsénico y zinc y por ello, se podrían utilizar en la biorremediación del suelo o para estimular el crecimiento de plantas remediadoras en suelos contaminados (Adams *et al.*, 2007; Arriagada *et al.*, 2009) Estas características codificadas en el genoma de las diferentes especies de *Trichoderma* lo hacen un hongo verdaderamente benéfico con más de una aplicación en la agricultura y la biotecnología.

1.4 Genes y proteínas de *Pseudocercospora fijiensis* relacionados con la patogenicidad

El tamaño del genoma de *P. fijiensis* es de 74 Mb con 13,107 genes ubicados en 56 "scaffolds"; un genoma más grande que el promedio de otros organismos del mismo orden, debido a su cantidad de elementos retrotransponibles tipo LTR (Long Terminal Repeats, de sus siglas en inglés) (Arango-Isaza *et al.*, 2016). En la secuencia del genoma publicado por Arango Isaza *et al.* (2016) se observó que dicho genoma contiene un número reducido de enzimas que degradan la pared celular e.g. cutinasas, xilanasas, quitinasas y proteínas que se unen a carbohidratos, incluidas las que tienen módulos de unión a quitina y de unión a celulosa, así como β -glucosidasas, en comparación con las encontradas en los *Dothideomycetes* necrotróficos *Phaeosphaeria nodorum*, *Pyrenophora tritici-repentis* y *Cochliobolus heterostrophus*. En cambio, el número de genes que codifican a péptido sintetetas no ribosómicas (NRPS) en *P. fijiensis* (13 genes NRPS y un híbrido NRPS-PKS) se mantienen en niveles comparables al número existente en los necrótrofos *P. tritici-repentis* y *C. heterostrophus* y es mayor a los 5 genes de NRPS encontrados en el saprófito, *Neurospora crassa*.

Escobar-Tovar *et al.* (2015) compararon el proteoma recuperado *in vitro* e *in planta* de cepas virulentas y avirulentas de *P. fijiensis* y encontraron que entre las proteínas expresadas diferencialmente *in planta* estaban una proteína cerato platanina, Ecp2 (efector previamente caracterizado en *C. fulvum*), una exo-beta-1,3-glucanasa y proteínas hipotéticas. Noar & Daub (2016), compararon el transcriptoma de *P. fijiensis* durante la fase

necrotrófica de la infección en planta respecto al transcriptoma del crecimiento saprófito en medio de cultivo *in vitro* y encontraron que los genes involucrados en el metabolismo secundario tenían una mayor expresión en el tejido foliar infectado, incluidos los genes que codifican a proteínas citocromo P450, deshidrogenasas de cadena corta y las oxidorreductasas de la superfamilia de la oxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato y Fe (II). Otros genes relacionados a patogenicidad que tuvieron una mayor expresión en el tejido foliar infectado fueron los que codifican alsalicilato hidroxilasa, las hidrofobinas, proteínas que contienen el dominio CFEM y genes que codifican para proteínas secretadas y ricas en cisteína, esta última, característica de los efectores.

1.5 Genes y proteínas de *Trichoderma* sp. relacionados con el micoparasitismo

El tamaño estimado del genoma de los hongos de *Trichoderma* sp. está entre 31 a 39 Mb y de 3 a 7 cromosomas (Srivastava *et al.*, 2014). El genoma disponible para *Trichoderma harzianum* CBS 226.95 v1.0 en el base de datos del JGI (de sus siglas en inglés Joint Genome Institute), tiene un tamaño 40.98 Mb con 14,095 genes en 532 "scaffolds" ("andamios de ADN") (Druzhinina *et al.*, 2018). En el genoma de *T. harzianum* T6776 se codifican cerca de 11,497 proteínas, según un estudio bioinformático realizado por Mendoza-Mendoza *et al.* (2018).

Kubicek *et al.* (2011) encontraron que los genomas de *T. virens*, *T. atroviride* y *T. reesei* tienen 256, 242 y 193 glicosil hidrolasas, respectivamente, y 36, 29 y 20 de éstas pertenecen a la familia GH18, la cual participa en la degradación de quitina. Por su parte, Ferreira Filho *et al.* (2017) reportaron 259 glucosil hidrolasas en *T. harzianum*. Kubicek *et al.* (2011) reportaron que, en comparación con 14 hongos de varios estilos de vida, el único que tiene una cantidad similar de glicosil hidrolasas es el hongo saprófito *Nectria haematococca* (*Fusarium solani*), agente devastador de vegetales dado que causa la enfermedad conocida como la marchitez inducida por *Fusarium* o Fusariosis vascular. Aparte de las quitinasas, *Trichoderma* tiene uno de los conjuntos más grandes de proteasas entre los hongos y aunque *T. reesei*, *T. atroviride* y *T. virens* tienen cantidades similares entre sí, aproximadamente el 75% de ellas son únicas para cada especie (Druzhinina *et al.*, 2012). Seidl *et al.* (2009) mostraron que el ataque a *Rhizoctonia solani* por parte de *T. reesei*, *T. atroviride* o *T. virens* estuvo acompañado por la expresión de genes que codifican

a varias familias de proteasas extracelulares y transportadores de oligopéptidos y aminoácidos.

El estilo de vida micoparasitario de *Trichoderma* (Kubicek *et al.*, 2011; Druzhinina *et al.*, 2012) sugiere que el repertorio de compuestos biosintéticos, particularmente en *T. atroviride* y *T. virens*, son necesarios para el ataque contra otros microbios. Estos incluyen compuestos como pirógenos, terpenoides, esteroides y policétidos. Los metabolitos secundarios de *Trichoderma* como harzianolida, 6-pentil- α -pirona y pequeños péptidos antimicrobianos conocidos como peptaiboles, también juegan un papel en la inducción de respuestas de defensa de las plantas (Hermosa *et al.*, 2012). Hasta la fecha se conocen más de 700 secuencias de peptaiboles, principalmente de origen *Trichoderma* / *Hypocrea* (Degenkolb *et al.*, 2006).

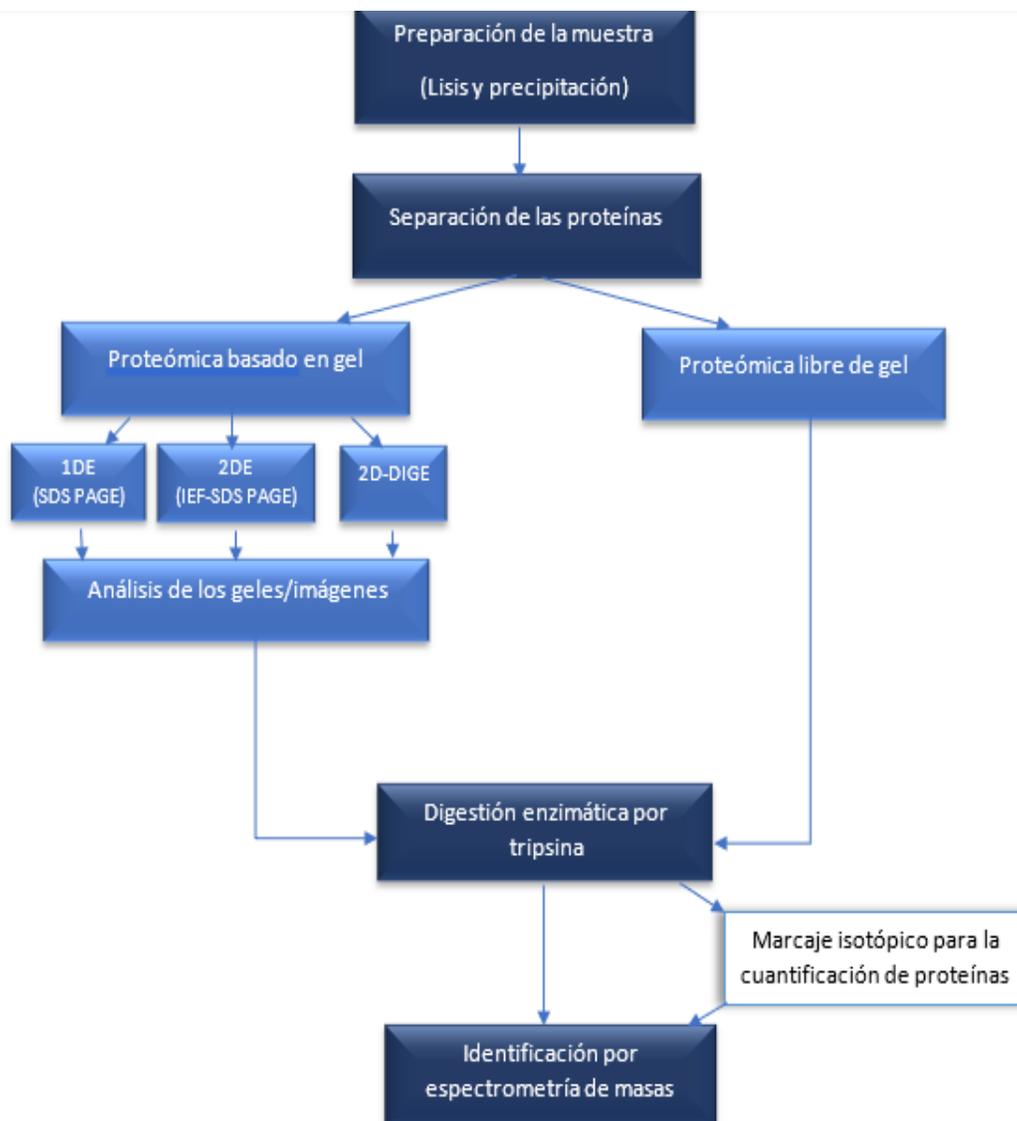
En lo que se refiere a las proteínas secretadas, ricas en cisteína, Guzmán-Guzmán *et al.* (2017) encontraron 233 efectores putativos en *Trichoderma* sp (*T. atroviride*, *T. virens* y *T. reesei*). En este conjunto de efectores, 145 se agruparon en familias funcionales. Estas familias fueron: i) proteínas de tiorredoxina, identificadas como posibles efectores durante las interacciones planta-hongo o micoparasitarias y que actúan como antioxidantes, lo que facilita la reducción de otras proteínas mediante el intercambio de cistina (disulfuro) a cisteína (tiol); ii) proteínas con dominios CFEM (“Commonly Found in Extracellular Membranes”); estas proteínas se encuentran en la parte más externa de la membrana y en la pared celular y se han descrito como receptores de superficie celular, transductores de señal o como moléculas de adhesión en interacciones hospedero-patógeno; iii) proteínas tipo ceratoplatanina, las cuales, se ha reportado que son capaces de provocar respuestas de defensa en plantas como el algodón o el maíz; iv) proteasas de serina, involucradas en el metabolismo de hongos; v) hidrofobinas que son proteínas secretadas con altos niveles de hidrofobicidad y ocho residuos conservados de cisteína; se localizan en la superficies externa de las paredes celulares de hifas y conidios, donde median las interacciones entre el hongo y superficies hidrofóbicas; y vi) metaloproteasas, enzimas proteolíticas de hongos patógenos asociados con la degradación tisular.

1.6 El secretoma

La proteómica ha permitido realizar estudios sistemáticos de las proteínas secretadas por los patógenos durante las interacciones con otros microorganismos o sus hospederos (Wang *et al.*, 2013), dando lugar a un nuevo término, el secretoma (Agrawal *et al.*, 2010). La definición propuesta por Agrawal *et al.* (2010) hace referencia a un grupo global de proteínas secretadas en el espacio extracelular por una célula, un tejido, un órgano o organismo en cualquier momento o condición, no obstante, si se trata de mecanismos de secreción conocidos o desconocidos. El secretoma ha sido una fuente importante de información en los estudios de proteínas extracelulares y las proteínas usualmente se caracterizan por la presencia de un péptido señal, aunque también hay proteínas secretadas que carecen de dicho péptido ("leaderless proteins"; Sperschneider *et al.*, 2015). Lowe & Howlett (2012), usando el programa SignalP para la predicción de péptidos señal y los genomas de más de 40 hongos, publicaron que del 4-14% de las proteínas totales de los hongos pertenecen al secretoma. Estas proteínas están involucradas en procesos diversos tales como la formación y mantenimiento de la pared celular, adquisición de nutrientes, división celular, reproducción sexual, virulencia y defensa e incluyen enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymes), oxidorreductasas, proteasas y lipasas (Girard *et al.*, 2013).

En la literatura, los estudios del secretoma han revelado proteínas relacionadas con la patogenicidad y han sido útiles en la búsqueda de proteínas secretadas (SSPs) llamadas efectores. Estas búsquedas pueden ser *in silico* usando herramientas bioinformáticas o por experimentación *in vitro* e *in vivo* usando métodos de proteómica basados en separación en gel e incluso en metodologías libres de gel, tal como se muestra en la Figura 1.3. En el genoma del hongo necrotrófico, *Sclerotinia sclerotiorum*, un análisis *in silico* (usando programas como SignalP, TargetP and TMHMM) identificó 745 proteínas secretadas con 73 candidatos a efectores, 17 de ellos específicos del hongo (Guyon *et al.*, 2014). Otro análisis *in silico* de un hongo hemibiotrófico, *Zyoseptoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) encontró 266 proteínas secretadas, las cuales fueron sometidas a un escrutinio para identificar candidatos a efectores. Usando información transcriptómica (Expressed sequence tags-ESTs) obtenida durante la interacción con el hospedero, permitió reducir la lista de efectores candidatos hasta 78 para el estudio de

expresión de sus transcritos durante 20 días (Gohari *et al.*, 2015). En *Trichoderma* sp., el hongo de interés de nuestro estudio, se ha reportado la presencia de 747, 968 y 947 proteínas predichas para el secretoma con 174, 258 y 250 SSPs para *T. reesei*, *T. atroviride* y *T. virens*, respectivamente (Druzhinina *et al.*, 2012). En el caso de *T. harzianum* (T6776), Monteiro *et al.* (2018) reportaron que un estudio *in silico* por medio del programa EffectorP, se detectaron 578 proteínas secretadas con 108 candidatos a efectores. Los estudios *in vitro* que usan técnicas de proteómica basados en geles han identificado manchas ("spots") de proteína que pertenecen a *Trichoderma harzianum* en interacciones microbianas por ejemplo con *G. citricarpa* (144 manchas; Blauth de Lima *et al.*, 2017) *B. cinerea* (100 manchas; (Yang *et al.*, 2009) y *F. solani* (202 manchas; Ramada *et al.*, 2016). En la interacción de *T. virens* con las raíces de *Z. mays*, se identificaron 280 proteínas por LC-MS/MS, este último es el único estudio que reporta la secuenciación e identificación de todas las proteínas del secretoma de una especie de *Trichoderma*. Con respecto a *P. fijiensis*, pocos estudios abordan el secretoma del hongo. Escobar-Tovar *et al.* (2015) usando SDS-PAGE y 2D-PAGE, reportaron 436 manchas para una cepa virulenta de *P. fijiensis* creciendo *in vitro*, mientras que observaron 101 manchas para la cepa virulenta en interacción con la planta hospedera, Las manchas de proteína fueron secuenciados por LC-MS. Chuc-Uc *et al.* (2011) usando SDS-PAGE y PAGE mostraron actividad proteolítica del secretoma de *P. fijiensis* e identificaron una proteasa termoestable de 30 kDa como posible efector en la interacción *P. fijiensis*-*Musa*.



1DE: electroforesis de proteínas en SDS-PAGE de una dimensión o electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE); **2DE:** electroforesis bidimensional (isoelectroenfoque y (SDS-PAGE); **2DDIGE:** electroforesis diferencial en gel y en dos dimensiones

Figura 1.3 Las etapas fundamentales para los estudios de los proteomas/secretomas (modificado de De Jesus *et al.*, 2014).

1.7 Los efectores

Los efectores son productos microbianos, generalmente secretados, que facilitan el establecimiento de diversas interacciones, tanto benéficas como perjudiciales (Kim *et al.*, 2016). Aunque el enfoque del presente trabajo son los efectores proteicos, estas moléculas también pueden ser de tipo RNA o metabolito secundario y pueden ser clasificados como efectores apoplásticos o citoplásmicos, dependiendo de la localización celular de su molécula blanco en el hospedero (Giraldo & Valent, 2013; Kamoun, 2006). Los efectores proteicos fueron descritos inicialmente como pequeñas proteínas ricas en cisteína (SSCPs- “small secreted cysteine-rich proteins”), lo que ayuda a estabilizar la estructura terciaria de la proteína a través de puentes disulfuro intramoleculares (Saunders *et al.*, 2012). Hoy en día, se acepta que las proteínas efectoras no necesariamente son pequeñas y la presencia de cisteína es una de las características básicas para la identificación de los efectores tipo apoplástico. Con respecto a su ubicación en el genoma, se ha visto que los genes de efectores residen en regiones del genoma ricas en AT, en regiones con alta proporción de ADN repetitivo, cercanas a los telómeros (Schmidt & Panstruga, 2011; Raffaele *et al.*, 2010), o agrupados en “islas de patogenicidad” (Stergiopoulos & de Wit, 2009). Otras características descritas para los efectores incluyen la presencia de un péptido señal, la expresión sobrerregulada en interacción con la planta hospedera, la ausencia de dominios transmembranales y especificidad a una especie o similitud de aminoácidos limitada en nivel de secuencia entre organismos (Lo Presti *et al.*, 2015; Saunders *et al.*, 2012; Stergiopoulos & de Wit, 2009).

Los efectores se estudian ampliamente en las interacciones planta-patógeno porque desempeñan funciones fundamentales en el desarrollo de la enfermedad. Existe una cantidad innumerable de microorganismos, pero solo unos pocos pueden parasitar con éxito a una especie vegetal en particular debido al sistema de defensa intrínseco de la planta (Balmer *et al.*, 2013). En su defensa basal, las plantas reconocen moléculas conservadas llamadas patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP) o patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP) que desencadenan una respuesta inmune. La inmunidad activada por PAMP (PTI) involucra receptores de reconocimiento de patrón (PRR), que son proteínas tipo cinasas transmembranales que reconocen diversos PAMP tales como quitina y glucanos, entre otros. Esta detección ocurre en el apoplasto de

las células vegetales y la planta se defiende produciendo especies reactivas de oxígeno (EROS) y secretando compuestos antimicrobianos, enzimas hidrolíticas (proteasas, quitinasas y glucanasas). Los patógenos responden mediante efectores secretados que funcionan para inactivar o evitar el encendido de la inmunidad disparada por patrones moleculares (PTI). A su vez, las plantas han desarrollado una segunda línea de defensa, la inmunidad desencadenada por efectores (ETI), que involucra la detección de efectores específicos de avirulencia (efectores Avr), ya sea a través de interacciones directas ligando-receptor o mediante la detección indirecta de la acción del efector sobre dianas en el hospedero. Cuando los efectores citoplásmicos “se entregan” en el citoplasma del hospedero, y son reconocidos por las proteínas intracelulares de resistencia conocidas como proteínas R, se desencadena la respuesta hipersensible y se detiene el crecimiento del patógeno en la planta (Lo Presti *et al.*, 2015). Un modelo de este mecanismo se ilustra en la Figura 1.4.

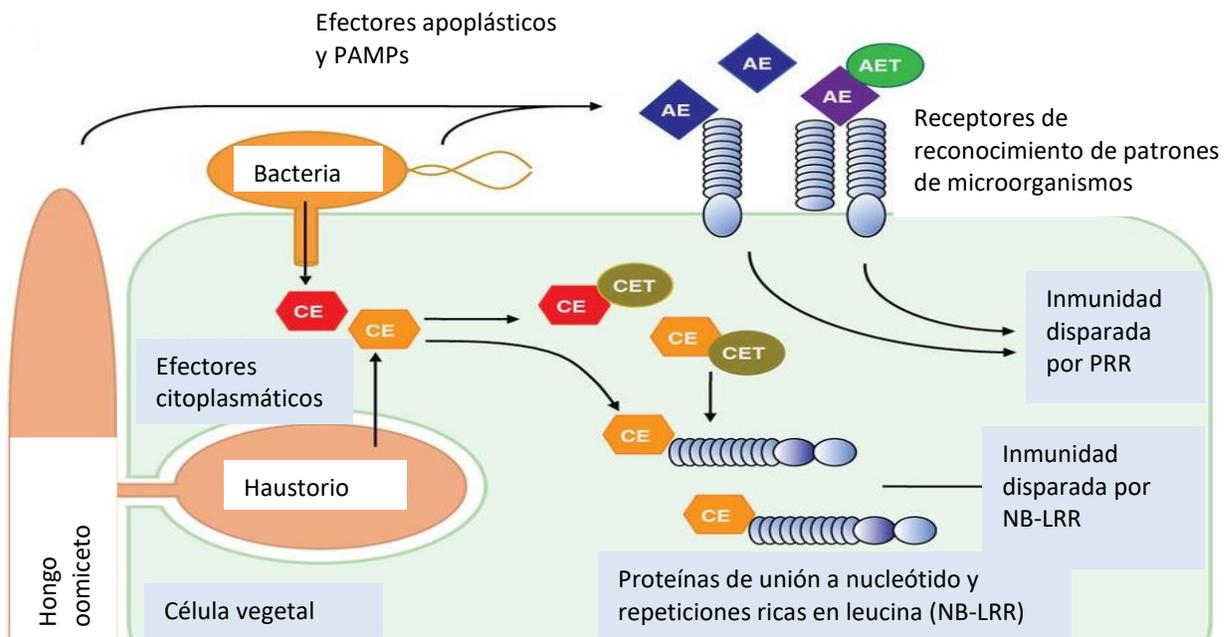


Figura 1.4 Modelo de inmunidad activada por la planta en la interacción planta-microorganismo. La inmunidad disparada por NB-LRR o la inmunidad disparada por los efectores ocurre cuando las proteínas NB-LRR reconocen a los efectores citoplásmicos secretados por los microorganismos y resulta en la activación de la respuesta hipersensible en las plantas, una manera por lo cual la planta impide el desarrollo de la infección (Win *et al.*, 2012).

La interacción entre el efector Avr y la proteína R fue descrito primero para el hongo causal de la roya del lino (*Melampsora lini*) y la planta de lino (*Linum usitatissimum*) (Flor, 1956) y nombrado el modelo del reconocimiento "gen por gen". Hoy en día, se sabe que este reconocimiento "gen-por-gen" se encuentra en muchas otras interacciones planta-patógeno, para biótropos, hemibiótropos, y más recientemente, los necrótrofos con una interacción entre efector y gen de susceptibilidad en vez de resistencia (Friesen *et al.*, 2007; Friesen *et al.*, 2006). También, se sabe que la interacción directa entre Avr-R no es la única que existe en la naturaleza y otros modelos han sido postulados para explicar la complejidad de la interacción. Cuatro modelos se han propuesto para explicar la interacción (Petit-Houdenot & Fudal, 2017), una interacción directa entre Avr-R que es el modelo efector-receptor (Dodds *et al.*, 2006) y tres interacciones indirectas. El modelo "guardian" (Jones y Dangl 2001), el modelo "señuelo" (van der Hoorn & Kamoun, 2008) y el modelo "señuelo integrado" (Cesari *et al.*, 2014; Le Roux *et al.*, 2015).

En las interacciones incompatibles, las proteínas 'R' reconocen a las proteínas Avr y como resultado, no hay infección debido a la inmunidad activada por efectores. En contraste, las interacciones compatibles dan lugar al desarrollo de la enfermedad debido a que no hay interacción entre el factor de avirulencia y la proteína de resistencia. Tanto los efectores Avr como las proteínas de resistencia están bajo constante presión evolutiva (Win *et al.*, 2012). El modelo del "zig-zag", postula que los efectores evolucionan rápidamente para mejorar su capacidad de causar enfermedad y minimizar la detección por el hospedero, y que de manera similar los hospederos responden con la evolución de los genes "R" de resistencia (Jones & Dangl, 2006). En el ámbito de la agricultura y seguridad alimentaria, la interacción Avr-R es muy importante debido a que los genes de resistencia se pueden usar para programas de mejoramiento genético para las plantas hospederas (Vleeshouwers *et al.*, 2011), pero cabe mencionar que los Avrs solo son un tipo de efector. Los efectores tipo Avr, cuando son reconocidos por la planta, resulta en una interacción desfavorable para el patógeno, por lo tanto, se cree que estos efectores deben poseer otra función. En el caso del Avr4 de *Cladosporium fulvum*, se une a la quitina en la pared de las células fúngicas y las protege de la hidrólisis causada por las quitinasas vegetales (van den Burg *et al.*, 2006), pero se sabe poco de las otras funciones de los muchos otros efectores Avrs que existen. De las funciones conocidos de los efectores, se ha descrito que actúan para prevenir el reconocimiento del patógeno por parte del hospedero; interferir con vías de defensa,

usualmente para reprimirlas, y modular la fisiología y estructura de células del hospedero (Stergiopoulos & de Wit 2009; Lo Presti *et al.*, 2015; Toruño *et al.*, 2016).

Pep1 (“protein essential for penetration 1”) es un ejemplo de un efector no Avr que se acumula en el apoplasto y desempeña una función en la penetración de las hifas en las células epidérmicas de la planta (Doehlemann *et al.*, 2009), esto se ha deducido debido a que, mutantes que perdieron la función de Pep1, no lograron infectar al hospedero. Pit2 (“proteins involved in tumors 2”) es otro efector apoplástico de *Ustilago maydis* que está relacionado con la virulencia e inhibe la actividad de las proteasas de cisteína del hospedero, dicha actividad es importante para la defensa asociada al ácido salicílico (Mueller *et al.*, 2013). La mutación de este efector produce una reducción en la formación de tumores en las plantas (Doehlemann *et al.*, 2011). En el biótrofo, *Cladosporium fulvum*, el efector Ecp6 que contiene el motivo LysM, participa en la supresión de la inmunidad inducida por quitina en la planta. El efector Ecp6 (“extracelular protein 6”) secuestra la quitina y evita el reconocimiento de la quitina del hongo por los receptores de quitina de la planta (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013). El efector CRN8 del oomiceto y hemibiotrofo, *Phytophthora infestans*, induce la muerte celular en la planta hospedera después de su translocalización al núcleo y también exhibe actividad de cinasa (Schornack *et al.*, 2010). Se ha visto que hemibiotrofos inducen la expresión de ciertos efectores para provocar la muerte celular al entrar a su fase necrotrófica. Los hongos necrotróficos como *Stagonospora nodorum* y *Pyrenophora tritici-repentis* producen varios efectores que inducen necrosis severa y operan como toxinas. El efector de ToxA interactúa con ToxABP1 en el trigo, una proteína que probablemente esté involucrada en la formación de los tilacoides de los cloroplastos y altera el fotosistema de tal forma que conduce a la muerte celular (Manning *et al.*, 2007).

Selin y colaboradores reportaron que 83 efectores de hongos habían sido clonados, 43 de ellos fueron efectores tipo Avr (Selin *et al.*, 2016) y hasta la fecha el número total no ha superado los 100 (Sperschneider *et al.*, 2018). Con respecto a *Pseudocercospora fijiensis*, se conocen tres efectores que son homólogos de tres efectores clonados en *Cladosporium fulvum*: Avr4, Ecp6 y Ecp2. En la literatura para *P. fijiensis*, solo se ha reportado que se clonó PfAvr4, y se encontró que tiene la misma función del Avr4 de *C. fulvum*. La función de PfEcp6 se propone es igual a la de Ecp6, pero la función de Ecp2 es desconocida. En

total, se predice que el número de efectores que *P. fijiensis* posee es 105 (Chang *et al.*, 2016). Con respecto a *Trichoderma harzianum*, se predicen 108 efectores (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2018) pero pocos han sido validados en la interacción (Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019). Los efectores validados específicamente para *Trichoderma harzianum* son: una ceratoplatanina llamado Epl1 (Vieira Gomes *et al.*, 2015), y tres glicósido hidrolasas Thph1, Thph2 (proteínas “cellulase-like”) (Saravanakumar *et al.*, 2016) y ThPG1, una endopoligalacturonasa (Morán-Diez *et al.*, 2009).

1.7.1 Los efectores en interacciones microbianas

El estudio de las interacciones planta-patógeno y los efectores son temas relevantes en la investigación debido a la necesidad de entender los mecanismos de interacción que se establecen en los patosistemas y su potencial aplicación para controlar las devastadoras enfermedades que causan los patógenos. El estudio de los efectores en interacciones entre microorganismos es un área emergente que nos proporcionará información relevante sobre efectores relacionados con el control biológico. Además, a través de esta interacción, se podrían identificar efectores que participan en las interacciones planta-patógeno, por lo tanto, esta pudiera ser una manera rápida y factible para priorizar a ciertos candidatos para su caracterización funcional.

En estudios recientes de interacciones microbianas, particularmente en los agentes de control biológico, se han identificado y descrito a candidatos a efectores. En la interacción *Trichoderma atroviride* y *T. virens* con *R. solani* se identificó a una ceratoplatanina, una proteína con dominio CFEM, una proteína con dominio LysM, una serina proteasa entre otros (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2017). También, se identificaron candidatos a efectores en las interacciones de *Pseudomyza flocculosa-Blumeria graminis* (Laur *et al.*, 2018) y *Pythium oligandrum-Phytophthora infestans* (Horner *et al.*, 2012). En el caso de la interacción *Zymoseptoria tritici-Triticum aestivum* se encontró al efector Zt6, una RNAsa con actividad fitotóxica en la planta hospedera, pero también para *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. pastoris* (Kettles *et al.*, 2018). Actualmente, la identificación de los efectores de microorganismos se ha facilitado debido al incremento en las facilidades para la secuenciación masiva de los diferentes componentes de los organismos mediante transcriptómica, proteómica y

metabolómica, así como su identificación por medio de la bioinformática. La validación de la función de los efectores candidatos identificados en los genomas de los microorganismos, a una tasa comparable a la de la identificación masiva por las ciencias “ómicas”, es un reto actual para su explotación.

Con base en todo lo anterior, en este trabajo se plantea estudiar el secretoma de la interacción de *Pseudocercospora fijiensis* y *Trichoderma harzianum* con el fin de explorar si en la interacción participan efectores de ambos hongos.

JUSTIFICACIÓN

Trichoderma sp. utiliza un complejo de mecanismos intrínsecos para controlar el crecimiento y desarrollo de los fitopatógenos. Cada interacción está mediada por genes expresados diferencialmente y se puede deducir que las proteínas correspondientes participan en el ataque o defensa de cada hongo. Las herramientas bioinformáticas pueden ayudar en la identificación *in silico* de estas proteínas, mientras que la transcriptómica y la proteómica pueden proporcionar información sobre la expresión génica y traducción de estas proteínas durante la interacción entre hongos. Los efectores se han estudiado principalmente en las interacciones planta-patógeno, pero poco en las interacciones hongo-hongo donde es probable que también participen en el micoparasitismo.

La identificación y el análisis de la expresión de genes que codifican proteínas que participan en la interacción *Pseudocercospora fijiensis* y *Trichoderma harzianum* puede permitir: 1) la expansión de conocimiento sobre efectores en interacciones microbianas, 2) establecer una ruta alterna para la identificación de los genes de proteínas efectoras. Hasta el momento casi todos los trabajos consideran el comportamiento del organismo antagónico, pero no el del otro microorganismo (“presa”). En este trabajo se propone analizar la expresión de posibles efectores en ambos microorganismos, para tener un escenario más completo de la interacción microbiana.

HIPÓTESIS

En la interacción entre *P. fijiensis* y *T. harzianum*, la expresión de proteínas efectoras ocurre en el ataque y defensa de cada hongo versus la contraparte.

OBJETIVO GENERAL

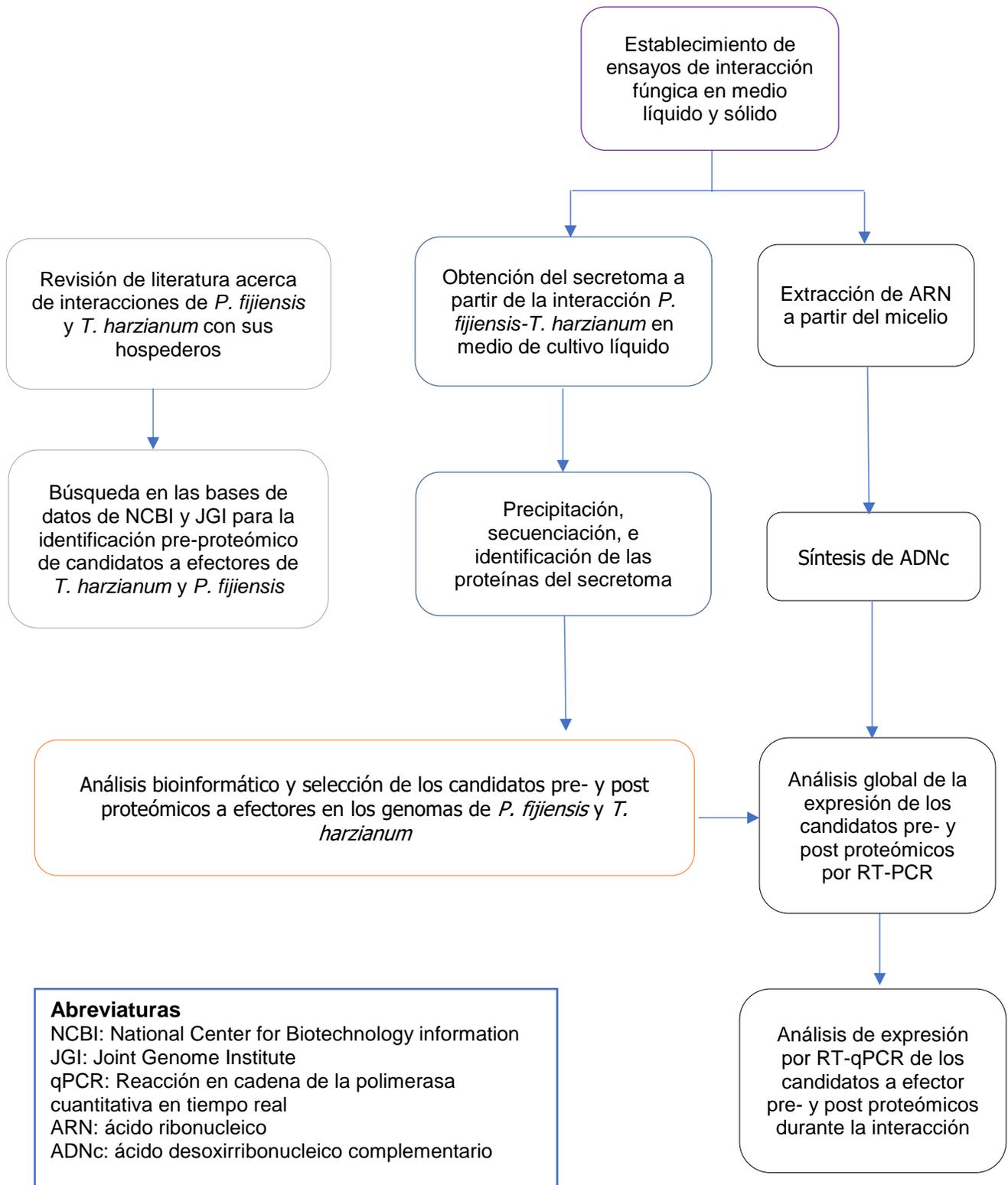
Analizar la interacción de *Trichoderma harzianum* y *Pseudocercospora fijiensis* con un enfoque bipartito: el arsenal de ataque y defensa de cada uno de los hongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el secretoma de la interacción entre *T. harzianum* y *P. fijiensis*.
2. Identificar los candidatos a efectores a partir del secretoma de la interacción.

3. Seleccionar al menos tres candidatos a efectores para cada hongo usando enfoques pre- y post-proteómico.
4. Analizar mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) la expresión de los genes codificantes para los candidatos seleccionados.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Identificación de candidatos a efectores

Basados en la literatura relacionada con efectores, análisis de secretoma y genes de patogenicidad en estudios transcriptómicos, para este estudio se seleccionaron 10 proteínas relacionadas con la patogenicidad de cada hongo y se denominaron como "candidatos pre-proteómicos". Las secuencias de proteínas y su información funcional se encontraron en Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) y la base de datos de proteínas del 'National Center for Biotechnology Information' (NCBI). Las secuencias obtenidas se usaron como sondas para la búsqueda de homólogos en las bases de datos de los genomas de *P. fijiensis* y *T. harzianum* publicados en el 'DOE Joint Genome Institute' (JGI) (<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/mycocosm/>).

2.2 Ensayo de interacción *Trichoderma harzianum*-*Pseudocercospora fijiensis*

2.2.1 Ensayo de interacción en medio sólido

El ensayo de confrontación en sólido se realizó de acuerdo con Guzmán-Guzmán *et al.* (2017) con modificaciones. Los hongos se cultivaron sobre capas de celofán sobre medio mínimo adicionado con agar al 1.5%, incubando a 25 °C y fotoperiodo 12 h luz. La interacción se llevó a cabo colocando una sección de micelio de 9mm de diámetro de las cepas crecidas previamente en PDA (10 días para *P. fijiensis* y 5 para *T. harzianum*) en extremos opuestos a una distancia de 50 mm entre los dos hongos. Como control, los hongos se inocularon individualmente. Los micelios de la interacción y los controles se colectaron en los días 1, 3, 5 y 7 con el objetivo de extraer el ARN. Las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido. El experimento se repitió tres veces.

2.2.2 Ensayo de interacción en medio líquido

Los aislados de *P. fijiensis* y *T. harzianum* se cultivaron por separado en 50 ml de medio de cultivo líquido de papa dextrosa (PDB) durante cinco (5) y diez (10) días a 25 °C y agitación

a 100 rpm. El micelio se centrifugó a 1699 x g por 15 minutos, se lavó tres veces con agua destilada estéril y se centrifugó a 1699 x g por 15 min cada vez. Para las interacciones, tres gramos de micelio de cada hongo (6 gramos en total) se colocaron en matraces de 250 ml con 50 ml de medio mínimo. Los matraces control fueron mantenidos en las mismas condiciones que los experimentales, excepto que fueron inoculados solo con un hongo. Los matraces se cosecharon a los días 1, 3, 5 y 7 después de su inoculación al matraz. Las muestras se centrifugaron a 166 x g por 10 minutos a 4 °C y posteriormente se pesaron y almacenaron en nitrógeno líquido. El experimento se repitió tres veces.

2.3 Obtención del secretoma y su secuenciación

Las muestras del secretoma de los controles (*P. fijiensis* o *T. harzianum*) y de la interacción *T. harzianum*-*P. fijiensis* se extrajeron de los medios de cultivo, cinco días después de su inoculación. Brevemente, la biomasa fúngica se separó del medio mediante filtración con Miracloth™. Los secretomas se liofilizaron y almacenaron a -20 °C hasta continuar su procesamiento. Los liofilizados se resuspendieron en amortiguador Tris-HCl pH 7.0 adicionado con 0.1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ¼ de pastilla del inhibidor de proteasas Complete™ (Roche Complete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail). Las proteínas en cada muestra se precipitaron adicionando 1 ml 10% w/v de ácido tricloroacético (TCA) disuelto en acetona fría por cada ml de muestra; las muestras se incubaron a -20 °C durante 12 h. Enseguida, las muestras se centrifugaron 45 min a 17,000 x g a 4 °C y se descartaron los sobrenadantes. Las pastillas proteicas se lavaron tres veces con 90% acetona. Las pastillas se secaron a temperatura ambiente durante una hora. Las pastillas se resuspendieron en 500 µl de Tris-HCl (pH 7.0) con inhibidores de proteasas. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Ernst & Zor (2010). Se empleó una curva de calibración basada en albúmina de suero bovino (BSA), la absorbancia de las muestras se determinó a 595 nm y 450 nm. Para el cálculo de las concentraciones de proteína en las muestras, sus absorbancias fueron interpoladas en la curva de calibración. El perfil de proteínas se analizó por SDS-PAGE aplicando 1.2 µg de proteína por carril y el gel se tiñó con nitrato de plata.

Para la secuenciación se liofilizó un volumen de muestra conteniendo 40 µg de proteína por cada tratamiento (los monocultivos y la interacción) y se enviaron a secuenciar al *Functional Genomics Center Zurich*, (Suiza).

2.4 Búsqueda de las proteínas secuenciadas a partir del secretoma de la interacción fúngica en las bases de datos de proteínas

Las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación del secretoma se analizaron mediante el “Protein Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTP) para buscar proteínas homólogas en la base de datos del ‘National Center for Biotechnology Information’ (NCBI). Las bases de datos PFAM y SUPERFAMILY se utilizaron para anotar funcionalmente las proteínas que se encontraron.

2.5 El proceso de identificación de los posibles candidatos a efectores

Los criterios para la identificación de los efectores se basaron en los descritos en la literatura por Chang *et al.* (2016) y Sperschneider *et al.* (2015), con algunas modificaciones (Figura 2.1). Para la identificación y selección de efectores se usó un sistema de suma de puntos basada en el cumplimiento de los criterios preestablecidos, similar al trabajo de Syme *et al.* (2013) que implementó un sistema de agrupación de candidatos según los números de criterios que cumplieron. En el presente trabajo, se estableció como mínimo un valor de 6 de 10 puntos para la identificación como ‘candidato’. La lista completa de las herramientas bioinformáticas utilizadas para la selección de los candidatos se describe en el Cuadro 2.1.

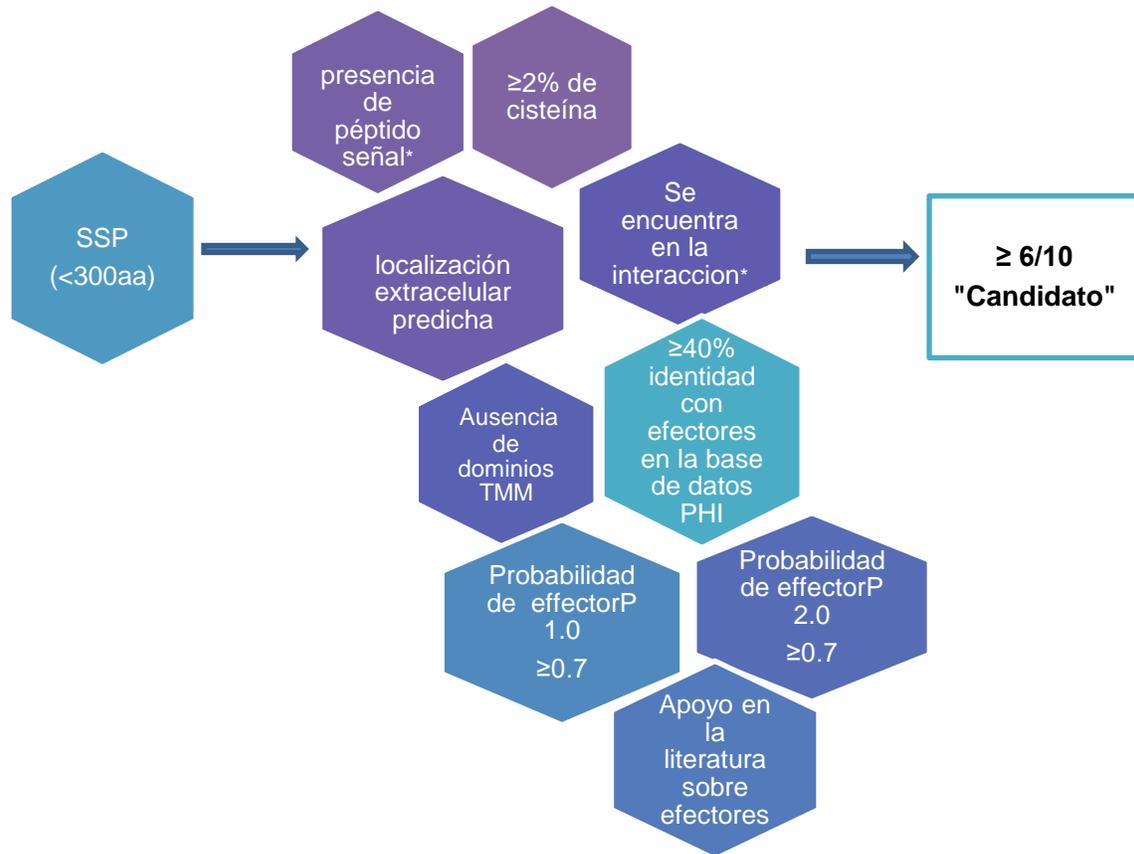


Figura 2.1 Criterios utilizados para la selección de posibles candidatos a efectores

Dominios TMM: Dominios transmembranales; Presencia de un péptido señal* u otra señal no-canónica para la secreción de proteínas; (*) si se encuentra específicamente en el secretoma de la interacción generado en el presente trabajo también en el control (Con+Int).

Cuadro 2.1 Las herramientas bioinformáticas usados en la identificación de candidatos.

Herramienta	Uso	Sitio web/ Referencia
SignalP 4.1	Para la predicción de péptidos señal	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ (Nielsen, 2017)
SecretomeP	Para la predicción de señales de secreción no canónicas	http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/ (Bendtsen <i>et al.</i> , 2004)
TMHMM Server v. 2.0	Para la predicción de dominios transmembranales	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ (Krogh <i>et al.</i> , 2001)
DeepLoc-1.0	Para la predicción de localización subcelular de las proteínas eucariotas	http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/ (Almagro Armenteros <i>et al.</i> , 2017)
PHIB-BLAST	Para buscar homología con otros efectores caracterizados	http://phi-blast.phi-base.org/ (Urban <i>et al.</i> , 2017)
EffectorP 2.0;	Para la predicción de candidatos a efectores en secretomas de patógenos vegetales. Esta versión puede identificar candidatos con más precisión debido a que es una base de efectores más grande que la del EffectorP 1.0	http://effectorp.csiro.au/ (Sperschneider <i>et al.</i> , 2018; Sperschneider <i>et al.</i> , 2016)
ProtParam tool	Para la identificación de varios parámetros físicos y químicos como composición de aminoácidos y peso molecular	https://web.expasy.org/protparam/

ApoplastP	Para la predicción de efectores apoplásticos	http://apoplastp.csiro.au/ (Sperschneider <i>et al.</i> , 2018)
SeqNLS	Para la predicción de señales de localización nuclear	http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/ (Lin & Hu, 2013)
ScanPrositeTool	Para la identificación de motivos	https://prosite.expasy.org/scanprosite/ (Sigrist <i>et al.</i> , 2002)
MOTIF	Para la identificación de motivos	https://www.genome.jp/tools/motif/
BLAST2GO	Para la anotación funcional de las secuencias usando el algoritmo BLAST y Gene Ontology (GO)	(Conesa <i>et al.</i> , 2005)
NCBI BLASTP	Para la anotación funcional de las secuencias y la búsqueda de ortólogos	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins
UNIPROT	Para la identificación de secuencias	https://www.uniprot.org/ The UniProt Consortium, 2017
JGI	Para la asignación de un identificador JGI a las secuencias	https://genome.jgi.doe.gov/Mycfi2/Mycfi2.home.html https://genome.jgi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html (Nordberg <i>et al.</i> , 2014)
PFAM	Para la identificación de dominios y familias de proteínas	https://pfam.xfam.org/ (Finn <i>et al.</i> , 2008)
InterProScan	Para la identificación de dominios y familias de proteínas	https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search (Jones <i>et al.</i> , 2014)

2.6 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Las muestras de micelio almacenadas a -80°C se pulverizaron en presencia de nitrógeno líquido. El ARN total se aisló utilizando el reactivo TRIZOL™ (Invitrogen). El ARN obtenido se trató con ADNasa siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADNc se sintetizó con la transcriptasa reversa SuperScript™ III (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADNc resultante se utilizó para los análisis de expresión génica por PCR en tiempo real y RT-qPCR.

2.7 Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores para los genes seleccionados se realizó utilizando el programa "PrimerQuest Tool" en Integrated DNA Technologies (IDT).

2.8 Análisis de expresión de los genes con qPCR

Las reacciones RT-qPCR se realizaron utilizando *Fast SYBR Green Master Mix*® (Applied Biosystems) utilizando como templado 20 ng de ADNc sintetizado a partir de ARNm colectado de los días 1, 3, 5, 7 tanto de la interacción como de los monocultivos. Los componentes de la reacción fueron, 7.5 µl SYBR Green, 5.7 µl de agua ultra pura, 0.4 µl de oligonucleótidos sentido y reverso y 1 µl de templado; el volumen final de reacción fue de 15 µl. Como controles de expresión se usaron al factor de elongación de *Trichoderma harzianum* y actina de *Pseudocercospora fijiensis*. El programa usado tiene un periodo inicial de 10 minutos a 95 °C para desnaturalización, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos de desnaturalización y 1 minuto de alineación y extensión según la temperatura de disociación (Tm) de los oligonucleótidos. Se usó el método de cuantificación relativa descrito por Pfaffl (Pfaffl, 2001) para determinar la expresión de los genes seleccionados (modificado de Guzmán-Guzmán *et al.*, 2017). Se calculó la expresión relativa para cada replica biológica y luego se usó el promedio de los dos valores de expresión para graficar los resultados. Usando los promedios de expresión de cada gen en las muestras de interacción y el control, se hizo el análisis estadístico (ANOVA y la prueba de Tukey) por el software GraphPad Prism y la representación de los resultados usando Microsoft Excel.

2.9 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras (cortes de 1 cm² de agar con micelio de la zona de la interacción) fueron sumergidas en el fijador (amortiguador de fosfato de sodio 0.2 M, pH 7.2 con 2.5% glutaraldehído) durante 24 h a temperatura ambiente y luego 24 h a 4 °C en la ausencia de luz. Después de 48 h de fijación, las muestras fueron lavadas por 2 h con el amortiguador de fosfato de sodio usado para la fijación, excepto que no contenía glutaraldehído, los tubos se agitaron suavemente cada 20 min, una hora después de iniciada la incubación, las muestras se adicionaron con amortiguador nuevo. Enseguida, las muestras se deshidrataron incubándolas en concentraciones crecientes 30, 50, 70, 85, 96 y 100% de etanol. La incubación en cada concentración de etanol fue de 2 h, aunque cabe mencionar que, en la primera hora de incubación, el etanol de las muestras se sustituyó por solución nueva, aplicando entonces dos cambios de etanol para cada concentración. Una vez deshidratadas, las muestras fueron procesadas en un secador de punto crítico SAMDRI-795 (30 °C, 1200 psi) y posteriormente metalizadas con oro.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Selección pre-proteómica de candidatos a efectores a partir de la revisión bibliográfica

La selección de candidatos a efectores se basó en el análisis de la literatura sobre efectores descritos en interacciones planta-patógeno y en estudios *in silico* de los genomas de los hongos; los últimos son efectores predichos cuya función como efectores no ha sido validada. Para la mayoría de los efectores predichos las anotaciones son de proteínas huérfanas (“no hits”), función desconocida (“unknown function”) o proteína hipotética (“hypothetical protein”). A partir de un pequeño conjunto de posibles efectores en los que sí se encontró anotación de función o dominio conocido, se eligieron los candidatos que se presentan en el Cuadro 3.1. Con esta estrategia se esperaba incrementar la probabilidad de encontrarlos en la interacción.

Cuadro 3.1. Selección de efectores candidatos y otras proteínas relacionados con la patogenicidad después de la revisión bibliográfica.

Organismo	Referencia	JGI ID	Descripción de proteína y tamaño	Número ; % de cisteína	Péptido señal	EffectorP
<i>T.harzianum</i>	Steindorff <i>et al.</i> (2014) Mendoza-Mendoza <i>et al.</i> (2018)	74755	Proteína con dominio fosfolipasa (186 aa)	4; 2.15%	Si	0.858
	Steindorff <i>et al.</i> (2014) Ramada <i>et al.</i> (2016)	511478	Proteína con dominio de inhibidor de proteasa tipo Kazal (143aa)	18; 12.59%	Si	1
	Mendoza-Mendoza <i>et al.</i> (2018)	170055	toxina, kp4 con dominio Killer (120aa)	8; 6.67%	Si	0.997
	Steindorff <i>et al.</i> (2014)	536144	Proteína con dominio LysM (205 aa)	8; 3.9%	Si	-
	Steindorff <i>et al.</i> (2012)	100520	Hidrofobina Qid3 (129 aa)	8, 6.2%	Si	0.975

	Carsolio <i>et al.</i> (1994); El-Katatny <i>et al.</i> (2000), Do Vale <i>et al.</i> (2012)	101028	Quitinasa chit 42 (430 aa)	1; 0.23%	Si	-
	Steindorff <i>et al.</i> (2014) Ramada <i>et al.</i> (2016)	526221	Proteasa pra1 (trypsin-like) (258 aa)	6; 2.33%	Si	-
<i>P. fijiensis</i>	Stergiopoulos <i>et al.</i> (2010), Chang <i>et al.</i> (2016)	87167	PfAvr4 (121 aa)	10; 8.26%	Si	1
	Chang <i>et al.</i> (2016)	212004	PfEcp6	8; 1.94%	Si	0.961
	Chang <i>et al.</i> (2016)	210135	Proteína con dominio metaloproteasa (185 aa)	6; 3.24%	Si	0.898
	-	132767	Inhibidor de proteasas (121 aa)	1; 0.82%	Si	0.979
	Chang <i>et al.</i> (2016)	201584	Proteína con dominio RALF ("Rapid alkalization factor") (112 aa)	5; 4.46%	Si	0.995

3.2 Análisis proteómico de la interacción

Con el fin de determinar si las proteínas de los secretomas en estudio no se degradaron en el proceso de obtención y precipitación se prepararon geles de 12% SDS-PAGE, se cargaron con 1.2 µg de proteína de cada muestra y se separaron por electroforesis. La tinción de los geles con AgNO₃ después de la electroforesis, mostró que *T. harzianum* en cultivo individual secreta más proteínas en el rango de 31 a 80 kDa (Figura 3.1). En contraste, *P. fijiensis* en cultivo individual secretó más proteínas en el rango de 20-25 kDa con una banda abundante de masa molecular cercana a los 100 kDa. En el caso del secretoma de la interacción *P. fijiensis*-*T. harzianum* se observaron proteínas abundantes con masas moleculares de entre 50 y 200 kDa así como un segundo grupo con masas moleculares de entre 7.1 y 20.6 kDa (Figura 3.1). El segundo grupo de proteínas no se

detectó en el perfil proteico de *T. harzianum* pero si en el de *P. fijiensis* y en la interacción, sugierido entonces que dichas proteínas son de *P. fijiensis*. El perfil proteico en el gel de SDS-PAGE es pobre porque sólo se aplicó 1.2 µg de proteína por carril; sin embargo, el resultado del SDS-PAGE sugiere que ambos hongos cambian su proteoma en respuesta a la interacción con su contraparte.

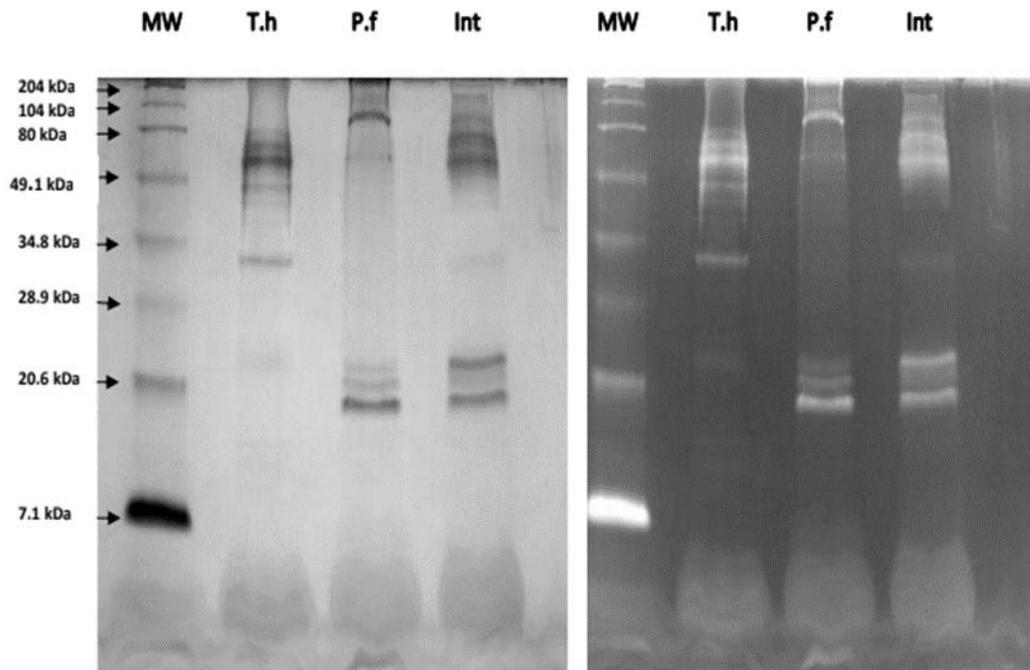


Figura 3.1 SDS-PAGE del secretoma de cinco días obtenido a partir de monocultivos de *T. harzianum* y *P. fijiensis*, así como de la interacción entre ambos hongos cultivados en medio mínimo. La imagen de la derecha fue tomada con luz invertida. Se analizó 1.2 microgramos de proteína por carril y el gel se tiñó con nitrato de plata.

3.3 Selección post-proteómica de candidatos a efectores a partir del secretoma secuenciado

3.3.1 El secretoma: una vista global de las proteínas

Las muestras de proteína fueron secuenciadas por la empresa 'Functional Genomics Center Zurich' siguiendo las etapas descritas en la Figura 3.2. Mediante el programa Mascot se introdujeron los péptidos en las bases de datos de Swissprot y Trembl para la

identificación de los péptidos. La obtención de las identidades de las proteínas se realizó con el programa Scaffold, utilizando los siguientes parámetros: 0.3% de tasa máxima de falsos positivos (FDR) para las proteínas, detección de un mínimo de dos péptidos para cada proteína y 0.1% tasa de falsos positivos (FDR) para los péptidos.

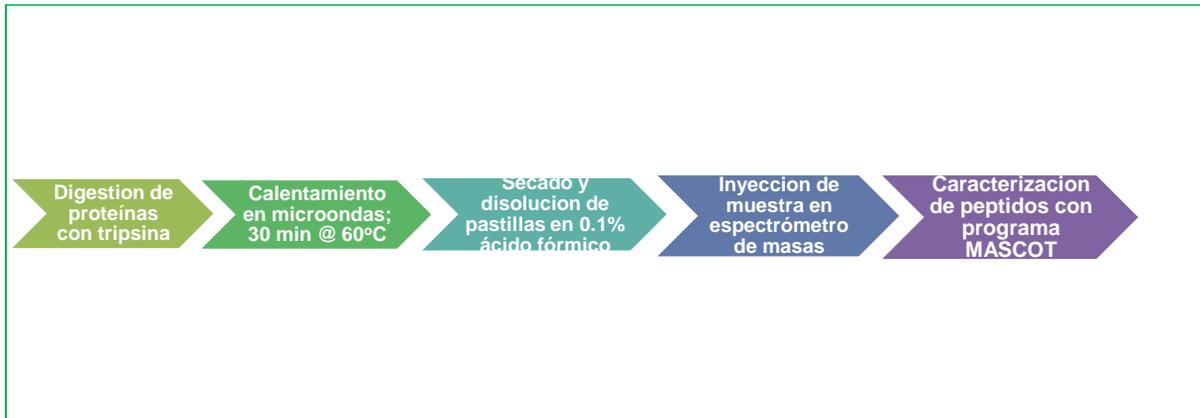


Figura 3.2 Pasos seguidos para el procesamiento de las muestras de proteínas y su identificación.

Usando los criterios arriba mencionados, se encontraron 363 proteínas secretadas y la distribución de esas proteínas en los monocultivos y la interacción se presenta en la Figura 3.3. De las 363 proteínas, 218 proceden de *T. harzianum* y 145 de *P. fijiensis*. Con el objetivo de conocer las funciones de esas proteínas y los procesos globales en que participan, entonces se usó el programa Gene Ontology (GO) para vincular los productos genéticos con sus actividades biológicas usando los 'términos GO' que se clasifican bajo tres ontologías: a) proceso biológico, b) función molecular y c) componente celular. El análisis GO para el conjunto total de proteínas se puede ver en las Figuras 3.4, 3.5 y 3.6 respectivamente. Las gráficas muestran los términos más representativos de todas las secuencias y una proteína puede tener más de un término asignado debido a los dominios presentes. En el caso del "proceso biológico", los términos más representados son 'proceso metabólico', proceso 'desconocido' y 'proceso celular' mientras que en la "función molecular" los términos más representados son 'actividad catalítica', 'función molecular' y función 'desconocida'. Para "componente celular" el término 'desconocido' fue lo más común entre las secuencias.

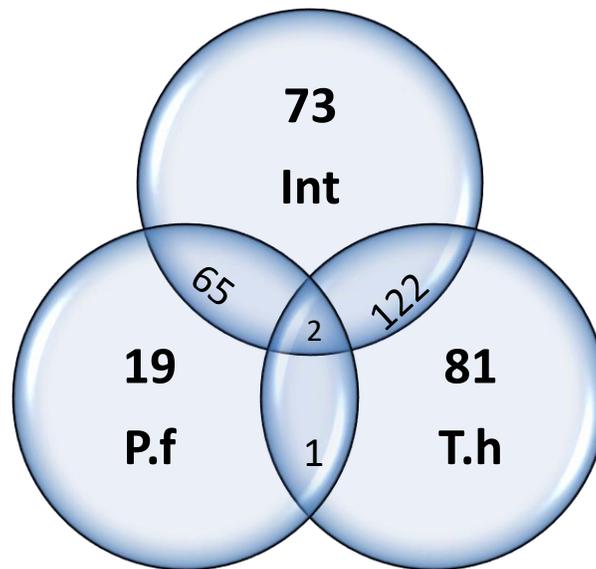


Figura 3.3 Distribución de las proteínas del secretoma de los monocultivos de *P. fijiensis* y *T. harzianum* así como de su interacción. **Int**: interacción; **P.f**: *Pseudocercospora fijiensis*; **T.h**: *Trichoderma harzianum*

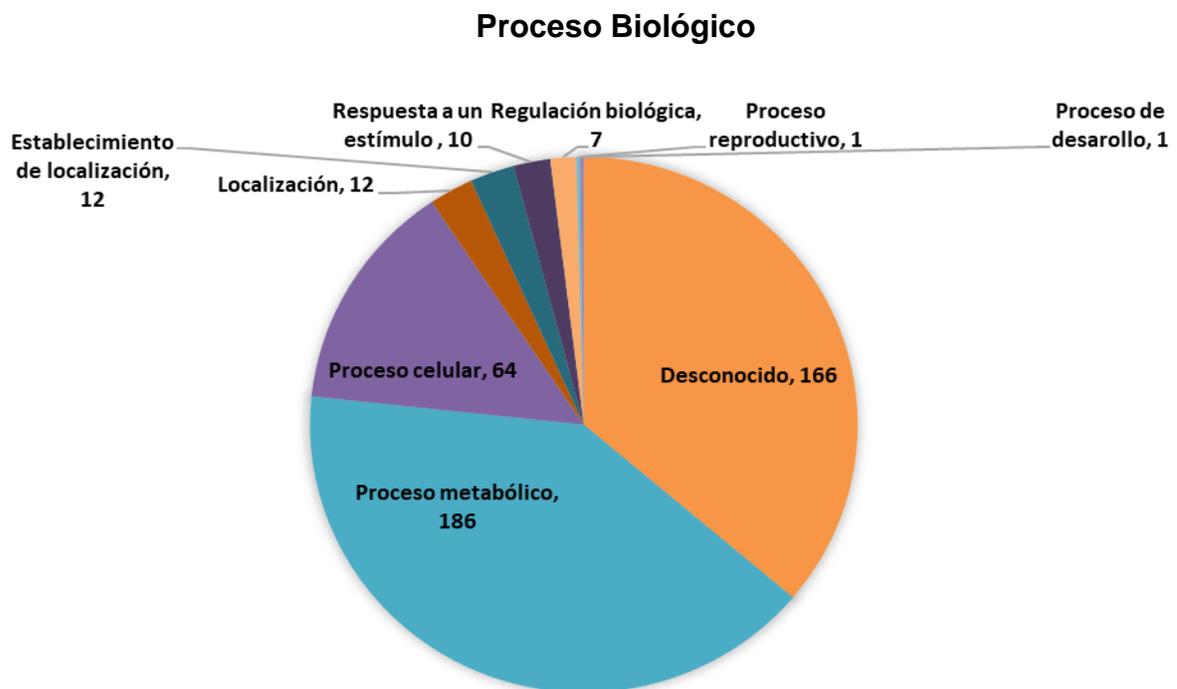


Figura 3.4 Análisis GO mostrando la distribución de proteínas totales (de los monocultivos y la interacción) en relación a sus procesos biológicos

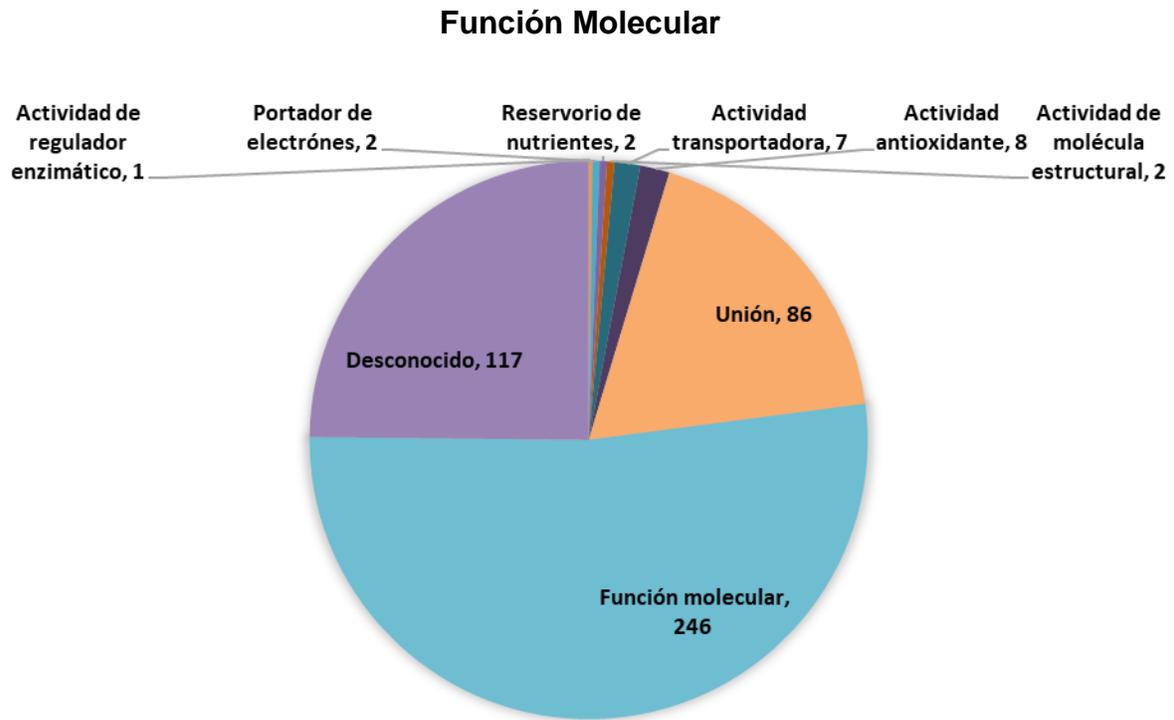


Figura 3.5 Análisis GO mostrando la distribución de proteínas totales (de los monocultivos y la interacción) en relación a sus funciones moleculares.

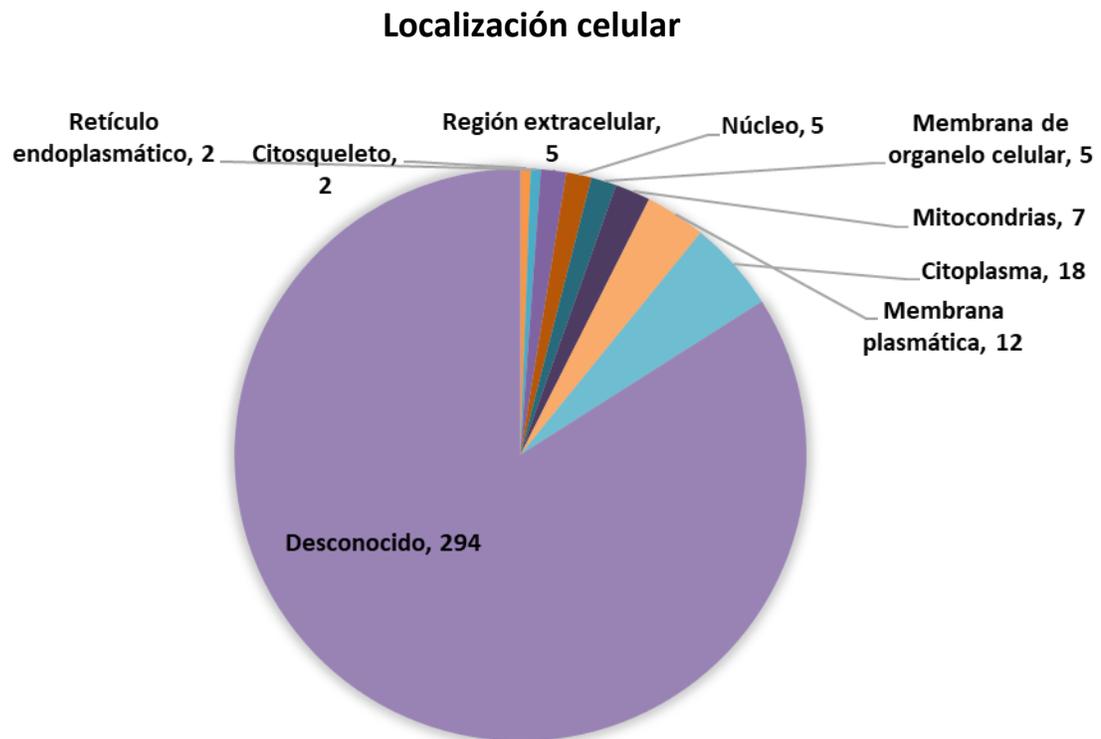


Figura 3.6 Análisis GO mostrando la distribución de proteínas totales (de los monocultivos y la interacción) en relación a su localización celular.

3.3.2 Proteínas identificadas en la interacción

Doscientos sesenta y dos proteínas forman parte del secretoma de la interacción (algunas se encuentran también en los monocultivos) con 140 proteínas procedentes de *T. harzianum* y 122 de *P. fijiensis*. Comparando las proteínas secretadas en las condiciones de monocultivo y la interacción, 206 proteínas fueron secretadas por *T. harzianum* en el monocultivo y 140 secretadas en la interacción, mientras que *P. fijiensis* secretó 87 proteínas en el monocultivo y aumentó el número de proteínas a 122 en la interacción.

En las Figuras 3.7 y 3.8 se muestra la distribución de las secuencias procedentes de cada hongo según su clasificación de dominios con InterProScan, una herramienta que permite la clasificación de secuencias con modelos predictivos que utilizan información proporcionada por varias bases de datos que forman el consorcio InterPro. La mayor parte del secretoma fueron proteínas CAZY-enzimas que crean, modifican y rompen enlaces

glicosídicos. Este tipo de enzimas se encuentran frecuentemente en la literatura referente a interacciones microbianas y planta-patógeno así que es probable que un amplio rango de organismos las usa para atacar y protegerse. Debido a la presencia de glucanos en la pared celular de muchos organismos, genes que codifican para las enzimas como glicosil transferasas y glicosil hidrolasas son ubicuos en sus genomas. En las veinte familias más representadas en el secretoma, la mayoría (doce para *P. fijiensis* y seis para *T. harzianum*) estuvo relacionado con enlaces glicosídicos, aunque la clasificación que agrupó más que 90 secuencias en *P. fijiensis* y *T. harzianum* fue la descrita como “otros” donde se encuentran muchas proteínas sin dominios conocidos. En segundo lugar, las glicosido hidrolasas IPR017853 fueron el dominio más representado en los dos hongos y en el tercer lugar las hidrolasas de pliegues alfa/beta IPR029058 (lipasas y esterases) para *P. fijiensis* y la familia de peptidasas A1 IPR001461 para *T. harzianum*. Las secuencias se analizaron con el propósito de conocer sus funciones moleculares asignadas por el Gene Ontology (GO), los dos hongos, tuvieron a la función de hidrolasa como la más representada con el 51% de las secuencias de *T. harzianum* y 59% de *P. fijiensis* (Figuras 3.9 y 3.10). Enseguida se ubicó la actividad catalítica con el 14% para *T. harzianum* y 13% para *P. fijiensis*. La actividad de oxidoreductasa y varios términos GO relacionados con unión a compuestos y iones. ‘Ion Binding’ (GO:0043167) y ‘Transferase Activity’ (GO:0016740) fueron las siguientes categorías representadas en el análisis de *T. harzianum* (Figura 3.9) y no se encontraron en *P. fijiensis* (Figura 3.10). Las secuencias con función desconocida no se incluyeron en esta Figura.

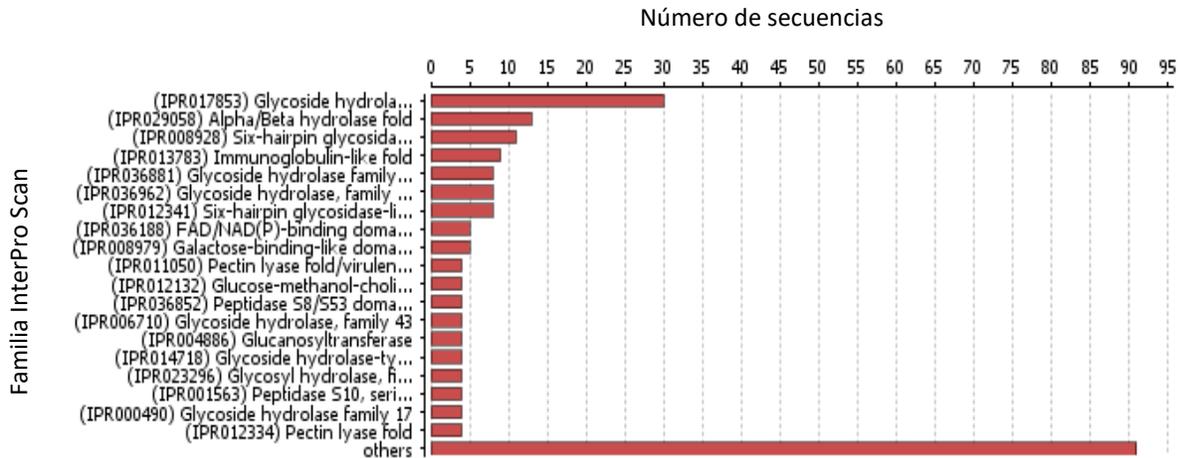


Figura 3.7 Distribución de las familias InterPro para las secuencias procedentes de *P. fijiensis* en el secretoma de la interacción.

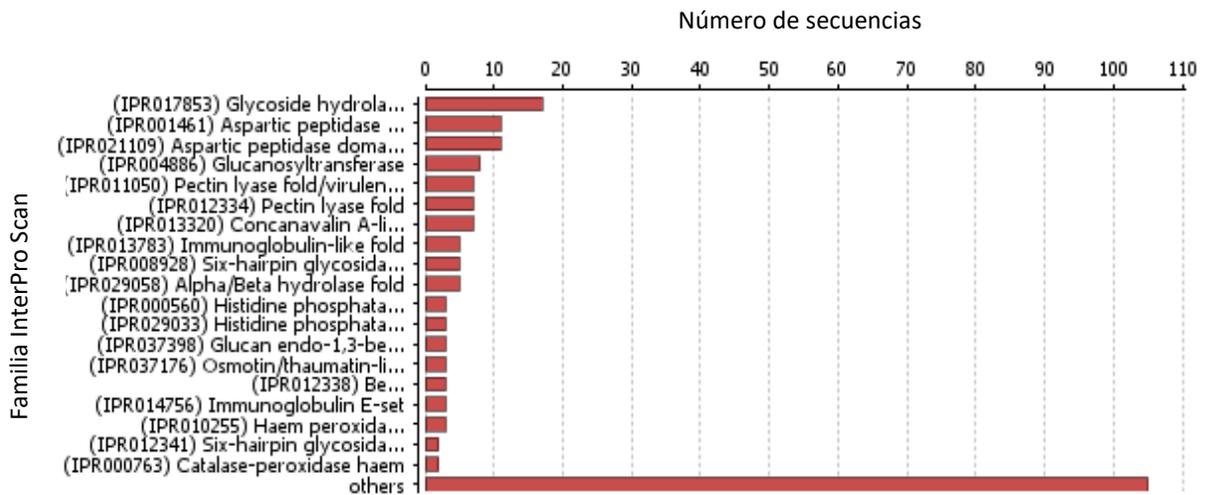


Figura 3.8 Distribución de las familias InterPro para las secuencias procedentes de *T. harzianum* en el secretoma de la interacción.

Funciones asignadas a las proteínas de *T. harzianum*

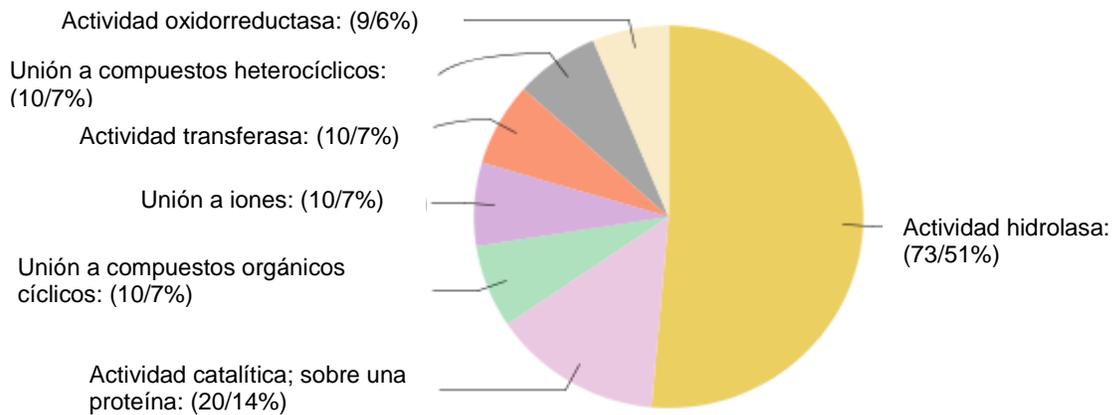


Figura 3.9 Distribución de las funciones asignadas por GO para las secuencias procedentes de *T. harzianum* en el secretoma de la interacción.

Funciones asignadas a las proteínas de *P. fijiensis*

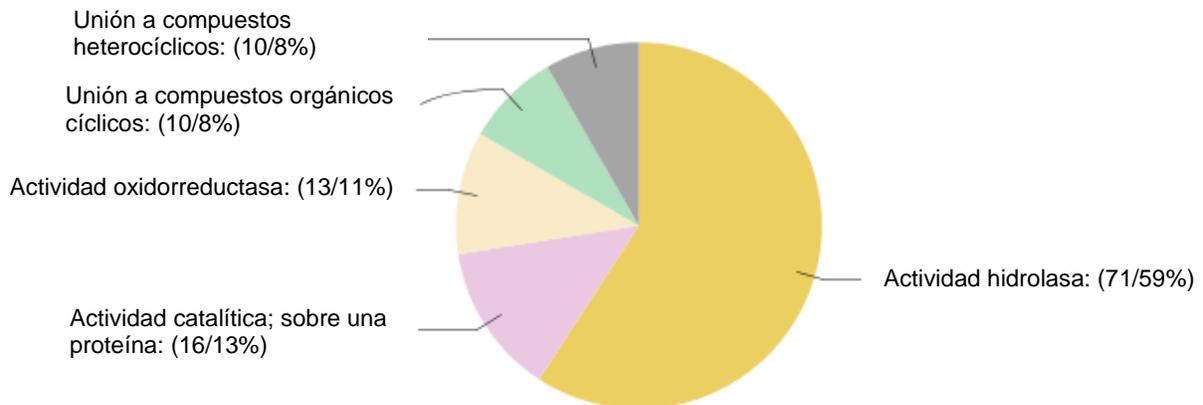


Figura 3.10 Distribución de las funciones asignadas por GO para las secuencias procedentes de *P. fijiensis* en el secretoma de la interacción.

La anotación GO e InterPro mostró que la mayoría de las proteínas poseen actividad catalítica. El término de "actividad de hidrolasa" (GO:0016787), tuvo el mayor número de secuencias representadas, con valores muy similares entre *T. harzianum* (73) y *P. fijiensis* (71), y con respecto a enlaces glucosídicos fueron 26 secuencias para *T. harzianum* y 35 para *P. fijiensis*. Para el término de "unión" (GO:0005488), los dos hongos tuvieron 22 secuencias cada uno y para el término "actividad de peptidasa" (GO:0008233), se encontraron 18 secuencias para *T. harzianum* y 16 para *P. fijiensis*. Se observó que entre los hongos la "actividad de peptidasa tipo ácido aspártico" fue el término más representado en *T. harzianum* y *P. fijiensis*.

3.3.3 Proteínas específicas de la interacción *T. harzianum*- *P. fijiensis*

Los resultados de la secuenciación mostraron que, aunque *T. harzianum* está secretando más proteínas en la interacción, la mayoría de esas proteínas se producen tanto en la interacción con *P. fijiensis* como en el monocultivo (control). En la Figura 3.11 se observa que solo el 16% de las proteínas específicas provienen de *T. harzianum* mientras que 84% de las proteínas provinieron de *P. fijiensis*, es decir, fueron inducidas por la presencia de la contraparte en la interacción. El Cuadro 3.2 presenta las familias de proteínas de cada hongo, específicas de la interacción, es decir, aquellas que no se identificaron en los cultivos fúngicos individuales.

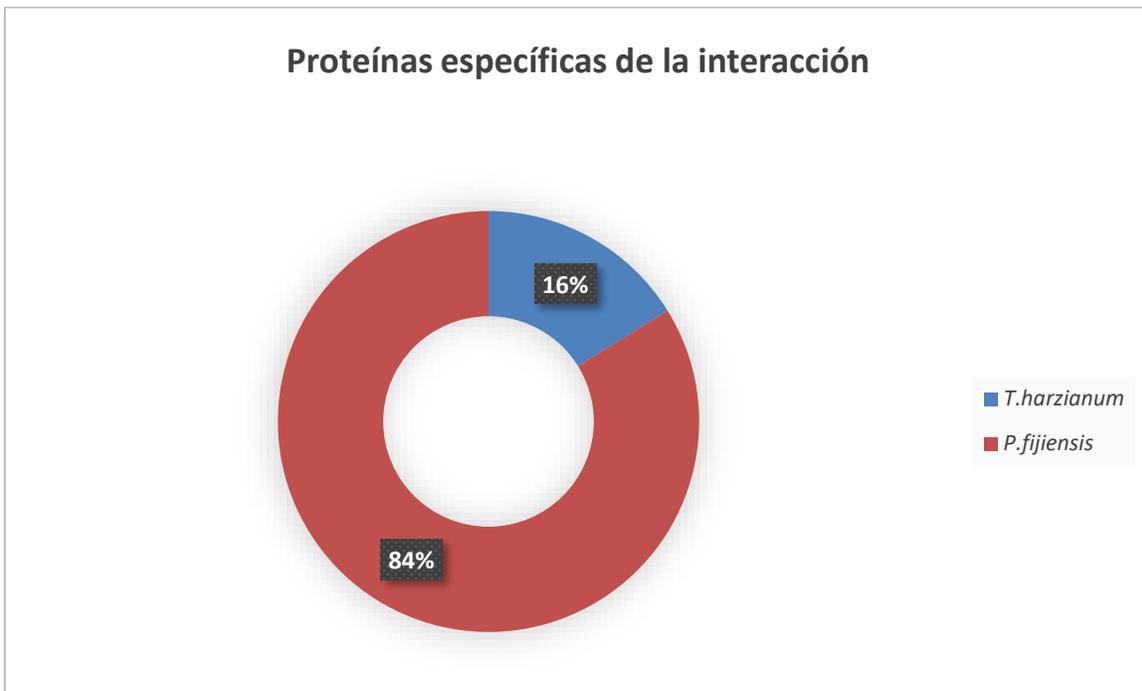


Figura 3.11 Proporción de proteínas específicas de la interacción, secretadas por *P. fijiensis* o *T. harzianum*.

Cuadro 3.2 Familias de proteínas presentes específicamente en la interacción *P. fijiensis*- *T. harzianum*.

<i>P. fijiensis</i>	<i>T. harzianum</i>
GH3 (7 proteínas): M3B352; M2ZUL6; N1QAW7; M2ZWF9; M3B1M3; N1QAN7; A0A139HVK5	1,3-endoglucanasas (2 proteínas): A0A0F9XTX0; A0A0F9ZX62
GH43 (5): N1Q9Z8; M3AM13; M3A3D6; M3B1N6; A0A139H086	Domino WSC (3-carbohydrate-binding domain) (3 proteínas): A0A0F9X878; A0A2K0UI85; A0A0F9ZWP3
GH72: M3BBQ1	Alpha/beta hidrolasa: A0A0F9X9V0
GH18 (2): N1QBN6; A0A139GT82	Aspartil proteasa (2 proteínas) A0A0F9WYI9; A0A024S6Q8
GH17 (2): M3AJZ2; A0A139H0D9	Proteína hipotética sin dominio caracterizado: A0A0F9X5Z9*
GH37: M3A6V1	Cupredoxina A0A0F9X4L9

GH20: M2YTH3	Superfamilia AXE1 (acetil esterasa) A0A0F9XR20
GH16: M2ZKI3	GH 55 (2) Pectate lyase A0A2N1LCJ1; A0A1T3CNN8
GH92: M3A5V7	
GH27: N1Q7U1	
GH78: M3AI27	
GH28: M2ZQ35	
GH36: M2YS96	
GH15 (2): M3B0B8; A0A139H2Q5	
GH31: M3AE52	
Superfamilia Kre9/Knh1: M2YXB5*	
Superfamilia DUF: N1QBQ5	
Peptidasas S8 (3): M3B2Z2; A0A139H7V6; A0A139IMG3;	
Peptidasas S10 (2): M3AWB3; M3AZQ1	
Alpha beta hidrolasa: M2ZK33	
Ceratoplatanina: M3B081*	
Cupredoxina: M3B642	
Tioredoxina reductasa: M2ZRH0	
Peroxidasa: M3B811	
Esterasa: N1QA39	
Dehidrogenasa FAD: M3AN98	
Fosfolipasa (2): M3B621; M3ALM0	
Superfamilia LRR (Leucine Rich Repeat): M3AH46	
Yeast PIR Repeat: NIQC80	
Proteína hipotética sin dominio caracterizado (4): M2ZY96*; NIQBE2*; M3A9Y6*; M2Y TZ7	

* Candidato a efector

3.3.4 Candidatos a efectores identificados

Las proteínas se sometieron a los filtros basados en su mayor parte en las características publicadas por Chang *et al.* (2016) y Sperschneider *et al.* (2015) y debido a que no todas las proteínas pequeñas secretadas (SSPs, por sus siglas en inglés) cumplieron con todos los criterios (con excepción de una proteína de *P. fijiensis*), se decidió usar un sistema de conteo para sumar puntos por cada uno de los criterios cumplidos para cada proteína, y con ello etiquetarla como 'candidata' si cumplía con al menos 6 de 10 criterios. Siguiendo esta metodología, se encontraron 13 candidatos para *P. fijiensis* (Cuadro 3.3); 10 candidatos son proteínas sin dominios conocidos en PFAM, ni en InterProScan o SUPERFAMILY, mientras que 3 candidatos tienen los dominios: 1) Ceratoplatanina (pfam07249; 2) GPI-anchored (pfam10342), Kre9/Knh1 family (InterPro); 3) SurE (Survival protein E) (pfam01975). Estas proteínas se detectaron en el conjunto de proteínas específicas de la interacción, juntos con otras tres proteínas aún sin caracterizar. Además de los seis candidatos específicos de la interacción, también se encontraron siete candidatos que se presentaron en las dos condiciones (interacción y cultivos control o monocultivo).

Con respecto a las características de los candidatos de *Pseudocercospora fijiensis*, todos fueron predichos como extracelulares y carentes de dominios transmembranales. Un candidato con péptido señal también tiene una señal de localización nuclear en su secuencia, lo que sugiere que pudiera tener relocalización al núcleo como algunos efectores de *Phytophthora infestans* (Boevink *et al.*, 2016) o el efector CgEP1 de *Colletotrichum graminicola*, que en el hospedero se relocaliza a núcleo (Vargas *et al.*, 2016). Solo en uno de los candidatos no se predijo péptido señal y obtuvo una probabilidad de 0.6 en el programa SecretomeP para ser secretado por una ruta no-canónica. La mayoría de los candidatos (12 de 13) contienen al menos 2% de cisteína en su secuencia, una característica fundamental de los efectores apoplásticos (Chang *et al.*, 2016).

Usando el programa ApoplastP se observó que 9 de los 13 candidatos tienen probabilidad ≥ 0.7 de ser efectores apoplásticos. Para la predicción general de efectores, se usó el programa EffectorP el cual indicó que cinco de los candidatos tienen probabilidad ≥ 0.7 de ser efectores con las dos versiones del programa. Los candidatos también fueron sometidos

en la base de datos de PHI (Pathogen-Host Interaction por sus siglas en inglés) versión 4.5. La búsqueda produjo tres proteínas con identidad $\geq 40\%$ en la base de datos de PHI; solo uno de estos ortólogos, el MSP1 de *Magnaporthe oryzae* se ha reportado previamente como efector. Luego, una búsqueda en la literatura sobre transcritos o proteínas identificadas en la interacción *P. fijiensis*-hospedero llevó a la localización de tres proteínas de *P. fijiensis* secretadas en la planta (Escobar-Tovar *et al.*, 2015) y un candidato que coincide con una secuencia del transcriptoma de este patógeno en su fase necrotrófica con *Musa acuminata* (Noar y Daub, 2016) (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.3 Características de los trece candidatos a efector encontrados en *P. fijiensis* (1).

Cond.	Uniprot ID	JGI ID	Dominio identificado	Longitud	Péptido Maduro	SP	% Cis	TM	Local.
Int	M3B081	137490	Cerato-platanin	123	-	-	4 (3.25%)	-	Extra.
Int	M2ZY96	210733		195	175	Sí	4 (2.05%)	-	Extra.
Int	M2YXB5	82273	Kre9/Knh1 family; GPI anchored superfamily	136	120	Sí	4 (2.94%)	-	Extra.
Int	N1QBE2	209811		149	130	Sí	4 (2.68%)	-	Extra.
Int	M3A9K2	81372	SurE Superfamily	302	285	Sí	7 (2.32%)	-	Extra.
Int+C	N1Q811	209943		215	197	Sí	5 (2.33%)	-	Extra.
Int+C	M3APS9	210559		191	173	Sí	4 (2.09%)	-	Extra.
Int+C	N1Q8L6	210027		188	168	Sí	5 (2.65%)	-	Extra.
Int+C	M3BBL4	210580		161	143	Sí	5 (3.10%)	-	Extra.
Int+C	M3A4I0	131203		175	157	Sí	4 (2.28%)	-	Extra.

CAPÍTULO III

Int+C	N1Q872	181415		193	174	Sí	4 (2.07%)	-	Extra.
Int+C	M3AW28	88023		185	167	Sí	2 (1.08 %)	-	Extra.
Int+C	M3AXX1	211515		296	274	Sí	10 (3.37%)	-	Extra.

Int = Interacción *P.f-T.h*; C = Control; Int+C = Se encuentra en la interacción y el control; SP = Péptido señal; %Cis = % cisteína; TM = Dominio Transmembranal; Local. = Localización; Extra. = Extracelular

Cuadro 3.4 Características de los trece efectores candidatos encontrados en *P. fijiensis* (2)

UniProt ID	EffectorP 1.0	EffectorP 2.0	ApoplastP	PHIB-Blast	Literatura	Puntaje
M3B081	0.9	0.6	0.7	60.71% identidad con <i>M.</i> <i>oryzae</i> MSP1		7
M2ZY96	0.8	0.7	0.8			9
M2YXB5	NE	NE	0.75		Chang <i>et al.</i> , 2016	6
N1QBE2	0.9	0.7	0.5			8
M3A9K2	NE	NE	0.55			6
N1Q811	NE	NE	0.73			6
M3APS9	0.5	0.5	0.82		Escobar-Tovar <i>et al.</i> , 2015	7
N1Q8L6	0.8	0.7	0.76		Escobar-Tovar <i>et al.</i> , 2015	9
M3BBL4	0.7	0.7	0.59		Chang <i>et al.</i> , 2016 Noar y Daub, 2016	10
M3A4I0	0.8	0.8	0.71			8
N1Q872	NE	0.6	0.81			6

M3AW28	0.8	0.7	0.65		Escobar-Tovar <i>et al.</i> , 2015	9
M3AXX1	NE	0.5	0.85			6

NE= No es un efector

Con respecto a las características de los efectores candidatos de *Trichoderma harzianum*, siete proteínas fueron predichas como extracelulares (uno con un dominio transmembranal), dos citoplásmicos y uno en la membrana celular. Siete candidatos tienen un péptido señal y de los tres candidatos sin péptido señal, uno fue predicho como secretado por una ruta no-canónica. La mayoría de los candidatos (8 de 10) contienen al menos 2% de cisteínas en su secuencia y 4 candidatos alcanzaron un valor de probabilidad ≥ 0.7 con el programa ApoplastP. Para la predicción general de efectores, el programa EffectorP (las dos versiones) indicaron probabilidad ≥ 0.7 de ser efectores en seis de los candidatos, mientras que uno obtuvo un valor > 0.7 con solo una de las versiones y los tres candidatos restantes tuvieron valores menores a 0.7 en las dos versiones del EffectorP. Usando la base de datos de PHI, un candidato tuvo $\geq 40\%$ de identidad con un efector en la base, Pc107869 de *Phytophthora capsici*, una proteína con dominio 'necrosis- and ethylene-inducing peptide 1' (Nep1)-like proteins (NLPs). Tres candidatos tienen además más de 80% de identidad con factores de virulencia tal es el caso de sm1 de *T. viresns*, sod1 de *F. graminearum* y Fvcyp1 de *F. verticillioides*, cuyos mutantes mostraron un nivel reducido de virulencia en sus hospederos. Tres candidatos (ID: 1760, 511404, 508110) son ortólogos de efectores de *T. viresns*. Lamdan *et al.* (2015) publicaron que dichos efectores están involucrados en la interacción con raíces de *Zea mays*; dos candidatos se encuentran en la lista de efectores predichos en *T. harzianum* a partir de un escrutinio genómico (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2018).

Los dominios caracterizados que se identificaron en la lista de candidatos de *T. harzianum* fueron: 1) superóxido dismutasa de Cu/Zn; 2) superfamilia Ciclofilina; 3) proteína conteniendo dominio CFEM 4) proteína inductora de necrosis (NPP1); 4) familia Ceratoplatanina.

Cuadro 3.5 Características de los diez efectores candidatos encontrados en *T. harzianum* (1).

Cond.	Uniprot ID	JGI ID	Dominio identificado	Longitud	Péptido maduro	SP	% Cis	TM	Local.
Int	A0A0F9X5Z9	1760	-	119	100	sí	6(5.04)	1	Extra.
Int+C	A0A2N1LN60	505052	-	118	101	sí	6 (5.08%)	-	Extra.
Int+C	A0A0F9X8L2	502238	-	129	-	no	4 (3.10%)	-	Extra.
Int+C	A0A1T3CKS4	92302	Copper/zinc superoxide dismutase superfamily	154	-	no	2 (1.29%)	-	Cito
Int+C	A0A0F9XGK6	398162	Cyclophilin superfamily	181		no	1 (0.55%)	-	Cito
Int+C	A0A0F9X6Z0	511404	CFEM domain-containing protein	193	177	sí	9 (4.66%)	-	CM
Int+C	A0A0F9XM39	508110	Cerato-platanin	138	120	sí	4 (2.89%)	-	Extra.
Int+C	A0A0F9ZTU1	507042	Necrosis inducing protein (NPP1)	281	261	sí	6 (2.12%)	-	Extra.
Int+C	A0A0F9XHB8	572481 *T22	-	193	176	sí	8 (4.14%)	-	Extra.
C	A0A0F9XRZ8	496054	-	137	119	sí	4 (2.91%)	-	Extra.

Int = Interacción *P.f-T.h*; C = Control; Int+C = Se encuentra en la interacción y el control; SP = Péptido señal; %Cis = % cisteína; TM = Dominio Transmembranal; Local. = Localización; Extra. = Extracelular; Cito= Citoplasma, CM = Membrana celular, *T22= Esta proteína no se encuentra

codificada en el genoma de la cepa secuenciada de *Trichoderma harzianum* CBS 226.95 v1.0 (JGI), pero está presente en la cepa T22 v1.0 (JGI).

Cuadro 3.6 Características de los diez efectores candidatos encontrados en *T. harzianum* (2).

UniProt ID	EffectorP 1.0	EffectorP 2.0	ApoplastP	PHIB-Blast	Literatura	Puntaje
A0A0F9X5Z9	0.9	0.8	0.66		Lamdan <i>et al.</i> , 2015	8
A0A2N1LN60	0.9	0.8	0.64			8
A0A0F9X8L2	0.7	NE	0.36			6
A0A1T3CKS4	0.9	0.8	0.78	87.5% similitud con <i>F. graminearum</i> Sod1		6
A0A0F9XGK6	0.9	0.9	0.46	83% similitud con <i>F. verticillioides</i> Fvcyp1		6
A0A0F9X6Z0	NE	NE	0.89		Lamdan <i>et al.</i> , 2015	7
A0A0F9XM39	NE	NE	0.66	91.3% similitud con sm1 de <i>T. virens</i>	Lamdan <i>et al.</i> , 2015	8
A0A0F9ZTU1	NE	NE	0.83	44% similitud con Pc107869 de <i>Phytophthora capsici</i> *		7
A0A0F9XHB8	0.9	0.7	0.89			8
A0A0F9XRZ8	0.9	0.7	0.75			7

NE = No es un efector

Después de analizar los efectores candidatos procedentes de los dos hongos, se eligieron tres candidatos de cada hongo para el estudio de expresión génica, tomando en cuenta valores altos de probabilidad con el EffectorP, apoyo en la literatura científica y también posible novedad para cumplir con el objetivo de investigar nuevos candidatos a efectores o efectores que no han sido reportados. Los candidatos elegidos se indican en el cuadro 3.7.

Cuadro 3.7 Candidatos de efectores elegidos en el enfoque post-proteómico para *P. fijiensis* y *T. harzianum*.

Organismo	Cond.	Descripción	Dominios PFAM	Effector P 1.0	Effector P 2.0	Soporte en la literatura
<i>P. fijiensis</i>	Int+Cont	hypothetical protein MYCFIDRAFT_88023	-	0.8	0.7	Escobar-Tovar <i>et al.</i> , 2015
	Int+Cont	hypothetical protein MYCFIDRAFT_210580	-	0.7	0.7	Chang <i>et al.</i> , 2015
	Int+Cont	hypothetical protein MYCFIDRAFT_131203	-	0.8	0.8	-
<i>T. harzianum</i>	Int	hypothetical protein M431DRAFT_1760	-	0.9	0.8	-
	Int+Cont	hypothetical protein M431DRAFT_505052	-	0.9	0.8	-
	Int+Cont	hypothetical protein THAR02_04245	Cyclophilin Superfamily	0.8	0.8	-

Cond. = Condición; Int = Interacción; Int + Cont = Interacción y Control

3.4 Análisis de expresión génica de los candidatos efectores pre y post-proteómicos

Se extrajo ARN del micelio de los hongos en interacción y de los hongos en monocultivo de muestras colectadas en los días 1, 3, 5 y 7 del micelio inoculado en medio líquido. La integridad del ARN total (1 µg) se analizó en un gel de 1% de agarosa después de ser sometido a electroforesis. Se observó la presencia de las bandas ribosomales 28S y 18S que corresponden al ARN ribosomal de eucariotas (Figura 3.12).

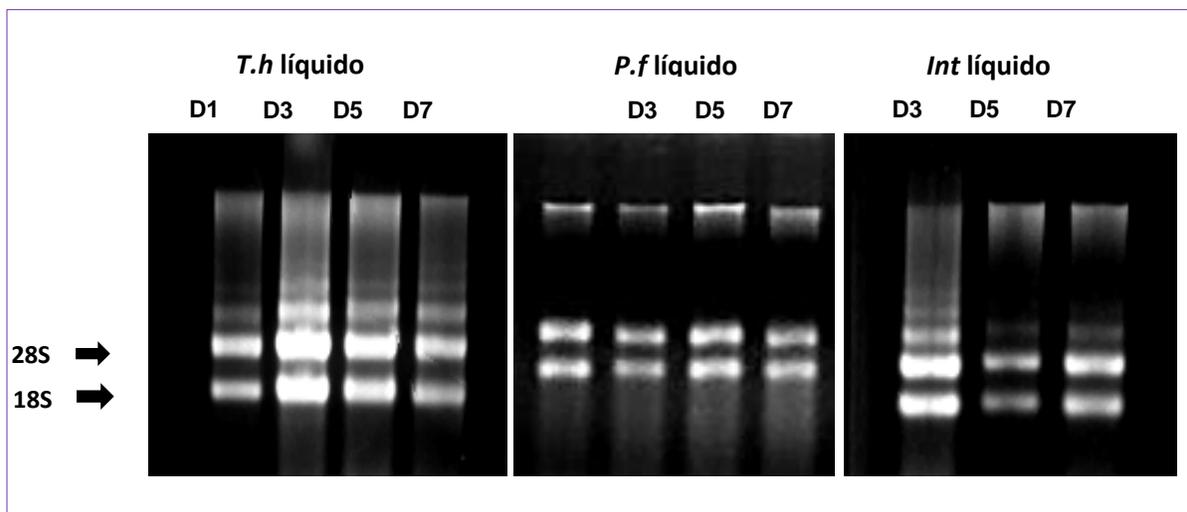


Figura 3.12 Bandas ribosomales de ARN total en un gel nativo de agarosa al 1%. Se analizó 3-4 µl de ARN por carril y se tiñó con bromuro de etidio. Las flechas a la izquierda de la Figura indican las bandas de ARN 28 y 18S.

A partir del ARN total, un microgramo (1 µg), se utilizó para sintetizar ADN complementario (ADNc) para estudiar en los diferentes días de los ensayos en medio sólido y líquido, la expresión de los genes de los efectores seleccionados. El ADNc sintetizado se usó como templado para primero amplificar actina de *P. fijiensis* y con ello asegurar que el ADNc provino del ADNc y no de ADNg residual en la muestra. La banda de actina amplificada sobre ADNc es un poco más pequeña que la obtenida usando ADNg como templado, esto debido a la presencia de un intrón de ~50pb en la secuencia genómica (Figura 3.13). En las muestras de ADNc, se amplificó la actina de *P. fijiensis* con el tamaño esperado, demostrando la ausencia de ADNg en el ARN que se utilizó para la síntesis del ADNc.

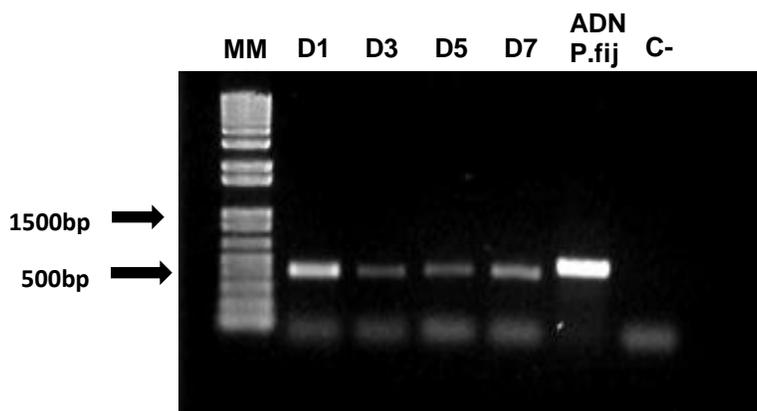


Figura 3.13 Amplicones de actina de *P. fijiensis* obtenidos a partir de ADNc de la interacción en un gel de agarosa de 1.5%. Las muestras corresponden a los días 1, 3, 5 y 7 de la interacción. Se utilizaron 200 ng de ADNc como templado, en cada carril se observa el amplicón de ~ 500 pb correspondiente al fragmento de actina. Como control positivo de amplificación se utilizó ADNg de *P. fijiensis* y agua libre de nucleasas como control negativo con cebadores de actina. Las flechas a la izquierda de la Figura indican el tamaño del marcador de DNA y el del amplicón de actina.

Después de la síntesis de ADNc, se realizó PCR en gradiente para cada uno de los pares de cebadores sintetizados, esto para determinar la temperatura óptima de amplificación en el análisis de la expresión de los genes que codifican a los candidatos de efector. La información de cada par de cebadores se encuentra en el cuadro 3.8.

Cuadro 3.8 Temperaturas medias y secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en la amplificación por RT-PCR de los candidatos a efectores

Nombre	Secuencias de cebadores 5' a 3'	Tamaño de amplicón	Tm
Pre-proteómico			
PfAvr4	FW: GGGACCGAAAGATTGCCTATAC RV: GGCCAATCACACCACTTCT	175	60
PfEcp6	FW: TCATCACCACCCAATCTTACTC RV: GAAGGCACTGTTGGTGTATTG	167	55
InhibidorPf	FW: TCACCTGCATGATAGACGAATAC RV: CCACATACCTGTTGCCTGTTA	162	60.4
Metaloproteasa	FW: CGACGATCCAGATGGAAACT	152	60.4

	RV: CTCGGACATTGTAGCCTTGA		
RALF	FW: GCTCAGACTTATTCTCCTGTCAA RV: CAGAGCAGCGTAGATGATGTAT	159	60
Fosfolipasa	FW: AAACCAGCCTCTCAACCATC RV: AAGGGAATCCGAAAGGGTTATC	150	61.4
Kp4	FW: TGTCCTCCCTCTTCTCTACAC RV: GGCTGTATGATGTGCTTGGGA	143	58.9
LysM	FW: AAGGACCAAACATGCGATAGT RV: GATGGAAGAGCTGCTGGATAC	150	60
Qid3	FW: CCTCGTTCTTGGCATCGT RV: CTGGCAAAGGACGTCTTGA	154	62
Pra1	FW: CCCAGGTTGGTGTTCATCT RV: GAAGCAGGCAGAGTAGCATAG	145	60.4
CHIT 42	FW: GTTGCCTACCTCAAGTCTCTC RV: AGCAAGTTCTGAGTCGTGTC	134	58
	Post-Proteómico		
MF8L6	FW: ATCGAAGCGTCAACAGCA RV: CATTCTTCAGGTCCCAGGTAAG	99	63
MF410	FW: AGCCTACCTGAAGGAACTCTA RV: GACCGAAGTGACGACTTTC	106	63
MFW28	FW: TCTTAGGCCAAACCGACAAG RV: TGGCTTTGTGTTGGAGAGATAG	105	61.4
MF580	FW: GGACCAGTTCTTGTTCAATTC RV: CTTACCAAATGCAAGATGTC	100	60
TH 5Z9 (TH1)	FW: TGCACATTCACGGCTTACA RV: ACTTCATGCTCCAGGCTTTC	109	58.4
TH N60 (TH2)	FW: CGATGAGGGCACTGCTATATTC RV: TTTACAGAGGACCGACCGTA	93	63.6
TH GK6 (TH3)	FW: CAACGGCTCTCAGTTCTTCATC RV: CGTACTTAACCTTGCCGTCATC	149	63
	Genes de referencia <i>P. fijiensis</i>		
Actin1 (RT-PCR)	FW: CTCATGAAGATCTTGGCTGAG RV: GCAATGATCTTGACCTTCAT	~500	54
Actin2 (RT-qPCR)	FW: CATCACCATTGGCAACGAGC RV: CCTGGATACATGGTAGTACC	<200	60

3.5 Análisis por RT-PCR de los candidatos post-proteómicos de efectores de *P. fijiensis* en la interacción en medio líquido

Se hizo una mezcla ("pool") de 200 ng de los ADNc sintetizados a partir de las muestras de RNA obtenidas en los días 1, 3, 5 y 7 de la interacción en medio líquido de *T. harzianum*-*P. fijiensis*. A partir de dicha mezcla se utilizaron 400 ng de ADNc como templado y los cebadores específicos de cada candidato para amplificarlos por medio de PCR. Se amplificó el producto esperado para MFW28 (carril 3), un candidato post proteómico de *P. fijiensis* y también para la quitanasa CHIT42 (carril 4) de *T. harzianum* (Figura 3.14). Es probable que los amplicones obtenidos correspondan a los efectores de interés en este estudio, debido a que solo se observó un amplicón que tiene el tamaño esperado. Los cebadores fueron diseñados para el estudio de expresión en PCR en tiempo real, así que los tamaños de los amplicones esperados es pequeño, 105 pares de bases (pb), para MFW28 y 134 pb para CHIT42.

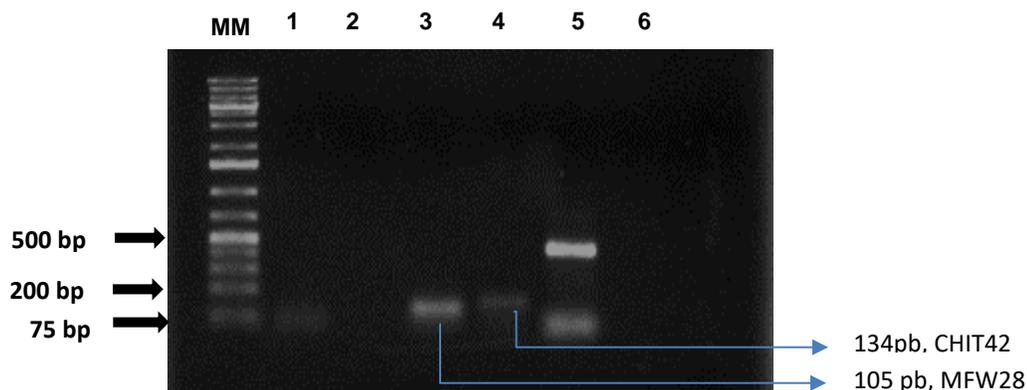


Figura 3.14 Análisis por RT-PCR de tres candidatos de *P. fijiensis* seleccionados con el enfoque post-proteómico (1=MF8L6, 2=MF410, 3=MFW28) y uno de *T. harzianum* seleccionado con el enfoque pre-proteómico (CHIT42) en el carril 4. En los carriles 1-5 se usó 400 ng de ADNc de la interacción. Como control positivo (carril 5) se usó la amplificación del factor de elongación de *T. harzianum* y agua libre de nucleasas con cebadores de factor de elongación como control negativo.

Dado que MF410 no amplificó, se decidió estudiar otro gen de la lista de candidatos post-proteómicos llamado MF580. En la Figura 3.15 se muestra la amplificación de MF580 en la interacción y el control y también el candidato MFW28 que se muestra en la Figura 3.14. El

amplicón esperado para Mf580 es de 100 pb. Se usó 200 ng de ADNc de las mezclas de la interacción y del control.

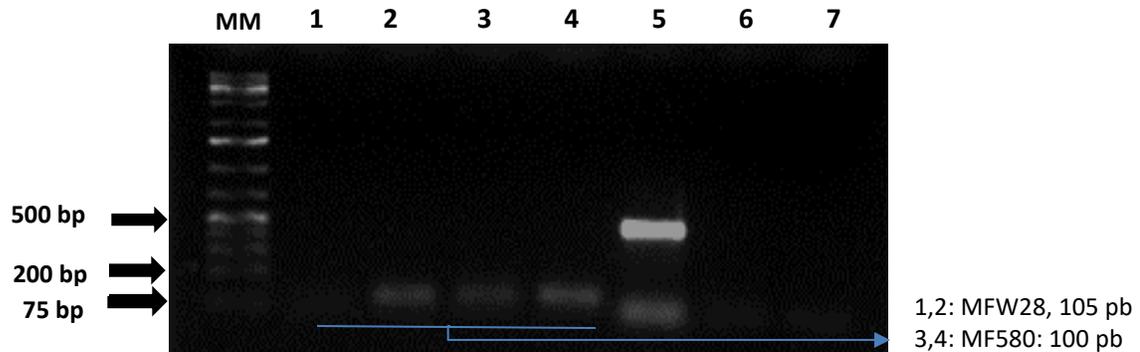


Figura 3.15 Análisis por RT-PCR de candidatos MFW28 y MF580 de *P. fijiensis* del enfoque post-proteómico en la interacción pool ADNc de los días 1,3,5 y 7. Se usó 200 ng de ADNc como templado en cada carril. Los carriles corresponden a las muestras: 1 = amplicón de MFW28 en la interacción; 2 = amplicón de MFW28 en el control; 3 = amplicón de MF580 en la interacción; 4 = amplicón de MF580 en el control; 5 = amplicón de actina en ADNc (200 ng) de *P. fijiensis* como control positivo; 6 = agua libre de nucleasas con cebadores de MFW28 como control negativo y 7 = agua con cebadores de MF580

3.6 Amplificación por RT- PCR de los candidatos pre-proteómicos de *P. fijiensis* a partir del ADNc sintetizado de la interacción en medio líquido

Doscientos nanogramos (200 ng) de la mezcla de ADNc de la interacción o del control se utilizaron como templado en el análisis de expresión de los candidatos pre-proteómicos. La Figura 3.16 muestra la amplificación de un producto de 153 pb correspondiente a una metaloproteasa en la muestra control; en contraste, no se observó amplificación en el carril correspondiente a un inhibidor de proteasa. Los amplicones observados en las líneas 5 y 6 de la Figura 3.16, corresponden a la amplificación de actina de *P. fijiensis*.

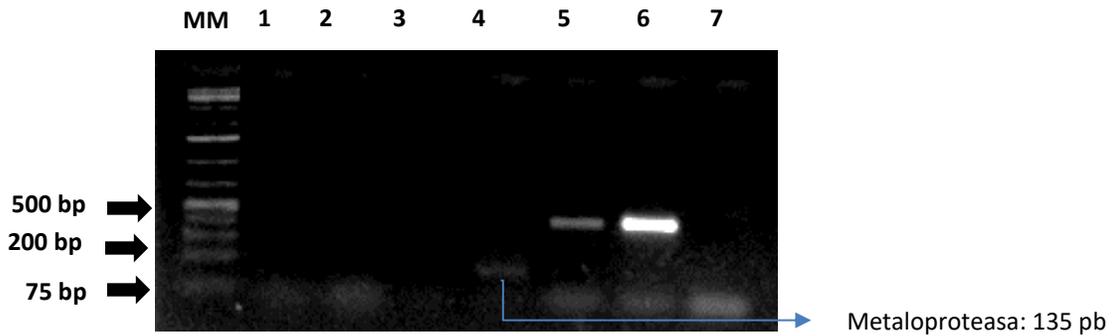


Figura 3.16 Análisis por RT-PCR de candidatos pre-proteómicos de *P. fijiensis* y del enfoque post-proteómico en la mezcla de ADNc de la interacción de los días 1, 3, 5 y 7 y los controles o monocultivos. Se usó 200 ng de ADNc como templado en cada carril. Los carriles corresponden a las muestras: 1 = inhibidor de proteasa en la interacción; 2 = inhibidor de proteasa en el control; 3 = metaloproteasa en la interacción; 4 = metaloproteasa en el control; 5 = actina en la interacción; 6 = actina en el control; 7 = agua con cebadores de actina.

La Figura 3.17 muestra los amplicones de la metaloproteasa e inhibidor de proteasa (162 pb) obtenidos a partir ADNg de *P. fijiensis* como templado. El candidato, RALF, no se amplificó en el ADNg después de diversos intentos.

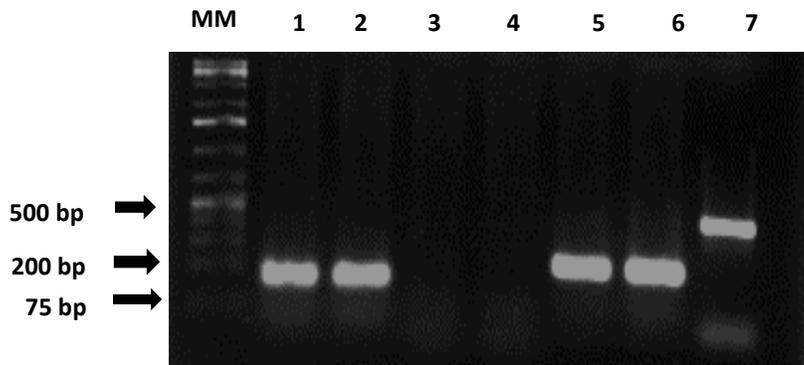


Figura 3.17 Amplicones de los candidatos pre-proteómicos en ADNg de *P. fijiensis*: InhibidorMF, RALF y Metaloproteasa. Se usó 1 ul de ADNg (200 ng) de *P. fijiensis* en cada reacción. Los carriles corresponden a las muestras: líneas 1 y 2 = Inhibidor de proteasa, 3 y 4 = RALF; 5 y 6 = Metaloproteasa, 7 = Actina de *P. fijiensis*.

El uso de las mezclas de ADNc de la interacción o de los monocultivos, como templado en las reacciones de PCR y cebadores específicos para amplificar a Avr4, produjo un amplicón con el tamaño esperado de 174 pb tanto en el ADNc de los monocultivos como en el de la interacción (Figura 3.18).

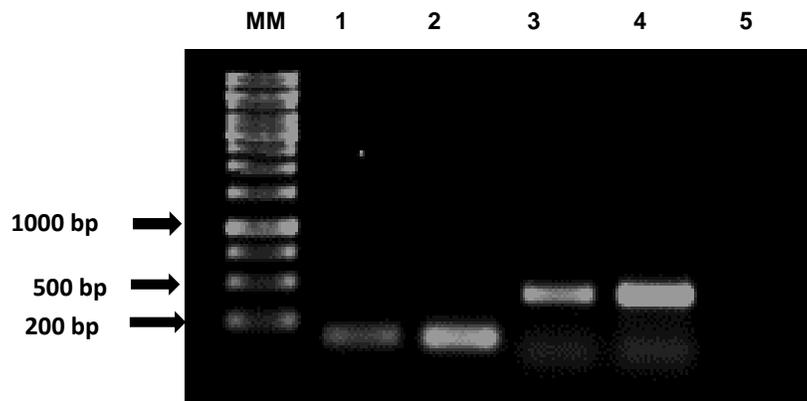


Figura 3.18 Análisis por RT-PCR y visualización en gel de de agarosa del efector candidato Avr4 de *P. fijiensis* seleccionado con el enfoque pre-proteómico. El ADNc de la interacción (400 ng) se utilizó como templado en las reacciones analizadas en los carriles 1-4. Los carriles denotan 1 = amplicón de Avr4 de la interacción; 2 = amplicón de Avr4 del monocultivo de *P. fijiensis*; 3 = amplicón de actina de *P. fijiensis* en la interacción; 4 = amplicón de actina de *P. fijiensis* en monocultivo; 5 = Agua libre de nucleasas con cebadores de Avr4 como control negativo.

En la Figura 3.19 se muestra que por RT-PCR solo se observó el amplicón de Ecp6 en el carril correspondiente al monocultivo.

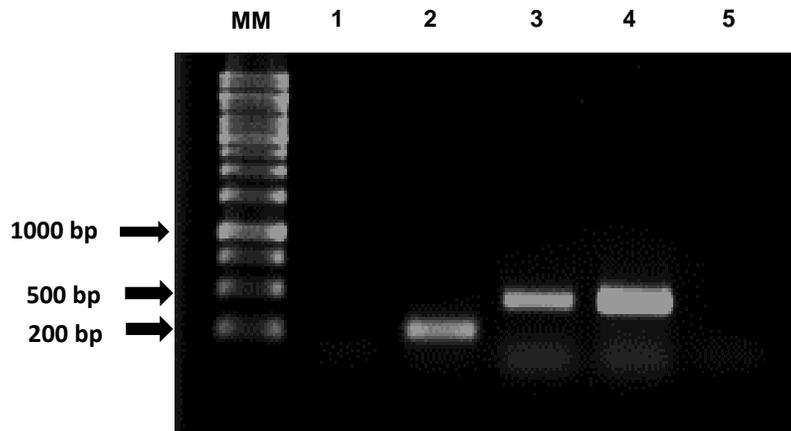


Figura 3.19 Análisis por RT-PCR y visualización en gel de agarosa del efector candidato Ecp6 de *P. fijiensis* seleccionado con el enfoque pre-proteómico. El ADNc de la interacción fue utilizado en los carriles 1-4. Los carriles denotan 1 = amplicón de Ecp6 en la interacción; 2 = amplicón de Ecp6 en el monocultivo de *P. fijiensis*; 3 = amplicón de actina de *P. fijiensis* en la interacción; 4 = amplicón de actina de *P. fijiensis* en monocultivo; 5 = Agua libre de nucleasas con cebadores de Ecp6 como control negativo.

3.7 Amplificación por RT-PCR de los efectores candidatos post-proteómicos de *T. harzianum* a partir de la interacción en medio líquido

No obstante que se utilizaron 400 ng de ADNc de la interacción como templado, ninguno de los efectores candidatos post-proteómicos (TH1, TH2 y TH3) de *T. harzianum* amplificaron en las reacciones de PCR. Cabe mencionar que se obtuvo un amplicón del factor de elongación de *T. harzianum*, el cual fue utilizado como control positivo (Figura 3.20).

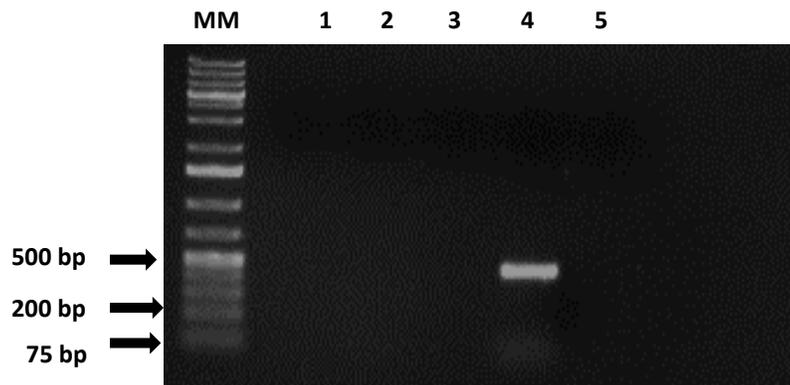


Figura 3.20 Análisis por RT-PCR de los tres candidatos de *T. harzianum* seleccionados con el enfoque post-proteómico (TH1, TH2, TH3) usando ADNc de la interacción. Como control positivo de amplificación se utilizó al factor de elongación de *T. harzianum*; como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas.

3.8 Amplificación de los candidatos pre-proteómicos de efectores de *T. harzianum* en la interacción en medio líquido

La utilización de la mezcla de ADNc (200 ng) de la interacción o del control en reacciones de PCR no produjo amplicones para los candidatos pre-proteómicos: fosfolipasa, kp4, inhibidor de proteasa, Pra1 de *T. harzianum* (Figura 3.21). Cabe mencionar que el candidato, CHIT42, que se eligió en el enfoque pre-proteómico sí amplificó en el ADNc de la interacción tal como se observa en la Figura 3.14.

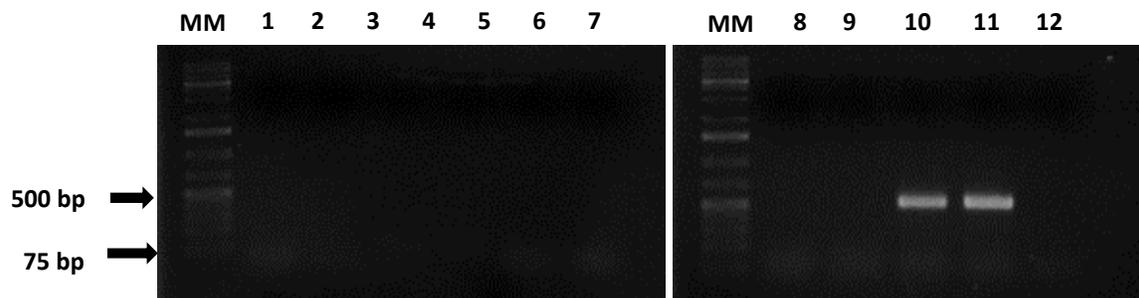


Figura 3.21 Análisis por RT-PCR de cuatro de los cinco candidatos de *T. harzianum* seleccionados con el enfoque pre- proteómico. Se uso una mezcla de ADNc de la interacción o del monocultivo de los días 1,3,5 y 7. Los carriles

corresponden a las muestras: 1 = amplicón de fosfolipasa en la interacción; 2 = amplicón de fosfolipasa en el control; 3 = amplicón de Kp4 en la interacción; 4 = amplicón de Kp4 en el control; 5 = inhibidor de proteasa en la interacción; 6 = inhibidor de proteasa en el control; 7 = Pra1 proteasa en la interacción; 8 = Pra1 proteasa en el control; 10 = Factor de elongación en la interacción; 11 = Factor de elongación en el control; 12 = Agua libre de nucleasas con Factor de elongación.

La Figura 3.22 muestra los amplicones obtenidos de los candidatos pre-proteomicos en ADNg (150 ng) de *T. harzianum*. Se obtuvo amplificación de la fosfolipasa, kp4, InhibidorTH y Pra1, pero no se observaron amplicones para LysM y Qid3.

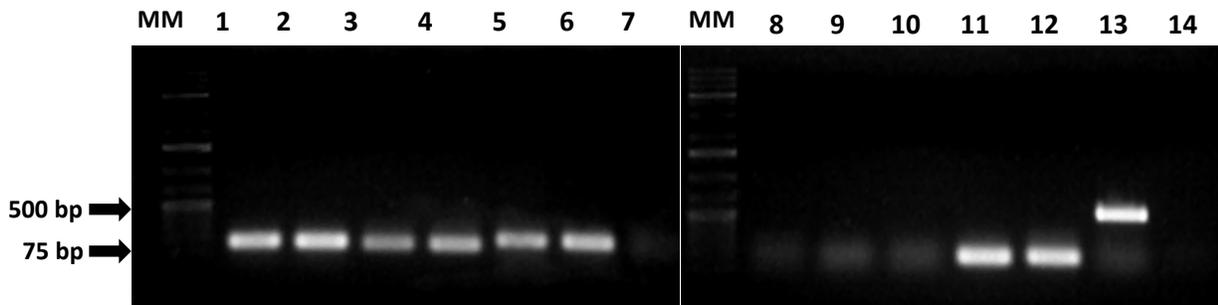


Figura 3.22 Imagen de un gel de agarosa mostrando los amplicones de los candidatos pre-proteomicos obtenidos a partir de ADNg (150 ng/ul) de *T. harzianum*. Los carriles muestran el resultado de la amplificación de los siguientes genes: 1 y 2 = Fosfolipasa: temperaturas 61.4 y 60.4 °C; 3 y 4 = Kp4: temperaturas 58.9 y 57.1; 5y6 = InhibidorTH: temperaturas 58.9 y 57.1; 7 y 8 = LysM: temperaturas 58.9 y 57.1; 9 y 10 = Qid3: temperaturas 58.9 y 57.1; 11 y 12 = Pra1: temperaturas 60.4 y 58.9; 13 = Factor de elongación 53°C ; 14 = Agua con cebadores de factor de elongación.

3.9 Análisis de expresión usando la técnica qPCR

Los efectores candidatos que produjeron amplicones en las reacciones de RT-PCR fueron seleccionados para estudios de expresión usando PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Los candidatos seleccionados se enlistan en el cuadro 3.9.

Cuadro 3.9. Candidatos seleccionados para análisis de expresión por qPCR.

Organismo	Nombre	Tm
<i>P. fijiensis</i>	MFW28	61.4
	MF580	60
	ECP6	55
	AVR4	60

Los niveles de expresión de los candidatos a efectores se calcularon utilizando la expresión relativa, que está en función de la expresión de un gen constitutivo, es decir, cuya expresión se mantiene invariante en diferentes condiciones. La Figura 3.23 muestra la gráfica del promedio de Cts de actina obtenidos en los experimentos de PfAvr4 y MFW28 en los días 1,3,5 y 7 en el control (monocultivo) y la interacción.

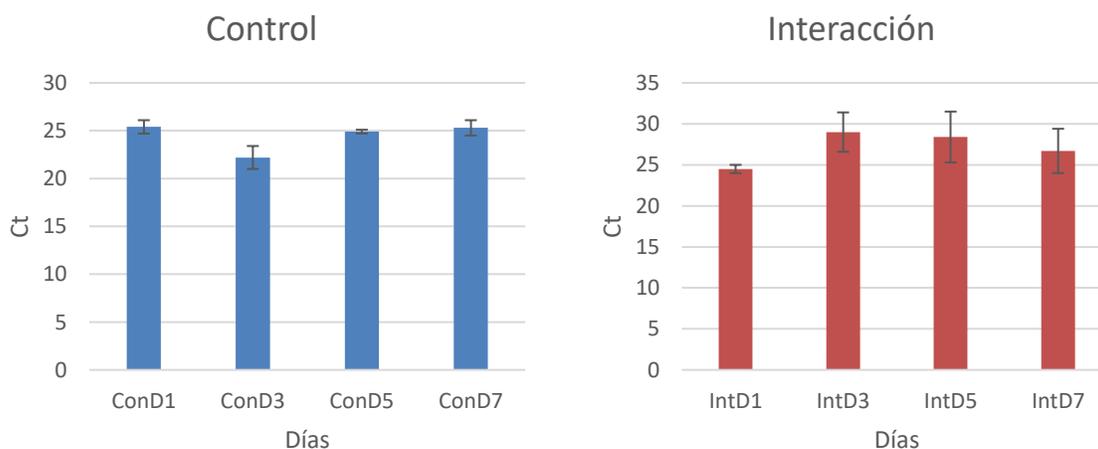


Figura 3.23 Gráficas de barra mostrando los promedios de Cts observados para Actina durante los días 1,3,5 y 7 en el control (azul) y la interacción (rojo).

- **Candidato MFW28**

Se realizó una curva estándar con un factor de dilución de 1:10 con los cebadores de MFW28, esto para determinar su eficiencia de amplificación (Figura 3.24). Una vez establecida la eficiencia, se utilizaron 20 ng de ADNc como templado en los experimentos de expresión. Los análisis de expresión de MFW28 mostraron valores de 0.18, 0.73 y 0.58 para los días 1, 5 y 7 con respecto al valor (1) del control (Figura 3.25). En el día 3, MFW28 se expresó más en la interacción (2.58) que en el control, aunque no hay diferencia significativa entre la expresión de ambos. En el día 1 el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey's ($P \leq 0.05$) mostraron que la diferencia de expresión en la interacción en relación al control es significativa en el día 1.

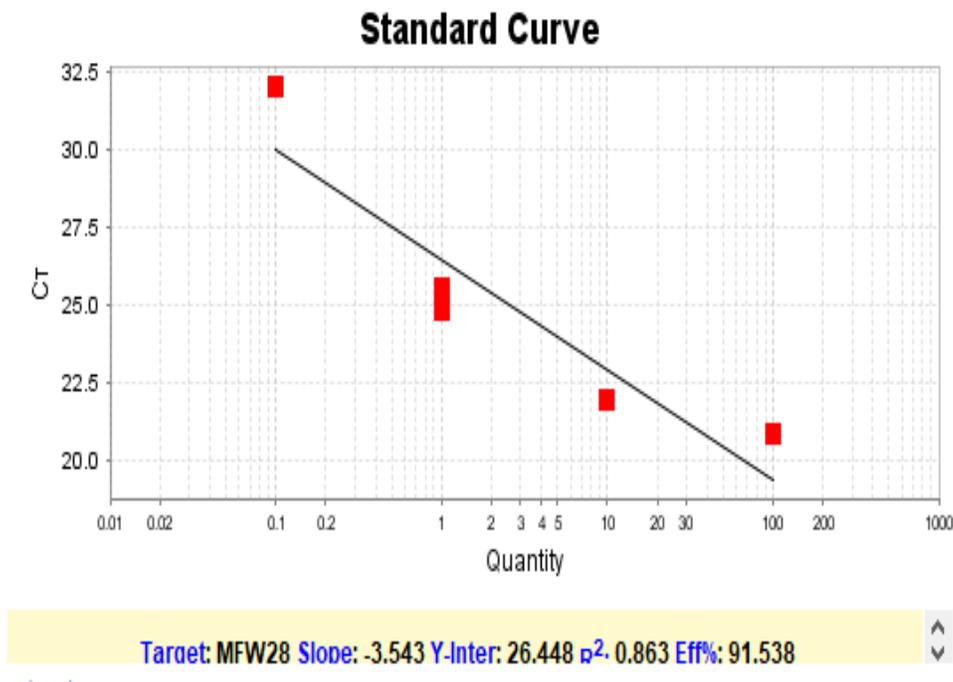


Figure 3.24 Curva estándar para MFW28 usando una dilución de 1:10 a partir de una concentración inicial de 100 ng/ul de ADNc.

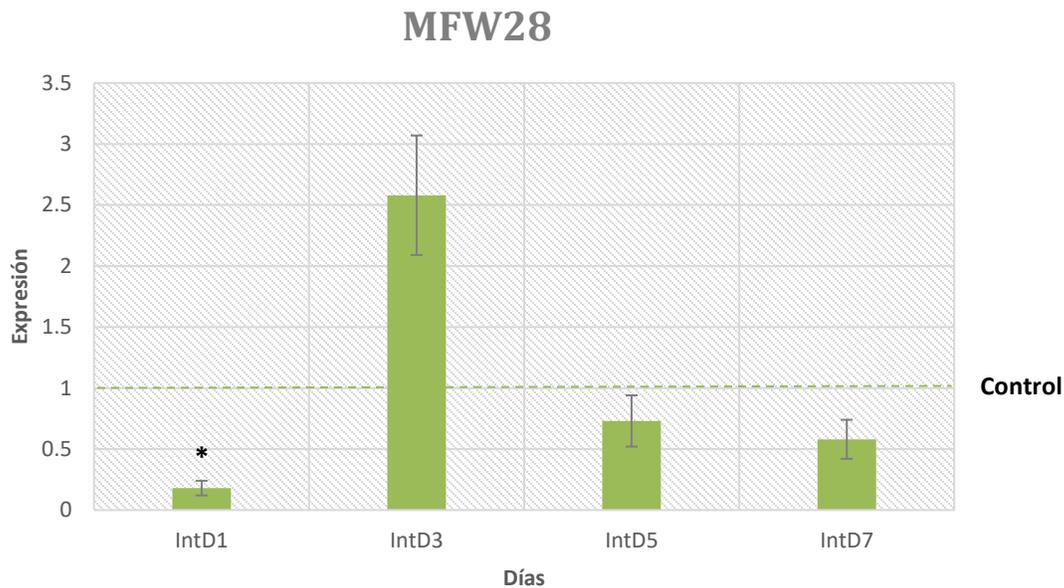


Figura 3.25. Gráfica de expresión relativa de los transcritos de MFW28 de *P. fijiensis*. La expresión de transcritos se calculó con respecto a la expresión basal (monocultivos) en los días 1,3,5 y 7, utilizando actina de *P. fijiensis* como gen de referencia. La gráfica es representativa de dos replicas biológicas con tres replicas técnicas para cada día analizado. Se utilizaron 20 ng de ADNc como templado. Los resultados se analizaron con ANOVA y prueba de Tukey's $P \leq 0.05$ para determinar diferencias significativas entre la interacción y el control.

- **PfAvr4**

Se realizó una curva estándar con un factor de dilución de 1:5 para determinar la eficiencia de los cebadores de PfAvr4 (Figura 3.26). Los experimentos de expresión de Avr4 mostraron valores de 0.05, 0.34 y 0.15 en los días 1,5 y 7 y fueron valores más bajos que el valor de 1 observado en el control (Figura 3.27). En el día 3 de la interacción, la expresión de Avr4 (2.18) superó a la del control. Este nivel de expresión es similar al observado para los transcritos de MFW28. La diferencia en expresión entre el control y la interacción fue significativa ($P \leq 0.05$) para el día 1.

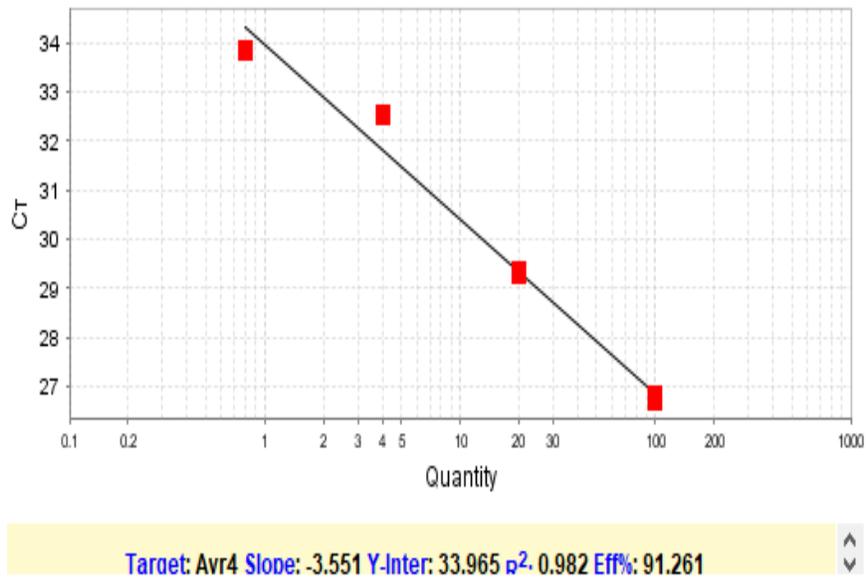


Figure 3.26 Curva estándar para *Pf-Avr4* usando una dilución de 1:5 a partir de una concentración inicial de 100 ng.

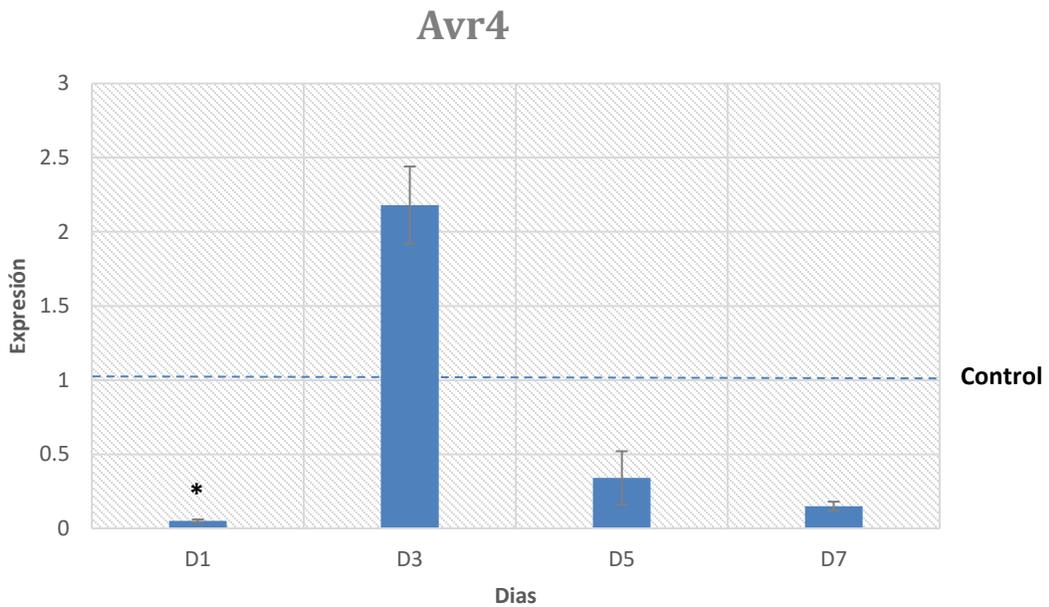


Figura 3.27 Gráfica de expresión relativa de *Avr4* de *P. fijiensis* (*PfAvr4*). El nivel de transcritos en relación a la expresión basal de los monocultivos en los días 1,3,5 y 7, utilizando actina de *P. fijiensis* como gen de referencia. El nivel de expresión relativa se calculó utilizando la ecuación descrita por Pfaffl (2001). La gráfica es representativa de dos replicas biológicas con tres replicas técnicas para cada día analizado. Se utilizaron

20 ng de ADNc como templado. Los resultados se analizaron con ANOVA y prueba de Tukey's $P \leq 0.05$ para determinar diferencias significativas entre la interacción y el control.

- **MF580**

Para el candidato a efector MF580 se realizó una curva estándar con un factor de dilución de 1:5 para determinar la eficiencia de amplificación de sus cebadores (Figura 3.28). El análisis de expresión mostró que en todos los días analizados, la expresión de MF580 fue menor a la observada en el control. Los valores de la expresión fueron de 0.79, 0.33, 0.13 y 0.35 para los días 1,3,5 y 7, tal como se observa en la Figura 3.29. En el día 1 se observó la expresión mas elevada de MF580, aunque por debajo de la del control; dicha tendencia de disminución continuo en los siguientes días analizados. La diferencia en expresión entre el control y la interacción fue significativa ($P \leq 0.05$) en el día 5.

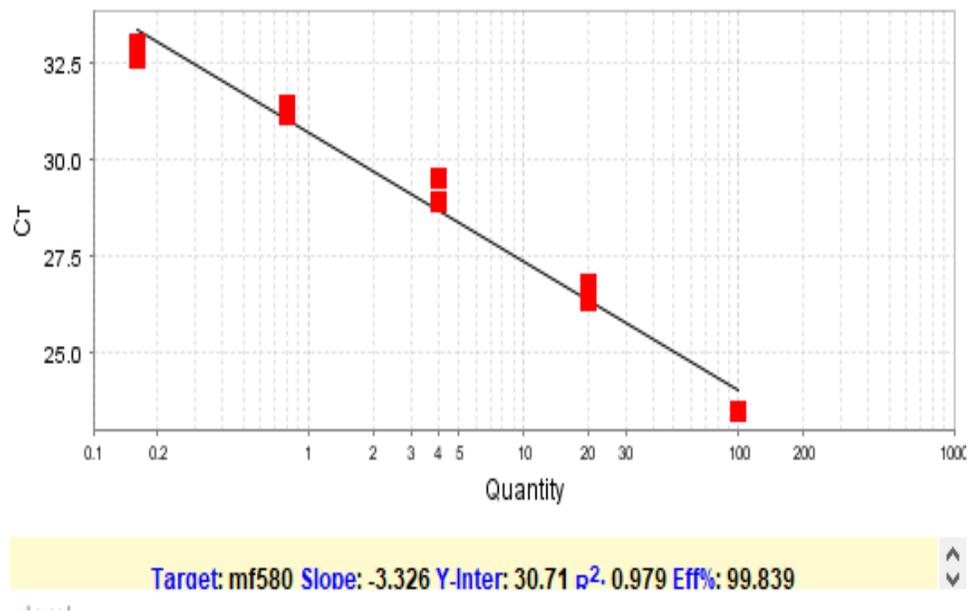


Figure 3.28 Curva estándar para MF580 usando una dilución 1:5 a partir de una concentración inicial de 100 ng de ADNc.

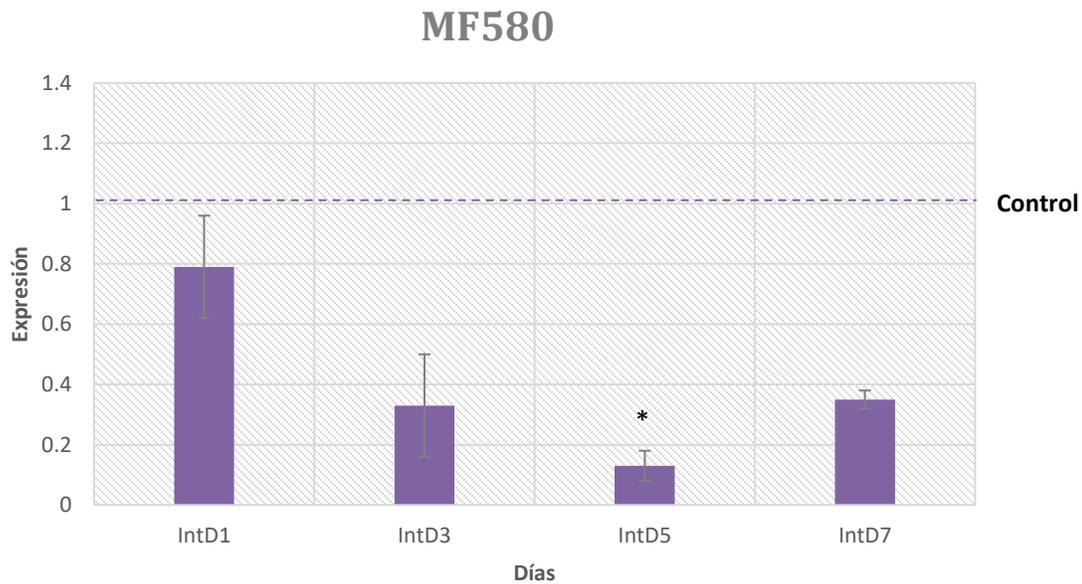


Figura 3.29 Gráfica de expresión relativa de MF580 de *P. fijiensis*. Se muestran los niveles de expresión de transcritos de MF580 en la interacción con respecto a su expresión basal en los monocultivos en los días 1,3,5 y 7. Se utilizó a la actina de *P. fijiensis* como gen de referencia. El nivel de expresión relativa se calculó usando la ecuación descrita por Pfaffl (2001). Los niveles de expresión son representativos de dos replicas biológicas con tres replicas técnicas para cada día analizado. Se utilizaron 20 ng de ADNc como templado. Los resultados se analizaron con ANOVA y prueba de Tukey's $P \leq 0.05$ para determinar diferencias significativas entre la interacción y el control.

- **PfEcp6**

Dado que ya se contaba con una gráfica de calibración para los cebadores de Ecp6, entonces los experimentos de expresión de dicho gen se realizaron directamente. Se encontró que, en todos los días analizados, la expresión de PfEcp6 fue menor a la del control. Los valores de expresión de PfEcp6 en la interacción fueron de 0.17, 0.02, 0.04 y 0.06 para los días 1,3,5 y 7 (Figura 3.30). Aunque menor que el control, en el día 1 se observó la expresión más elevada de PfEcp6, disminuyó al mínimo en el día 3, y en los días días 5 y 7 tuvo un ligero repunte. La diferencia en expresión entre el control y la interacción fue significativa ($P \leq 0.05$) en los días 1 y 3.

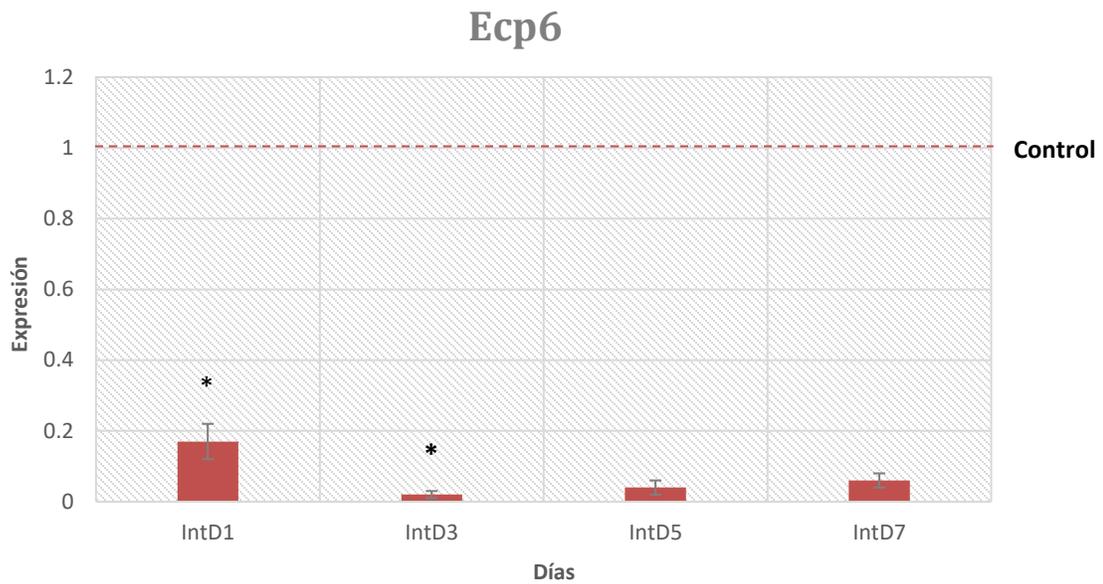


Figura 3.30 Gráfica de expresión relativa de Pf-Ecp6 de *P. fijiensis* en interacción con *T. harzianum* o como monocultivo. La evaluación de la expresión de transcritos en la interacción *P. fijiensis*-*T. harzianum* con respecto a la expresión basal en los monocultivos se realizó en los días 1,3,5 y 7, utilizando actina de *P. fijiensis* como gen de referencia. La expresión relativa de PfEcp6 se realizó mediante la ecuación descrita por Pfaffl (2001). La gráfica es representativa de los resultados obtenidos a partir de dos replicas biológicas con tres replicas técnicas para cada día analizado. Se utilizaron 20 ng de ADNc como templado. Los resultados se analizaron con ANOVA y prueba de Tukey's con $P \leq 0.05$ para determinar diferencias significativas entre la interacción y el control.

3.10 Observación por microscopía de la interacción *T. harzianum*-*P. fijiensis*

En la literatura se ha reportado que *T. harzianum* es capaz de ‘enrollar’ sus hifas sobre las de otros hongos durante su interacción, aunque su comportamiento no se ha observado en todas las interacciones microbianas. Para analizar el comportamiento hifal de *T. harzianum* sobre *P. fijiensis*, se realizaron experimentos con microscopía óptica y electrónica de barrido. El análisis por microscopía electrónica de barrido mostró que *T. harzianum* cuyas hifas se observan más blancas y delgadas se “enrolla” sobre las hifas de *P. fijiensis* (hifas más gruesas y oscuras (Figura 3.31).

Otro fenómeno descrito en el micoparasitismo por *T. harzianum* es la producción de esporas sobre el micelio de la contraparte (Acosta-suárez *et al.*, 2013). En nuestro trabajo se observó que al día 7, cuando el micelio de *T. harzianum* había cubierto completamente el micelio de *P. fijiensis*, entonces *T. harzianum* empezó a producir conidios dispersos sobre su superficie (Figura 3.32). Las Figuras 3.33 y 3.34 muestran que el análisis con microscopía óptica al séptimo día de la interacción, una vez más, evidenció el enrollamiento de las hifas de *T. harzianum* sobre *P. fijiensis*.

Las interacciones en medio de cultivo líquido y sólido se muestran en las Figuras 3.36 y 3.37 y se observa que el crecimiento de *T. harzianum* hacia *P. fijiensis* es más evidente en el cultivo sólido. *T. harzianum* logró sobrecrecer a *P. fijiensis* a los cinco días después de iniciada la interacción.

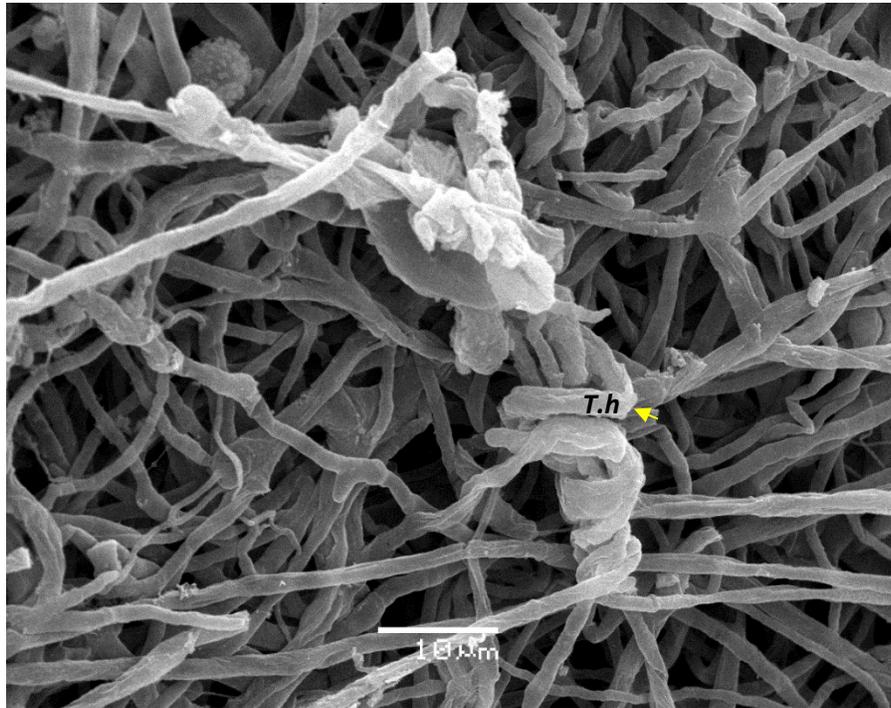


Figura 3.31 Micrografía de microscopía electrónica de barrido de la interacción de las hifas de *T. harzianum* y *P. fijiensis* después de 7 días de cocultivo (magnificación: 1700x).

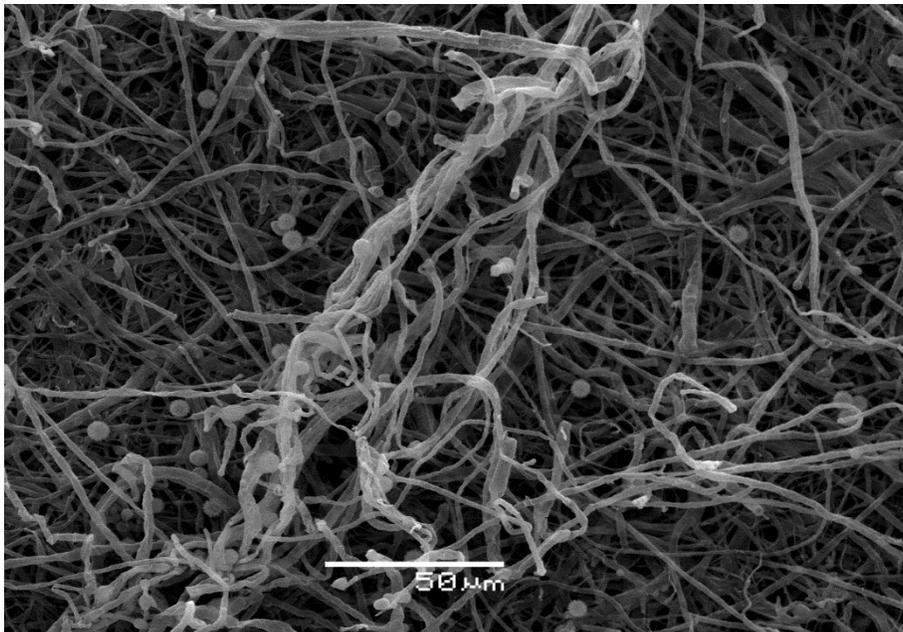


Figura 3.32 Micrografía de microscopía electrónica de barrido de las hifas y la producción de conidios de *T. harzianum* a los 7 días de interacción con *P. fijiensis* (magnificación: 500x).

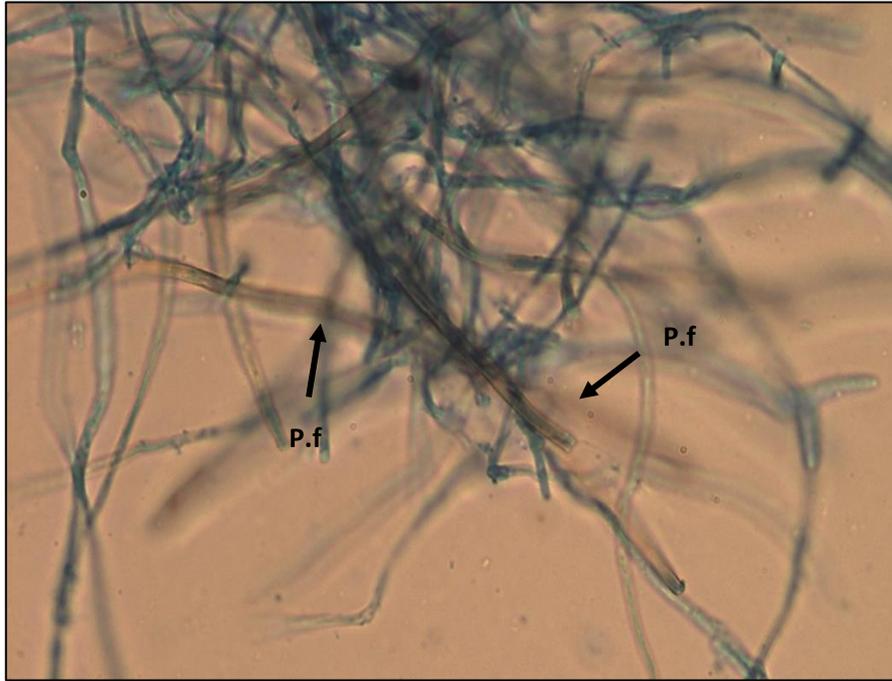


Figura 3.33 Observación por microscopía óptica de la interacción de *T. harzianum*-*P. fijiensis*; las hifas se tiñeron con azul de lactofenol. En las imágenes las hifas de *P. fijiensis* son más oscuras que las de *T. harzianum* y son señaladas con flechas negras mientras que las hifas más delgadas, abundantes y azules son de *T. harzianum*. Sus hifas presentaron con mayor tinción debido a la carencia de pigmentos en sus hifas hialinas. Las imágenes se capturaron con 40 aumentos

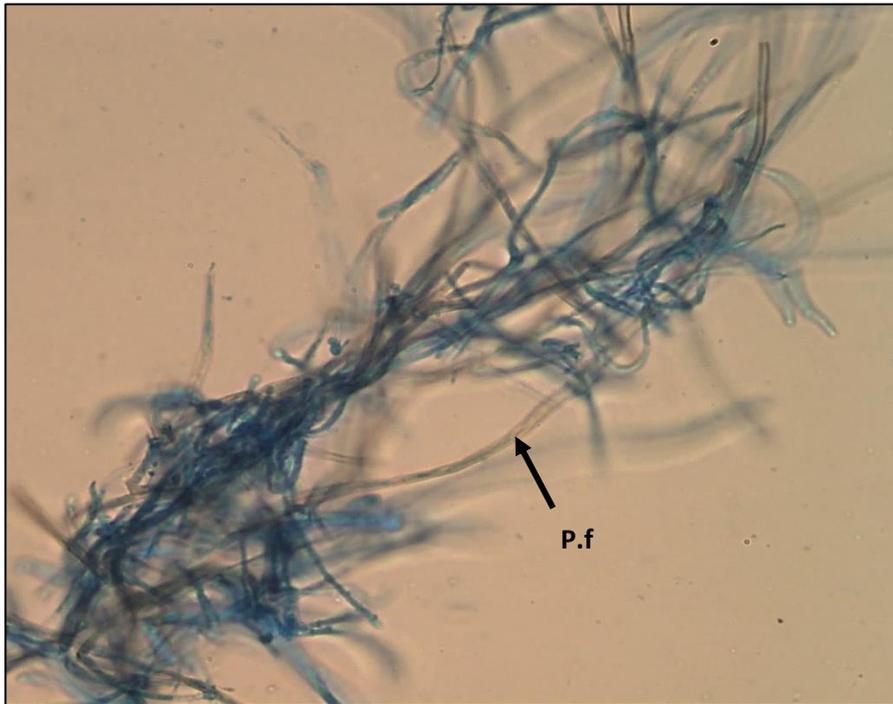


Figura 3.34 Micrografías de microscopía óptica de la interacción al quinto día entre *T. harzianum*-*P. fijiensis*. El aumento de la imagen es de 40x.



Figura 3.35 Observación por medio de microscopía de contraste de fase de la interacción *T. harzianum*-*M. fijiensis*. El aumento es de 400x. (Acosta-Suarez *et al.*, 2013)

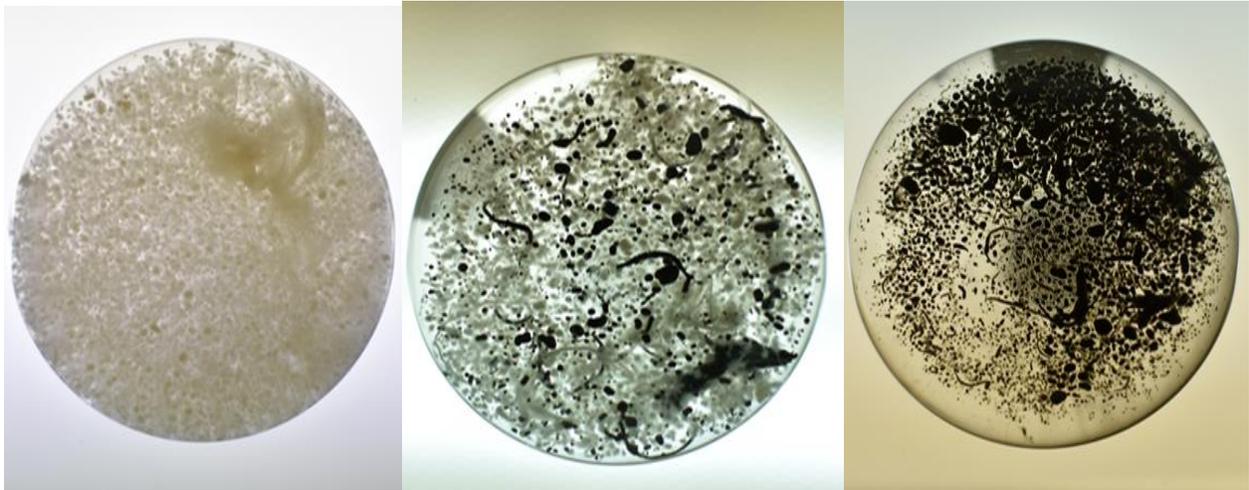


Figura 3.36 Imágenes de los monocultivos y de la interacción al día 5 de *T. harzianum*-*P. fijiensis* en medio líquido. De izquierda a derecha: **A**- monocultivo de *Trichoderma harzianum*, **B**- Interacción *T. harzianum*-*P. fijiensis*, **C**- monocultivo de *Pseudercospora fijiensis*. Fotografías tomadas por el MC Miguel Tzec Simá.

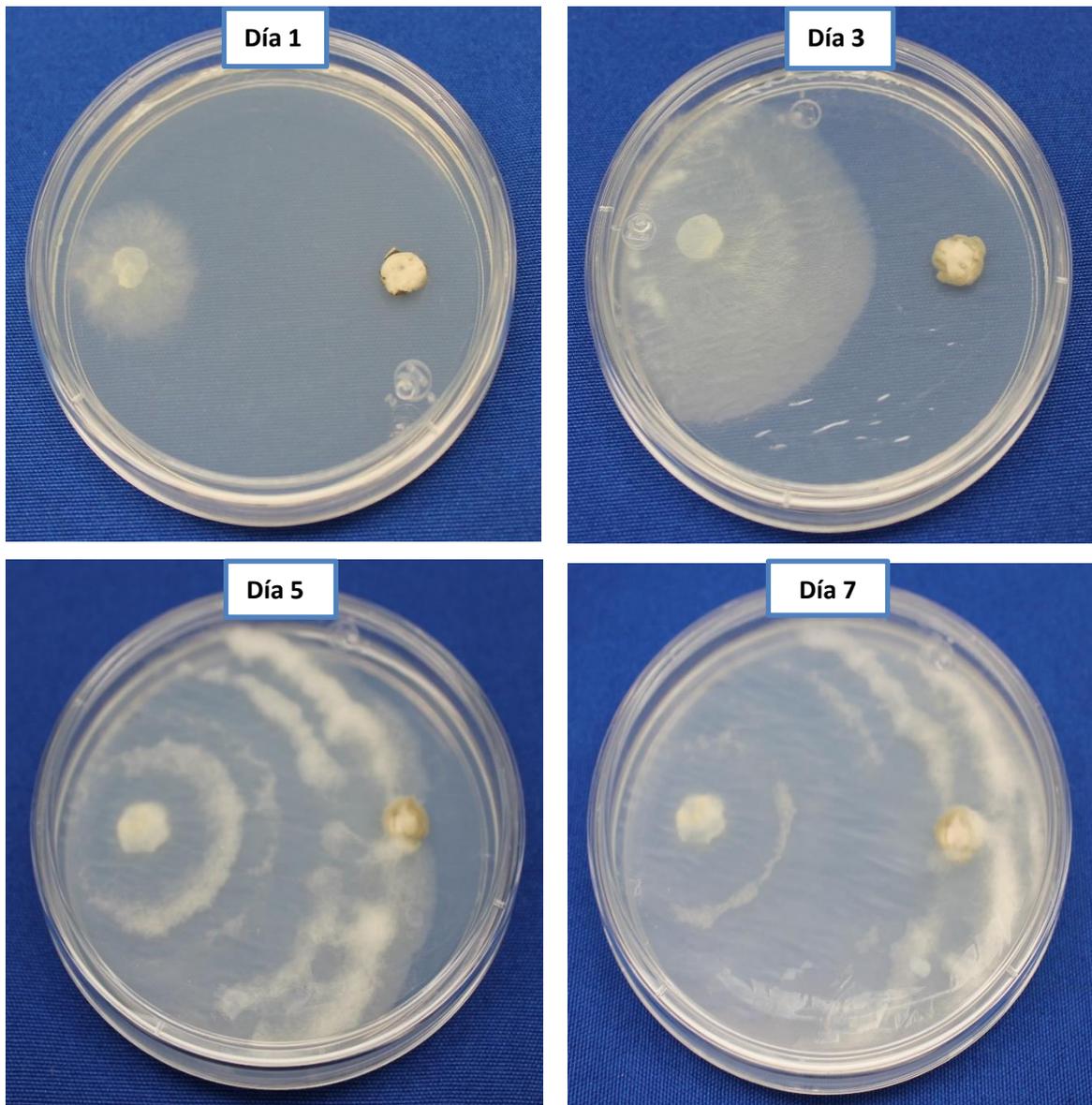


Figura 3.37 Registro fotográfico de diversas etapas de la interacción *T. harzianum*-*P. fijiensis* en medio sólido durante los días 1, 3, 5 y 7 de su interacción.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

4.1 El análisis pre-proteómico

Para identificar posibles candidatos a efectores en la interacción entre *P. fijiensis* y *T. harzianum* se decidió identificarlos desde una perspectiva pre-proteómica y una post-proteómica. En el primer enfoque, se identificaron y seleccionaron candidatos que han sido descritos en la literatura existente sobre el genoma de *P. fijiensis* y su transcriptoma en interacción con *Musa* sp., mientras que los candidatos pre-proteómicos de *T. harzianum* fueron seleccionados de las investigaciones que han descrito las interacciones microbianas de *T. harzianum*. Se esperaba que algunos de los candidatos pre-proteómicos estuvieran presentes en la interacción *P. fijiensis* -*T. harzianum*.

En el genoma de *Pseudocercospora fijiensis*, *in silico*, se han identificado 584 proteínas pertenecientes al secretoma, 105 de ellas fueron candidatos a efectores (Chang *et al.*, 2016). En un trabajo posterior, Arango-Isaza y colaboradores (2016) publicaron que el genoma de *P. fijiensis* posee 172 genes que codifican para proteínas pequeñas (menores de 300 aminoácidos), ricas en cisteína (SSCPs) que serían posibles efectores. Como parte del enfoque pre-proteómico, en este trabajo, se seleccionaron dos de los tres efectores conocidos para *P. fijiensis*, PfAvr4 y PfEcp6, ambos, ortólogos funcionales de los efectores 'Avr4' y 'Ecp6' del dotidiomiceto, hemibiótrofo *Cladosporium fulvum* (Stergiopoulos *et al.*, 2010; Bolton *et al.*, 2008).

Avr4 es el único efector caracterizado para *P. fijiensis* y se sabe que este efector, a través de su unión con quitina, protege al hongo contra la acción de las quitinasas del hospedero (Stergiopoulos *et al.*, 2010) y también induce la respuesta hipersensible con el cultivar resistente de banano, Calcuta IV (Arango-Isaza *et al.*, 2016).

En el caso del efector Ecp6, se conoce que éste desempeña un papel fundamental en el "secuestro" de los oligómeros de quitina que se liberan de la ruptura de la pared celular fúngica; de esta manera Ecp6 compete con los receptores de quitina de la planta y evita su reconocimiento, previniendo con ello la activación de las respuestas de defensa vegetal,

dado que serían perjudiciales para el hongo (Bolton *et al.*, 2008; de Jonge *et al.*, 2010). Se sabe que Ecp6 es un factor de virulencia de *C. fulvum* debido a que se observó que la sobreexpresión de este gen promovió el desarrollo de la infección por *F. oxysporum* en cultivos de tomate y el silenciamiento causó la atenuación de la virulencia (Bolton *et al.*, 2008).

En nuestro trabajo se hipotetizó que PfAvr4 y PfEcp6 están involucrados en la interacción microbiana como protectores contra las diferentes quitinasas de *T. harzianum* y posiblemente en el retraso de la detección de *P. fijiensis* por *T. harzianum*. De igual manera, se hipotetizó que *P. fijiensis* utiliza enzimas líticas para atacar a *T. harzianum*, posiblemente proteasas, como se ha descrito en otras interacciones microbianas.

Algunos efectores tienen actividad hidrolítica como 'Avr-Pita', una metaloproteasa y efector de *Magnaporthe oryzae* que desencadena la respuesta hipersensible en plantas resistentes (Jia *et al.*, 2000) 'Cgfl' otro efector y metaloproteasa del hongo *Colletotrichum graminicola* (Sanz-Martín *et al.*, 2016). Por lo tanto, para nuestro trabajo se eligió una metaloproteasa como candidato a efector (JGI: 210135). Una proteína con dominio RALF 'rapid alkalization factor' (JGI: 201584) dado que se hipotetizó que *P. fijiensis* lo usaría para cambiar el pH del medio de cultivo, tal como lo hacen algunos hongos, i.e., *Colletotrichum gloeosporioides* (Shnaiderman *et al.*, 2013) y *Magnaporthe oryzae* (Landraud *et al.*, 2013) que utilizan amonio para cambiar el pH del tejido en su ataque de la planta hospedera. Mecchia *et al.* (2017) proponen que los hongos pueden utilizar este tipo de péptidos para señalización celular; provocar la fosforilación de una Map cinasa (MAPK) inducida por el pH alcalino del ambiente, lo que puede resultar en el crecimiento acelerado del hongo. En cultivos de tomate que crecieron en medio de cultivo adicionados con péptidos RALF, (sintetizados a partir de las secuencias en *F. oxysporum* raza 2) se observó que ocurrió retraso en el crecimiento de las plántulas además de que sus raíces y las plántulas mostraron altos niveles de especies reactivas de oxígeno (Thynne *et al.*, 2017).

Por último, se eligió un inhibidor de proteasas (JGI: 132767), un tipo de efector que se encuentra descrito frecuentemente en la literatura de hongos e.g., *Ustilago maydis* (Pit2, (Mueller *et al.*, 2013), *Cladosporium fulvum* (Avr2, Shabab *et al.*, 2008) y oomicetos e.g., *Phytophthora sojae* (PsAvh240, Guo *et al.*, 2019) y *Phytophthora infestans* (EPIC1, Tian *et*

al., 2007) y que probablemente *P. fijiensis* lo utilice para defenderse contra las proteasas de *T. harzianum*.

Con respecto a los candidatos pre-proteómicos de *T. harzianum*, Mendoza-Mendoza *et al.* (2018) reportaron que el genoma de *T. harzianum* posee un secretoma deducido *in silico* de 1146 proteínas y que entre ellas 108 corresponden a efectores. *T. harzianum* es capaz de antagonizar otros hongos debido en su mayor parte a sus enzimas líticas. La quitina es un componente estructural que consiste de unidades de β -1,4-N-Acetilglucosamina (GlcNAc) y comprende ~ 10-20 % de la pared celular fúngica (Bowman & Free, 2006). Los otros componentes son glucanos, con un contenido ~ 50-60 % en la pared y ~ 20-30% de glicoproteínas que forman la capa más extrema de la pared celular. Por esta razón, en este trabajo también se seleccionaron dos genes que codifican a la proteasa (*pra1*) y a la quitinasa (*Chit42*), la presencia de ambas enzimas líticas ha sido reportada en varios trabajos de interacción patógeno-planta (Steindorff *et al.*, 2014; Ramada *et al.*, 2016; Carsolio *et al.*, 1994; Haran *et al.*, 1996; Katatny *et al.*, 2001; Do Vale *et al.*, 2012).

Siguiendo la ruta de pensamiento descrita en el párrafo anterior, y dada la capacidad de *T. harzianum* de degradar paredes celulares y membranas de su hospedero, entonces en el presente estudio se eligió un efector con actividad de fosfolipasa. Las fosfolipasas hidrolizan enlaces éster en glicerofosfolípidos de la membrana plasmática y también puede afectar las rutas de transducción celular de los hongos (Djordjevic, 2010). Además, se seleccionó un efector *LysM* dado que este tipo de efector puede proteger al hongo contra la degradación lítica inducida por su contraparte, como es el caso de *Mg1LysM* y *Mg3LysM* de *Mycosphaerella graminicola* (Marshall *et al.*, 2011) o tener la función de secuestrar oligosacáridos como *Ecp6* de *Cladosporium fulvum* y *Slp1* de *Magnaporthe oryzae* (Mentlak *et al.*, 2012).

Por otra parte, se eligió una hidrofobina debido a que, en hongos, estas proteínas anfífilas facilitan la adhesión de los conidios a superficies hidrofóbicas. En *Magnaporthe grisea*, la eliminación de genes que corresponden a hidrofobinas resultaron en hongos menos virulentos y con una capacidad reducida para infectar el cultivo de arroz (Kim *et al.*, 2005). La hidrofobina 'qid3' se encontró en la secuenciación de las bibliotecas de ADNc de *T. harzianum* en antagonismo con *Rhizoctonia solani* (Steindorff *et al.*, 2014); en esta interacción también se detectaron la proteína con dominio *LysM* y la fosfolipasa

previamente descritas. Mendoza-Mendoza *et al.* (2018) destacaron un péptido pequeño identificado en el genoma de *T. harzianum*, homólogo a la proteína 'kp4', un péptido que inhibe canales de calcio (Gage *et al.*, 2001). El gen de 'kp4' codifica una toxina de origen viral y en los hongos esta toxina fue primeramente reportada en *Ustilago maydis* (Gage *et al.*, 2001). También, se identificó un homólogo en el transcriptoma de la interacción de *Fusarium graminearum* con trigo (Lysøe *et al.*, 2011) y por lo tanto, se eligió kp4 como candidato para *T. harzianum*. Por último, se eligió un inhibidor de proteasa (JGI: 511478) que se identificó en el transcriptoma de interacción de *T. harzianum* con *R. solani* (Steindorff *et al.*, 2014).

Con base en lo descrito en la literatura sobre el comportamiento de *P. fijiensis* o de *T. harzianum*, en su interacción antagónica con sus hospederos, se eligieron para su estudio los días de cultivo, 1, 3, 5 y 7, según su crecimiento, así como la actividad de algunas de sus enzimas líticas. En *P. fijiensis*, se ha reportado que su crecimiento exponencial en cultivo líquido (de medio V8) empieza tres días después de su inoculación y hasta el día 9. A la par, su actividad proteolítica aumenta desde el día de inicio (0), hasta el día 21 (Chuc-Uc *et al.*, 2011). Hay pocos reportes sobre la expresión de enzimas o posibles efectores de *P. fijiensis* en interacciones microbianas, pero hay reportes para algunas especies de *Trichoderma* debido a su capacidad para el control biológico de microbios. Por ejemplo, se cuantificaron las actividades enzimáticas de siete especies del género *Trichoderma* en interacción con *Macrophomina phaesolina* y se determinó que poseen mayor actividad quitinolítica en los días 3 y 4 de la interacción. Similarmente, al día 3, seis de las siete especies mostraron la actividad más alta de beta 1, 3-glucanasa aunque al día 4 dicha actividad disminuyó (Gajera *et al.*, 2012).

En interacción con *Sclerotinia rolfisii*, seis especies de *Trichoderma* mostraron un aumento en la actividad de quitinasa, proteasa, beta 1, 3- glucanasa, celulasa y poligalacturonasa en los días 2, 3 y 4 (Parmar *et al.*, 2015). *Trichoderma harzianum* crecido en medio adicionado con micelio muerto de *Rhizoctonia solani*, mostró un aumento en la actividad de xilanasa y quitinasa en el día 4 de cultivo y disminuyó al día 5. En contraste, la actividad de beta 1,3- glucanasa fue mayor al día 5 de cultivo. La actividad de proteasa fue más alta al día 4 (Tseng *et al.*, 2008). Según la literatura sobre interacciones microbianas de *Trichoderma* sp. la actividad máxima de sus enzimas líticas relacionadas con el control

biológico se observa entre los días 3-5 de la interacción. De acuerdo con esos reportes y nuestros datos experimentales, se decidió estudiar la expresión de los genes que codifican a los candidatos a efectores, desde el día 1 hasta 7, así como el secretoma producido al día 5 del cultivo.

4.2 El estudio por RT-PCR de la expresión de los candidatos pre-proteómicos

De los cinco candidatos pre-proteómicos elegidos para *P. fijiensis*, cuatro candidatos fueron analizados usando RT-PCR (uno de los candidatos no amplificó en el ADNg de *P. fijiensis*) usando como templado ADNc de la interacción y del monocultivo. Se encontró que PfAvr4, se expresó en la interacción, aunque tuvo una mayor expresión en el control. En contraste, PfEcp6 y una metaloproteasa (JGI: 210135) se expresaron en el control, pero no en la interacción. De los genes pre-proteómicos de *T. harzianum*, solo CHIT42 amplificó en la interacción, pero además estuvo presente en la secuenciación del proteoma del monocultivo de *T. harzianum*.

4.3 Análisis post-proteómico: las proteínas presentes en el secretoma

Con el fin de determinar si en el secretoma de la interacción experimental *T. harzianum*-*P. fijiensis* están involucrados candidatos de efectores, entonces el secretoma del día 5 de la interacción, así como del día 5 de los monocultivos de *T. harzianum* y *P. fijiensis* fue colectado y procesado para la extracción de proteínas. Al secuenciar las proteínas colectadas, se encontraron 363 proteínas en total con 262 procedentes de la interacción. Las proteínas con actividad lítica constituyeron una gran proporción del arsenal secretado por los dos hongos. De los secretomas de los monocultivos y de la interacción (363 proteínas en total), se encontraron más que 90 secuencias sin dominios conocidos, incluyendo proteínas pequeñas (menos que 300 aminoácidos). En total se identificaron 62 proteínas pequeñas (< 300 aa) de los dos hongos, pero después del escrutinio para encontrar candidatos a efectores, se identificaron 23 candidatos (13 para *P. fijiensis* y 10 para *T. harzianum*).

Los resultados de la secuenciación mostraron que la distribución de proteínas del secretoma estuvo sesgada hacia las proteínas grandes, hecho que coincidió con lo

observado en la electroforesis en los geles de SDS-PAGE, donde el secretoma de la interacción mostró abundancia de proteínas con masas moleculares de entre 49.1-204 kDa. Resultados similares se observaron para los secretomas de los monocultivos de *T. harzianum* y el de *P. fijiensis*. Las proteínas, en mayor parte, fueron glicósido hidrolasas de las familias 15, 3, 92, 1 y peptidasas de las familias S8, S58 y S10; además, se encontraron aspartil proteasas, peptidil liasas, proteínas con dominio DUF y proteínas de la familia alfa/beta hidrolasa. Aparte de las enzimas líticas, también se encontraron proteínas relacionadas con el estrés y el metabolismo como cupredoxinas, deshidrogenasas, peroxidases y oxidoreductasas de varias familias.

Dos proteínas encontradas en el secretoma experimental de *T. harzianum* y que llamaron la atención tuvieron dominios de la familia *LanC_like*. LanC es una ciclase que participa en la síntesis de los lantibióticos, péptidos antibióticos producidos por bacterias gram positivas y que inhiben la síntesis de la pared celular de otros organismos con los cuales compiten (McAuliffe *et al.*, 2001). Se sabe que la antibiosis es un componente del antagonismo de *Trichoderma* sp., y que se lleva a cabo en parte por péptidos antimicrobianos llamados peptaiboles. El mecanismo de estos péptidos antimicrobianos es similar al de los lantibióticos, produciendo poros en la pared celular de otros hongos y junto con enzimas hidrolíticas de la pared celular, aumentan el antagonismo de *Trichoderma harzianum* en interacciones microbianas (Lorito *et al.*, 1996; Schirmböck *et al.*, 1994).

La secuenciación de las proteínas aisladas de la interacción *T. harzianum*-*P. fijiensis* mostró que un mayor número de proteínas fueron secretadas por *T. harzianum* (140 vs 122 de *P. fijiensis*), esta característica también se observó en el secretoma del control (206 vs. 87 de *P. fijiensis*). Hasta antes de este trabajo no existían reportes sobre el proteoma de la interacción *T. harzianum*-*P. fijiensis*; no obstante, en las interacciones de *T. harzianum*-*Fusarium solani* y *T. harzianum*-*Guignardia citricarpa*, por medio de geles de electroforesis en doble dimensión (2D-PAGE) se encontró que *T. harzianum* secretó 202 proteínas (94 manchas identificadas) en su interacción con *F. solani* y 144 manchas (65 proteínas identificadas), con *G. citricarpa*. En nuestro trabajo se encontró que las proteínas secretadas específicamente en la interacción *T. harzianum*-*P. fijiensis* fueron enzimas líticas como endo-1,3- glucanasas, glicosil hidrolasas de la familia 55 (GH55), una alfa/beta-

hidrolasa, esterasa, una proteína con dominio WSC y una cupredoxina y un candidato a efector sin dominio conocido.

Muchas de las proteínas de *T. harzianum* secretadas en la interacción también se produjeron y secretaron en el monocultivo. De acuerdo con el número de hidrolasas secretadas, no pareciera que *T. harzianum* tuviera ventaja en términos de la cantidad de hidrolasas secretadas en la interacción porque *P. fijiensis* secretó una cantidad similar en términos de proteínas con dominios caracterizados (73 vs 71). Se ha reportado que además de proteínas con actividad lítica, el antagonismo de *Trichoderma* sp. también se debe a que este hongo produce metabolitos secundarios como el ácido harzianico, policétidos, 6-pentil- α -pirona, viridina, gliovirina entre otros (Benítez *et al.*, 2004), los cuales también participan en la sinergia para el control biológico (Monte, 2001).

Blauth de lima *et al.* (2017) publicaron que *T. harzianum* en interacción en medio mínimo con el patógeno de cítricos, *Guignardia citricarpa* secretó 144 ± 11 proteínas mientras que en el monocultivo *T. harzianum* produjo 352 ± 39 manchas de proteína, revelando así que, en la interacción, *T. harzianum* puede reducir su secretoma. En nuestro estudio, en la condición de monocultivo *T. harzianum* secretó muchas proteínas relacionados con el metabolismo primario que no aparecieron en la interacción; es probable que en la interacción *T. harzianum* disminuyó la cantidad de esas proteínas en favor de las proteínas necesarias para el micoparasitismo. Blauth de Lima *et al.* (2017), mencionaron que las proteínas de *T. harzianum* involucradas en la degradación de la pared celular de los hongos "presa" se expresan en ausencia de éstos, por ejemplo, beta glucanasas, endoquitinasa de 42 kDa (chit42), las familias de proteínas GH31 y GH71, esto podría deberse a que las glicosil hidrolasas están involucradas tanto en procesos de metabolismo de la propia pared de *T. harzianum*, así como en el micoparasitismo. Esto podría explicar porque muchas de las glicosil hidrolasas detectadas en la interacción *T. harzianum*-*P. fijiensis* también se encontraron en el monocultivo.

Por otra parte, durante la interacción *P. fijiensis* secretó un mayor número de proteínas específicas a esta condición que *T. harzianum* (57 vs 11 de *T. harzianum*). En el secretoma de la interacción hay mayor número de proteínas procedentes de *T. harzianum* pero el número de proteínas específicas de la interacción es mayor para *P. fijiensis*. Algunas de esas proteínas están relacionadas con la patogenicidad y sugieren que *P. fijiensis* no solo

responde para defenderse, sino también para atacar al antagonista. Entre estas proteínas estuvieron glicósido hidrolasas de 15 diferentes familias, por ejemplo, GH3, GH43, GH18, GH72, GH 20, GH 43, entre otras, peptidasas tipo S8 y S10, una cerato-platanina, una proteína DUF una oxidoreductasa, una peroxidasa y una cupredoxina. Con base en las proteínas secretadas e identificadas en nuestro trabajo, se puede inferir que *P. fijiensis* secretó proteínas en respuesta a la presencia de *T. harzianum*. Noar y Daub (2016), reportaron la presencia de glicósido hidrolasas de las familias 3, 36 y 43 con expresión diferencial en el transcriptoma de la interacción *P. fijiensis-Musa acuminata*, algunas de esas familias de proteínas también fueron encontradas en el secretoma de este trabajo. La familia GH72 son proteínas tipo glicosil transferasas que pueden estar involucradas en la síntesis de la pared celular en *P. fijiensis*, posiblemente para reparar los daños causados por *T. harzianum*. La presencia de proteínas de las familias GH3 (entre las proteínas de esta familia se encuentran β -glucosidasas) y G43 (comúnmente se encuentran β -xilosidasas y arabinasas) sugiere que *P. fijiensis* también puede estar atacando a *T. harzianum*. La literatura apoya la hipótesis debido a que, en interacción con el hospedero, se ha encontrado en el secretoma *in planta* de *P. fijiensis* una endo-arabinasa y una exo-beta 1,3-glucanasa (Escobar-Tovar *et al.*, 2015). Una ceratoplatanina también estuvo en la lista de proteínas encontradas específicamente en la interacción de *P. fijiensis*. En un estudio del secretoma de la interacción de una cepa virulenta de *P. fijiensis-Musa acuminata* var. Yangambi Km 5', se observaron 436 manchas (90 proteínas identificados), una de dichas proteínas fue identificada como ceratoplatanina (Escobar-Tovar *et al.*, 2015), es posible que dicha proteína desempeñe una función similar en la interacción *P. fijiensis-T. harzianum*.

Entre las proteínas específicas de *P. fijiensis*, identificadas durante el análisis post proteómico de la interacción se identificaron 6 candidatos a efectores y para *T. harzianum* solo un candidato. Dado ese resultado, se decidió considerar para el análisis a los candidatos a efectores que estuvieron presentes tanto en la interacción como en los monocultivos. La selección de los efectores candidatos se apoyó en los criterios que en la literatura han sido descritos como característicos de los efectores (características descritas en materiales y métodos). Los candidatos resultantes constituyeron lo que llamamos la lista post-proteomica de candidatos a efectores.

4.4 Candidatos post-proteómicos a efectores

En el análisis post-proteómico se encontraron 13 candidatos a efectores para *P. fijiensis* y 10 para *T. harzianum*; 3 candidatos de *P. fijiensis* y 5 candidatos de *T. harzianum* tuvieron homólogos con dominios conocidos en las bases de datos de proteínas de Uniprot y NCBI. Entre las interacciones planta-patógeno se han reportado algunas proteínas con estos dominios conocidos que se encuentran en la lista de candidatos identificados en nuestro trabajo.

4.5 Candidatos post-proteómicos con dominios conocidos de *Pseudocercospora fijiensis*

La familia de las ceratoplataninas es un grupo de proteínas común en los hongos, tanto en patógenos de plantas, como en hongos benéficos e incluso en humanos y en hongos benéficos (Baccelli, 2015). La primera ceratoplatanina se descubrió en el hongo ascomiceto *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*, una proteína de 12.4 kDa que se encontró en el secretoma del monocultivo y en su interacción con *Nicotiana benthamiana* (Pazzagli *et al.*, 1999). Esta proteína indujo necrosis en las hojas de *N. benthamiana*, mostrando actividad fitotóxica. La proteína tiene alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos (40%) y cuatro cisteínas que forman puentes disulfuro. Baccelli (2015) reportó que estas proteínas participan en el crecimiento y desarrollo de los hongos. Parte de las funciones de las ceratoplataninas consisten en promover la expansión de la pared celular y elongación de las hifas, por lo cual es común encontrar esas proteínas en los monocultivos fúngicos. En el transcriptoma de la interacción de *P. fijiensis*-*Musa* sp., se ha reportado la presencia de una ceratoplatanina putativa en el transcriptoma del hongo, pero su expresión fue más alta en el monocultivo fúngico (Noar y Daub, 2016). Adicionalmente, en los secretomas de una cepa virulenta y otra avirulenta de *P. fijiensis* creciendo *in vitro* o *in planta* también se reportó la presencia de una ceratoplatanina; aunque la expresión fue mayor *in planta* infectada con una u otra cepa (Escovar-Tovar *et al.*, 2015).

Otro de los candidatos identificados en este estudio tiene un dominio Kre9/Knh1, *Kre9* y su homólogo *Knh1* son dos proteínas de un total de diez, reportadas en *Saccharomyces cerevisiae* y están involucradas en la síntesis de beta-1,6-glucanos. La interrupción del gen en *S. cerevisiae* y *Candida glabrata* resulta en la reducción de la producción de este glucano

y también en la disminución de la tasa de crecimiento del hongo, así como en la agregación anormal de células (Lussier *et al.*, 1998). Según el programa EffectorP, este candidato no es un efector, pero debido a características como el tamaño, contenido de cisteína y el hecho de que se expresó únicamente en la interacción, se considera que esta proteína puede ser un efector. Además, el mismo candidato fue reportado por Chang *et al.* (2016) en su lista de potenciales efectores en el genoma de *P. fijiensis*.

El último efector candidato con dominio conocido de *P. fijiensis* posee un dominio SurE o 'Survival Protein E', este candidato ya ha sido caracterizado, se descubrió por vez primera en *Escherichia coli* y ahora se conoce que esta proteína es esencial para la sobrevivencia de la bacteria bajo condiciones de estrés térmico y salino (Visick *et al.*, 1998). La elucidación de la estructura y ensayos enzimáticos demostraron que esta proteína posee actividad de fosfatasa con especificidad por nucleótidos, y se caracterizó como una 5'-nucleotidasa que puede estar involucrada en la regulación de las cantidades de desoxirribonucleótidos en la célula. Esta proteína no se ha reportado en interacciones de *P. fijiensis* ni tampoco se considera efector con el programa EffectorP, pero no se descarta la posibilidad de que las 5'-nucleotidasas puedan ser una clase poco conocida de efectores. En el secretoma del hongo endófito *Serendipita indica* se encontró una 5'-nucleotidasa en fluido apoplástico de *Hordeum vulgare* (Nizam *et al.*, 2018) donde, la hidrólisis de ATP por la nucleotidasa afectó la señalización relacionada con la defensa vegetal y aumentó la colonización de *Serendipita indica*.

4.6 Candidatos post-proteomicos con dominios conocidos de *Trichoderma harzianum*

Como en *P. fijiensis*, se encontró un candidato con dominio ceratoplatanina en la lista de proteínas del secretoma de *T. harzianum*, Gomes *et al.* (2015), reportaron que además de desencadenar la expresión de genes relacionadas con la defensa en el hospedero, la ceratoplatanina epl1 de *T. harzianum* está involucrada en el enrollamiento hifal, ya que los mutantes no mostraron ese fenotipo en interacción con *Rhizoctonia solani*. Los autores sugirieron que epl1 es una proteína secretada rica en cisteína que se une a la pared celular de *T. harzianum* para protegerlo contra degradación enzimática. La posible función de este

presunto efector puede estar relacionada con actividad citotóxica y/o protección de la pared celular fúngica.

Otro candidato con dominio conocido fue una proteína NPP1 (Necrosis-inducing Phytophthora Protein 1) que forma parte del grupo de NEP-1 like proteins (NLPs). Estas proteínas son de 24 -26 kDa y poseen un motivo conservado, 'GHRHDWE', que es ubicuo en bacterias, oomicetos y hongos. Este dominio se relaciona con la repuesta de necrosis que causan en los hospederos, particularmente en plantas dicotiledóneas (Schouten *et al.*, 2008). En el secretoma de *T. harzianum* creciendo en medio mínimo e inducido con paredes celulares de *Fusarium solani*, se encontró una proteína NPP1 (Ramada *et al.*, 2016), entonces se hipotetizó que esas proteínas pudieran estar involucradas en el micoparasitismo de *T. harzianum* debido a su citotoxicidad. En *Verticillium dahliae* dos de siete de sus proteínas con dominio NLP demostraron actividad citotóxica y esas dos proteínas fueron necesarias para la virulencia del patógeno. Una de las proteínas, NPL1 es importante para la producción de conidios y biomasa micelial, incluso en el monocultivo (Santhanam *et al.*, 2013).

El dominio CFEM ('Common in Fungal Extracellular Membranes') es un dominio exclusivo de los hongos y contiene ocho cisteínas dentro de un dominio de sesenta aminoácidos en secuencias compuestas con un número alto de residuos hidrofóbicos (32–45%). La mayoría son conocidas como proteínas de membrana (Kulkarni *et al.*, 2003), aunque hay también proteínas de este tipo que son secretadas. En la interacción con las raíces de *A. thaliana*, *T. atroviride* mostró que en el contacto inicial se sobreexpresa un gen que codifica para una proteína con dominio CFEM, dicha sobreexpresión aumentó en la etapa de sobrecrecimiento del hongo, este patrón se repitió en la interacción de *T. atroviride* con *Rhizoctonia solani* (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2017). Similarmente, Lamdan *et al.* (2015), encontraron una proteína con dominio CFEM en el secretoma de *T. virens* en interacción con raíces de *Zea mays*. Una hipótesis sobre las funciones de dichas proteínas es que están involucradas en la modificación de las paredes celulares para facilitar la adhesión de hifas entre organismos y la formación de biopelículas en *Candida* sp. (Pérez *et al.*, 2006), y en la formación del apresorio en *Magnaporthe oryzae* (Oh *et al.*, 2008). Por otro lado, una proteína CFEM de *Botrytis cinera* está directamente involucrada en la virulencia, dado que

la mutante del gen BcCFEM1 mostró reducción de virulencia, menor producción de conidios y menor tolerancia al estrés (Zhu *et al.*, 2017).

Los últimos candidatos con dominios conocidos fueron las proteínas con dominios de superóxido dismutasa y ciclofilina. Estos dos dominios son ubicuos en la naturaleza, y por ello, tal vez no son los mejores candidatos a efectores, sin embargo, fueron seleccionadas porque estas proteínas recibieron un alto puntaje en el análisis post-proteómico, y con el programa EfactorP 2.0 se predicen con alta probabilidad (0.8 y 0.9) de ser efectores. Las enzimas superóxido dismutasas son ubicuas en los organismos aeróbicos y controlan los niveles de superóxido, un radical libre que es un subproducto metabólico de la respiración celular y una molécula de señalización comúnmente asociada con diferentes tipos de estrés y que en altas concentraciones puede ser tóxico para la célula. En *B. cinerea*, se descubrió que una superóxido dismutasa es un factor de virulencia ya que las plantas infectadas con la mutante Δ bc sod1 de *B. cinerea* en la que se realizó knock out de SOD, desarrollaron menos lesiones que las plantas infectadas con el hongo silvestre. Por lo tanto, la reducción del nivel de superóxido y/o la generación de peróxido de hidrógeno (otra molécula de señalización) por SOD son importantes para la patogenicidad (Rolke *et al.*, 2004).

Las ciclofilinas son enzimas que forman parte de la familia de peptidilprolil cis-trans-isomerasas que catalizan la cis/trans isomerización de los enlaces peptídicos (enlace amida del N-terminal de prolina). Estas enzimas facilitan el plegamiento de proteínas recién sintetizadas y/o hacen cambios conformacionales en otras (Dimou *et al.*, 2017). Además de esta actividad enzimática, las ciclofilinas pueden actuar como chaperonas (Kumari *et al.*, 2013). Coaker y colaboradores (2006), publicaron que el efector AvrRpt2 (una proteasa) de *Pseudomonas syringae* requiere de una ciclofilina del hospedero (*Arabidopsis*) para su activación por cis/trans-isomerización debido a que este efector llega a las células del hospedero en su forma inactiva y desplegado. Se ha visto que las ciclofilinas tienen un rol en la patogenicidad ya que una mutante de *B. cinerea* carente del gen para la ciclofilina BCP1 mostró una reducción en virulencia (Viaud *et al.*, 2003), y en el mutante Cyp1 de *Magnaporthe oryzae* también en interacción con *Oryza sativa* (Viaud *et al.*, 2002)

4.7 Análisis de expresión por qPCR de los candidatos a efectores seleccionados

Para obtener información precisa sobre la expresión de ciertos efectores en la interacción, *T. harzianum*-*P. fijiensis* se hizo RT-qPCR estudiando la expresión de cuatro candidatos de *P. fijiensis* en los días 1, 3, 5 y 7. Los candidatos pre-proteómicos fueron PfAvr4 y PfEcp6 mientras que del enfoque post-proteómico fueron MFW28 y MF580. PfAvr4 y PfEcp6 son efectores bien conocidos de *P. fijiensis* mientras que no se sabe las funciones de los candidatos nombrados MFW28 y MF580.

Con respecto a Avr4, se observó una expresión relativamente baja en el día 1 de la interacción (0.059), luego un aumento significativo en la expresión en el día 3 (2.189) y posteriormente la expresión se reprimió en los días 5 (0.347) y 7 (0.158), respectivamente. El candidato MFW28 mostró un patrón de expresión similar a Avr4. En la literatura, este candidato se encuentra en el secretoma de *P. fijiensis* (cepas virulenta y avirulenta) crecido *in vitro* (monocultivo) e in planta en interacción con *Musa* sp. (Escobar-Tovar *et al.*, 2015). En lo que respecta a MFW28, se observó una tendencia similar en el patrón de expresión dado que al día 3 de la interacción se detectó la expresión más alta (2.579), con respecto a la detectada en los días 1, 3 y 7 donde se observaron valores de expresión de 0.176, 0.732 y 0.580, respectivamente. De acuerdo con dichos resultados, la presencia de *T. harzianum* en la interacción resultó en la represión de los transcritos de MFW28 con respecto al nivel observado en el control. El candidato "MF580" es otro gen estudiado del enfoque post-proteómico con función desconocida. En la literatura, este candidato no se encuentra en el secretoma o transcriptoma publicados para *P. fijiensis* en interacción con la planta hospedera, pero se encuentra en la lista de efectores publicado por Chang *et al.* (2016) en su análisis bioinformático del genoma de *P. fijiensis*. En este trabajo, el análisis de expresión de "MF580" mostró que, en todos los días estudiados, hubo una mayor expresión en los controles con respecto a los niveles de expresión observados en la interacción que fueron 0.79, 0.33, 0.13 y 0.35 para los días 1, 3, 5 y 7. Por último, PfEcp6 mostró una inhibición en la expresión en todos los días estudiados con 0.17, 0.02, 0.04 y 0.06 para los días 1, 3, 5 y 7, esto con respecto a la expresión observada en el control (1).

Se sabe que la función de Avr4 es la protección de la pared celular del hongo contra la hidrólisis por enzimas líticas, particularmente las quitinasas. En un estudio de la expresión

de Avr4 de *C. fulvum* en interacción con la planta hospedera, se reportó una tendencia de aumento desde el día 4 hasta el día 16, mientras que no se observó expresión en los medios de cultivo (De Wit *et al.*, 2012). Por otro lado, PfAvr4 se expresa constitutivamente (Noar and Daub, 2016), aunque, hasta antes de este trabajo, no se había analizado si PfAvr4 tiene una expresión diferencial entre condiciones control con respecto a la interacción con la planta hospedera. Es probable que la sobreexpresión de PfAvr4 detectada en nuestro trabajo durante el día 3 de la interacción se deba a la inducción de las quitinasas de *T. harzianum*, dado que las mismas se expresan mayormente durante las primeras 24-96 horas de su interacción antagónica con otros hongos. Tseng *et al.* (2008) reportó que la actividad enzimática de una quitinasa de *T. harzianum* fue más alta entre las 72 y 96 horas en medio de cultivo suplementado con micelio muerto de *Rhizoctonia solani*. Por otra parte, Reindorff *et al.* (2014), reportó aumento en el nivel de expresión de quitinasas de 37 y 42 kDa después de 24 horas de interacción con *Sclerotinia sclerotiorum*. De acuerdo con la literatura, la inducción de quitinasas, como otros genes involucradas en el micoparasitismo, varía dependiendo del organismo (“presa”) al que se enfrente *Trichoderma* sp. Cabe mencionar que, las enzimas líticas (como las quitinasas, proteasas, lipasas/esterasas) son proteínas ubicuas en las interacciones microbianas de *Trichoderma*, y algunas se han considerado como efectores. La represión de los transcritos de *P. fijiensis* en los días 1, 5 y 7 para PfAvr4 puede ser atribuido a la producción de efectores por parte de *T. harzianum*, los cuales afectan directamente la transcripción del gen o a la producción de efectores de *P. fijiensis*. Un fenómeno similar puede estar ocurriendo para “MFW28” que mostró un patrón de expresión comparable.

En este trabajo de investigación a través de la proteómica y la bioinformática se encontraron candidatos a efectores en ambos hongos, hecho que fue el objetivo principal del estudio. El análisis posterior de expresión de algunos de esos candidatos con énfasis en los efectores del patógeno, *P. fijiensis*, por lo general mostró una baja expresión en los niveles de los transcritos en la interacción con *T. harzianum*. Tales resultados nos permiten hipotetizar que los efectores de *T. harzianum* que le permiten antagonizar a su contraparte, están involucrados directa o indirectamente en supresión de la expresión génica de los efectores de *P. fijiensis*. Algunas evidencias de la literatura que apoyan dicha hipótesis han mostrado que durante la interacción *T. harzianum*-*B. cinera*, el efector Epl1 de *T. harzianum* redujo o suprimió la expresión de los genes BOT, algunos que codifican transportadores ABC, así

como una MAP cinasa de *B. cinerea* (Gomes *et al.*, 2017). Es de resaltar que el gen que codifica al efector Epl1, tiene un 87% de identidad de secuencia con un efector candidato tipo ceratoplatanina de *T. harzianum* encontrado en el presente estudio.

En el secretoma de la interacción recuperado en nuestro estudio los efectores de *T. harzianum* encontrados incluyeron una ceratoplatanina, una proteína con dominio CFEM y una proteína inductora de necrosis NPP1, tales proteínas se han reportado como efectores de *Trichoderma* sp. (Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019; Guzmán-Guzmán *et al.*, 2017; Ramada *et al.*, 2016). Otros candidatos descritos incluyen una ciclofilina y varias proteínas con funciones desconocidas. Aunque no se estudió la expresión génica de dichos candidatos, es posible que al estar presentes en el secretoma de *T. harzianum*, jueguen un papel en el antagonismo de *Trichoderma* sobre *P. fijiensis*. Dicho comportamiento se ha observado en las interacciones de *Trichoderma virens* con *R. solani*, donde se determinó que una ceratoplatanina tuvo una expresión elevada en el tiempo de sobrecrecimiento del hongo. Similarmente, una proteína de *T. virens* con dominio CFEM mostró expresión elevada al contacto con *R. solani* y aún más en el tiempo de sobrecrecimiento del hongo (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2017). En conjunto, es posible proponer que los efectores detectados en este estudio junto con otros descritos en la literatura, juegan un papel fundamental en el micoparasitismo de *Trichoderma* sp. y que *in vitro*, *T. harzianum* y *P. fijiensis* usan efectores como parte de su arsenal de ataque-defensa, pero finalmente, *T. harzianum* supera la competencia impuesta por *P. fijiensis*.

Además, es pertinente proponer la continuación del estudio de la expresión de los genes candidatos de efectores de *T. harzianum* identificados en nuestro análisis, tal actividad podría generar mayor conocimiento acerca del éxito de *T. harzianum* como antagonista de *P. fijiensis*. Es posible que la inducción temprana de estos efectores en *T. harzianum* permita explicar la represión de la expresión observada en de los genes de *P. fijiensis* que codifican para efectores de este fitopatógeno. Estudios posteriores se podrían enfocar en la expresión de los efectores durante estadios más tempranos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

1. Se logró obtener el secretoma de la interacción *T. harzianum*- *P. fijiensis* a partir de la interacción en medio líquido.
2. Se identificaron 23 posibles candidatos de efectores, 10 de *T. harzianum* y 13 de *P. fijiensis* presentes en la interacción de estos microorganismos.
3. El candidato de efector MFW28 (post- proteómico) mostró un comportamiento similar a PfAvr4, auténtico efector de *P. fijiensis*, lo que apoya que MFW28 sea también un efector de este hongo.
4. El efector PfEcp6 mostró baja expresión en todos los días analizados, en comparación al control (cultivo individual de *P. fijiensis*). La expresión del candidato MF580 mostró similar inhibición, apoyando que sea un efector de este patógeno.
5. Este trabajo evidencia un nuevo mecanismo del antagonismo de *T. harzianum* sobre *P. fijiensis*: la represión de la expresión de los efectores del patógeno.
6. La interacción microbiana es un modelo que permite la identificación de potenciales efectores del patógeno, lo que también muestra que al menos parte de los efectores son comunes entre la interacción planta-microbio y la interacción microbio-microbio.
7. La confrontación entre microorganismos puede revelar algunos efectores de los patógenos. La identificación de efectores en interacciones microbianas puede ayudar en la selección de candidatos para su futuro análisis funcional.

5.2 PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos, algunas preguntas que han surgido para investigar en el futuro son:

1. ¿Cuáles son las dianas de los efectores empleados en las interacciones microbio-microbio? ¿Las dianas de los efectores encontrados en múltiples tipos de interacciones son iguales? ¿Los microorganismos tienen cognados como la proteína de resistencia "R" en las plantas?
2. ¿La expresión de genes y la secreción de proteínas efectoras por el patógeno, *P. fijiensis*, sería similar en interacciones con otros microorganismos?
3. ¿Cuáles son las funciones de los candidatos 'MFW28', un posible factor de virulencia en la infección de *Musa* sp y 'MF580', dado que hasta el momento no se ha visto 'MF580' en reportes de la interacción *P. fijiensis*-*Musa* sp? ¿Participa en la interacción con el hospedero vegetal, o es un efector empleado únicamente en interacciones con otros microorganismos?

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Suárez, M., Pichardo, T., Roque, B., Cruz Martin, M., Mena, E., Leiva Mora, M., Castro, R., Alvarado-Capó, Y. (2013). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet / In vitro antagonism of *Trichoderma harzianum* Rifai against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Bioteconología Vegetal*, 13, 231–235.
- Adams, P., De-Leij, F. A., & Lynch, J. M. (2007). *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial Ecology*, 54(2), 306–313. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9203-0>
- Agrawal, G. K., Jwa, N.-S., Lebrun, M.-H., Job, D., & Rakwal, R. (2010). Plant secretome: Unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*, 10(4), 799–827. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900514>
- Aktar, Md. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Alakonya, A. E., Kimunye, J., Mahuku, G., Amah, D., Uwimana, B., Brown, A., & Swennen, R. (2018). Progress in understanding *Pseudocercospora* banana pathogens and the development of resistant *Musa* germplasm. *Plant Pathology*, 67(4), 759–770. <https://doi.org/10.1111/ppa.12824>
- Almagro Armenteros, J. J., Sønderby, C. K., Sønderby, S. K., Nielsen, H., & Winther, O. (2017). DeepLoc: Prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics* (Oxford, England), 33(21), 3387–3395. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx431>
-

- Arango Isaza, R. E., Diaz-Trujillo, C., Dhillon, B., Aerts, A., Carlier, J., Crane, C. F., V. de Jong, T., De Vries, I., Dietrich R., Farmer A. D., Fortes Fereira C., Garcia S., Guzman M., Hamelin R. C., Lindquist E. A., Mehrabi R., Quiros O., Schmutz J., Shapiro H., Reynolds E., Scalliet G., Souza Jr M., Stergiopoulos I., Van der Lee T. A. J., De Wit P. J. G. M., Zapater M-F., Lute-Harm Zwiers, Grigoriev I. V., Goodwin S. B., Kema G. H. J. (2016). Combating a Global Threat to a Clonal Crop: Banana Black Sigatoka Pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (Synonym *Mycosphaerella fijiensis*) Genomes Reveal Clues for Disease Control. *PLoS Genetics*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005876>
- Arriagada, C., Aranda, E., Sampedro, I., Garcia-Romera, I., & Ocampo, J. A. (2009). Contribution of the saprobic fungi *Trametes versicolor* and *Trichoderma harzianum* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus deserticola* and *G. claroideum* to arsenic tolerance of *Eucalyptus globulus*. *Bioresource Technology*, 100(24), 6250–6257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.010>
- Arzate-Vega, J., Michel-Aceves, A. C., Domínguez-Márquez, V. M., & Santos-Eméstica, O. A. (2006). Antagonismo de *Trichoderma* spp. Sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa* sp.) in vitro e Invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2). Retrieved from <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=61224203>
- Bacelli, I. (2015). Cerato-platanin family proteins: One function for multiple biological roles? *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00769>
- Balmer, D., Flors, V., Glauser, G., & Mauch-Mani, B. (2013). Metabolomics of cereals under biotic stress: Current knowledge and techniques. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00082>

- Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., Von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, 17(4), 349–356. <https://doi.org/10.1093/protein/gzh037>
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 7(4), 249–260.
- Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W., & Samuels, G. J. (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*, 6(2), 263–295. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02>
- Blauth de Lima, F., Félix, C., Osório, N., Alves, A., Vitorino, R., Domingues, P., Da Silva Ribeiro R.T., A.C. Esteves. (2017). *Trichoderma harzianum* T1A constitutively secretes proteins involved in the biological control of *Guignardia citricarpa*. *Biological Control*, 106, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.003>
- Bolton, M. D., van Esse, H. P., Vossen, J. H., de Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I. J. E., Van den Berg G. C., Borrás-Hidalgo O., Dekker H.L., De Koster C. G., De Wit P.J., Joosten M.H., Thomma B. P. H. J. (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology*, 69(1), 119–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06270.x>
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 28(8), 799–808. <https://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Carsolio, C., Gutiérrez, A., Jiménez, B., Van Montagu, M., & Herrera-Estrella, A. (1994). Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene
-

- expressed during mycoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), 10903–10907. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.10903>
- Cavero, P. A. S., Hanada, R. E., Gasparotto, L., Neto, C., Albuquerque., & R., Souza, J. T. de. (2015). Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*. *Ciência Rural*, 45(6), 951–957. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140436>
- Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T., & Dodds, P. N. (2014). A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: The ‘integrated decoy’ hypothesis. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00606>
- Chang, T.-C., Salvucci, A., Crous, P. W., & Stergiopoulos, I. (2016). Comparative Genomics of the Sigatoka Disease Complex on Banana Suggests a Link between Parallel Evolutionary Changes in *Pseudocercospora fijjensis* and *Pseudocercospora eumusae* and Increased Virulence on the Banana Host. *PLOS Genetics*, 12(8), e1005904. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005904>
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., & Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558–590. <https://doi.org/10.3852/14-147>
- Chet, I., Harman, G. E., & Baker, R. (1981). *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology*, 7(1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/BF02010476>
- Chuc-Uc, J., Brito-Argáez, L., Canto-Canché, B., Tzec-Simá, M., Rodríguez-García, C., Peraza-Echeverría, L., Peraza-Echeverría, S., James-Kay, A., Cruz-Cruz, C.A., Peña-Rodríguez, L. M., Islas-Flores, I. (2011). The *in vitro* secretome of

-
- Mycosphaerella fijiensis* induces cell death in banana leaves. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 49(6), 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.02.006>
- Churchill, A. C. L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: Progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 307–328. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x>
- Coaker, G., Zhu, G., Ding, Z., Van Doren, S. R., & Staskawicz, B. (2006). Eukaryotic cyclophilin as a molecular switch for effector activation. *Molecular Microbiology*, 61(6), 1485–1496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05335.x>
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(18), 3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>
- De Jesus, J. B., Mesquita-Rodrigues, C., & Cuervo, P. (2014). Proteomics Advances in the Study of Leishmania Parasites and Leishmaniasis. In A. L. S. Santos, M. H. Branquinha, C. M. d'Avila-Levy, L. F. Kneipp, & C. L. Sodré (Eds.), *Proteomics and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma* (pp. 323–349). https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_14
- De Jonge, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H., & Thomma, B. P. H. J. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5994), 953–955. <https://doi.org/10.1126/science.1190859>
- Degenkolb, T., Gräfenhan, T., Berg, A., Nirenberg, H. I., Gams, W., & Brückner, H. (2006). Peptaibiotics: Screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-
-

- protective *Trichoderma* species. *Chemistry & Biodiversity*, 3(6), 593–610.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.200690063>
- Dimou, M., Venieraki, A., & Katinakis, P. (2017). Microbial cyclophilins: Specialized functions in virulence and beyond. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 33(9), 164. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2330-6>
- Djordjevic, J. T. (2010). Role of Phospholipases in Fungal Fitness, Pathogenicity, and Drug Development – Lessons from *Cryptococcus Neoformans*. *Frontiers in Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00125>
- Do Vale, L. H. F., Gómez-Mendoza, D. P., Kim, M.-S., Pandey, A., Ricart, C. A. O., Ximenes F Filho, E., & Sousa, M. V. (2012). Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics*, 12(17), 2716–2728.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201200063>
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I. A., Ayliffe, M. A., ... Ellis, J. G. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), 8888–8893. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602577103>
- Doehlemann, G., Reissmann, S., Aßmann, D., Fleckenstein, M., & Kahmann, R. (2011). Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Molecular Microbiology*, 81(3), 751–766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07728.x>
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwambach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., Kahmann, R. (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathogens*, 5(2), e1000290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000290>
-

- Druzhinina, I. S., Chenthamara, K., Zhang, J., Atanasova, L., Yang, D., Miao, Y., Rahimi, M. J., Grujic, M., Cai, F., Pourmehdi, S., Salim, K. A., Pretzer, C., Kopchinskiy, A. G., Henrissat, B., Kuo, A., Hundley, H., Wang, M., Aerts, A., Salamov, A., Lipzen, A., LaButti, K., Barry, K., Grigoriev, I.V., Shen., Q, Kubicek, C. P. (2018). Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. *PLoS Genetics*, 14(4), e1007322. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007322>
- Druzhinina, I. S., Shelest, E., & Kubicek, C. P. (2012). Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiology Letters*, 337(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02665.x>
- Dubey, S. C., Suresh, M., & Singh, B. (2007). Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. Sp. Ciceris for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control*, 40(1), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.06.006>
- El-Katatny, M. H., Somitsch, W., Robra, K. H., El-Katatny, M. S., & Gübitz, G. M. (2000). Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technology and Biotechnology*, 38(3), 173–180.
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford Protein Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (38). <https://doi.org/10.3791/1918>
- Escobar-Tovar, L., Guzmán-Quesada, M., Sandoval-Fernández, J. A., & Gómez-Lim, M. A. (2015). Comparative analysis of the in vitro and in planta secretomes from *Mycosphaerella fijiensis* isolates. *Fungal Biology*, 119(6), 447–470. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.01.002>
- FAO, 2019. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
-

- Ferreira Filho, J. A., Horta, M. A. C., Beloti, L. L., dos Santos, C. A., & de Souza, A. P. (2017). Carbohydrate-active enzymes in *Trichoderma harzianum*: A bioinformatic analysis bioprospecting for key enzymes for the biofuels industry. *BMC Genomics*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4181-9>
- Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coggill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H.-R., Ceric G, Forslund, K., Eddy, S.R., Sonnhammer, E. L., Bateman, A. (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue), D281-288. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm960>
- Flor, H. H. (1956). The Complementary Genic Systems in Flax and Flax Rust**Joint contribution from the Field Crops Research Branch, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture and the North Dakota Agricultural Experiment Station. In M. Demerec (Ed.), *Advances in Genetics* (Vol. 8, pp. 29–54). [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60498-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60498-8)
- Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav-David, D., Bilu A., Dag, A., Shafir, S., Elad, Y. (2004). *Trichoderma* Biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and Survival in Strawberry. *European Journal of Plant Pathology*, 110(4), 361–370. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000021057.93305.d9>
- Friesen, T. L., Meinhardt, S. W., & Faris, J. D. (2007). The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for-gene manner. *The Plant Journal*, 51(4), 681–692. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03166.x>
- Friesen, T. L., Stukenbrock, E. H., Liu, Z., Meinhardt, S., Ling, H., Faris, J. D., Rasmussen, J. B., Solomon, P. S., McDonald, B. A. & Oliver, R. P. (2006). Emergence of a new
-

-
- disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics*, 38(8), 953–956. <https://doi.org/10.1038/ng1839>
- Gage, M. J., Bruenn, J., Fischer, M., Sanders, D., & Smith, T. J. (2001). KP4 fungal toxin inhibits growth in *Ustilago maydis* by blocking calcium uptake. *Molecular Microbiology*, 41(4), 775–785. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02554.x>
- Gajera, H., Bambharolia, R., Patel, S. V., Khatrani, T. J., & Goalkiya, B. A. (2012). Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophomina phaseolina*: Evaluation of Coiling and Cell Wall Degrading Enzymatic Activities. *Plant Pathology & Microbiology*, 3.
- Galarza, L., Akagi, Y., Takao, K., Kim, C., Maekawa, N., Itai, A., Peralta, E., Santos, E., & Kodama, M. (2015). Characterization of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 81(3), 201–210. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0587-x>
- Ganry, J., Fouré, E., Bellaire, L. de L. de, & Lescot, T. (2012). *An Integrated Approach to Control the Black Leaf Streak Disease (BLSD) of Bananas, while Reducing Fungicide Use and Environmental Impact*. <https://doi.org/10.5772/29794>
- Giraldo, M. C., & Valent, B. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 800–814. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3119>
- Girard, V., Dieryckx, C., Job, C., & Job, D. (2013). Secretomes: The fungal strike force. *Proteomics*, 13(3–4), 597–608. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200282>
- Gohari, A. M., Ware, S. B., Wittenberg, A. H. J., Mehrabi, R., M'Barek, S. B., Verstappen, E. C. P., Van der Lee T. A. J., Robert, O., Schouten H. J., de Wit P. J. G. M., & Kema, G. H. J. (2015). Effector discovery in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria*
-

- tritici*. *Molecular Plant Pathology*, 16(9), 931–945.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12251>
- Gomes, Eriston V., Ulhoa, C. J., Cardoza, R. E., Silva, R. N., & Gutiérrez, S. (2017). Involvement of *Trichoderma harzianum* Epl-1 Protein in the Regulation of *Botrytis Virulence*- and Tomato Defense-Related Genes. *Frontiers in Plant Science*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00880>
- Gomes, Eriston Vieira, Costa, M. do N., de Paula, R. G., de Azevedo, R. R., da Silva, F. L., Noronha, E. F., Ulhoa, C. J., Monteiro, V. N., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., & Silva, R. N. (2015). The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. *Scientific Reports*, 5, 17998. <https://doi.org/10.1038/srep17998>
- Guo, B., Wang, H., Yang, B., Jiang, W., Jing, M., Li, H., Xia, Y., Xu, Y., Hu, Q., Wang, F., Yu, F., Wang, Y., Ye, W., Dong, S., Xing, W., & Wang, Y. (2019). *Phytophthora sojae* Effector PsAvh240 Inhibits Host Aspartic Protease Secretion to Promote Infection. *Molecular Plant*, 12(4), 552–564. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.017>
- Guyon, K., Balagué, C., Roby, D., & Raffaele, S. (2014). Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *BMC Genomics*, 15(1), 336.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-336>
- Guzmán-Guzmán, P., Alemán-Duarte, M. I., Delaye, L., Herrera-Estrella, A., & Olmedo-Monfil, V. (2017a). Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. And role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. *BMC Genetics*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0481-y>
- Guzmán-Guzmán, P., Alemán-Duarte, M. I., Delaye, L., Herrera-Estrella, A., & Olmedo-Monfil, V. (2017b). Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. And
-

-
- role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. *BMC Genetics*, 18(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0481-y>
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(1), 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Henderson, J., Pattemore, J. A., Porchun, S. C., Hayden, H. L., Brunschot, S. V., Grice, K. R. E., ... Aitken, E. a. B. (2006). Black Sigatoka disease: New technologies to strengthen eradication strategies in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 35(2), 181–193. <https://doi.org/10.1071/AP06017>
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 1), 17–25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
- Heslop-Harrison, J. S., & Schwarzacher, T. (2007). Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of Botany*, 100(5), 1073–1084. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm191>
- Horner, N. R., Grenville-Briggs, L. J., & van West, P. (2012). The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation. *Fungal Biology*, 116(1), 24–41. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.09.004>
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4–10. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Huang, X., Chen, L., Ran, W., Shen, Q., & Yang, X. (2011). *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping-off
-

- disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(3), 741–755. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3259-6>
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., & Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal*, 19(15), 4004–4014. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.15.4004>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S. Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Kamoun, S. (2006). A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 41–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436>
- Kettles, G. J., Bayon, C., Sparks, C. A., Canning, G., Kanyuka, K., & Rudd, J. J. (2018). Characterization of an antimicrobial and phytotoxic ribonuclease secreted by the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *The New Phytologist*, 217(1), 320–331. <https://doi.org/10.1111/nph.14786>
- Kim, K.-T., Jeon, J., Choi, J., Cheong, K., Song, H., Choi, G., Cheong, K., Song, H., Choi, G., Kang, S., & Lee, Y.-H. (2016). Kingdom-Wide Analysis of Fungal Small Secreted Proteins (SSPs) Reveals their Potential Role in Host Association. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00186>
- Kim, S., Ahn, I.-P., Rho, H.-S., & Lee, Y.-H. (2005). MHP1, a *Magnaporthe grisea* hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization.
-

-
- Molecular Microbiology*, 57(5), 1224–1237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04750.x>
- Kovacs, K., Szakacs, G., Pusztahelyi, T., & Pandey, A. (2004). Production of chitinolytic enzymes with *Trichoderma longibrachiatum* IMI 92027 in solid substrate fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1), 189–204. <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:189>
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., et al. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12(4), R40. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>
- Kulkarni, R. D., Kelkar, H. S., & Dean, R. A. (2003). An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(3), 118–121. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00025-2)
- Kumari, S., Roy, S., Singh, P., Singla-Pareek, S. L., & Pareek, A. (2013). Cyclophilins. *Plant Signaling & Behavior*, 8(1). <https://doi.org/10.4161/psb.22734>
- Lamdan, N.-L., Shalaby, S., Ziv, T., Kenerley, C. M., & Horwitz, B. A. (2015). Secretome of *Trichoderma* Interacting With Maize Roots: Role in Induced Systemic Resistance. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 14(4), 1054–1063. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.046607>
-

- Landraud, P., Chuzeville, S., Billon-Grande, G., Poussereau, N., & Bruel, C. (2013). Adaptation to pH and role of PacC in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS One*, 8(7), e69236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069236>
- Laur, J., Ramakrishnan, G. B., Labbé, C., Lefebvre, F., Spanu, P. D., & Bélanger, R. R. (2018). Effectors involved in fungal–fungal interaction lead to a rare phenomenon of hyperbiotrophy in the tritrophic system biocontrol agent–powdery mildew–plant. *The New Phytologist*, 217(2), 713–725. <https://doi.org/10.1111/nph.14851>
- Le Roux, C., Huet, G., Jauneau, A., Camborde, L., Trémousaygue, D., Kraut, A., Zhou, B., Levailant, M., Adachi, H., Yoshioka, H., Raffaele, S., Berthomé, R., Couté, Y, Parker, J. E., & Deslandes, L. (2015). A Receptor Pair with an Integrated Decoy Converts Pathogen Disabling of Transcription Factors to Immunity. *Cell*, 161(5), 1074–1088. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.025>
- Lin, J., & Hu, J. (2013). SeqNLS: Nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring. *PLoS One*, 8(10), e76864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076864>
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S. & Kahmann, R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114623>
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B., & Kubicek, C. P. (1996). Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*, 178(21), 6382–6385.
- Lowe, R. G. T., & Howlett, B. J. (2012). Indifferent, Affectionate, or Deceitful: Lifestyles and Secretomes of Fungi. *PLoS Pathogens*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002515>
-

-
- Lussier, M., Sdicu, A.-M., Shahinian, S., & Bussey, H. (1998). The *Candida albicans* KRE9 gene is required for cell wall β -1,6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 9825–9830.
- Lysøe, E., Seong, K.-Y., & Kistler, H. C. (2011). The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 24(9), 995–1000. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-11-0038>
- Mahmood, S., & Rahman, S. R. (2008). Production and Partial Characterization of Extracellular α -Amylase by *Trichoderma viride*. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 25(2), 99–103. <https://doi.org/10.3329/bjm.v25i2.4870>
- Manning, V. A., Hardison, L. K., & Ciuffetti, L. M. (2007). Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 20(2), 168–177. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-2-0168>
- Marín, D. H., Romero, R. A., Guzmán, M., & Sutton, T. B. (2003). Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. *Plant Disease*, 87(3), 208–222. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.3.208>
- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K., Thomma, B.P., & Rudd, J. (2011). Analysis of Two in Planta Expressed LysM Effector Homologs from the Fungus *Mycosphaerella graminicola* Reveals Novel Functional Properties and Varying Contributions to Virulence on Wheat. *Plant Physiology*, 156, 756–769. <https://doi.org/10.1104/pp.111.176347>
- McAuliffe, O., Ross, R. P., & Hill, C. (2001). Lantibiotics: Structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), 285–308. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x>
-

- Mecchia, M. A., Santos-Fernandez, G., Duss, N. N., Somoza, S. C., Boisson-Dernier, A., Gagliardini, V., Martínez-Bernardini, A., Fabrice, T. N., Ringli, C., Muschietti, J. P., & Grossniklaus, U. (2017). RALF4/19 peptides interact with LRX proteins to control pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)*, *358*(6370), 1600–1603. <https://doi.org/10.1126/science.aao5467>
- Mendoza-Mendoza, A., Zaid, R., Lawry, R., Hermosa, R., Monte, E., Horwitz, B. A., & Mukherjee, P. K. (2018). Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, *32*(2), 62–85. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.12.001>
- Mentlak, T. A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B. P., & Talbot, N. J. (2012). Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *The Plant Cell*, *24*(1), 322–335. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.092957>
- Mohamed, S., Azhar, E., M. Ba-Akdah, M., Tashkandy, N., & Kumosani, T. (2011). Production, purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma harzianum* grown on mandarin peel. *African Journal of Microbiology Research*, *5*, 1018–1028.
- Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: Between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, *4*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s101230100001>
- Monteiro, V. N., do Nascimento Silva, R., Steindorff, A. S., Costa, F. T., Noronha, E. F., Ricart, C. A. O., de Sousa, M. V., Vainstein, M. H., & Ulhoa, C. J. (2010). New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by

- secreted protein analysis. *Current Microbiology*, 61(4), 298–305.
<https://doi.org/10.1007/s00284-010-9611-8>
- Morán-Diez, E., Hermosa, R., Ambrosino, P., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Lorito, M., & Monte, E. (2009). The ThPG1 Endopolygalacturonase Is Required for the *Trichoderma harzianum*–Plant Beneficial Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(8), 1021–1031. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1021>
- Mueller, A. N., Ziemann, S., Treitschke, S., Aßmann, D., & Doehlemann, G. (2013). Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS Pathogens*, 9(2), e1003177. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003177>
- Nampoothiri, K. M., Baiju, T. V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2004). Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, 39(11), 1583–1590. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00282-6)
- Nielsen, H. (2017). Predicting Secretory Proteins with SignalP. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1611, 59–73. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7015-5_6
- Nizam, S., Qiang, X., Wawra, S., Nostadt, R., Getzke, F., Schwanke, F., Schwanke, F., Dreyer, I., Langen, G., & Zuccaro, A. (2018). The fungal root endophyte *Serendipita indica* modifies extracellular nucleotides to subvert plant immunity. *BioRxiv*, 396028. <https://doi.org/10.1101/396028>
- Noar, R. D., & 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>
-

- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I. V., & Dubchak, I. (2014). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D26-31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1069>
- Oh, Y., Donofrio, N., Pan, H., Coughlan, S., Brown, D. E., Meng, S., Mitchell, T., & Dean, R. A. (2008). Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Genome Biology*, 9(5), R85. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-r85>
- Omann, M., & Zeilinger, S. (2010). How a Mycoparasite Employs G-Protein Signaling: Using the Example of *Trichoderma* [Research article]. <https://doi.org/10.1155/2010/123126>
- Pal, K. K., & McSpadden Gardener, B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Pazzagli, L., Cappugi, G., Manao, G., Camici, G., Santini, A., & Scala, A. (1999). Purification, Characterization, and Amino Acid Sequence of Cerato-platanin, a New Phytotoxic Protein from *Ceratocystis fimbriata* f. Sp. Platani. *Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 24959–24964. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.24959>
- Pérez, A., Pedrós, B., Murgui, A., Casanova, M., López-Ribot, J. L., & Martínez, J. P. (2006). Biofilm formation by *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. *FEMS Yeast Research*, 6(7), 1074–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00131.x>
- Pérez-Vicente, L. (2012). A Holistic Integrated Management Approach To Control Black Sigatoka Disease Of Banana Caused By *Mycosphaerella fijiensis*.
- Perrier, X., De Langhe, E., Donohue, M., Lentfer, C., Vrydaghs, L., Bakry, F., Carreel, F., Hippolyte I., Horry, J. P., Jenny, C., Lebot, V., Risterucci, A. M., Tomekpe, K., Doutrelepon, H., Ball, T., Manwaring, J., de Maret, P., & Denham, T. (2011).

- Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11311–11318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102001108>
- Petit-Houdenot, Y., & Fudal, I. (2017). Complex Interactions between Fungal Avirulence Genes and Their Corresponding Plant Resistance Genes and Consequences for Disease Resistance Management. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01072>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45–e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Raffaele, S., Win, J., Cano, L. M., & Kamoun, S. (2010). Analyses of genome architecture and gene expression reveal novel candidate virulence factors in the secretome of *Phytophthora infestans*. *BMC Genomics*, 11, 637. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-637>
- Ramada, M. H. S., Steindorff, A. S., Bloch, C., & Ulhoa, C. J. (2016). Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. *Proteomics*, 16(3), 477–490. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400546>
- Ramírez-Valdespino, C. A., Casas-Flores, S., & Olmedo-Monfil, V. (2019). *Trichoderma* as a Model to Study Effector-Like Molecules. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01030>
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K.-M., Siewers V, Tenberge, K. B., Tudzynski, B., & Tudzynski, P. (2004). Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: The major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose

- oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology*, 5(1), 17–27.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00201.x>
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D.-J., Thomma, B. P., & Mesters, J. R. (2013). Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *eLife*, 2.
<https://doi.org/10.7554/eLife.00790>
- Sandhya, C., Adapa, L. K., Nampoothiri, K. M., Binod, P., Szakacs, G., & Pandey, A. (2004). Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. *Journal of Basic Microbiology*, 44(1), 49–58.
<https://doi.org/10.1002/jobm.200310284>
- Sanz-Martín, J. M., Pacheco-Arjona, J. R., Bello-Rico, V., Vargas, W. A., Monod, M., Díaz-Mínguez, J. M., Thon, M. R., & Sukno, S. A. (2016). A highly conserved metalloprotease effector enhances virulence in the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant Pathology*, 17(7), 1048–1062.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12347>
- Saravanakumar, K., Fan, L., Fu, K., Yu, C., Wang, M., Xia, H., Sun, J., Li, Y., & Chen, J. (2016). Cellulase from *Trichoderma harzianum* interacts with roots and triggers induced systemic resistance to foliar disease in maize. *Scientific Reports*, 6, 35543.
<https://doi.org/10.1038/srep35543>
- Saunders, D. G. O., Win, J., Cano, L. M., Szabo, L. J., Kamoun, S., & Raffaele, S. (2012). Using Hierarchical Clustering of Secreted Protein Families to Classify and Rank Candidate Effectors of Rust Fungi. *PLoS ONE*, 7(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029847>
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E., & Kubicek, C. P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic
-

-
- enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4364–4370.
- Schmidt, S. M., & Panstruga, R. (2011). Pathogenomics of fungal plant parasites: What have we learnt about pathogenesis? *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.006>
- Schornack, S., Damme, M. van, Bozkurt, T. O., Cano, L. M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., & Huitema, E. (2010). Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17421–17426. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008491107>
- Schouten, A., Baarlen, P. V., & Kan, J. A. L. V. (2008). Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytologist*, 177(2), 493–505. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02274.x>
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintha, R., Harzen A, Colby, T., Kamoun, S., van der Hoorn, R. A. L. (2008). Fungal Effector Protein AVR2 Targets Diversifying Defense-Related Cys Proteases of Tomato. *The Plant Cell*, 20(4), 1169–1183. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056325>
- Sharma, V., Salwan, R., Sharma, P. N., & Kanwar, S. S. (2017). Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: Universal yet host specific response. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.042>
- Shnaiderman, C., Miyara, I., Kobilier, I., Sherman, A., & Prusky, D. (2013). Differential activation of ammonium transporters during the accumulation of ammonia by
-

- Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on appressoria formation and pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 26(3), 345–355. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-12-0170-R>
- Sigrist, C. J. A., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A., & Bucher, P. (2002). PROSITE: A documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Briefings in Bioinformatics*, 3(3), 265–274. <https://doi.org/10.1093/bib/3.3.265>
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2015). Advances and Challenges in Computational Prediction of Effectors from Plant Pathogenic Fungi. *PLOS Pathogens*, 11(5), e1004806. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004806>
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2018). Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Molecular Plant Pathology*, 19(9), 2094–2110. <https://doi.org/10.1111/mpp.12682>
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2018). ApoplastP: Prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. *New Phytologist*, 217(4), 1764–1778. <https://doi.org/10.1111/nph.14946>
- Sperschneider, J., Gardiner, D. M., Dodds, P. N., Tini, F., Covarelli, L., Singh, K. B., Manners, J. M., & Taylor, J. M. (2016). EffectorP: Predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytologist*, 210(2), 743–761. <https://doi.org/10.1111/nph.13794>
- Sperschneider, J., Williams, A. H., Hane, J. K., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2015). Evaluation of Secretion Prediction Highlights Differing Approaches Needed for Oomycete and Fungal Effectors. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01168>
-

- Srivastava, M., Shahid, M., Pandey, S., Singh, A., Kumar, V., Singh, A., Kumar, V., Gupta S., & Maurya, M., (2014). *Trichoderma* Genome to Genomics: A Review. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, 5(3). <https://doi.org/10.4172/2153-0602.1000162>
- Steindorff, A. S., Silva, R. do N., Coelho, A. S. G., Nagata, T., Noronha, E. F., & Ulhoa, C. J. (2012). *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. *Biological Control*, 61(2), 134–140.
- Steindorff, Andrei Stecca, Ramada, M. H. S., Coelho, A. S. G., Miller, R. N. G., Pappas, G. J., Ulhoa, C. J., & Noronha, E. F. (2014). Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics*, 15(1), 204. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-204>
- Stergiopoulos, I., & de Wit, P. J. G. M. (2009). Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 233–263. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.112408.132637>
- Stergiopoulos, I., van den Burg, H. A., Ökmen, B., Beenen, H. G., van Liere, S., Kema, G. H. J., & de Wit, P. J. G. M. (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), 7610–7615. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002910107>
- Steyaert, J. M., Ridgway, H. J., Elad, Y., & Stewart, A. (2003). Genetic basis of mycoparasitism: A mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 31(4), 281–291. <https://doi.org/10.1080/01140671.2003.9514263>
-

- Syme, R. A., Hane, J. K., Friesen, T. L., & Oliver, R. P. (2013). Resequencing and Comparative Genomics of *Stagonospora nodorum*: Sectional Gene Absence and Effector Discovery. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 3(6), 959–969. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004994>
- Thynne, E., Saur, I. M. L., Simbaqueba, J., Ogilvie, H. A., Gonzalez-Cendales, Y., Mead, O., Taranto, A., Catanzariti, A. M., McDonald, M. C, Schwessinger, B., Jones, D. A., Rathjen, J. P., & Solomon, P. S. (2017). Fungal phytopathogens encode functional homologues of plant rapid alkalization factor (RALF) peptides. *Molecular Plant Pathology*, 18(6), 811–824. <https://doi.org/10.1111/mpp.12444>
- Tian, M., Win, J., Song, J., Hoorn, R. van der, Knaap, E. van der, & Kamoun, S. (2007). A *Phytophthora infestans* Cystatin-Like Protein Targets a Novel Tomato Papain-Like Apoplastic Protease. *Plant Physiology*, 143(1), 364–377. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090050>
- Toruño, T. Y., Stergiopoulos, I., & Coaker, G. (2016). Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. *Annual Review of Phytopathology*, 54, 419–441. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100204>
- Tseng, S.-C., Liu, S.-Y., Yang, H.-H., Lo, C.-T., & Peng, K.-C. (2008). Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 6914–6922. <https://doi.org/10.1021/jf703626j>
- Urban, M., Cuzick, A., Rutherford, K., Irvine, A., Pedro, H., Pant, R., Sadanadan, V., Khamari, L., Billal, S., Mohanty, S., & Hammond-Kosack, K. E. (2017). PHI-base: A new interface and further additions for the multi-species pathogen–host interactions

-
- database. *Nucleic Acids Research*, 45 (D1), D604–D610.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1089>
- Van den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M. H. A. J., Vervoort, J., & de Wit, P. J. G. M. (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 19(12), 1420–1430. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1420>
- Van der Hoorn, R. A. L., & Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell*, 20(8), 2009–2017. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>
- Viaud, M., Brunet-Simon, A., Brygoo, Y., Pradier, J.-M., & Levis, C. (2003). Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Microbiology*, 50(5), 1451–1465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03798.x>
- Viaud, M. C., Balhadère, P. V., & Talbot, N. J. (2002). A *Magnaporthe grisea* cyclophilin acts as a virulence determinant during plant infection. *The Plant Cell*, 14(4), 917–930. <https://doi.org/10.1105/tpc.010389>
- Visick, J. E., Ichikawa, J. K., & Clarke, S. (1998). Mutations in the *Escherichia coli* surE gene increase isoaspartyl accumulation in a strain lacking the pcm repair methyltransferase but suppress stress-survival phenotypes. *FEMS Microbiology Letters*, 167(1), 19–25. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13202.x>
- Vleeshouwers, V. G. A. A., Raffaele, S., Vossen, J. H., Champouret, N., Oliva, R., Segretin, M. E., Rietman, H., Cano, L. M., Lokossou, A., Kessel, G., Pel, M. A., & Kamoun, S. (2011). Understanding and Exploiting Late Blight Resistance in the Age of Effectors.
-

- Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 507–531. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095326>
- Waghunde, R., Shelake, R., N. Sabalpara, A. (2016). *Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment* (Vol. 11). <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10584>
- Wang, Y., Kim, S. G., Wu, J., Huh, H.-H., Lee, S.-J., Rakwal, R., Agrawal, G. K., Park, Z. Y., Young Kang K., & Kim, S. T. (2013). Secretome analysis of the rice bacterium *Xanthomonas oryzae* (Xoo) using *in vitro* and *in planta* systems. *Proteomics*, 13(12–13), 1901–1912. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200454>
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D. G. O., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S. A. & Kamoun, S. (2012). Effector biology of plant-associated organisms: Concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 77, 235–247. <https://doi.org/10.1101/sqb.2012.77.015933>
- Yang, H.-H., Yang, S. L., Peng, K.-C., Lo, C.-T., & Liu, S.-Y. (2009). Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 113(Pt 9), 924–932. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.04.004>
- Zeilinger, S., & Omann, M. (2007). *Trichoderma* Biocontrol: Signal Transduction Pathways Involved in Host Sensing and Mycoparasitism. *Gene Regulation and Systems Biology*, 1, 227–234.
- Zhu, W., Wei, W., Wu, Y., Zhou, Y., Peng, F., Zhang, S., Chen P., & Xu, X. (2017). BcCFEM1, a CFEM Domain-Containing Protein with Putative GPI-Anchored Site, Is Involved in Pathogenicity, Conidial Production, and Stress Tolerance in *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1807. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01807>