



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**PREDICCIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE  
ESTERIGMATOCISTINA, GLIOTOXINA Y ÁCIDO  
FUSÁRICO EN *Pseudocercospora fijiensis***

Tesis que presenta

**JOSÉ RUFINO GÓMEZ TAH**

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**  
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México  
2020



---

---

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



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **José Rufino Gómez Tah**, titulado “**Predicción de la biosíntesis de esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico en *Pseudocercospora fijiensis***”, 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, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 2 de julio de 2020.

## **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.

Firma:  \_\_\_\_\_  
Biól. José Rufino Gómez Tah

---

---

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 Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca No. 702045 para la realización de mis estudios de Maestría, en el periodo 2018-2019.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento al proyecto "Enfoque agrogenómico en el estudio de la Sigatoka negra", clave CB2013-01 220957.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY), por la oportunidad de cursar el Programa de Maestría en Ciencias Biológicas y por permitirme el acceso a sus instalaciones, aulas, laboratorios y equipos, en particular a la Unidad de Biotecnología.

A mi Directora de Tesis, la Doctora Blondy Beatriz Canto Canché, por la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación, por su apoyo académico, por creer en mí, por su dedicación, confianza, amistad, gran paciencia y constante motivación para crecer intelectualmente.

A los integrantes de mi comité tutorial, el Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores y el Dr. Roberto Carlos Vázquez Euán, por sus comentarios, sugerencias y otras aportaciones para el desarrollo y culminación de este proyecto de investigación.

Al Dr. Jairo Cristobal Alejo y al Dr. Luis Sáenz Carbonell, por su valiosa colaboración en la revisión de este documento de tesis.

Al Técnico del Laboratorio de Biotecnología Microbiana, M.C. Bartolomé Humberto Chí Manzanero, por su constante ayuda técnica y académica, y por su valiosa amistad y confianza.

A la IBT. Karla Gisel Carreón Anguiano, por sus comentarios en favor del desarrollo de mi proyecto, por su invaluable ayuda técnica e informática, por ser un gran apoyo moral y académico, y por ser una gran amiga y hermana.

## AGRADECIMIENTOS

---

Al Dr. Max Mizraim Apolinar Hernandez, por su gran ayuda en los análisis bioinformáticos, por sus comentarios y muy útiles consejos.

A mis compañeros y mejores amigos de la generación 2018-I, Ing. Agrónomo Yessica Bautista Bautista, Q.F.B. Areli Robles Romero y Biól. Antonio Reyes Soria, por ser un gran apoyo moral, por brindarme una mano franca con la cual contar, por escucharme cuando más lo necesitaba, por compartir gratas vivencias e inolvidables aventuras en todo este tiempo. Gracias por hacer más agradable mi estancia en el CICY.

A mis compañeros y grandes amigos del Laboratorio de Biotecnología Microbiana, por ser parte importante en mi formación académica e intelectual, por ayudarme en la integración al grupo de investigación, por brindarme su valiosa amistad y confianza, M.C. Gemaly Elisama Ek Hernandez, M.C. Jewel Nicole Anna Todd, IBQ. Ricardo Barahona Cortés, IBQ. Jair Ernesto Díaz Ramírez, M.C. Osvaldo Jhosimar Couoh Dzul, M.C. Denise Esther Gutiérrez Domínguez, Br. Celina Ayil Naal, Br. Mercedes Rodríguez Argüello y Br. Juan Timoteo Méndez Díaz.

A todos los profesores que forman parte de este gran centro, que en el aula contribuyeron con mi formación académica, y a todo el personal administrativo y manual.

A todos los amigos que coseché en el CICY, en los diferentes laboratorios y unidades, evito nombrarlos, ellos se dan por aludidos.

A los buenos amigos que aún conservo desde la Licenciatura en Biología, Biól. Mirza Ramos Alcocer, Biól. Rosario Acosta Och y Biól. Renan Villanueva Vivas. Porque a pesar del tiempo y distancia siempre han estado ahí para escucharme, apoyarme y animarme.



## **DEDICATORIAS**

A mi Dios, por haberme permitido iniciar y culminar esta etapa tan importante en mi vida.

A mis padres Teresa Tah y Alfredo Gómez, por haberme brindado todo lo que he necesitado, por todo su cariño, paciencia y confianza, por alentarme todos los días a luchar por mis sueños, por sus valores y enseñanzas depositadas en mí.

A mis hermanos y hermanas, por el ejemplo que me transmiten al ser personas de bien, por el cariño, comprensión y gran ayuda en todos los aspectos. Gracias a Adriana, Tere, Alfredo, Carlos, Joel, Eva y también a la Tía Trinidad.

A mis sobrinas Hadasa y Ailyn, por alegrar mis días con sus travesuras y ocurrencias, por estar atentas de mi llegada a casa, para recibirme con mucho amor.



**ÍNDICE**

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMEN</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
1.1 Generalidades del Género <i>Musa</i> .....	3
1.2 Importancia socioeconómica del banano .....	4
1.3 Retos del cultivo del banano .....	5
1.4 La Sigatoka negra.....	6
1.4.1 <i>Pseudocercospora fijiensis</i> , el agente causal de la Sigatoka negra.....	6
1.4.1.1 Ciclo biológico de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> .....	7
1.4.2 Dispersión histórica de la Sigatoka negra.....	9
1.4.3 Diseminación de Sigatoka negra.....	10
1.4.4 Control de Sigatoka negra.....	10
1.4.5 Signos infecciosos de Sigatoka negra.....	11
1.5 Metabolitos secundarios y bioactividades en <i>P. fijiensis</i> .....	13
1.5.1 Análisis genómicos y transcriptómicos que sugieren biosíntesis de metabolitos secundarios en <i>P. fijiensis</i> .....	14
1.5.2 Metabolitos secundarios en conidios de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> .....	16
1.5.3 Esterigmatocistina.....	17
1.5.4 Gliotoxina.....	17
1.5.5 Ácido fusárico .....	18

<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>20</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>21</b>
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>23</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
2.1 Transcriptoma de conidios de <i>P. fijiensis</i> .....	23
2.2 Ensamble y anotación funcional del transcriptoma .....	23
2.3 Obtención de los clusters de las rutas biosintéticas .....	23
2.4 Identificación en el genoma .....	24
2.4.1 Análisis sinténico .....	24
2.5 Identificación en el transcriptoma .....	25
2.6 Selección de los genes para análisis de expresión .....	25
2.7 Obtención del material biológico .....	26
2.7.1 Obtención de biomasa .....	26
2.7.2 Conidiación .....	26
2.7.3 Cosecha de Conidios .....	26
2.7.4 Conteo de conidios .....	27
2.7.5 Monitoreo del proceso de germinación de los conidios de <i>P. fijiensis</i> .....	27
2.8 Extracción de ARN de los conidios y síntesis de ADNc .....	28
2.9 Análisis de expresión por RT-PCR .....	28
2.10 Diseño de oligonucleótidos degenerados .....	28
2.11 Purificación de bandas de PCR .....	29
2.12 Reacción de ligación al vector pGEM-T Easy .....	29
2.13 Transformación .....	29

2.14 Extracción de plásmido y secuenciación .....	29
2.15 Preparación de muestras para análisis metabolómico.....	30
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>31</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
3.1 Obtención de la biomasa de <i>P. fijiensis</i> .....	31
3.1.1 Conidiación .....	32
3.1.2 Cosecha y conteo de conidios.....	32
3.1.3 Monitoreo de la germinación de conidios de <i>P. fijiensis</i> .....	33
3.2. Análisis del “cluster” biosintético de esterigmatocistina (Stc).....	36
3.2.1 Identificación de los genes relacionados a las rutas de biosíntesis de Stc .....	36
3.2.2 “Cluster” biosintético de Stc identificado en <i>P. fijiensis</i> .....	38
3.2.3 Diseño de oligonucleótidos de los genes putativos de la biosíntesis de esterigmatocistina y su amplificación a partir del ADN genómico.....	39
3.2.4 Amplificación, clonación y secuenciación de los genes StcO y StcQ.....	41
3.2.5 Análisis de expresión de los genes de la ruta de esterigmatocistina. ....	45
3.2.6 Análisis sinténico del “cluster” de esterigmatocistina .....	50
3.3. Análisis del “cluster” biosintético de gliotoxina (Gli).....	52
3.3.1 Identificación de los genes relacionados a las rutas de biosíntesis de Gli .....	52
3.3.2 “Cluster” biosintético de Gli identificado en <i>P. fijiensis</i> .....	53
3.3.3 Diseño de oligonucleótidos de genes putativos de la biosíntesis de gliotoxina y amplificación en ADN genómico. ....	53
3.3.4 Amplificación, clonación y secuenciación del gen GliM .....	54
3.3.5 Análisis de expresión de genes putativos de la biosíntesis de gliotoxina.....	56
3.3.6 Análisis sinténico del “cluster” de gliotoxina .....	59
3.4 Análisis del “cluster” biosintético de ácido fusárico (AF).....	61

3.4.1 Identificación de los genes relacionados a la ruta de biosíntesis de ácido fusárico .....	61
3.4.2 “Cluster” biosintético de AF identificado en <i>P. fijiensis</i> .....	62
3.4.3 Análisis de expresión de genes putativos de la biosíntesis de AF .....	62
3.4.5 Análisis sinténico del “cluster” de ácido fusárico.....	64
3. 5 Análisis metabólico .....	65
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>68</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>77</b>
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>77</b>
5.1 CONCLUSIONES .....	77
5.2 PERSPECTIVAS.....	79
BIBLIOGRAFÍA.....	80

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.1 Ciclo biológico de *Pseudocercospora fijiensis*. ..... 9

Figura 1.2 Estadios de desarrollo de Sigatoka negra en hojas de banano (Asencio, 2004).  
..... 12

Figura 3.1 Matraces de 250 ml con medio PDB e inóculo de *Pseudocercospora fijiensis*. 31

Figura 3.2 Placas con cultivo de *P. fijiensis* en fase asexual. .... 32

Figura 3.3 Número de conidios de *P. fijiensis* recuperados en tres repeticiones. .... 33

Figura 3.4 Conidios de *P. fijiensis* sin germinar, colectados a las 0 h de germinación. .... 34

Figura 3.5 Conidios en proceso de germinación. .... 34

Figura 3.6 Conidios en proceso de germinación. .... 35

Figura 3.7 Esquematación del grupo de genes putativos de la biosíntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans*. .... 36

Figura 3.8 “Cluster” biosintético de esterigmatocistina en *P. fijiensis*, construido con el programa Geneious (Versión 5.4.7). .... 38

Figura 3.9 Electroforesis en gel de agarosa al 1 % para visualizar amplificaciones de los genes de las rutas evaluadas usando ADN genómico como templado. .... 40

Figura 3.10 Amplificación a partir del ADN genómico de *P. fijiensis* del gen StcO usando los oligonucleótidos degenerados StcO\_D. .... 41

Figura 3.11 Amplificación a partir del ADN genómico de *P. fijiensis* del gen StcQ usando oligonucleótidos degenerados StcQ\_D. .... 42

Figura 3.12 Productos de PCR en colonia de clones del gen StcO analizadas en gel de agarosa al 1 %..... 42

Figura 3.13 PCR en colonia de clones del gen StcQ analizadas en gel de agarosa al 1 %.  
..... 43

Figura 3.14 Secuencia del amplicón obtenido con los cebadores StcO\_D. .... 43

Figura 3.15 Secuencia del amplicón obtenido con los cebadores StcQ\_D. .... 44

Figura 3.16 Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para análisis de la integridad del ARN extraído de conidios en germinación. .... 45

Figura 3.17 Análisis de la amplificación por PCR del gen de actina a partir de ADNg o ADNc.  
..... 46

Figura 3.18 Análisis de expresión por RT-PCR del gen AflR en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios. .... 47

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 3.19 Análisis de expresión por RT-PCR del gen StcA en <i>P. fijiensis</i> durante la germinación de conidios. ....	47
Figura 3.20 Análisis de expresión por RT-PCR del gen StcK en <i>P. fijiensis</i> durante la germinación de conidios. ....	48
Figura 3.21 Análisis de expresión por RT-PCR del gen StcU en <i>P. fijiensis</i> durante la germinación de conidios. ....	48
Figura 3.22 Análisis de expresión por RT-PCR del gen StcJ en <i>P. fijiensis</i> durante la germinación de conidios. ....	49
Figura 3.23 Análisis sinténico para el “cluster” biosintético de la esterigmatocistina de <i>P. fijiensis</i> y otros hongos. ....	51
Figura 3.24 Esquematización del grupo de genes putativos de la biosíntesis de gliotoxina en <i>A. fumigatus</i> . ....	52
Figura 3.25 “Cluster” biosintético de gliotoxina construido con el programa Geneious (Versión 5.4.7). ....	53
Figura 3.26 Amplificación a partir del ADN genómico de <i>P. fijiensis</i> de gen GliM, usando los oligonucleótidos degenerados StcO_D. ....	55
Figura 3.27 PCR en colonia de clones del gen GliM analizadas en gel de agarosa al 1 %. ....	55
Figura 3.28 Secuencia del amplicón obtenido con los cebadores GliM_D. ....	56
Figura 3.29 Análisis de expresión por RT-PCR del gen GliZ en <i>P. fijiensis</i> durante la germinación de conidios. ....	57
Figura 3.30 Análisis de expresión por RT-PCR del gen GliI en <i>P. fijiensis</i> durante la germinación de conidios. ....	57
Figura 3.31 Análisis de expresión por RT-PCR del gen GliT en <i>P. fijiensis</i> durante la germinación de conidios. ....	58
Figura 3.32. Análisis de expresión por RT-PCR del gen GliP en <i>P. fijiensis</i> durante la germinación de conidios. ....	58
Figura 3.33 Análisis sinténico para el “cluster” biosintético de la gliotoxina de <i>P. fijiensis</i> y otros hongos. ....	60
Figura 3.34 Esquematización del grupo de genes putativos de la biosíntesis de ácido fusárico en <i>Fusarium fujikuroi</i> . ....	61
Figura 3.35 “Cluster” biosintético de ácido fusárico, construido con el programa Geneious (Versión 5.4.7). Se observan los cinco genes identificados en el genoma de <i>P. fijiensis</i> . ....	62
Figura 3.36 Análisis de expresión por RT-PCR del gen FUB1 en <i>P. fijiensis</i> durante la germinación de conidios. ....	63

Figura 3.37 Análisis de expresión por RT-PCR de la expresión del gen FUB4 en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios..... 63

Figura 3.38 Análisis sinténico para el “cluster” biosintético del ácido fusárico de *P. fijiensis* y otros hongos ..... 64

Figura 3.39 Análisis de Componentes Principales (PCA 2D) de los metabolitos colectados a partir de los conidios en germinación..... 65

### ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1 Identificación <i>in silico</i> de los genes de la ruta de biosíntesis de esterigmatocistina en el genoma repotado y transcriptoma de conidios de <i>P. fijiensis</i> .	37
Cuadro 3.2 Oligonucleótidos específicos para amplificar genes de la probable ruta de esterigmatocistina en <i>P. fijiensis</i> .	39
Cuadro 3.3 Oligonucleótidos degenerados para amplificar genes de la probable ruta de esterigmatocistina en <i>P. fijiensis</i> .	41
Cuadro 3.4 Genes de la ruta de biosíntesis de gliotoxina identificados <i>in silico</i> en el genoma de referencia de <i>P. fijiensis</i> y en el transcriptoma de conidios de este hongo.	52
Cuadro 3.5 Oligonucleótidos específicos para amplificar genes de la probable ruta de gliotoxina en <i>P. fijiensis</i> .	54
Cuadro 3.6 Oligonucleótidos degenerados para amplificar genes de la probable ruta de gliotoxina en <i>P. fijiensis</i> .	54
Cuadro 3.7 Genes de la ruta de biosíntesis del ácido fusárico identificados <i>in silico</i> en el genoma de referencia de <i>P. fijiensis</i> y en el transcriptoma de conidios de este hongo.	61
Cuadro 3.8. Oligonucleótidos específicos para amplificar genes de la probable ruta de ácido fusárico en <i>P. fijiensis</i> .	62
Cuadro 3.9 Coincidencias en las masas moleculares entre los aductos identificados por LC-MS/MS QTOF y otros metabolitos.	66

**ABREVIATURAS**

ABC	Atlas of Biosynthetic gene Clusters
ACP	Proteína transportadora de acilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AF	Ácido fusárico
ARN	Ácido ribonucleico
AT	Aciltransferasa
BLAST	Herramienta de búsqueda para alineamiento local (Basic Local Alignment Search Tool)
C/ml	Conidios por mililitro
CEDRSSA	Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria
DH	Deshidratasa
DHN	Dihidroxinaftaleno
EBI	Instituto Europeo de Bioinformática (European Bioinformatics Institute)
EMBL	Laboratorio Europeo de Biología Molecular (European Molecular Biology Laboratory)
ER	Enoil reductasa
EST	Marcador de secuencia expresada (Expressed sequence tag)
<i>et al.</i>	y otros (latín)
ETP	Epidithiodioxopiperazina
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FAS	Sintasa de ácidos grasos

## ABREVIATURAS

---

Gli	Gliotoxina
H	Hidrógeno
h	Horas
ha	Hectáreas
IDT	Integrated DNA Technologies
IMG	Integrated Microbial Genomes
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (inductor de expresión del gen lacZ)
JGI	Joint Genome Institute
Kb	Kilobase (1000 pares de bases de ADN o ARN)
KR	Ketoacil reductasa
KS	Ketoacil sintasa
LB	Caldo de Lisogenia (Lysogeny Broth)
LC/MS-MS	Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (Liquid chromatography–mass spectrometry)
M	Masa
Mb	Megabyte
MeOH	Metanol
ml	mililitros
MXN	Nomenclatura de peso mexicano
Na	Sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
NLS	Señal de localización nuclear (Nuclear Localization Signal)
nt	Nucleótido
p. ej.	Por ejemplo
pb	Pares de bases

PCA	Análisis de componentes principales (Principal component analysis)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PDA	Medio de cultivo de papa-dextrosa-agar (Potato dextrose agar)
PDB	Caldo de papa y dextrosa (Potato Dextrose Broth)
PKS	Policétido sintasa (Polyketide synthase)
QTOF	Espectrometría de masas de tiempo de vuelo-cuadrupolo (Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry)
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (Reverse Transcriptase coupled to polymerase chain reaction)
s	Segundos
SIAP	Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera
sp	Especie no determinada
spp	Todas las especies de un mismo género
SPPC	Sistema Producto Plátano Chiapas
Stc	Esterigmatocistina
TLC	Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography)
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión (Melting Temperature)
USA	United States of America
UV	Luz Ultravioleta
CFP	Proteína cián fluorescente (Cian fluorescent protein)
µg	Microgramo
µM	Micromolar
µl	Microlitro
µm	Micrómetro



**RESUMEN**

*Pseudocercospora fijiensis* es el agente causal de la enfermedad foliar del banano conocida como Sigatoka negra, responsable de importantes pérdidas de producción en los países tropicales. *P. fijiensis* es un hongo holomorfo; cuyo ciclo biológico le permite desarrollar reproducción asexual y sexual alternadamente. Para infectar a su hospedero, usa esporas asexuales y sexuales conocidas como conidios y ascosporas respectivamente. Los conidios son responsables de la diseminación de la enfermedad a nivel local y se producen durante la mayor parte del ciclo de la enfermedad. Las ascosporas son el inoculo responsable de la diseminación a largas distancias, capaces de resistir condiciones ambientales extremas. Durante la infección, *P. fijiensis* desarrolla un hábito hemibiotrófico, pues inicialmente establece una relación de nutrición con su hospedero que aparentemente no resulta perjudicial; en esta etapa aún no se observa algún signo de daño y esta fase se conoce como biotrófica. Posteriormente, el hongo comienza a desarrollar su fase necrotrófica donde invade el tejido del hospedero de manera nociva, liberando proteínas efectoras y toxinas, lo que favorece la aparición del halo clorótico amarillo y necrosis en las hojas.

El estudio molecular de las esporas asexuales de *Pseudocercospora fijiensis* es de mucha trascendencia, pero hasta ahora ha sido poco abordado. Los conidios son estructuras expuestas al ambiente externo de la hoja, lo cual los hace buenos candidatos como blancos, para proponer un plan de control en una fase temprana de la enfermedad, es decir, cuando el ciclo infectivo inicia. Datos transcriptómicos de conidios en germinación de *P. fijiensis* revelaron la existencia de transcritos homólogos relacionados con los genes de las rutas de biosíntesis de micotoxinas como esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico, los cuales son compuestos que aún no han sido descritos en miembros de la familia Mycosphaerellaceae.

Este trabajo tuvo como objetivo realizar los análisis predictivos y de confirmación de la presencia de algunos de los genes involucrados en las rutas de biosíntesis de los siguientes metabolitos: esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico. Para ello se integraron recursos transcriptómicos, genómicos y metabolómicos con el fin de analizar la posible síntesis de estos compuestos y con esta estrategia escudriñar el potencial genético y metabolómico del hongo contribuyendo a la comprensión del patosistema.

---



**ABSTRACT**

*Pseudocercospora fijiensis* is the causal agent of the banana foliar disease, Sigatoka negra, responsible for substantial crop losses in tropical countries. *P. fijiensis* is a holomorphic fungus, it can develop alternately by sexual and asexual reproduction, using sexual and asexual spores to infect the host. These spores are known as conidia and ascospores, respectively. Conidia are responsible for disease propagation at the local level, or in very close ranges, and this is produced during most stages of the cycle. Ascospores are the inoculum responsible for dispersal over long distances, capable of withstanding extreme environmental conditions.

During infection by conidia or ascospores, *P. fijiensis* in its hemibiotrophic lifestyle, initially establishes a nutritional relation where its host is not harmed and damage is not observed. This phase is called the biotrophic phase. Later, the fungus begins to develop a necrotrophic phase where it produces effector proteins and toxins, resulting in the appearance of a yellow chlorotic halo and then leaf necrosis.

Although the molecular study of asexual spores from *P. fijiensis* is very important, it has not been approached successfully thus far. The conidia, being exposed to the environment on the leaf's surface, are viable targets for the proposition of a management plan in the early phases of infection. Transcriptomic data from *P. fijiensis* germination conidia show the existence of homologue transcripts related to genes from the mycotoxin biosynthetic pathways for sterigmatocystin, gliotoxin and fusaric acid. These compounds have never before been described as metabolites in members of the Mycosphaerellaceae family.

The objective of this study was to perform predictive and confirmation analyzes of the presence of some genes involved in the biosynthetic pathways of the following metabolites: sterigmatocystin, gliotoxin and fusaric acid. This was done by integrating transcriptomic, genomic and metabolomic resources with the purpose of analyzing the possible pathways of synthesis of these compounds, as well as the metabolomic potential of the fungus, improving understanding of this pathosystem.



## INTRODUCCIÓN

El banano es el sexto cultivo más importante a nivel mundial, después del arroz, trigo, maíz, yuca y papa (Alakonya *et al.*, 2018). Según la FAO (2016), el cultivo de banano se realiza en más de 150 países, cubriendo una superficie aproximada de 9,000,000 ha que producen 99 millones de toneladas de fruta por año. El cultivo se extiende en las regiones tropicales y tiene una importancia fundamental para las economías de muchos países en desarrollo. En México, el estado de Chiapas es el principal productor dentro de los 14 estados que se dedican a esta actividad, con una superficie sembrada de 24, 427 ha; le siguen los estados de Veracruz, Tabasco, Michoacán, Colima, Nayarit, Oaxaca y Jalisco. La región del Soconusco es el área más importante en Chiapas, con 6,786 ha sembradas cuya producción está orientada en su mayoría al mercado de exportación (SPPC, 2012; CEDRSSA, 2019).

Lograr una producción eficiente representa un gran reto para los pequeños y grandes productores, pues existe una gran diversidad de enfermedades que afectan a este cultivo. La Sigatoka negra es de las principales enfermedades que ataca al cultivo de banano en las regiones bananeras de México y en el mundo. El control de esta enfermedad se basa principalmente en la aplicación de fungicidas sintéticos, sistémicos y de contacto. Las fumigaciones de las plantaciones de banano se realizan dependiendo de las condiciones climáticas de cada región y se aplican en intervalos de 7 a 12 días, lo cual aumenta considerablemente los costos de producción y mantenimiento anual de las plantaciones. Tal aumento es de un 25 hasta un 30 % del costo de producción. También se sabe que el manejo de la Sigatoka negra con fungicidas ha favorecido el desarrollo de resistencia por parte de *Pseudocercospora fijiensis*, lo que representa un serio problema agronómico. El uso de fungicidas sintéticos también causa un impacto negativo en el ambiente y en la salud de los trabajadores de las plantaciones (Stergiopoulos *et al.*, 2014; Arango *et al.*, 2016; Alakonya *et al.*, 2018).

*P. fijiensis* es un hongo fitopatógeno que provoca daño severo a las plantaciones de banano en el mundo. Este hongo es un patógeno hemibiotrófico, pues primeramente invade a su hospedero y establece una relación de nutrición que al principio no resulta perjudicial para la planta. Después de establecerse comienza a desarrollar una fase necrotrófica, donde el patógeno secreta enzimas hidrolíticas y toxinas, que son compuestos de bajo peso

moleculares responsables de la necrosis del tejido vegetal (Hoss *et al.*, 2000). Este patógeno se disemina por aire, viento o lluvia mediante conidios y ascosporas. Las ascosporas se producen en las fases avanzadas de la enfermedad, mientras que los conidios se producen desde etapas tempranas y durante la mayor parte de la enfermedad. El estudio de las estructuras infectivas de los hongos patógenos representa una oportunidad para el desarrollo de estrategias de control efectivas, con el fin de evitar la propagación de la enfermedad, al comprender su biología, analizar sus procesos moleculares y conocer más acerca del patosistema. De esta forma será posible implementar el diseño de fungicidas u otros métodos alternativos de control para esta enfermedad.

Las enzimas, proteínas efectoras y toxinas constituyen los principales factores de virulencia de los organismos patógenos. Los metabolitos como la fijiensina y juglona son importantes toxinas en la infección de *P. fijiensis* sobre el banano. Además de fijiensina, se reporta que trihidroxitetralona, juglona, hidroxisidona, ácido hidroxicinámico y ácido isochracínico son otros compuestos producidos por *P. fijiensis* (Stierle *et al.*, 1991; Churchill, 2011). A través de análisis bioinformáticos del transcriptoma y del genoma de este fitopatógeno se puede predecir la biosíntesis de metabolitos secundarios que no han sido reportados en este hongo. Usando esta estrategia, Noar y Daub (2016) predijeron que *P. fijiensis* pudiera producir fumonisina, solanapirona y alternapirona, policétidos reportados en *Alternaria* spp. y *Fusarium* spp. Estas mismas autoras, a partir de la PKS8-1 presente en el genoma de *P. fijiensis*, predijeron la posible síntesis de monodictilfenona o cladofulvina (Noar *et al.*, 2019). En el presente trabajo se exploró mediante herramientas bioinformáticas y técnicas moleculares la posible producción de metabolitos secundarios en *P. fijiensis*. El objetivo fue analizar el potencial metabólico a través de análisis predictivos de las rutas de biosíntesis de los compuestos esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico. Este interés fue consecuencia de encontrar transcritos que codifican enzimas involucradas en estas rutas de biosíntesis en un transcriptoma de conidios de *P. fijiensis*. Estos resultados son relevantes porque estos compuestos se han descrito en otros ascomicetos, pero no Mycosphaerellaceae, por lo que resultan novedosos en este género de hongos y en particular en *P. fijiensis*.

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1 Generalidades del Género *Musa*

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.), son plantas monocotiledóneas, perennes gigantes, del orden Zingiberales, un grupo hermano del grupo de las *Poales* que incluye a los cereales. Los bananos son importantes para la seguridad alimentaria en muchos países tropicales y subtropicales y es la fruta más popular en los países industrializados. El proceso de domesticación de *Musa* comenzó hace aproximadamente 7,000 años en el sudeste asiático. Este proceso de domesticación se basó en ejemplares producidos por cruza híbridas entre diversas especies y subespecies, producto de las migraciones humanas y la selección de híbridos diploides y triploides partenocárpicos sin semilla. A partir de entonces se dispersaron ampliamente por propagación vegetativa. La mitad de la producción actual son somaclones derivados de un único genotipo triploide conocido como Cavendish (Rekha, 2011).

Los bananos y los plátanos proceden de las especies diploides *Musa acuminata* (genoma AA) y *Musa balbisiana* (genoma BB), con ciertos rasgos primitivos, como frutos pequeños, poco comestibles y con semillas. El proceso evolutivo de estas plantas provocó el desarrollo de un tercer juego de cromosomas, convirtiéndolas en triploides (AAA o BBB), en las cuales sus frutos carecen de semillas y tienen una gran cantidad de pulpa alrededor de los embriones muertos (Beltrán-García *et al.*, 2009).

En México, normalmente el término plátano es aplicado tanto a los bananos como a los plátanos, aunque son frutos diferentes. En cuanto a las diferencias genómicas, las variedades diploides y triploides de *Musa acuminata* (A) se conocen como bananos, las cuales comprenden las variedades enano gigante, valery y morado (AAA) y dátil (AA). Entre los plátanos se pueden mencionar al macho, dominico y manzano (AAB) y al tipo pera o cuadrado (ABB). En cuanto a las propiedades organolépticas también existe una marcada diferencia entre plátano y banano, como la estructura del carbohidrato que influye en el sabor y la textura de la pulpa. Los bananos tienen carbohidratos sencillos como glucosa y fructosa, lo que les da un sabor dulce y textura cremosa, en cambio, la pulpa de los plátanos contiene mucho almidón (amilosa y amilopectina), lo que provoca una consistencia harinosa y no tan dulce; la cocción o maduración excesiva provoca que el almidón se transforme en

---

glucosa. Por lo antes mencionado, incluso la forma de consumirlos también muestra diferencia entre uno y otro (Nadal *et al.*, 2009; Perrier *et al.*, 2011; Hoyos *et al.*, 2012).

El banano es un fruto muy apreciado por su sabor y por el aporte nutricional al ser humano, constituido por un 74 % de agua, 23 % por carbohidratos, 1 % en proteínas, 0.5 % de grasa libre de colesterol y 2.6 % de fibra; además, es rico en potasio, calcio, fósforo, vitaminas A, B1, B2, B3, B6, aminoácidos como lisina, leucina y valina (Canto y Castillo, 2011; Rekha, 2011).

### **1.2 Importancia socioeconómica del banano**

En México y en el resto del mundo el banano es una de las frutas más consumidas por la población, por su bajo precio y alto valor nutricional como fuente de energía, vitaminas y minerales, siendo su cultivo una de las ramas más importantes de la fruticultura (Secretaría de Economía, 2012).

En el año 2016, a nivel mundial se cosecharon 106,714,204.76 toneladas de banano y los países con mayor superficie cultivada fueron India, Tanzania, Brasil y Filipinas. En cuanto a producción mundial se generaron alrededor de \$5,411,964.86 USD al año (FAO, 2016). Ecuador es el principal exportador del mundo y su principal mercado es Europa. México ocupa el lugar número 10 con una producción de 2,384,778 toneladas al año. Este cultivo es el producto agrícola número veintiséis en el país (SIAP, 2019) y representa una importante fuente de ingresos. Por ejemplo, en el estado de Tabasco, el valor de producción agrícola en 2018 fue de aproximadamente de \$7,000,000,000 MXN, de los cuales el 30 % correspondió a la producción de banano, éste es un cultivo de gran importancia económica y social (CEDRSSA, 2019).

La principal variedad producida en México es el enano-gigante, seguido por el plátano macho, que representan la cuarta parte de la producción. Otras variedades de importancia nacional son el plátano Tabasco, Criollo, Valery, Dominicó, Pera, Manzano y Morado. Los estados productores se agrupan en cinco regiones: Golfo de México, Pacífico, Pacífico Centro, centro y península de Yucatán, que en total cultivan 75,314.64 hectáreas (Financiera Rural, 2014).

### 1.3 Retos del cultivo del banano

Varios factores negativos, tanto bióticos como abióticos, hacen un reto producir banano, por ejemplo: la pérdida de la fertilidad del suelo, la incidencia de los desastres naturales, las afectaciones por plagas de insectos y las enfermedades provocadas por patógenos que incluyen a nematodos, virus, bacterias y hongos. Tan solo se han registrado alrededor de 470 especies de insectos y ácaros que provocan en mayor o menor medida daño a los cultivos (Alvarado y Días, 2007).

Dentro de los microorganismos que causan enfermedades al banano se encuentra *Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas solanacearum*), una bacteria patogénica que provoca la enfermedad conocida como Moko del banano. Entre las enfermedades causadas por hongos se encuentran el mal de Panamá (*Fusarium oxysporum*), la punta de cigarro (complejo entre especies de los géneros *Stachylidium*, *Fusarium* y *Deightonella*), Cordana (*Cordana musae*), Sigatoka amarilla (*Pseudocercospora musicola*) y la Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis*) (Shirani *et al.*, 2012).

A nivel mundial, una de las enfermedades que causa más daño a las plantaciones de banano es la Sigatoka negra, pues las pérdidas que ocasiona pueden ser devastadoras; la necrosis de las hojas causa una reducción significativa en el área foliar efectiva, induciendo pérdidas de cosecha en un 50 % o más. La Sigatoka negra es una enfermedad sumamente explosiva, cuando las medidas de control de la enfermedad no son efectivas se reduce el peso de los racimos y los dedos no llenan las especificaciones de calibre. También se tiene un problema de madurez prematura durante el transporte, dando como resultados la baja aceptación de la calidad del fruto, lo que ocasiona un problema para la exportación (Nakyanzi, 2002).

Los grandes productores pueden cubrir los costos del control convencional de *P. fijiensis*, pero la mayoría de los pequeños productores no pueden hacerlo, éstos últimos son los más desprotegidos y propensos a sufrir pérdidas. Por lo anterior, existe un conflicto tanto económico como social, pues los altos costos se traducen en abandono del cultivo, reducción en la superficie sembrada y aumento del desempleo (Beltrán-García *et al.*, 2009; Noar y Daub, 2016a).

### 1.4 La Sigatoka negra

Martínez *et al.* (2011) describieron a la Sigatoka negra como una enfermedad que se desarrolla en las hojas del banano, y que es provocada por el hongo ascomiceto, hemibiotrófico *Pseudocercospora fijiensis* (anamorfo), constituyéndose un serio problema fitopatológico del cultivo. Esta enfermedad, junto con la Sigatoka amarilla y la enfermedad de la mancha foliar del banano, forma parte de lo que se conoce como “el complejo Sigatoka” junto con *P. musae* y *P. eumusae* (Arango *et al.*, 2016).

Este patógeno daña el tejido foliar del hospedero alterando drásticamente su fisiología; reduciendo su capacidad fotosintética, afectando su crecimiento y disminuyendo la producción y calidad de los frutos. Cuando no se realiza un control efectivo de la enfermedad, se puede reducir hasta en un 50 % el peso del racimo o causar pérdidas del 100 % de la producción debido a la disminución de la longitud y grosor del fruto (Martínez *et al.*, 2011).

#### 1.4.1 *Pseudocercospora fijiensis*, el agente causal de la Sigatoka negra

El agente causal de la Sigatoka negra es comúnmente identificado como *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, con su estado imperfecto correspondiente a la especie *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, renombrado recientemente como *Pseudocercospora fijiensis*. Este hongo pertenece a la clase Ascomycota, del orden Dothideales y de la familia Dothideaceae. Se reproduce y disemina a través de dos tipos de esporas conocidas como ascosporas y conidios, las cuales constituyen el inóculo del patógeno. Las condiciones óptimas de germinación son los climas cálidos y húmedos predominante en los países tropicales (Merchán, 2000; Henderson *et al.*, 2006).

Hoss *et al.* (2000) mencionaron que este hongo es considerado como un organismo hemibiotrófico, pues inicialmente establece una relación de nutrición con su hospedero que aparentemente no resulta perjudicial; en esta etapa aún no se observan signos de daño y esta fase se conoce como biotrófica. Posteriormente, desarrolla su fase necrotrófica, en la cual invade el tejido del hospedero de manera agresiva, liberando toxinas o enzimas. A partir de esta fase se comienzan a notar los signos característicos de la enfermedad.

#### 1.4.1.1 Ciclo biológico de *Pseudocercospora fijiensis*

Marín y Romero (1998), señalaron que *P. fijiensis* tiene una alta capacidad de variación genética debido a que puede reproducirse de manera sexual y asexual; lo que le brinda la capacidad de adaptarse a diversas condiciones ambientales, en casi todas las áreas productoras de banano y plátano del mundo.

Lindao (2010) dividió el ciclo biológico de *P. fijiensis* en cuatro etapas importantes: la etapa de infección, la etapa de incubación, la etapa de transición y la etapa sexual.

**Etapa de infección:** Esta es la primera etapa en donde las esporas (conidios o ascosporas) germinan luego de depositarse en la superficie de las hojas, al cabo de 2 a 3 horas, con temperatura superior a los 20 °C. La espora en germinación desarrolla un tubo germinativo que penetra por el estoma después de 48-72 h. La infección por medio de conidios se produce especialmente cuando existen niveles elevados de humedad.

**Etapa de incubación:** este período abarca desde la etapa de infección hasta la aparición de la primera mancha en la hoja, entre 10 a 14 días en condiciones ideales. En esta etapa emergen del estoma un gran número de células conidiógenas, de las que se desarrollan luego los conidióforos; crecen de manera paralela a las venas de la hoja con una distancia mayor a 3 mm, luego infectan el estoma adjunto, y forman pequeñas ramificaciones sobre éste. Este comportamiento ocasionará una incubación en cadena, a manera de red formado por las colonias, en donde se tiene como resultado el desarrollo de la raya negra en la totalidad de la hoja, la cual es denominada también como invasión inicial sobre el tejido de la hoja.

**Etapa de transición:** esta etapa se desarrolla entre la aparición del primer signo de infección hasta la aparición de la primera mancha madura con su centro seco y de color gris, entre 11 y 139 días. Al final de este ciclo ocurre la dispersión de los conidios por medio del aire o agua, haciendo más severa la invasión sobre el tejido de las hojas, debido a la susceptibilidad del cultivo y las condiciones climáticas.

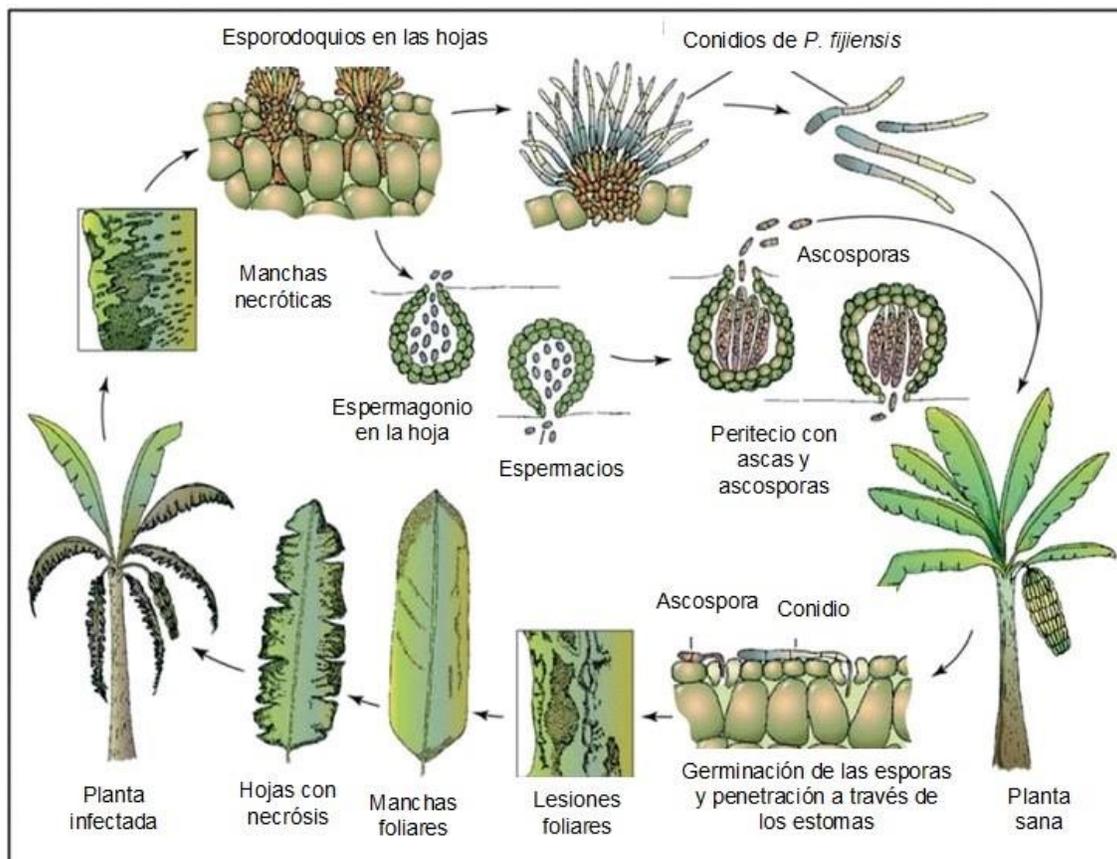
**Etapa de reproducción sexual:** durante esta etapa se produce la liberación de una gran cantidad de ascosporas desarrolladas en hojas secas o húmedas. La cantidad depende de la susceptibilidad de los cultivos, severidad de la infección y las condiciones climáticas.

Churchill (2011) realizó una revisión del ciclo de vida de este patógeno, y mencionó que consta de cuatro etapas: germinación de esporas, penetración del huésped, desarrollo de signos visibles de la enfermedad y la producción de esporas (Figura 1.1).

*P. fijiensis* es un hongo heterotálico y haploide que produce conidios multicelulares a partir de conidióforos. La fase de reproducción asexual puede ocurrir tanto *in vitro* como *in planta*. Los conidióforos emergen a partir de las hifas presentes en la cámara subestomática, y esto ocurre en gran medida en el envés de la hoja. Un solo conidióforo puede producir múltiples conidios; el proceso de conidiogénesis se denomina asincrónico pues en las diferentes etapas de la enfermedad pueden producirse conidios.

El ciclo biológico de *P. fijiensis* está influenciado por la disposición del agua libre sobre las hojas, este ciclo inicia con la germinación de las esporas, las cuales requieren de condiciones de humedad adecuadas (entre 92 a 100 % de humedad relativa). Las esporas germinan después de 2-3 horas de haberse depositado en la superficie de la hoja, con frecuencia esto ocurre en la superficie abaxial; el talo germinativo se alarga y ramifica hasta penetrar los estomas, la penetración del tubo germinativo puede tardar alrededor de 48 a 72 horas.

El periodo de aparición de los primeros signos visibles de la enfermedad dura entre 30 y 72 días si las condiciones de desarrollo son óptimas. El ciclo de vida termina cuando son liberadas las ascosporas, esto puede ocurrir entre los 49 y 64 días después de la infección del banano sano.



**Figura 1.1** Ciclo biológico de *Pseudocercospora fijiensis*. Este hongo se reproduce a través de esporas asexuales (conidios) y esporas sexuales (ascosporas) que se dispersan por acción del viento o lluvia. De esta manera puede infectar plantas sanas (Churchill, 2011).

#### 1.4.2 Dispersión histórica de la Sigatoka negra

La Sigatoka negra (SN), se describió como una enfermedad foliar grave en 1963, en Viti Levu (República de las Islas Fiji), aunque hay evidencias de su presencia en Hawai y en algunas zonas del Pacífico desde mucho antes. En Centroamérica, en 1974 se describió en Honduras una nueva variedad de *M. fijiensis* y nombrado como *M. fijiensis* var. *difformis*, de ahí se diseminó por la región. En 1979 se registró en Costa Rica, en 1980 en Panamá y Colombia, posteriormente en 1987 en Ecuador, Cuba y Venezuela (Marín *et al.*, 2003; Asencio, 2004).

La Sigatoka negra en México fue reportada de manera oficial en plantaciones de bananos y plátanos en los estados de Chiapas y Tabasco en 1981. Aunque se menciona que se observó por primera vez en Tapachula, Chiapas a finales de 1980. Luego la enfermedad se

diseminó en 1985 hacia los estados de Veracruz y Oaxaca, en 1989 se detectó en Colima y en 1990 llegó a Michoacán y Jalisco. La enfermedad fue encontrada en Nayarit en noviembre de 1994 y en la actualidad se encuentra en todas las áreas productoras de bananos y plátanos en México. (Vázquez-Euan *et al.*, 2019; Orozco-Santos *et al.*, 2008).

### **1.4.3 Diseminación de Sigatoka negra**

Los conidios infectan a las hojas a través de los estomas, mayormente en el envés, durante periodos de alta humedad. Un conidio germinado emerge por el estoma y penetra otros estomas aledaños, aumentando el tamaño de la lesión o daño foliar. Las esporas de los hongos son resistentes a la desecación y a las temperaturas extremas; si las condiciones no son favorables estas estructuras pueden entrar en un estado de latencia (Henderson *et al.*, 2006).

Hanada *et al.* (2004), reportaron que los conidios de *P. fijiensis* pueden sobrevivir en condiciones ambientales extremas hasta 60 días, aun en presencia de compuestos químicos para el control de las esporas. Existen esporas fúngicas que mantienen su viabilidad por un largo periodo; esas esporas poseen una alta presión osmótica, lo que les permite absorber agua y de esta manera mantener su viabilidad por largo tiempo.

### **1.4.4 Control de Sigatoka negra**

El control de esta enfermedad se basa en la aplicación de fungicidas sistémicos y de contacto. Este tratamiento representa altos costos debido a que se realizan por medio de mochilas de fumigación, avionetas o helicópteros, que destacan entre los métodos más sofisticados y con mayor alcance (Ganry *et al.*, 2012). Sin embargo, tales aplicaciones resultan potencialmente perjudiciales para el medio ambiente, animales y seres humanos que viven y trabajan en las zonas bananeras. La situación es aún más preocupante para los pequeños agricultores que no pueden pagar por el uso de fungicidas y técnicas costosas de aplicación, por lo tanto, están en desventaja al no tener los recursos para controlar efectivamente el impacto o la propagación del hongo (Churchil, 2011).

Desde 1950 se ha empleado aceite mineral para reducir el volumen de fungicidas, éstos forman una niebla homogénea que distribuye los ingredientes activos sobre la hoja, impidiendo la evaporación y mejorando, en el caso de muchos fungicidas sistémicos, la

penetración al tejido vegetal. Los benzimidazoles fueron los primeros fungicidas sitio-específico para el control de la enfermedad (Fouré y Ganry, 2008), mientras los bis-ditiocarbamatos de etileno, como son maneb y mancozeb son fungicidas de contacto ampliamente usados actualmente; tienen un modo no específico de acción, con el grupo tiol bloqueando la respiración y otros procesos metabólicos.

Debido a la alta dependencia de los fungicidas sintéticos se han desarrollado otras formulaciones bajo los nombres comerciales como: chlorothalonil, metiram, captan, thiram y propineb y son consideradas fungicidas de bajo riesgo de resistencia. También se emplean prácticas culturales que ayudan en el manejo de la Sigatoka negra, pues el crecimiento de las plantas en un suelo bueno y fértil da como resultado plantas más vigorosas, con reducción de la severidad de la enfermedad. Se sugieren prácticas como la poda de hojas necróticas, estas hojas deben incinerarse o enterrarse para evitar que se disemine el inóculo. La urea también se puede aplicar a los restos de hojas, para acelerar la descomposición (Orozco-Santos *et al.*, 2013).

#### **1.4.5 Signos infecciosos de Sigatoka negra**

El primer signo visible de la enfermedad es la aparición de una pequeña marca blanquizca con tonalidad amarillenta sobre el tejido foliar. Esta marca puede ser observada solamente en el envés de la hoja y no es visible a trasluz. Esta marca evoluciona y se torna de color café rojizo que puede verse a trasluz (Asencio, 2004). Estos signos de la enfermedad también pueden observarse en los primordios foliares cuando el progreso de la enfermedad ha sido alto y las condiciones de temperatura y humedad han sido óptimas, después de un tiempo corto de incubación (Bonilla, 2015).

Fouré (1985), estableció seis estadios que pueden ser identificados en el desarrollo de la enfermedad, que van desde puntos y rayas, hasta manchas necróticas (Figura 1.2).

**Estadio 1.** En esta etapa se aprecia el primer signo visible de la enfermedad, se distingue la presencia de pequeñas decoloraciones o puntos con menos de un milímetro de longitud, de color café rojizo conocidos como pizca. Este signo no es visible a trasluz y solo se puede observar por el envés de la hoja.

**Estadio 2.** Las lesiones toman la forma de una raya de color café; primero es visible únicamente en el lado inferior de la hoja, más tarde se observa como una raya amarilla en el lado superior de la hoja.

**Estadio 3.** Este estado se diferencia del anterior en el tamaño de la estría; la estría se extiende y se hace ligeramente más ancha.

**Estadio 4.** La estría se ha vuelto una mancha; el color es café oscuro en la parte inferior y negro en la parte superior de la hoja.

**Estadio 5.** La mancha se ha convertido en una lesión de color negro en ambos lados de la hoja. El amarillamiento del tejido alrededor de la lesión puede observarse y el área negra central se empieza a hundir.

**Estadio 6.** Este es el estado final de la enfermedad, el centro la mancha se seca y toma una sombra de color gris, las lesiones se unen y la hoja se necrosa.



**Figura 1.2** Estadios de desarrollo de Sigatoka negra en hojas de banano (Asencio, 2004).

### 1.5 Metabolitos secundarios y bioactividades en *P. fijiensis*

Los organismos sésiles (plantas y hongos), como resultado de su metabolismo secundario, producen gran cantidad de moléculas orgánicas de bajo peso molecular. Estos compuestos no están involucrados en los procesos fisiológicos primarios como crecimiento o reproducción, sino que, son producidos y acumulados como parte de la estrategia de competencia, ataque, defensa y protección ante el estrés biótico o abiótico al que estos organismos pueden verse sometidos (Boruta, 2018).

Los hongos han sido muy estudiados por su amplia capacidad de producir diferentes metabolitos secundarios como policétidos, péptidos no ribosomales, alcaloides y terpenos, que se clasifican según sus múltiples propiedades bioactivas. Estos compuestos le confieren al organismo gran ventaja de adaptación y conquista de diferentes nichos ecológicos (Demain y Fang, 2000).

Se estima que el 40 % de los hongos filamentosos producen antibióticos en condiciones de crecimiento natural. Fleming en 1928 descubrió la penicilina y desde entonces se han estudiado y explotado los métodos de defensa de los hongos ante las bacterias, y estos metabolitos han sido usados para proteger a los humanos de organismos patógenos. Además de usarse como antimicrobianos, muchos compuestos fúngicos también se utilizan como medicamentos hipolipemiantes (lovastatina), inmunosupresores (ciclosporina y ácido micofenólico) y vasoconstrictores (ergometrina) (Newman y Cragg, 2006).

En los hongos, en especial los patógenos, algunos de estos metabolitos tienen un alto potencial biológico, ya que causan severas reacciones adversas en otros organismos, pudiendo eliminar la competencia de otros microorganismos por los nutrientes, facilitando la colonización de los ambientes competidos (Borges *et al.*, 2010).

Entre las múltiples funciones bioactivas, los metabolitos secundarios tienen una función importante en el desarrollo de infecciones por los hongos fitopatógenos. En el caso de la interacción entre banano y *P. fijiensis*, Churchill (2011) mencionó que la aparición del halo amarillento alrededor de las lesiones producidas en la hoja del banano (clorosis; signo característico de la Sigatoka negra), podría ser causado por la secreción de un metabolito tipo toxina del hongo. Previamente se han evaluado extractos de cultivos de *P. fijiensis* que exhibieron actividad fitotóxica; estos ensayos se realizaron sumergiendo en el extracto acuoso de *P. fijiensis* puntas de hojas cortadas de las plantas, o con un método de punción

en las hojas o plántulas de banano. Los extractos se consideraron fitotóxicos si causaban daño necrótico, comparándolo con compuestos control que no lo producen.

Los principales metabolitos identificados y caracterizados según Stierle *et al.* (1991) en extractos obtenidos de cultivos de *P. fijiensis* son fijiensina, trihidroxitetralona, juglona, hidroxisidona, ácido hidroxicinámico y ácido isoochracínico.

La primera toxina aislada del hongo *P. fijiensis* fue la fijiensina, un compuesto aromático. La mayoría de los metabolitos secundarios aislados de este hongo son lipofílicos como la 2,4,8-trihidroxitetralona, la tetrahidroxitetralona, la juglona, el ácido isoochracínico, el ácido metoxicinámico y la flaviolina (Churchill, 2011; Cruz-Cruz y Peña-Rodríguez, 2011; Hoss *et al.*, 2000; Stierle *et al.*, 1991;), aunque también existe una fracción de toxinas hidrofílicas que aún no han sido bien elucidadas (Cruz-Cruz *et al.*, 2009).

La fitotoxina 2,4,8-trihidroxitetralona se consideraba la más importante del hongo por su alto nivel de bioactividad y cantidad producida en condiciones *in vitro*, ya que se observó que este compuesto se produce 30 veces más rápido en comparación con otros metabolitos evaluados. Sin embargo, la juglona es un compuesto con mayor fitotoxicidad que la 2,4,8-trihidroxitetralona, aunque se aísla en menores concentraciones en los extractos de *P. fijiensis* y no muestra selectividad por el hospedante (Churchill, 2011).

### **1.5.1 Análisis genómicos y transcriptómicos que sugieren biosíntesis de metabolitos secundarios en *P. fijiensis***

Los análisis genómicos proveen recursos que permiten analizar el potencial de un organismo para producir proteínas efectoras o sintetizar metabolitos secundarios del tipo toxinas. Ambas moléculas representan importantes factores de virulencia de los organismos patógenos.

En el portal del Joint Genome Institute (JGI, por sus siglas en inglés), se encuentra depositado el genoma de *P. fijiensis* que es de acceso público desde agosto del 2007. Se secuenció el genoma de la cepa virulenta CIRAD86 y actualmente existen dos versiones del genoma, la antes mencionada de agosto 2007 (v. 1.0) y la de mayo de 2010 (v. 2.0). Esta última versión del genoma (v. 2.0) comprende 74.1 Mb y está organizado en 56 andamios o “scaffolds”. Casi la mitad del genoma está contenido en cinco andamios, cada uno con 5.9 Mb aproximadamente. Este genoma tiene una cobertura de secuenciación de 7.11 x (Arango *et al.*, 2016).

A partir de la secuenciación del genoma de *P. fijiensis* y los posteriores análisis transcriptómicos, con ayuda de herramientas bioinformáticas es posible identificar genes de proteínas efectoras y predecir rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios. Esto permite entender mejor la biología del patógeno.

Empleando estrategias bioinformáticas, Stergiopoulos *et al.*, (2010) identificaron en el genoma de *P. fijiensis* genes homólogos de las proteínas efectoras Avr4 y Ecp2, efectores previamente reportados en *Cladosporium fulvum*. Estos homólogos identificados en el genoma de *P. fijiensis* fueron evaluados por agroinfiltración en plantas transgénicas de *Solanum esculentum* y *Nicotiana benthamiana* que expresan las proteínas cognadas, lo cual demostró que esas proteínas son reconocidas por las proteínas de resistencia respectivas.

Los análisis genómicos y transcriptómicos de *P. fijiensis* pueden ser usados para profundizar en la identificación y predicción de la biosíntesis de metabolitos secundarios de este patógeno. Noar y Daub (2016a), realizaron una búsqueda masiva bioinformática de genes de policétidos sintetas (polyketide syntase o PKSs, por sus siglas en inglés), en el genoma de *P. fijiensis* y en otros 103 Dothideomicetos. Estas PKSs son importantes en la síntesis de compuestos policétidos, metabolitos secundarios producidos por bacterias, hongos y plantas; algunos de ellos son importantes medicamentos como la tetraciclina, daunorubicina, eritromicina, rapamicina y lovastatina, entre otros (Shen, 2003). Una enzima PKS es una proteína multidominio, con una estructura mínima de  $\beta$ -cetoacil sintasa (KS),  $\beta$ -cetoacil transferasa (AT) y dominio de proteína transportadora de acilo (ACP). Las más complejas también pueden contener  $\beta$ -cetoacil reductasa (KR), deshidratasa (DH), enoil reductasa (ER), metiltransferasa y ciclasa (Gaffoor, 2006).

Los policétidos son parte de los factores de patogenicidad en los hongos necrotróficos y hemibiotróficos. En *P. fijiensis* se identificaron los genes PKSs y cada uno los homólogos más cercanos en otros hongos; con esta estrategia se predijeron los compuestos que pudieran producir estos grupos de genes o “clusters” biosintéticos. Noar y Daub (2016), identificaron ocho genes PKS y su posible relación con la biosíntesis de diversos compuestos. Observaron que existe similitud entre una PKS de *P. fijiensis* y la PKS involucrada en la síntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans*.

Noar *et al.* (2019) analizaron un “cluster” génico relacionado con la PKS8-1, predicha en un trabajo anterior (Noar y Daub, 2016), y encontraron que el “cluster” tiene homología con las proteínas involucradas en las rutas de biosíntesis de monodictilfenona y cladofulvina,

producidos por los organismos *Aspergillus nidulans* y *Cladosporium fulvum*, respectivamente.

### **1.5.2 Metabolitos secundarios en conidios de *Pseudocercospora fijiensis***

La producción de metabolitos secundarios durante la fase de esporulación se había considerado de vital importancia en los hongos, pero luego se demostró que muchas cepas fúngicas esporulantes son deficientes en la producción de metabolitos (Calvo *et al.*, 2002; Shimizu y Keller 2001). En cuanto a metabolitos, solo se han identificado y aislado de esporas, en especial conidios, la producción de pigmentos como la melanina (DHN-melanina), un pigmento producto de la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos ( $\beta$ -caroteno). La biosíntesis de melanina contribuye a la supervivencia de las esporas fúngicas al protegerlas de luz ultravioleta (Braga *et al.*, 2015; Dufosse *et al.*, 2014). Cladofulvina es otro pigmento identificado en conidios, este pigmento confiere a las esporas una coloración verde-marrón. Hasta el momento no ha sido posible determinar alguna actividad biológica de este compuesto, aunque es un derivado de antraquinonas, compuestos fenólicos ampliamente utilizados por su potencial biomédico. Recibe este nombre pues ha sido aislado de conidios de *C. fulvum* (Griffiths *et al.*, 2018; Griffiths *et al.*, 2016). Existe abundante información sobre los metabolitos secundarios secretados durante las interacciones necrotróficas o en las etapas necrotróficas (tardías) de las enfermedades vegetales, pero no se han descrito compuestos en la fase temprana de la infección o en las esporas mismas, y pudieran ser importantes para la supervivencia y desarrollo del propágulo.

En nuestro grupo de investigación, Efrén Pech Balam (2013) generó un transcriptoma a partir de conidios en germinación de *P. fijiensis* y recientemente la M. en C. Gemaly Ek Hernandez realizó el ensamblado del transcriptoma y la anotación funcional. Durante el análisis se identificaron algunos transcritos homólogos con genes de otros microorganismos patógenos, que están involucrados en las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios, de los cuales figuran micotoxinas de interés biológico. Ek-Hernández encontró algunos transcritos relacionados con la síntesis de esterigmatocistina (STC), gliotoxina (GLI) y ácido fusárico (AF) (datos no publicados). Por lo anterior se sugiere que *P. fijiensis* es capaz de sintetizar dichas toxinas.

### 1.5.3 Esterigmatocistina

La esterigmatocistina es una micotoxina carcinogénica, producida por diferentes especies de hongos filamentosos ascomicetos del género *Aspergillus*, como *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* y el hongo modelo *A. nidulans* (Klich *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 1996). Cabe resaltar que Rank *et al.* (2011) mencionan que la esterigmatocistina ha sido encontrada en varios géneros fenotípicamente diferentes de *Aspergillus* y filogenéticamente no relacionados, por ejemplo: *Aschersonia*, *Bipolaris*, *Botryotrichum*, *Chaetomium*, *Emericella*, *Eurotium*, *Farrowia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Moelleriella*, *Monocillium* y *Podospora*.

Calvo y Cary (2015) y Ámon *et al.* (2018) relacionan la producción de metabolitos secundarios fúngicos con la protección de sus estructuras reproductivas, y presentan a la esterigmatocistina como parte de la defensa química de *Aspergillus nidulans* contra los depredadores fungívoros, comúnmente insectos.

Esta micotoxina ha sido comúnmente encontrada en maíz, maní y semillas de algodón cuando han sido infectados por miembros del género *Aspergillus* (Feng y Leonard, 1998). Este metabolito es un policétido y se ha establecido que los miembros de la familia de las aflatoxinas (p. ej. Aflatoxina B1, G1 Y M1) también comparten la mayoría de los pasos de la vía de biosíntesis de la esterigmatocistina. La síntesis de esterigmatocistina y de las aflatoxinas, requiere tanto de una PKS como de una sintasa de ácidos grasos (FAS) para formar el primer intermedio estable de la vía (Ámon *et al.*, 2018; Keller y Hohn, 1997).

### 1.5.4 Gliotoxina

La gliotoxina es una micotoxina de tipo epidithiodioxopiperazina (ETP); es producida por varios hongos filamentosos en los que figuran *Aspergillus fumigatus*, miembros del género *Penicillium* y *Trichoderma*; este último es considerado un agente de biocontrol de fitopatógenos. También se reporta en algunos aislados clínicos de *Candida albicans* (Gardiner y Howlett, 2005). Las toxinas de tipo ETP no son factores determinantes de virulencia sobre plantas, sino que son consideradas como moléculas de defensa. *A. fumigatus* es un microorganismo saprófito en el que la gliotoxina juega un papel fundamental que le permite competir con éxito con otros microorganismos por el nicho ecológico (Scharf *et al.*, 2012; Reeves *et al.*, 2004). Bok *et al.* (2006) describen a la gliotoxina como un péptido no ribosomal con propiedades citotóxicas, genotóxicas y

apoptóticas en tejidos pulmonares humanos y que actúa como un factor de virulencia en *A. fumigatus*, infectando pacientes inmunosuprimidos.

### 1.5.5 Ácido fusárico

El ácido fusárico es una micotoxina de *Fusarium fujikuroi* y de otras especies de importancia agronómica del género *Fusarium*, como *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. crookwellense*, *F. sambucinum*, *F. heterosporum*, *F. oxysporum* y *F. solani*. Esta micotoxina es de baja a moderada toxicidad para animales y humanos, pero altamente tóxica para las plantas. El ácido fusárico es un compuesto con actividad fitotóxica produce necrosis, clorosis, inhibición del crecimiento, marchitamiento e inhibición de la germinación de las semillas (Amalfitano *et al.*, 2002; Wakulinski, 1989). El ácido fusárico es responsable de producir un severo marchitamiento vascular en plantas de arroz infectadas por *F. fujikuroi*, y en tomate por *F. oxysporum* (Niehaus *et al.*, 2014).

El ácido fusárico ha sido aislado en banano enfermo de marchitamiento producido por *F. oxysporum*; aislándose de raíz, pseudotallo y hojas de banano infectado conocida como marchitamiento del banano, por lo que se le atribuye la capacidad de producir necrosis *in vitro* (Li *et al.*, 2013). Este compuesto acelera la senescencia de las hojas del banano, pues produce daño significativo en el cloroplasto y la membrana plasmática de las células vegetales (Dong *et al.*, 2014). El ácido fusárico tiene la capacidad de formar quelatos con iones indispensables para las plantas, limitando su disponibilidad. También altera la permeabilidad de las membranas celulares y favorece la generación de especies reactivas de oxígeno. Este metabolito es una micotoxina policétida, pues esencialmente en la biosíntesis de sus precursores interviene una PKS (Ding *et al.*, 2018; Brown *et al.*, 2012).

## JUSTIFICACIÓN

Sigatoka negra es una enfermedad que afecta al banano y es producida por el hongo *P. fijiensis*, y es una de las principales enfermedades que afecta al cultivo de banano en México y en el resto del mundo. El patógeno, durante los primeros ciclos de la infección, se reproduce de forma asexual formando conidióforos que dan lugar a las estructuras infectivas llamadas conidios, los cuales son de suma importancia en el desarrollo y diseminación de la enfermedad a nivel local.

Para controlar a la Sigatoka negra se han desarrollado diferentes métodos de control los cuales han ido perdiendo eficiencia porque el hongo ha desarrollado resistencia a los productos antifúngicos utilizados en su manejo. Por otra parte, el uso de fungicidas representa un costo adicional de producción, contaminación de suelos y mantos freáticos, además de que se consideran un factor de riesgo biológico para los productores y consumidores de bananos.

El estudio molecular de las esporas asexuales es de mucha importancia, pues estas son las estructuras infectivas más importantes del patógeno para la transmisión local, y son estructuras expuestas en el ambiente, lo cual las hace más viables para ser atacadas de manera temprana, es decir, cuando el ciclo infectivo está iniciando.

Algunos ascomicetos como *Aspergillus nidullans*, sintetizan micotoxinas en las estructuras que albergan las esporas sexuales y eso las protege de organismos depredadores. Con base en los resultados de Ek-Hernández, *P. fijiensis* debe producir alguna micotoxina policétida relacionada a esterigmatocistina, dotistromina o aflatoxina. La esterigmatocistina es una micotoxina policétida relacionada con la dotistromina, otra micotoxina policétida producida por *Dothistroma septosporum*, hongo filogenéticamente cercano a *P. fijiensis*; ambas vías de biosíntesis comparten la ruta desde acetato hasta versicolorina A (Schwelm y Bradshaw, 2010).

Hasta el momento no se ha reportado la presencia de gliotoxina o ácido fusárico en miembros de la familia Mycosphaerellaceae, pero el análisis transcriptómico de conidios de *P. fijiensis*, obtenido en nuestro grupo de investigación, sugiere que estos metabolitos secundarios podrían estarse sintetizando. Es importante explorar esta posibilidad, pues estos metabolitos podrían ser factores de patogenicidad o virulencia, y conferir al patógeno la capacidad de competir exitosamente en su hábitat.

Este trabajo de investigación aborda el estudio de genes que participan en la síntesis de metabolitos secundarios que pueden ser importantes en la patogenicidad del hongo o en su defensa ante posibles depredadores y antagonistas.

### **HIPÓTESIS**

*Pseudocercospora fijiensis* tiene el potencial genético para sintetizar las micotoxinas: esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico.

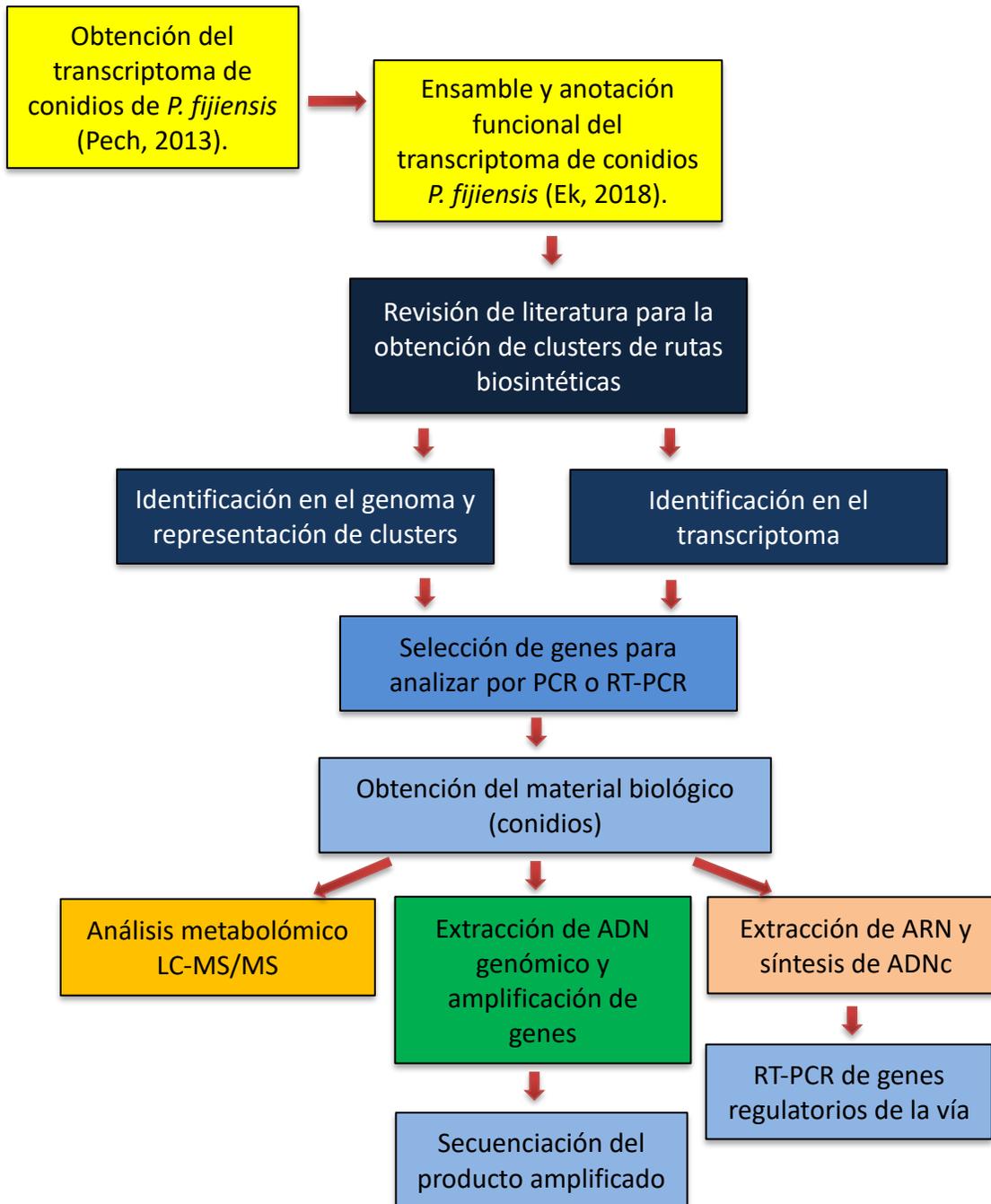
## OBJETIVO GENERAL

Analizar el potencial metabólico de *Pseudocercospora fijiensis*, integrando herramientas genómicas, transcriptómicas y metabolómicas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar en el transcriptoma de conidios de *Pseudocercospora fijiensis* los transcritos involucrados en la ruta de biosíntesis de esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico.
- Identificar en el genoma de *Pseudocercospora fijiensis* los genes involucrados en las rutas de biosíntesis de esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico.
- Representar los “clusters” (agrupamientos) de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico en el genoma de *Pseudocercospora fijiensis*.
- Seleccionar genes de importancia en la ruta biosintética para comprobar por PCR su presencia en el genoma de *P. fijiensis*.
- Analizar mediante RT-PCR la expresión de genes seleccionados, usando ADNc de conidios de *P. fijiensis* en diferentes horas de germinación.
- Fundamentar la biosíntesis de metabolitos secundarios en conidios mediante un análisis metabolómico por LC/MS-MS.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Transcriptoma de conidios de *P. fijiensis*

Se obtuvieron las bibliotecas del transcriptoma de conidios de *P. fijiensis* como producto de una tesis de licenciatura realizada por Efrén Jesús Pech Balan en 2013 en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán bajo la dirección de la Dra. Blondy Beatriz Canto Canche. Las muestras de conidios en germinación para la secuenciación masiva del transcriptoma fueron enviadas a la compañía Research and Testing Laboratories (Lubbock, Texas, USA).

#### 2.2 Ensamble y anotación funcional del transcriptoma

El ensamble de las bibliotecas del transcriptoma y la anotación funcional de los transcritos fue realizado como parte del trabajo de tesis de Maestría de Gemaly Ek Hernández (2019). En la anotación funcional se identificaron algunos transcritos relacionados con las rutas de biosíntesis de esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico. La anotación funcional obtenida en el análisis masivo fue validada para los genes seleccionados en este trabajo, usando como sonda *in silico* (“query”) las secuencias de los transcritos y realizando análisis Blastx en la base de datos no redundantes de proteínas del NCBI y la base no redundante de Swiss-Prot, considerando el porcentaje de identidad y cobertura, para sustentar la predicción funcional.

#### 2.3 Obtención de los clusters de las rutas biosintéticas

Algunos transcritos relacionados con la biosíntesis de esterigmatocistina fueron los primeros en identificarse en el transcriptoma de conidios. Después se identificaron transcritos relacionados a la biosíntesis de la gliotoxina y por último los relacionados con la biosíntesis del ácido fusárico. No se descarta la existencia de rutas de biosíntesis de otros metabolitos secundarios, pero no son considerados dentro de este trabajo. Para identificar los genes que participan en la ruta de biosíntesis de estos metabolitos secundarios, se tomaron como modelo los “clusters” biosintéticos de organismos en los que se conoce la producción del metabolito, la ruta biosintética y las enzimas involucradas en la producción.

---

Los “clusters” de rutas biosintéticas se obtuvieron consultando la base de datos del JGI “Atlas of Biosynthetic Gene Clusters” (JGI IMG/ABC, 2018) (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/abc-public/main.cgi>) y bibliografía relacionada (Ámon *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2018; Niehaus *et al.*, 2014; Scharf *et al.*, 2012; Gardiner y Howlett, 2005 y Keller y Hohn, 1997). Se identificaron las rutas biosintéticas completas a partir de *Aspergillus nidulans* (esterigmatocistina), *Aspergillus fumigatus* (gliotoxina) y *Fusarium fujikuroi* (ácido fusárico), organismos ampliamente estudiados en cuanto a su producción de metabolitos secundarios. Combinando estos recursos fue posible representar de manera gráfica los “clusters” biosintéticos en el genoma de *P. fijiensis*.

### 2.4 Identificación en el genoma

Para identificar a los genes homólogos presentes en *P. fijiensis* y poder construir las rutas biosintéticas, se utilizaron como sonda *in silico* (“query”) las secuencias de los genes biosintéticos de las toxinas de los organismos usados como modelo (*Aspergillus nidulans* para esterigmatocistina, *Aspergillus fumigatus* para gliotoxina y *Fusarium fujikuroi* para ácido fusárico), y se realizaron análisis Blastx en el genoma de *P. fijiensis* reportado en la base de datos MycoCosm del JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/Mycofi2/Mycofi2.home.html>). Se consideraron los “hits” con los porcentajes de identidad  $\geq 30\%$  y cobertura  $\geq 30\%$ .

#### 2.4.1 Análisis sinténico

El programa MultiGeneBlastx (<http://multigeneBlastx.sourceforge.net/>; Medema *et al.*, 2013) fue utilizado para analizar el genoma de *P. fijiensis*, con el objetivo de encontrar la relación sinténica de las rutas estudiadas en *P. fijiensis*, en comparación con las rutas de biosíntesis descritas en los organismos modelo. Para conocer la relación sinténica entre estos grupos de genes, se tomó como sonda el “cluster” de genes de un compuesto en específico y se comparó con el genoma de *P. fijiensis*. En este análisis, se consideraron como genes homólogos aquellos genes con porcentaje de identidad  $\geq 30\%$ .

El software MultiGeneBlastx asigna valores predeterminados considerando un peso por la conservación de la sintenia por cada “hit” resultante. Un valor de corrida de 0.5 le da al número de genes homólogos el doble del peso de la conservación de la sintenia, arrojando los mejores resultados de conservación en la ruta de biosíntesis comparada.

Para darle un mejor sustento, en los análisis se incluyeron los genomas de parientes cercanos al organismo modelo considerado (*Aspergillus nidulans*; esterigmatocistina, *Aspergillus fumigatus*; gliotoxina y *Fusarium fujikuroi*; ácido fusárico) y parientes filogenéticamente cercanos a *P. fijiensis* (*Cercospora beticola*, *Coccidioides immitis*, *Colletotrichum sp.*, *Dothistroma septosporum*, *Podospora anserina*, *Pseudocercospora eumusae*, *Pseudocercospora musae*, *Zymoseptoria tritici*).

### **2.5 Identificación en el transcriptoma**

Se analizó de manera local la lista de los transcritos obtenidos de conidios, los cuales fueron anotados funcionalmente por Ek-Hernández, junto con la descripción de porcentaje de cobertura y porcentaje de identidad con sus genes homólogos. Se consideraron como resultados positivos los transcritos con porcentaje de identidad  $\geq 30\%$  y cobertura  $\geq 30\%$ .

### **2.6 Selección de los genes para análisis de expresión**

A partir de la ruta reconstruida *in silico*, se seleccionaron algunos genes para analizar su expresión. Se siguieron dos criterios: a) se seleccionaron genes que no fueron identificados en el genoma de referencia y/o en el transcriptoma, para confirmar su presencia y/o ausencia en el genoma de la cepa experimental de *P. fijiensis* usada en el presente trabajo, pues existe la posibilidad de que el gen no se identificara en el genoma de referencia debido a la baja profundidad de secuenciación (7x). b) con base en los reportes de regulación metabólica de esas vías en los hongos modelo, se seleccionaron los genes que codifican enzimas limitantes (regulatorias).

Los productos de PCR de los genes amplificados, fueron secuenciados para confirmar su identidad.

Para los genes que sí se encontraron *in silico* en el genoma de referencia y que se seleccionaron por representar pasos regulatorios de las vías, se diseñaron oligonucleótidos específicos. Para ello se usó el software en línea de diseño de oligonucleótidos PrimerQuest Tool, de la página Integrated DNA Technologies (IDT, por sus siglas en inglés) (<https://www.idtdna.com/pages>).

### **2.7 Obtención del material biológico**

Para el análisis transcriptómico se usó la cepa C1233 de *Pseudocercospora fijiensis*, aislada en la zona de Uxmal, Santa Elena, Yucatán, México, por el Dr. Andrew James (Unidad de Biotecnología del CICY). Esta misma cepa C1233 fue utilizada para los estudios moleculares desarrollados a lo largo de la presente investigación.

#### **2.7.1 Obtención de biomasa**

A partir del cultivo de resguardo en medio líquido PDB (Difco, Le Pont de Claix, France), se tomó una muestra de *P. fijiensis* cepa C1233 y se inoculó en matraces de 250 ml con 100 ml de medio líquido PDB y se cultivó con agitación a 110 rpm por 15 días, con fotoperiodo de 12 h, temperatura de 24 °C ( $\pm 2$ ). Después de los 15 días se recuperó la biomasa y se maceró con mortero y pistilo, seguidamente se tomó una alícuota de 3 ml y se depositó en otro matraz conteniendo medio PDB nuevo, esto se realizó para renovar la biomasa y tener micelio “nuevo” antes de la etapa de inducción de la conidiación. Cada etapa de producción de conidios fue antecedida por la producción de biomasa.

#### **2.7.2 Conidiación**

Con una gasa estéril se colectó el micelio y se depositó en el recipiente de un procesador de alimentos conteniendo 50 ml de medio PDB y se trituró por 40 s. Se obtuvo una suspensión micelial con una consistencia semilíquida con fragmentos finos de micelio. Se tomó una alícuota de 2.5 ml de esta suspensión micelial y se extendió sobre una placa de Petri conteniendo 30 ml de medio sólido PDA; se inocularon 200 placas de Petri. Las placas fueron resguardadas en el cuarto de cultivo a 24 °C ( $\pm 2$ ) con luz constante durante dos semanas, para inducir el proceso de conidiación del hongo (Kim *et al.*, 2013; Leyva-Mora *et al.*, 2008 y Takahara *et al.*, 2005).

#### **2.7.3 Cosecha de Conidios**

Las placas Petri que contenían el cultivo esporulante (conidios), fueron abiertas en la campana de flujo laminar horizontal para proceder con la cosecha bajo condiciones asépticas. A cada caja se le agregó 2 ml de grenetina comercial al 1 % y con ayuda de un

pincel de cabello natural y de de media pulgada de calibre, se “barrió” suavemente la superficie del hongo por 30 s, la suspensión resultante se colectó en tubos Falcon de 50 ml. Esto se realizó en todas las placas con el fin de recuperar el mayor número de conidios. La suspensión final colectada de las cajas se filtró con gasas estériles para eliminar los fragmentos de micelio. El filtrado se centrifugó a 4000 rpm por tres minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se aforó el tubo a 15 ml con agua destilada estéril, se homogeneizó la suspensión y se alicuotó 1 ml en placas Petri que contenían 1 ml de Tritón al 0.05 %. Las cajas inoculadas con los conidios se muestrearon a las 0, 8 y 16 h después de la inoculación. Las muestras se almacenaron a -80 °C para su posterior extracción de ADN o ARN.

#### 2.7.4 Conteo de conidios

Para el conteo, 1 ml de la suspensión de conidios diluida 1:10 se aplicó a la cámara Sedgwick-Rafter. Se dejó reposar por cinco minutos, y se realizó el conteo de conidios en microscopio óptico (Nikon Eclipse E200); se realizaron tres conteos independientes por muestra. Para cada conteo, de la cámara Sedgwick-Rafter se tomaron los valores de 15 campos seleccionados de manera aleatoria y los valores se promediaron para calcular el número aproximado conidios, aplicando la siguiente formula:

$$\text{Conidios/ml} = \frac{\Sigma N \times 1000 \text{ mm}^3 \times \text{factor de dilución}}{A \times D \times F}$$

A= Área del campo (mm<sup>2</sup>)

D= Profundidad del campo (mm<sup>2</sup>)

F= Número de campos contados

ΣN= Número de conidios contados

#### 2.7.5 Monitoreo del proceso de germinación de los conidios de *P. fijiensis*

El monitoreo del proceso de germinación de los conidios se realizó depositando 1 ml de la suspensión conidial con 1 ml de Tritón al 0.05 % en una placa de Petri.

Los tiempos del monitoreo fueron 0, 8 y 16 horas, considerándose la hora cero el momento de depositar la suspensión conidial en la placa de Petri con Tritón. En cada tiempo de colecta se tomó una muestra de 20  $\mu$ l para ser observada en el microscopio óptico y se fotografiaron los conidios para posteriormente analizar sus características. En estos mismos tiempos de colecta se tomaron alícuotas de 1 ml y se depositaron en tubos de microcentrífuga de 2 ml y se resguardaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para la posterior extracción de ARN. De igual manera se colectaron alícuotas de 10 ml de cada tiempo de germinación, las cuales fueron usadas para el análisis de LC-MS/MS.

### **2.8 Extracción de ARN de los conidios y síntesis de ADNc**

Se utilizó el reactivo TRIZOL (Invitrogen, California, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó la enzima DNAsa I (Invitrogen, California, USA) para eliminar el DNA de la muestra y el paquete comercial de la enzima SuperScript III (Invitrogen, California, USA) para la síntesis de ADNc; en ambos casos se siguieron las indicaciones del fabricante. El ADNc resultante se utilizó para el análisis de expresión por RT-PCR.

### **2.9 Análisis de expresión por RT-PCR**

En los análisis de expresión se utilizó el ADNc sintetizado a partir de los ARNs de los conidios colectados a las 0, 8 y 16 h de germinación; también se incluyó el ADNc obtenido de una muestra de micelio de 15 días en cultivo en medio líquido. Las reacciones de PCR fueron de 15  $\mu$ l de volumen, utilizando 1  $\mu$ l de ADNc con concentración de 400 ng/ $\mu$ l, 7.5  $\mu$ l de DreamTaq PCR master mix (2X) (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA), 5.3  $\mu$ l de agua ultrapura "RNase free" y 0.6  $\mu$ l de 10  $\mu$ M de oligonucleótidos forward y reverse.

### **2.10 Diseño de oligonucleótidos degenerados**

Para los genes que participan en las rutas de biosíntesis de los metabolitos considerados en este estudio y que no se encontraron *in silico* en el genoma de referencia de *P. fijiensis*, se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de alineamientos de secuencias de los genes ortólogos, incluyendo secuencias de estos genes de hongos filogenéticamente cercanos a *P. fijiensis*. Los alineamientos fueron hechos con el software MEGA7 y el diseño

de los oligonucleótidos se realizó con el software “PrimerQuest Tool” del IDT. Para estandarizar las temperaturas óptimas de amplificación, se realizaron reacciones de PCR punto final con gradientes de temperatura, utilizando ADN genómico como templado.

### **2.11 Purificación de bandas de PCR**

Los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos degenerados fueron purificados del gel de agarosa con el paquete comercial de extracción de ADN QIAquick Gel Extraction (QUIAGENE), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los ADNs purificados fueron cuantificados y clonados en el vector pGEM-T Easy.

### **2.12 Reacción de ligación al vector pGEM-T Easy**

Los productos de PCR purificados fueron ligados al vector linearizado pGEM-T Easy (Promega, Wisconsin, USA), usando la enzima T4 DNA Ligasa (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **2.13 Transformación**

Los vectores recombinantes fueron introducidos en células quimio-competentes de *E. coli* Top 10 mediante choque térmico. Las transformantes se sembraron en medio de cultivo sólido LB, adicionado con el agente de selección (ampicilina), el sustrato cromogénico (X-gal) y el inductor de expresión del gen *lacZ* (IPTG; Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido). Se realizó el escrutinio de las colonias blancas mediante PCR en colonia; los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

### **2.14 Extracción de plásmido y secuenciación**

Las clonas positivas se inocularon en 5 ml de medio líquido LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y se cultivaron en agitación constante a 150 rpm, y 37 °C por 12 h. El plásmido se recuperó mediante miniprep con el paquete comercial de extracción de plásmido “QIAprep Spin Miniprep” (QUIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN recuperado fue cuantificado y ajustado a la concentración requerida para su secuenciación y enviado al laboratorio de servicio LAMBAMA (Instituto Potosino de Investigación Científica y

Tecnológica A.C., IPICYT). Para la secuenciación se usaron oligonucleótidos que se unen a los promotores T7 y SP6 del vector; se usó el secuenciador automatizado 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, USA). Las secuencias fueron analizadas por Blastx en la base de datos del GenBank.

Las secuencias obtenidas fueron usadas para realizar una búsqueda de proteínas homólogas realizando un análisis Blastx en la base de datos del del GenBank del NCBI (<https://Blastx.ncbi.nlm.nih.gov/Blastx.cgi>). Las búsquedas de dominios conservados se realizaron consultando la base de datos de Pfam (<https://pfam.xfam.org/>), la herramienta “*Conservain domain search*” de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) y la base de datos InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) de EMBL-EBI.

### **2.15 Preparación de muestras para análisis metabólico**

Las muestras de conidios colectadas a las 0, 8 y 16 h de germinación se procesaron de acuerdo a las instrucciones recibidas del laboratorio que prestó los servicios de análisis metabólico; los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante, se agregó 1 ml de MeOH al 80 %, y se agitó por vortex durante 1 minuto. Posteriormente las muestras se sonicaron por 30 minutos se liofilizaron y se enviaron al Centro Metabólico de la Universidad de Missouri, Missouri, USA para su análisis. Las muestras se analizaron por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas de Cuadrupolo de Tiempo de Vuelo (LC-MS/MS QTOF por sus siglas en inglés), el cual es un análisis de alta resolución.

---

**CAPÍTULO III****RESULTADOS****3.1 Obtención de la biomasa de *P. fijiensis***

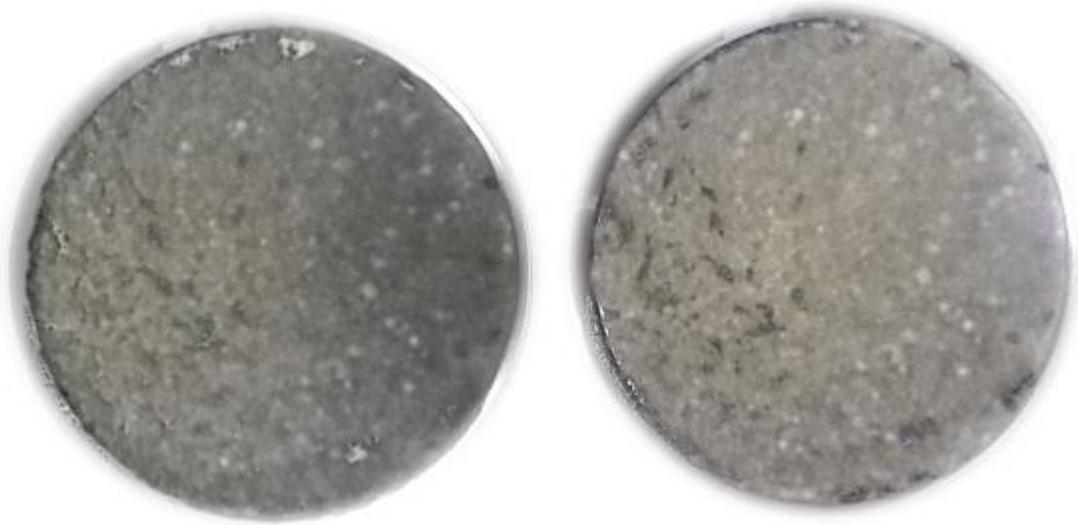
Se inocularon 16 matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio líquido PDB cada uno (Figura 3.1), subcultivando dos veces para renovar la biomasa y obtener micelio nuevo antes de la etapa de inducción a la conidiación.



**Figura 3.1** Matraces de 250 ml con medio PDB e inóculo de *P. fijiensis*.

### 3.1.1 Conidiación

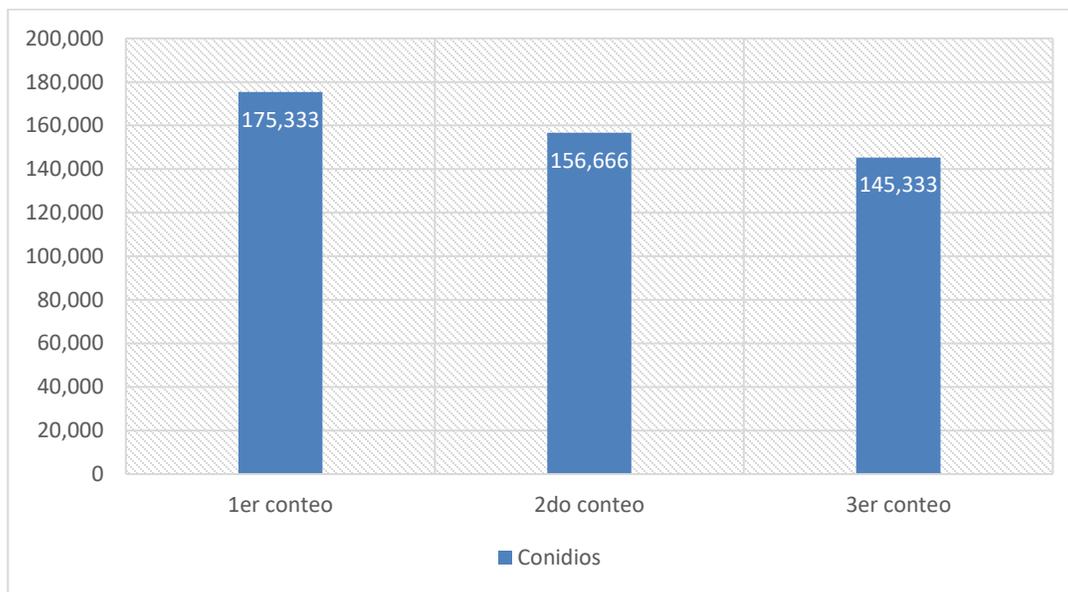
Los conidios de *P. fijiensis* se observaron a los 10 días de cultivo en placas de Petri con PDA. La parte aérea del micelio mostró coloración grisácea con aspecto aterciopelado y con algunos puntos blanquecinos (Figura 3.2). La morfología de la colonia indicó que se estaban produciendo conidios (Pech 2013; Leyva-Mora *et al.*, 2008).



**Figura 3.2** Placas con cultivo de *P. fijiensis* en fase asexual. A los 10 días se puede apreciar el color grisáceo y la textura aterciopelada, señal de que se están desarrollando los conidios en los cultivos *in vitro*.

### 3.1.2 Cosecha y conteo de conidios

En cada cosecha se obtuvieron 50 ml de suspensión conidial. En el primer conteo se obtuvieron 175,333 c/ml (conidios por mililitro), en el segundo conteo se obtuvieron 156,666 c/ml y en el tercer conteo 145,333 c/ml (Figura 3.3). La media de estos datos es 159,110 c/ml ( $1.59 \times 10^5$ ).

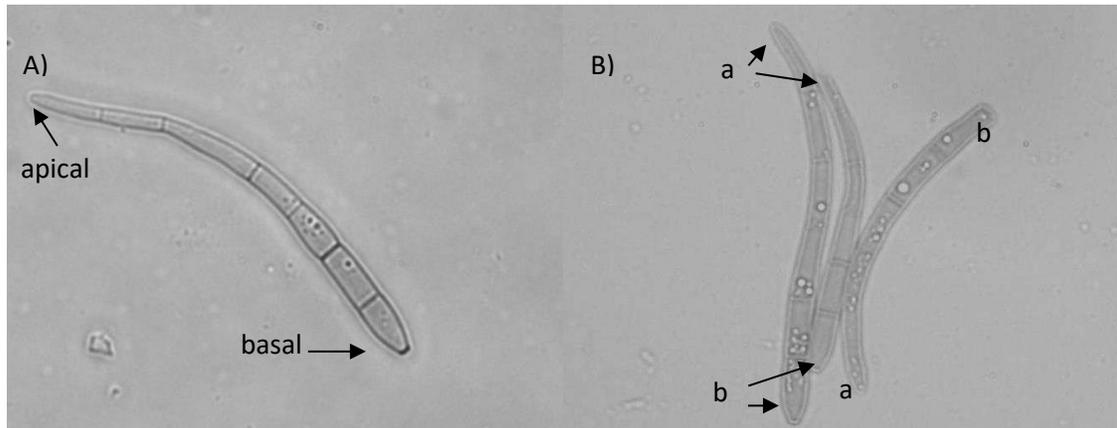


**Figura 3.3** Número de conidios de *P. fijiensis* recuperados en tres repeticiones.

### 3.1.3 Monitoreo de la germinación de conidios de *P. fijiensis*

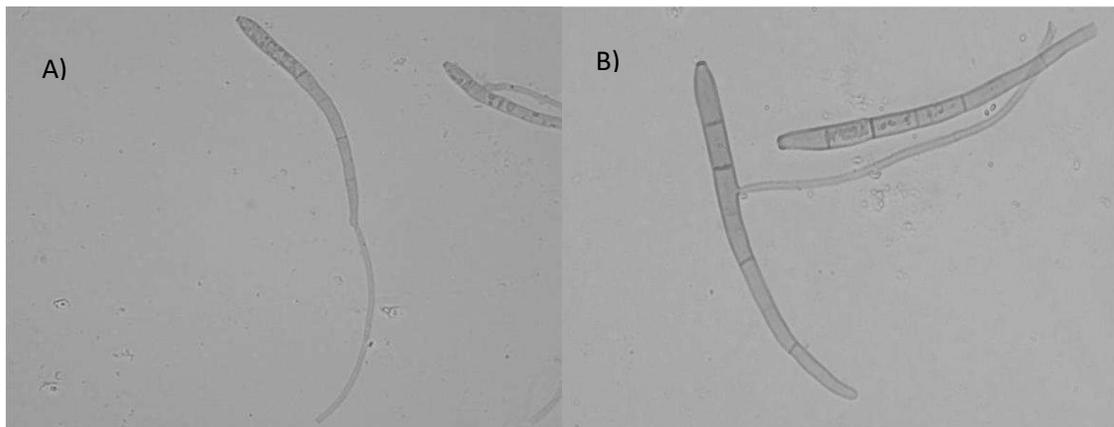
La suspensión conidial obtenida presentó un aspecto turbio. Para inducir la germinación de los conidios, se mezclaron en placas Petri vacías 1 ml de suspensión conidial y 1 ml de Tritón al 0.05 %. Con esto se trató de imitar la condición natural de germinación: la placa actuaría como la superficie hidrofóbica de la hoja y el detergente rompería la tensión superficial del agua.

En la observación de los conidios a las 0 h casi todos los conidios estuvieron sin germinar (Figura 3.4). Se observaron los septos característicos, con aparentes microvesículas internas; el vértice apical y basal permanecen conservados. Se observaron conidios con tamaños entre 360  $\mu\text{m}$  y 490  $\mu\text{m}$  de largo (B) y algunos más largos de hasta 695  $\mu\text{m}$  (A).



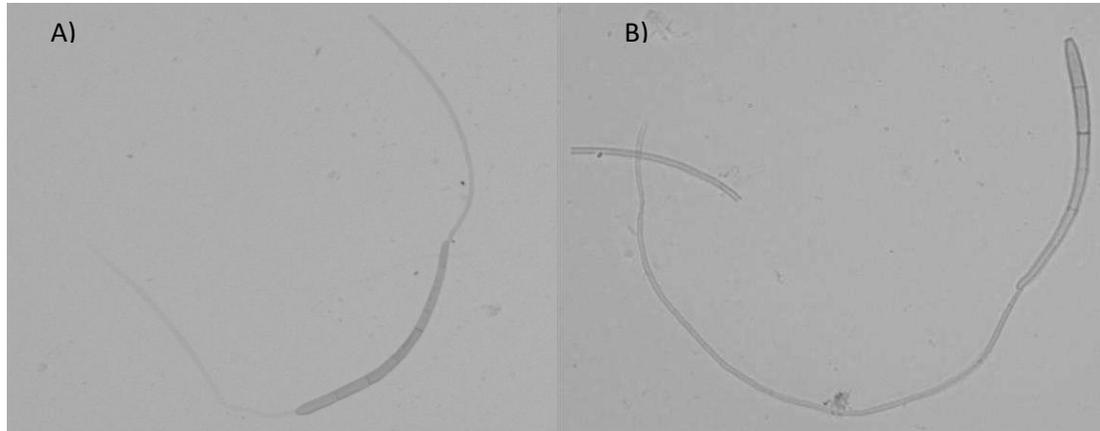
**Figura 3.4** Conidios de *P. fijiensis* sin germinar, colectados a las 0 h de germinación. Las micrografías se realizaron en aumentos de 40x.

Los conidios colectados a las ocho horas mostraron un aumento en tamaño y número de septos; conservaban su morfología, pero presentaban hifas cortas en germinación en los extremos apicales, basales e incluso laterales (Figura 3.5).



**Figura 3.5** Conidios en proceso de germinación. A) Conidio con hifa desarrollándose en extremo apical, B) Conidio con hifa en desarrollo lateral, a partir de un septo. Las micrografías se realizaron en aumentos de 20x.

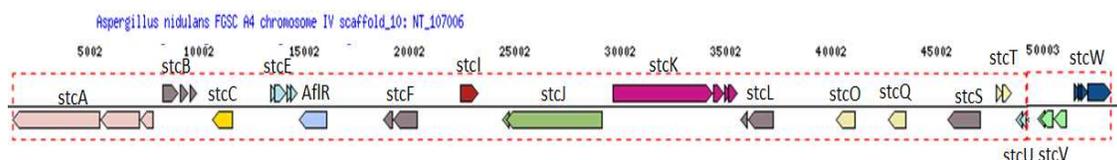
La observación de conidios a las 16 horas de germinación mostró mayor desarrollo de hifas en los extremos apicales y basales (Figura 3.6).



**Figura 3.6** Conidios en proceso de germinación. A) Conidio con desarrollo de hifas en los extremos apicales y basales B) Conidio con hifa en el extremo apical, bastante desarrollada. Las micrografías se realizaron en aumentos de 20x.

### 3.2. Análisis del “cluster” biosintético de esterigmatocistina (Stc)

La biosíntesis de esterigmatocistina se atribuye a la presencia de un “cluster” (agrupamiento) de genes corregulados por un factor de transcripción específico que en el genoma de *Aspergillus nidulans* recibe el nombre de AfIR (Yu *et al.*, 1996). Este “cluster” lo conforman 17 genes llamados StcA, StcB, StcC, StcE, AfIR, StcF, StcI, StcJ, StcK, StcL, StcO, StcQ, StcS, StcT, StcU, StcV, y StcW (Figura 3.7) y codifican proteínas con diferentes dominios enzimáticos. Las principales propiedades enzimáticas de estos genes se reportan en el cuadro 3.1 (Ámon *et al.*, 2018; JGI IMG/ABC, 2018).



**Figura 3.7** Esquematización del grupo de genes putativos de la biosíntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans*. Se puede apreciar la dirección de la transcripción de los genes (Tomado del JGI IMG/ABC *et al.*, 2018).

#### 3.2.1 Identificación de los genes relacionados a las rutas de biosíntesis de Stc

Mediante el análisis Blastx se realizó la búsqueda de los genes de biosíntesis de la esterigmatocistina en el genoma de *P. fijiensis*.

En el cuadro 3.1 se muestran los resultados de la búsqueda de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de esterigmatocistina, en el genoma reportado de *P. fijiensis* y en el transcriptoma de conidios de este hongo. Marcados con una “X” están los genes no encontrados en el genoma o transcriptoma.

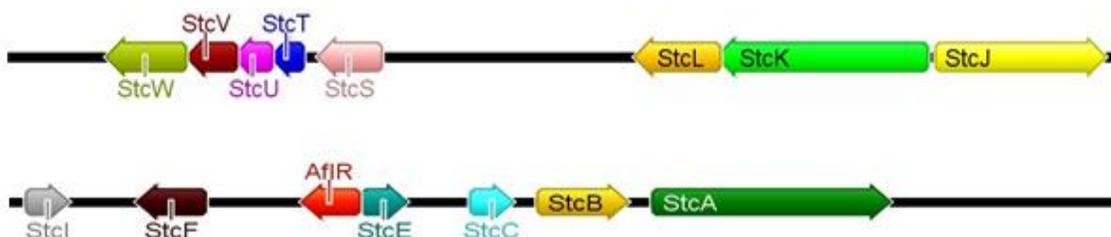
**Cuadro 3.1** Identificación *in silico* de los genes de la ruta de biosíntesis de esterigmatocistina en el genoma repotado y transcriptoma de conidios de *P. fijiensis*.

Genes del modelo <i>A. nidulans</i> STC	Encontrado en genoma de <i>P. fijiensis</i>	% Identidad	% Cobertura	Encontrado en transcriptoma de conidios de <i>P. fijiensis</i>	% Identidad	% Cobertura
StcA PKS	✓	43.6	72.7	✓	41	85
StcB CP450 Monoxigenasa	✓	41.6	71.2	✓	30	50
StcC Oxidasa	✓	38.8	77.5	X		
StcE Ketoreductasa	✓	33.8	72.6	X		
AflR Factor de transcripción	✓	48	38.7	X		
StcF CP450 Monoxigenasa	✓	43.9	73.5	✓	38	53.25
StcI Esterasa	✓	40	66.3	X		
StcJ FASa	✓	49.5	61.6	X		
StcK FASb	✓	43.8	67.5	✓	79	54.84
StcL CP450 Monoxigenasa	✓	41.8	79.8	X		
StcO Desconocido	X			X		
StcQ Desconocido	X			X		
StcS CP450 Monoxigenasa	✓	40.9	70.5	X		
StcT Factor de elongación	✓	51.8	47.5	X		

StcU Ketoreductasa	✓	69.4	95.5	✓	88	59.59
StcV Deshidrogenasa	✓	57.7	85	✓	40	83.81
StcW CP450 Moxigenasa	✓	66.5	88.8	X		

### 3.2.2 “Cluster” biosintético de Stc identificado en *P. fijiensis*

Con base en la ubicación de los genes de biosíntesis de Stc en los “scaffolds” (andamios genómicos) del genoma reportado de *P. fijiensis* y la dirección de la transcripción, se representó el “cluster” hipotético de la biosíntesis de esterigmatocistina (Figura 3.8). Se encontraron 15 de los 17 genes descritos en *A. nidulans*, faltando en *P. fijiensis* los genes StcO y StcQ. Las flechas indican la dirección de la transcripción de los genes.



**Figura 3.8** “Cluster” biosintético de esterigmatocistina en *P. fijiensis*, construido con el programa Geneious (Versión 5.4.7). Se observan 15 genes identificados en el genoma de *P. fijiensis*, faltando los genes StcO y StcQ. Las flechas indican la dirección de la transcripción de los genes.

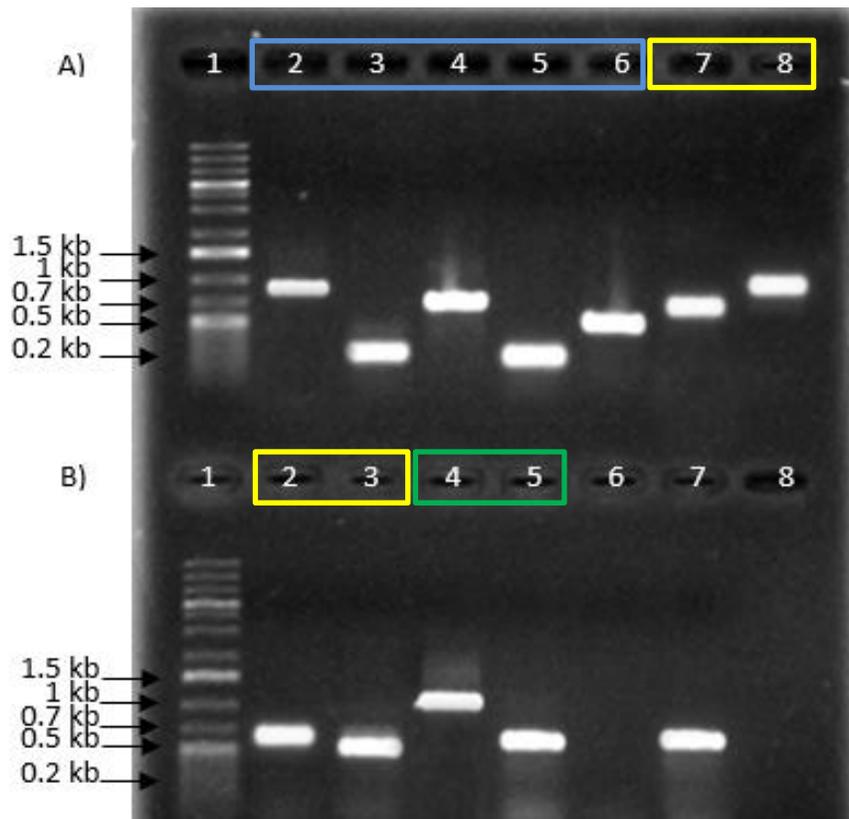
### 3.2.3 Diseño de oligonucleótidos de los genes putativos de la biosíntesis de esterigmatocistina y su amplificación a partir del ADN genómico.

Se seleccionaron cinco de los genes putativos involucrados en la biosíntesis. En el cuadro 3.2 se presentan las secuencias de los oligonucleótidos con sus respectivas características.

**Cuadro 3.2** Oligonucleótidos específicos para amplificar genes de la probable ruta de esterigmatocistina en *P. fijiensis*.

Gen	Secuencia	pb	Tm	%GC	Amplificación en ADN genómico
<b>AfIR</b>	Fw: CCAAAGGCTACACGAGCACGA	21	60	57	869 pb
	Rv: AAGTTGAGCTGCCATCCGTGC	21	60	57	
<b>StcA</b>	Fw: AGGAGCCACTTTGGTGTTT	19	62	47.4	259 pb
	Rv: CTCTCATCTACCTTGCCGAAAT	22	62	45.5	
<b>StcK</b>	Fw: GGACAGACGTTCTCGTACAT	20	61.1	50	230 pb
	Rv: CTGCTCAGCACCTTCAGTA	19	61.1	52.6	
<b>StcU</b>	Fw: GTCAACCTGGTCATCAGTAAGG	22	61.1	50	499 pb
	Rv: CGTCGACTCGATCAAGAAGAAT	22	61.1	45.5	
<b>StcJ</b>	Fw: GCTCGACCTCTGGACCACC	19	62	68.4	719 pb
	Rv: TGGGAATGGCAGCACCGT	18	62	61.1	

Para evaluar por medio de PCR la efectividad de amplificación de los oligonucleótidos, se usó como templado ADN genómico de *P. fijiensis* y los oligonucleótidos específicos. Se analizaron los productos de PCR en gel de agarosa al 1 %. En la Figura 3.9 se muestra el amplicón que coincide o es cercano al tamaño esperado para cada uno de los genes analizados.



**Figura 3.9** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % para visualizar amplificaciones de los genes de las rutas evaluadas usando ADN genómico como templado. Amplificación de los genes *AflR*, *StcA*, *StcJ*, *StcK*, *StcU* (recuadro azul; carriles 2A, 3A, 4A, 5A y 6A, respectivamente), genes *GliI*, *GliP*, *GliT*, *GliZ* (recuadros amarillos; carriles 7A, 8A, 2B y 3B, respectivamente) y *FUB1* y *FUB4* (recuadro verde; carriles 4B y 5B, respectivamente). Marcador molecular (mm) O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (carriles 1A y 1B), reacción de PCR sin templado (control negativo; carril 6B) y gen de actina (control positivo; carril 7B).

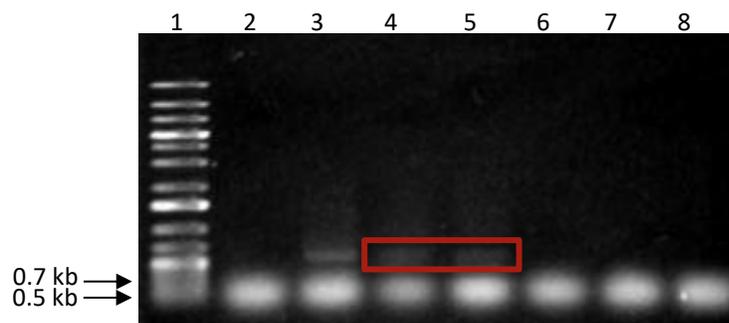
### 3.2.4 Amplificación, clonación y secuenciación de los genes StcO y StcQ

Estos genes no se detectaron en el genoma de *P. fijiensis*, por lo que se usaron oligonucleótidos degenerados para explorar su presencia. Estos pares de oligonucleótidos están marcados con “\_D” al final de su nombre.

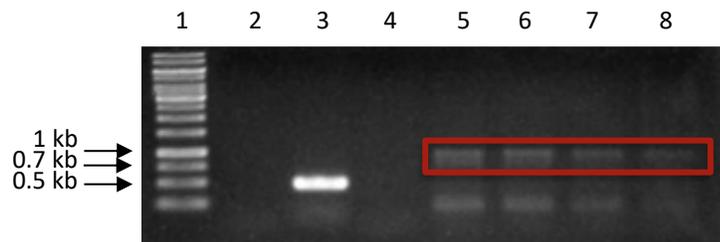
La amplificación se realizó a partir de ADN genómico de *P. fijiensis* y aunque con bajo rendimiento se obtuvieron amplificaciones con el tamaño aproximado al esperado (cuadro 3.3). Las figuras 3.10 y figura 3.11 corresponden a los productos de amplificación por PCRs de StcO y StcQ, respectivamente.

**Cuadro 3.3** Oligonucleótidos degenerados para amplificar genes de la probable ruta de esterigmatocistina en *P. fijiensis*.

Gen	Secuencia	pb	Tm	%GC	Amplificación en ADN genómico
<b>StcO_D</b>	Fw: ATGGYCACATACGCCCTT	18	51	52.8	700 pb
	Rv: CTADRGTTATGGTAACAYHTRGCAGA	25	51	40.7	
<b>StcQ_D</b>	Fw: GTBCTRGGSGCYACWGGCA	19	54.2	66.7	900 pb
	Rv: CCCGCMGCMAGRTCARG	18	54.2	72.2	

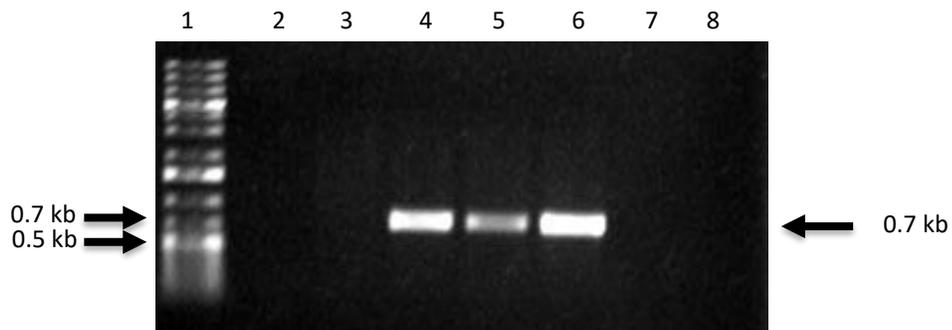


**Figura 3.10** Amplificación a partir del ADN genómico de *P. fijiensis* del gen StcO usando los oligonucleótidos degenerados StcO\_D. Los productos fueron analizados en gel de agarosa al 1 %. Carril 1; marcador molecular O´GeneRuler 1kb plus DNA Lader. Carril 2; control negativo (agua ultrapura usada como sustituto de templado). Carril 3; control positivo (actina). Carriles 4 y 5 corresponden a los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos degenerados.

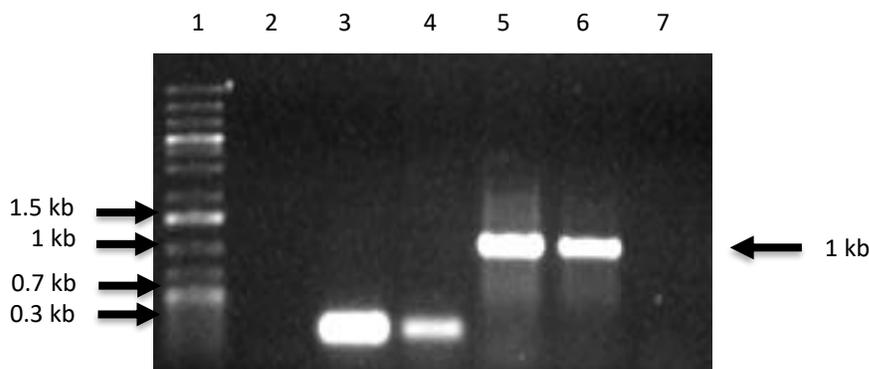


**Figura 3.11** Amplificación a partir del ADN genómico de *P. fijiensis* del gen StcQ usando oligonucleótidos degenerados StcQ\_D. Los productos fueron analizados en gel de agarosa al 1 %. Carril 1; marcador molecular O'GenRuler 1 kb DNA Ladder. Carril 2; control negativo (agua ultrapura usada como sustituto de templado). Carril 3; control positivo (actina). Carriles 5, 6, 7 y 8 corresponden a los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos degenerados.

Las figuras 3.12 y 3.13 muestran los resultados de la confirmación por PCR en colonia de un fragmento de los genes StcO y StcQ en clonas transformadas con estos genes. Se observan los insertos con los tamaños cercanos a lo esperado (700pb y 1000pb, respectivamente).



**Figura 3.12** Productos de PCR en colonia de clonas del gen StcO analizadas en gel de agarosa al 1 %. Carril 1: marcador molecular O'GenRuler 1 kb DNA Ladder. Carril 2: control negativo (agua ultrapura usada como sustituto de templado). Carriles 4, 5 y 6: colonias transformadas.



**Figura 3.13** PCR en colonia de clones del gen StcQ analizadas en gel de agarosa al 1 %. Carril 1: marcador molecular O'GeneRuler 1kb Plus DNA. Carril 2: control negativo (agua ultrapura usada como sustituto de templado). Carriles 3 y 4: amplicón obtenido con oligonucleótidos M13. Carriles 5 y 6: colonias transformadas.

Las figuras 3.14 y 3.15 corresponden al resultado de la secuenciación de los productos amplificados.

La secuencia obtenida estuvo flanqueada por los oligonucleótidos degenerados, lo que indicó que el amplicón se secuenció por completo. La secuencia es 350 pb menor a lo esperado para StcO y no mostró homología con este gen, por lo que se descarta que corresponda a StcO. En la búsqueda de dominios no fue posible asignarle alguno, luego de consultar las bases de datos (Pfam, NCBI e InterProScan). En la búsqueda por Blastx se identificó una proteína homóloga con 100 % de identidad perteneciente a *P. fijiensis* (XP\_007921222.1). En la búsqueda de EST (*Expressed sequence tag* por sus siglas en inglés), se encontró una secuencia homóloga con 96 % de identidad y 7 % de cobertura perteneciente a *Trichoderma atroviride* (GE284535.1).

```

TATGGCCACATACGCCCTTCCGCTCCCATAGCAGACGCAGGTCCTTCTCGAAGCAGT
GTGATCGAACAACACTACCGACATATTCATCTACACAACACTACGCACTCTGTGCTACGCGC
CGCGCCGTACCGTTCTTGGGCAAGTTTGCTTCGACGTGCTGCCCGCCATCATCATGT
CCACGCTCGCCAAGCTACCACTGGACGCCAGTGCTTCACAGCTCCATGTCCACTGCA
CCAGGCCACAGCATGCGACTTCGCGGAGAAGACGCCCAAGATGACACACATATCGTT
GAACGAATCGAACTTACTACCGTGTCCCCGAGTCATGTTTCATGCATCTGCCATGTGTT
ACCATACCCTAG

```

**Figura 3.14** Secuencia del amplicón obtenido con los cebadores StcO\_D. Al inicio, en rojo y subrayado se indica el oligonucleótido forward; al final se observa la secuencia complementaria del oligonucleótido reverse.

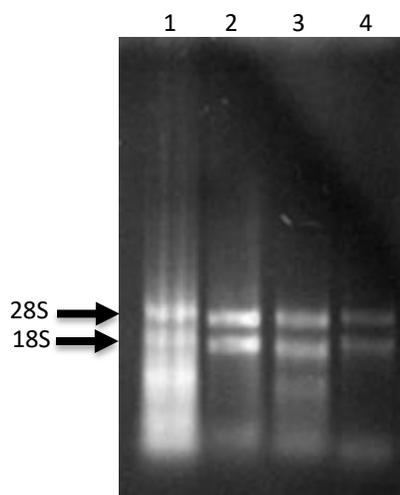
La secuencia obtenida con los oligonucleótidos StcQ\_D (figura 3.22) tampoco mostró homología con el gen esperado; la secuencia presentó 99.19 % de identidad con una proteína hipotética del proteoma deducido de *P. fijiensis* (XP\_007920714.1). A esta secuencia no se le pudo asignar ningún dominio funcional, por lo que no se le puede proponer función. En la búsqueda de EST se encontró una secuencia homóloga con 99.06 % de identidad y 53 % de cobertura perteneciente a *P. fijiensis* (FD696499.1).

```
CCCGCAGCAAGGTCCAGGCATACCTTGGCAGAAGATCCAGGCTACGCCTACCAATAA  
AGGCTCTGATGCCAAGCTTGACATTACGATCGAGAGGAACGAGAACTAAACGAGCT  
TGCCAAGAGGACCGAACTGCCAATCAAGAAATTCACGACTGTTGAGGTGGATGGGT  
CAAGCTCAACCTCGTTGAACGACGGCCTCCACATTTTGATGAAAGCGGAAAGAAGAA  
GTATCCTGTACTTTTCTTCTGTATAATGGTCCTGGATTCCAGCATGTTGACTACAAAT  
TCACTGTTGATTTCCAAGCATACGTCGCAAGCAGCCTAGGGTATATCGTTGTGACGCT  
CGATGGTCTAGGCACTGGATACCAAGGGCGAAAGCAGCGCACCATCGTTCGTGGCA  
ACATTGGCTTTTGGGAAGCGTATTCCAGATCGCGGCCGCAAAGAAGTGGGCTGCAA  
AGAAATACGTCGATGCTGAACGAATGGCGATCTGGGGTTGGAGCTATGGCGGGTTCA  
TGGCACTGAAGACGCTTGAGCAGGACGCTGGTCGGACTTTTAAGTACGGTATGGCAG  
TGGCACCAGTCGTAGATTGGCGGTTCTATGATTCTGTGTACACCGAACGATACATGC  
ATATGCCCAACACAACCAAGCCGGATACGACAACACTTCGGTATCGGACATGCAGG  
CCTTGTGAAAAATGTGCGCTTCTGTTGATGCATGATTTCAGCGATGACAACGTCC  
ATTTCCAGAACACACTGCAATTGCTGGACAACTTGGATCTTGCGGCGGGA
```

**Figura 3.15** Secuencia del amplicón obtenido con los cebadores StcQ\_D. Al inicio, en rojo y subrayado se indica el oligonucleótido reverse: al final se observa la secuencia complementaria del oligonucleótido forward.

### 3.2.5 Análisis de expresión de los genes de la ruta de esterigmatocistina.

Para la evaluación de la expresión se extrajo el ARN de los conidios en germinación. La figura 3.16 muestra la integridad de los ARN obtenidos; se observan las bandas ribosomales (28S y 18S).



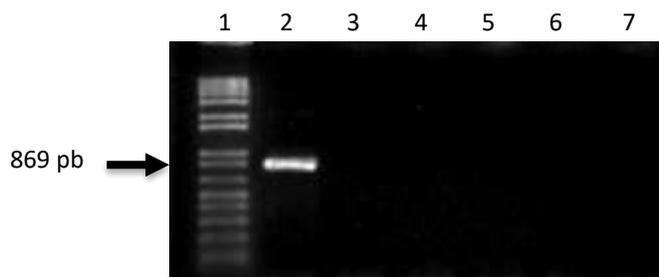
**Figura 3.16** Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para análisis de la integridad del ARN extraído de conidios en germinación. ARN de conidios en germinación a las 0 h (carril 1), ARN de conidios en germinación a las 8 h (carril 2), ARN de conidios en germinación a las 16 h carril 3) y ARN de micelio crecido en medio líquido PDB (Carril 4) como control positivo de la extracción.

El ARN extraído de las muestras fue tratado con 1  $\mu$ l de la enzima DNAsa I (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) para eliminar las trazas de ADN presente en la muestra. La eliminación de ADNg en el ARN tratado se confirmó realizando una prueba de amplificación por PCR del gen de actina; las muestras tratadas con DNAsa I no mostraron amplificación (Figura 3.17a). Después de la síntesis del ADNc se repitió la PCR con oligonucleótidos de actina. Se observó ligeramente más arriba el amplicón obtenido con ADNg, lo cual es esperado por que los oligonucleótidos amplifican un fragmento que contiene un intrón de 50 pb. La observación de una sola banda y más pequeña en los ADNc es consistente con la ausencia de ADNg en las muestras y con la amplificación del producto esperado a partir del ADNc (Figura 3.17b).

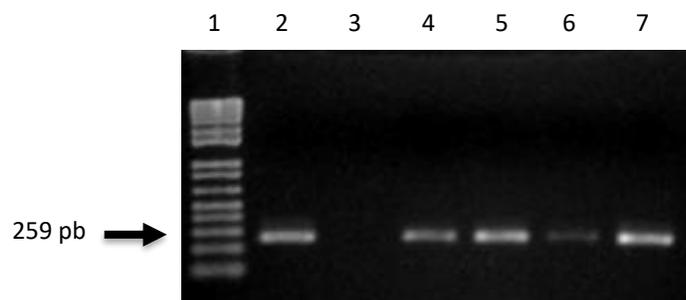


**Figura 3.17** Análisis de la amplificación por PCR del gen de actina a partir de ADNg o ADNc. A) Evaluación mediante PCR de la eliminación del ADNg en los ARN tratados con DNAsa I (en ausencia de enzima RT), B) Prueba de amplificación de un fragmento de actina en los ADNc obtenidos. (+) ADNg como templado, control positivo (---) agua ultrapura, control negativo.

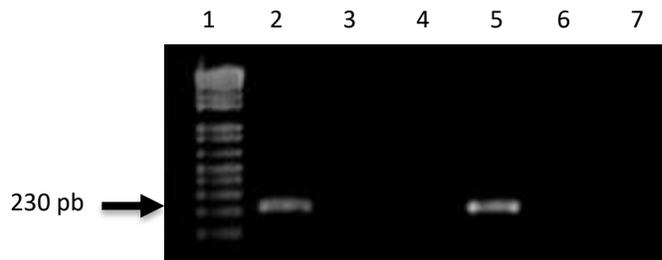
La evaluación de la expresión de los genes *AflR*, *StcA*, *StcK*, *StcU* y *StcJ* de la ruta de esterigmatocistina mostró una máxima expresión del gen *StcA* a las 8 h de conidio en germinación, notándose una ligera señal a las 16 h y estando presente en la muestra de ADNc de micelio (Figura 3.19). Además, la expresión del gen *StcK* solo se observó a las 8 h de germinación, (Figura 3.20). La expresión del gen *StcU* fue considerable a las 0 h y 8 h de germinación y decreció a las 16 h (Figura 3.21), el gen *StcJ* mostró una intensa expresión a las 8 h y se observó una expresión baja en la muestra de micelio evaluada (Figura 3.22).



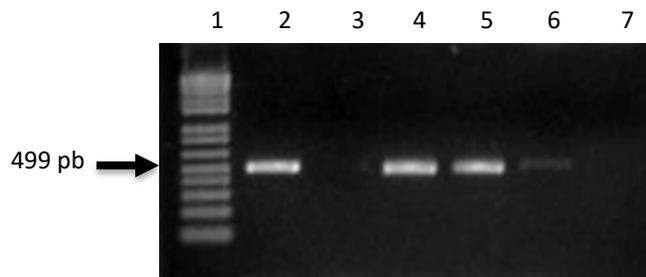
**Figura 3.18** Análisis de expresión por RT-PCR del gen AflR en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder (carril 1). Carriles 4, 5, 6 y 7 corresponden a las 0, 8 y 16 h de conidios en germinación y a la muestra evaluada de micelio. Se observa amplificación del gen con los oligonucleótidos específicos usando ADN genómico (carril 2). Control negativo usando agua libre de nucleasas (carril 3).



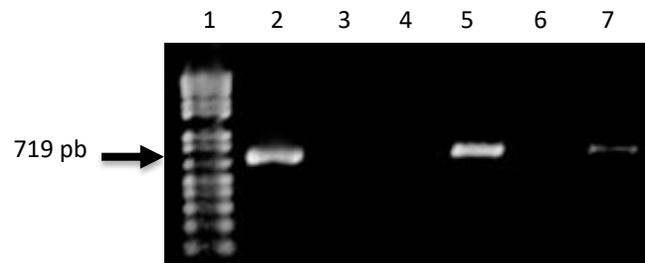
**Figura 3.19** Análisis de expresión por RT-PCR del gen StcA en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder (carril 1). Carriles 4, 5, 6 y 7 corresponden respectivamente a 0, 8 y 16 h de conidios en germinación y la muestra de micelio. Se observa amplificación del gen con los oligonucleótidos específicos usando ADN genómico (carril 2) y señales de amplificación en 0, 8, 16 h y micelio. Control negativo usando agua libre de nucleasas (carril 3).



**Figura 3.20** Análisis de expresión por RT-PCR del gen *StcK* en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder (carril 1). Carriles 4, 5, 6 y 7 corresponden respectivamente a 0, 8 y 16 h de conidios en germinación y a la muestra de micelio. Se observa amplificación del gen con los oligonucleótidos específicos usando ADN genómico (carril 2) y señal de amplificación en 8 h. Control negativo usando agua libre de nucleasas (carril 3).



**Figura 3.21** Análisis de expresión por RT-PCR del gen *StcU* en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder (carril 1). Carriles 4, 5, 6 y 7 corresponden respectivamente a 0, 8 y 16 h de conidios en germinación y a la muestra de micelio. Se observa amplificación del gen con los oligonucleótidos específicos usando ADN genómico (carril 2) y señales de amplificación en 0, 8 y 16 h. Control negativo usando agua libre de nucleasas (carril 3).

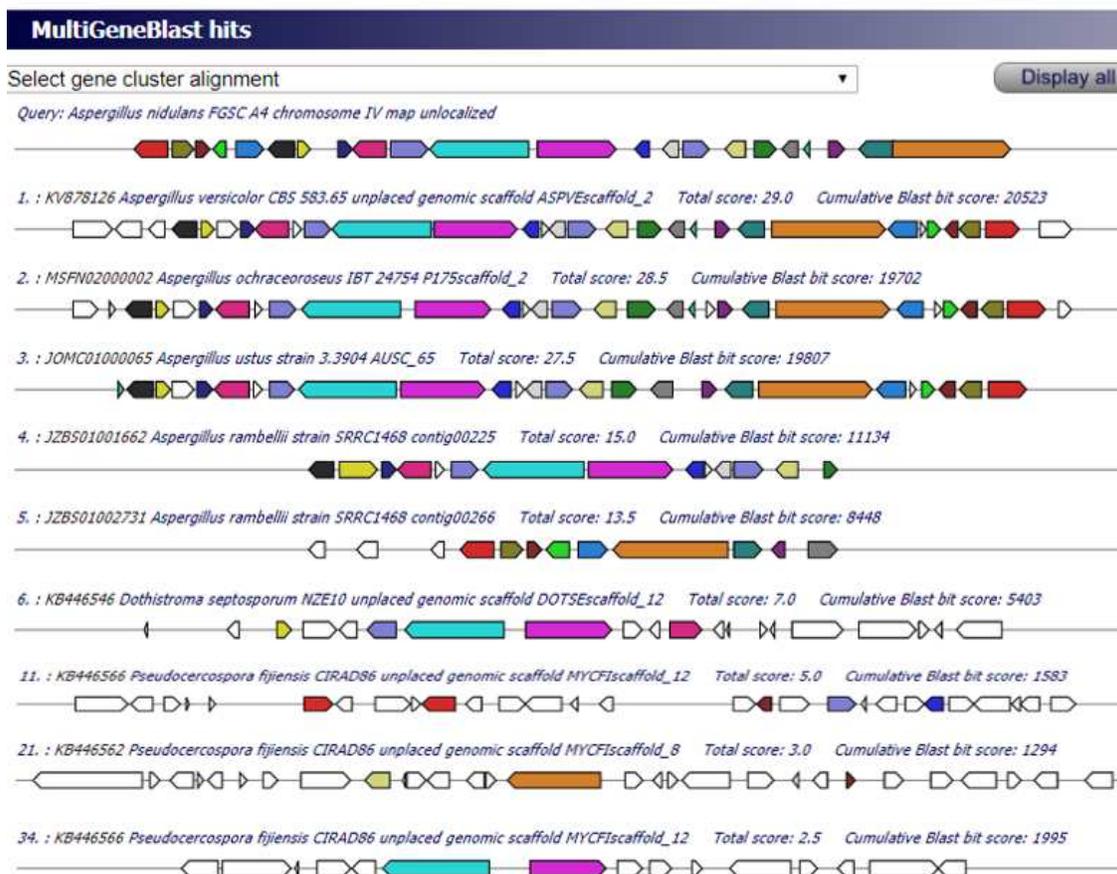


**Figura 3.22** Análisis de expresión por RT-PCR del gen *StcJ* en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios. Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder (carril 1). Carriles 4, 5, 6 y 7; 0, 8, 16 h de conidios en germinación y la muestra de micelio. Se observa amplificación del gen con los oligonucleótidos específicos usando ADN genómico (carril 2) y señales de amplificación en 8 h y micelio. Control negativo usando agua libre de nucleasas (carril 3).

### 3.2.6 Análisis sinténico del “cluster” de esterigmatocistina

Aunque no se corroboró la existencia del gen StcO y StcQ en el genoma de *P. fijiensis*, la expresión de los genes de la ruta evaluados apoya a que el “cluster” biosintético de Stc está presente en *P. fijiensis* y que pudiera ser funcional. Se investigó si el “cluster” de *P. fijiensis* es sinténico con los “clusters” de especies de *Aspergillus*. También se incluyó en el análisis a *Dothistroma septosporum*, un hongo filogenéticamente relacionado y que posee una ruta (biosíntesis del policétido similar a esterigmatocistina, la dotistromina) que comparte pasos biosintéticos con la Stc. El software MultiGeneBlastx calculó los valores para conocer la conservación de la sintenia por cada “hit” resultante. Se observó que algunos de los genes de la vía de biosíntesis de esterigmatocistina coincidieron en ubicación en los mismos “scaffolds” en el genoma de *P. fijiensis*. En la Figura 3.23 se observa que los genes identificados se encuentran distribuidos en dos “scaffolds”; 7 genes en el “scaffold” 12 (“hit” 11 y 34) y 3 genes en el “scaffold” 8 (“hit” 21).

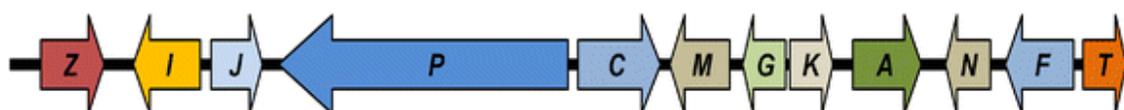
En los “hits” identificados se observó conservación sinténica en los genes StcK (cian) y StcJ (rosa) en el “scaffold” 12 del genoma de *P. fijiensis*, con respecto al ordenamiento de estos genes en *Aspergillus* sp. Estos genes corresponden a una sintasa de ácidos grasos beta y alfa respectivamente, los cuales participan en la biosíntesis de esterigmatocistina y aflatoxinas (Ámon *et al.*, 2018). Corriente arriba del mismo “scaffold” 12 se encuentran los genes StcW (rojo) con una duplicación, StcV (vino) con una inversión, StcL (azul zafiro) y StcI (azul celeste), estos dos últimos conservan su orientación, pero todos están separados por proteínas hipotéticas, lo que indicó eventos de inserción y reordenamiento. En el “scaffold” 8 se observa una proteína hipotética que forma parte del “cluster” y el gen StcA que codifica para una PKS, esencial para la biosíntesis de la esterigmatocistina (Georgianna y Payne, 2009). De los genomas comparados que son cercanos al hongo modelo *Aspergillus nidulans*, se identificaron los 17 genes homólogos que forman el “cluster” biosintético de esterigmatocistina, en los hongos *A. versicolor*, *A. ochraceus* y *A. ustus* (“hit” 1, 2 y 3 respectivamente). En lo que respecta a los hongos filogenéticamente cercanos a *P. fijiensis*, solamente se identificaron cinco genes homólogos en el “scaffold” 12 de *Dothistroma septosporum* (“hit” 6).



**Figura 3.23** Análisis sintético para el “cluster” biosintético de la esterigmatocistina de *P. fijiensis* y otros hongos. Las direcciones de las flechas indican la dirección de la transcripción y los colores la relación de homología entre genes de los genomas evaluados.

### 3.3. Análisis del “cluster” biosintético de gliotoxina (Gli)

Los genes que forman parte del “cluster” biosintético de la gliotoxina en *A. fumigatus* son 12 (Cuadro 4): GliZ, GliI, GliJ, GliP, GliC, GliM, GliG, GliK, GliA, GliN, GliF y GliT (Figura 3.24). Estos genes son corregulados por el producto del gen GliZ, un “Zinc finger” con actividad regulatoria transcripcional (JGI IMG/ABC, 2018; Scharf *et al.*, 2012; Gardiner y Howlett, 2005).



**Figura 3.24** Esquemización del grupo de genes putativos de la biosíntesis de gliotoxina en *A. fumigatus*. Se puede apreciar la dirección de la transcripción de los genes (Tomado de Scharf *et al.*, 2012).

#### 3.3.1 Identificación de los genes relacionados a las rutas de biosíntesis de Gli

El cuadro 3.4 presenta la evidencia genética encontrada *in silico* en *P. fijiensis*.

**Cuadro 3.4** Genes de la ruta de biosíntesis de gliotoxina identificados *in silico* en el genoma de referencia de *P. fijiensis* y en el transcriptoma de conidios de este hongo.

Genes del modelo <i>A. fumigatus</i> Gliotoxina	Encontrado en genoma de <i>P. fijiensis</i>	% Identidad	% Cobertura	Encontrado en transcriptoma de conidios de <i>P. fijiensis</i>	% Identidad	% Cobertura
GliZ Regulador transcripcional	✓	55	10.1	X		
GliI Aminotransferasa	✓	36.7	59.5	X		
GliJ Dipeptidasa	✓	49.6	59.1	X		
GliP Péptido sintetasa	✓	39.7	38.4	✓	39	41
GliC CP450 monooxigenasa	✓	31.1	25.2	X		
GliM O-metiltransferasa	X			X		
GliG Glutation s-transferasa	✓	32.7	68.1	X		
GliK Proteína hipotética	✓	37.3	62	X		

GliA Proteína transportadora	✓	42.9	70.5	✓	48.78	90
GliN Metiltransferasa	✓	37.4	29.4	X		
GliF CP450 Monoxigenasa	✓	30	85	X		
GliT Tiorredoxina reductasa	✓	50.4	28.6	✓	53	96

### 3.3.2 “Cluster” biosintético de Gli identificado en *P. fijiensis*

Siguiendo la estrategia anteriormente descrita, se representó el “cluster” hipotético de la biosíntesis de gliotoxina en *P. fijiensis* (Figura 3.25). Se encontraron 11 de los 12 genes descritos en *A. fumigatus*, faltando el gen GliM.



**Figura 3.25** “Cluster” biosintético de gliotoxina construido con el programa Geneious (Versión 5.4.7). Se observan 11 genes identificados en el genoma de *P. fijiensis*, faltando el gen GliM. Las flechas indican la dirección de la transcripción del gen.

### 3.3.3 Diseño de oligonucleótidos de genes putativos de la biosíntesis de gliotoxina y amplificación en ADN genómico.

Se seleccionaron cuatro de los genes putativos involucrados en la biosíntesis. En el cuadro 3.5 se encuentran las secuencias de los oligonucleótidos con sus respectivas características.

**Cuadro 3.5** Oligonucleótidos específicos para amplificar genes de la probable ruta de gliotoxina en *P. fijiensis*.

Gen	Secuencia	pb	Tm	%GC	Amplicón en ADN genómico
<b>GliZ</b>	Fw: AAGACTCTCGAGCGCGTC	18	62	61.1	488 pb
	Rv: GAGATATCCGAGGGCTCCG	19	62	63.2	
<b>GliI</b>	Fw: GCCGCTCTACACCGGCTT	18	62	66.7	763 pb
	Rv: CATCGCAATCCACACGCCG	19	62	63.2	
<b>GliT</b>	Fw: GATCAAGCGCTCGGTATTCT	20	62	50	650 pb
	Rv: GTGACATCGCTAGGCTCATT	20	62	50	
<b>GliP</b>	Fw: GGATGGTAGGTGGTGGTTATG	21	62	52.3	765 pb
	Rv: GTCCCAGCCATTCAGGATATT	21	62	47.6	

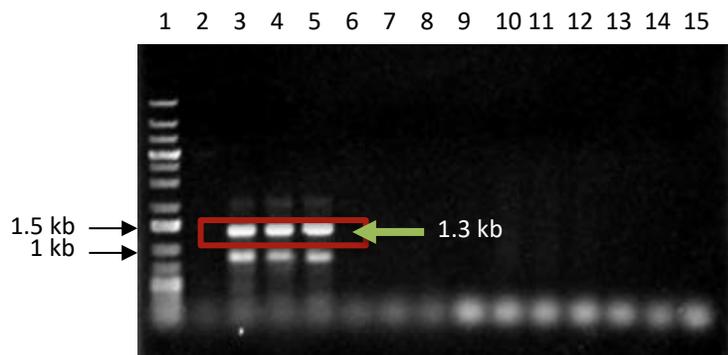
Estos oligonucleótidos fueron probados usando ADN genómico (figura 3.9) y los resultados de las Tm's óptimas fueron usados para los análisis de expresión por RT-PCR

### 3.3.4 Amplificación, clonación y secuenciación del gen GliM

Se realizaron PCR's en gradiente usando oligonucleótidos degenerados (cuadro 3.6) para el gen GliM, usando ADN genómico de *P. fijiensis*. Se observaron varios amplicones con el tamaño aproximado a lo esperado (Figura 3.26).

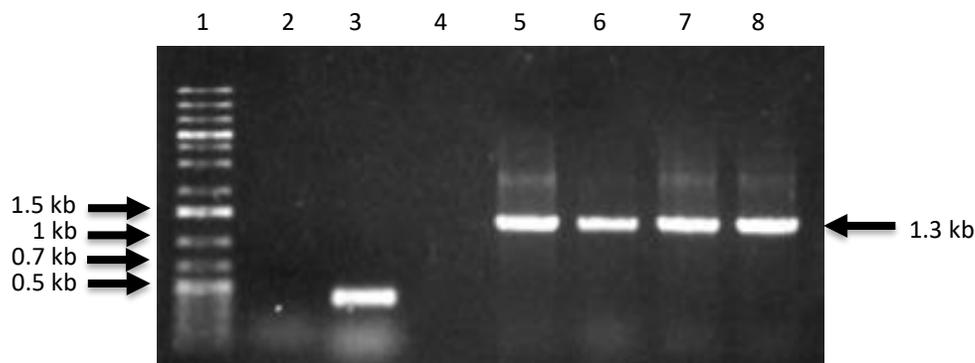
**Cuadro 3.6** Oligonucleótidos degenerados para amplificar genes de la probable ruta de gliotoxina en *P. fijiensis*.

Gen	Secuencia	pb	Tm	%GC	Amplicón en ADN genómico
<b>GliM_D</b>	Fw: ATGGCGCCCGGTCTRCTA	18	58	66	1,320 pb
	Rv: TYACATAGGCCGAAAGTCGATGATACA	27	58	44	



**Figura 3.26** Amplificación a partir del ADN genómico de *P. fijiensis* de gen GliM, usando los oligonucleótidos degenerados StcO\_D. Los productos fueron analizados en gel de agarosa al 1 %. Carril 1; marcador molecular O'GeneRuler 1kb plus DNA Lader. Carril 2; control negativo (agua ultrapura usada como sustituto de templado). Carriles 3, 4 y 5 corresponden a los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos degenerados.

En la PCR en colonia se confirmó la presencia del inserto de interés con el tamaño esperado de 1.3 kb (figura 3.27).



**Figura 3.27** PCR en colonia de clonas del gen GliM analizadas en gel de agarosa al 1 %. Carril 1: marcador molecular O'GenRuler 1 kb DNA Ladder. Carril 2: control negativo (agua ultrapura usada como sustituto de templado). Carril 3: amplicón obtenido con oligonucleótidos M13. Carriles 5, 6, 7 y 8; colonias transformadas.

La secuencia obtenida (figura 3.28) es 89.18 % homóloga de una proteína hipotética de *P. fijiensis* (XP\_007922022.1). No se confirmó que fuese GliM y la búsqueda de dominios conservados en Pfam, InterProScan y GenBank fue negativa, por lo que no fue posible asignarle función al producto obtenido. Es importante observar que el producto secuenciado

fue de más 1000 pb, por lo que su falta de homología con genes conocidos no es por ser una secuencia pequeña, sino que se sugiere que corresponde a un gen no identificado previamente, aunque no se puede descartar que corresponda a una región no codificante. En la búsqueda de EST se encontró una secuencia homóloga con 95.83 % de identidad y 2 % de cobertura perteneciente a *P. fijiensis* (FD686327.1).

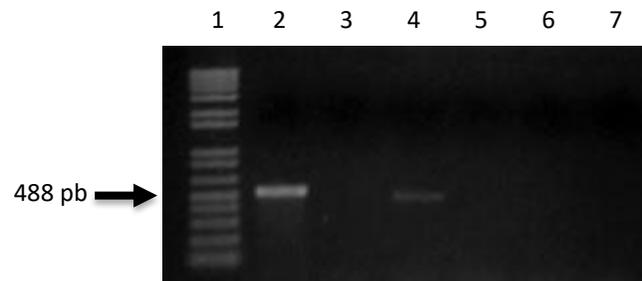
```
ATGGCGCCCGGTCTGCTACACCGCCTATGGCTTCCTCGCTAGCTATATCTCGTCCGC
CACCCGTATTGTCGTACCAAGCCGAAACCAAGGCCTTCTCCGGCATCTGCCTCCG
TCATTTGACTCGTCTCGACAAACTCGAATTCCTGTTGGTGTCTGGAGTAGCATTATC
GGCTATGTTCGTATTAGAGACGCTAGCATTGTCAAGACTCTGATCGTTAAGAGGGGC
GTAGACATCTGGAAGAGGCATGAACTGGATTGAGTCGGGGCGCTGTCGCTCATATA
GCCAGGCCGAGGAGAGGGAGAATAGCGGCGTGGAGTCTGTGACTTCGGAAGTGCT
GTGAGATAATTTAGGGCGGTTGGTGAACACGTCGTTATCGTATGTCGCACTCGGT
CTCTCTGCTAGCGGCGAGGGTGAGTATACAGGAGCAGTAGGGCAGCGCCGCCGATG
AGTATGCCGCTTACTATGCTAGACGGCAAGACAACCTACATGGTTAGTCTTGTAGTAA
CGAATGGTGGAGGCGAGGAGGTACGTCCTGAGTAAGAGCGTGAAGTAAAGGACAAA
ATCATTTCGCTTCAAACAAATGCAGTTATACAGCGGTGGAAGAAGGGGAAGAAGAAG
AAGAGGGAGAAGAATCGAACCAAGAGCAGATCGAGATATGAAAATACCAATGAGC
AAAATTAGGCATAAAGAATAAGCTCTCAATGCAGCGATCGCATAATAGACTAAAGTAG
CTGATCCAGTATCGCCTCACGAACACGATCGTCCTATCCATCCTGTCGCTGGACTTCT
CTGAAAATCCCCCCCCCTGCATCATTAAACGGTTTCTTAGCACGAGCTCGTCCCAAT
CCGATCCTTGCTGCGCAGATGTGATATCCTTTCCATCTTGCGTCTTACGGCACCATG
CCAAGATCAAGTCAACTGCGGACTTTCTCTTATACCATAGAATTGGTGGGCGAGAGTT
TCCGAATTGAATCGAACCAGACGCGTTTATGTCGCTCGCAGCCAGCCTGCTATCGCG
TCGAGCCCATCAAGCTTCTCTGCGACCGTCCTGCTCTAGCTGGAGAGGGCCCGATG
ATTACCTTAAATTG
```

**Figura 3.28** Secuencia del amplicón obtenido con los cebadores GliM\_D. Al inicio, en rojo y subrayado se indica el oligonucleótido forward; la secuenciación no permitió llegar hasta la secuencia del oligonucleótido reverse, pero se logró secuenciar 1099 nt del amplicón.

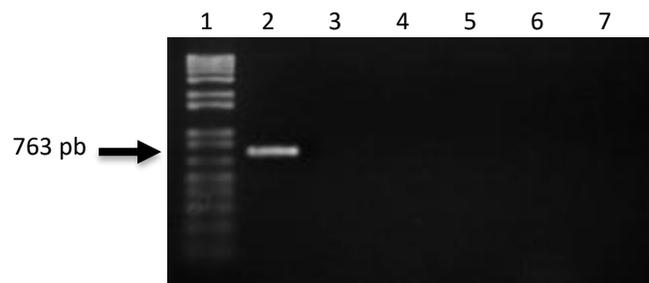
### 3.3.5 Análisis de expresión de genes putativos de la biosíntesis de gliotoxina

Se seleccionaron cuatro de los genes putativos involucrados en la biosíntesis para analizar su expresión. En el cuadro 5 se encuentran las secuencias de los oligonucleótidos con sus respectivas características.

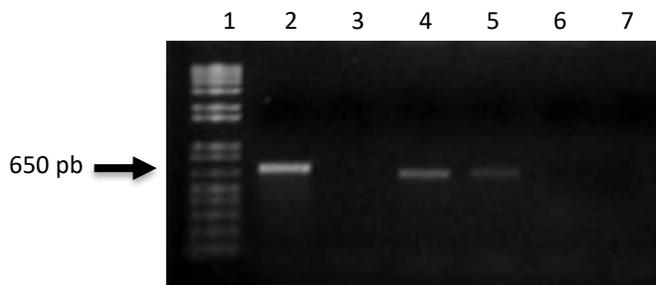
Se observó la expresión del gen GliZ a las 0 h de germinación (Figura 3.29). También se observó en ese momento la expresión del gen GliT y éste continuó expresándose a las 8 h de germinación, pero menos a cero horas (figura 3.31).



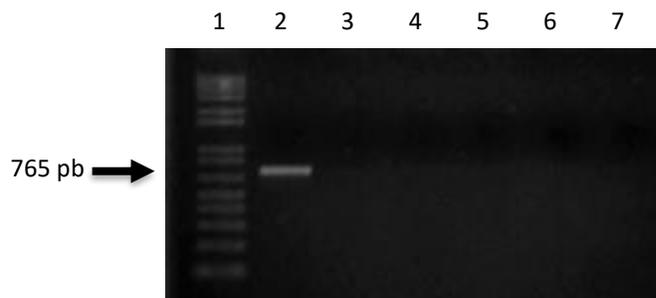
**Figura 3.29** Análisis de expresión por RT-PCR del gen *GliZ* en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios. Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (carril 1). Carriles 4, 5, 6 y 7 corresponden respectivamente a 0, 8 y 16 h de conidios en germinación y la muestra de micelio. Se observa amplificación del gen con los oligonucleótidos específicos usando ADN genómico (carril 2) y señal de amplificación en 0 h (carril 4). Control negativo usando agua libre de nucleasas (carril 3).



**Figura 3.30** Análisis de expresión por RT-PCR del gen *GliI* en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios. Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (carril 1). Carriles 4, 5, 6 y 7 corresponden respectivamente a 0, 8 y 16 h de conidios en germinación y la muestra de micelio. Solamente se observa amplificación del gen con los oligonucleótidos específicos usando ADN genómico (carril 2). Control negativo usando agua libre de nucleasas (carril 3).



**Figura 3.31** Análisis de expresión por RT-PCR del gen GliT en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios. Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (carril 1). Carriles 4, 5, 6 y 7 corresponden respectivamente a 0, 8 y 16 h de conidios en germinación y a la muestra de micelio. Se observa amplificación del gen con los oligonucleótidos específicos usando ADN genómico (carril 2) y señales de amplificación en 0 y 8 h (carriles 4 y 5). Control negativo usando agua libre de nucleasas (carril 3).

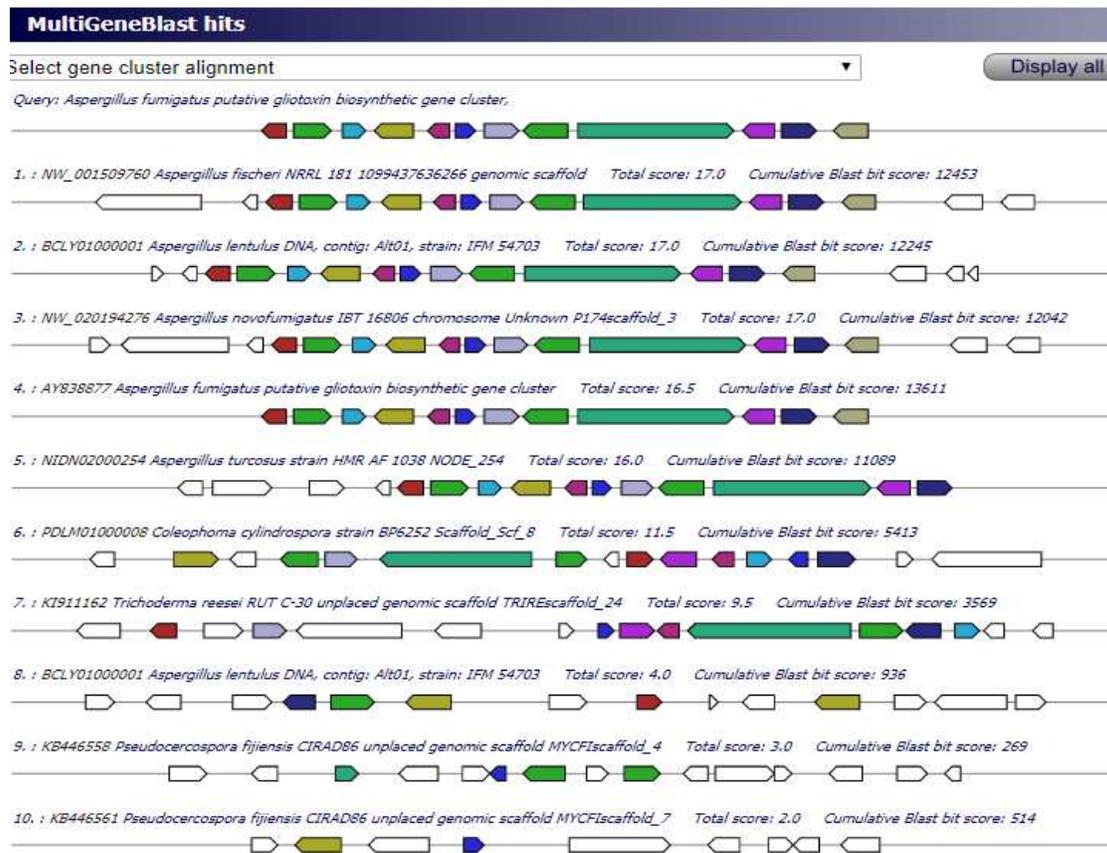


**Figura 3.32.** Análisis de expresión por RT-PCR del gen GliP en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios. Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (carril 1). Carriles 4, 5, 6 y 7 corresponden respectivamente a 0, 8 y 16 h de conidios en germinación y la muestra de micelio. Solamente se observa amplificación del gen con los oligonucleótidos específicos usando ADN genómico (carril 2). Control negativo usando agua libre de nucleasas (carril 3).

### 3.3.6 Análisis sinténico del “cluster” de gliotoxina

La figura 3.33 muestra la relación sinténica del “cluster” de biosíntesis de gliotoxina de *P. fijiensis* con otros hongos. Se observaron algunos de los genes de la vía de biosíntesis, coincidiendo en dos “scaffolds”. En el “scaffold” 4 se observaron 4 genes homólogos de la ruta (“hit” 9), en el “scaffold” 7 se observaron 2 genes homólogos (“hit” 10). Se observa la existencia de sintenia entre los genes GliP (turquesa), GliG (azul celeste), GliF (verde, duplicado) en el “scaffold” 7 de *P. fijiensis*, codificando una péptido sintetasa, una glutatión S-transferasa y una monooxigenasa respectivamente, esenciales en la biosíntesis de gliotoxina (Gardiner and Howlett, 2005). En el “scaffold” 7 de *P. fijiensis* se observa también sintenia entre el gen GliA (beige) y GliG (azul celeste).

En los organismos emparentados filogenéticamente con *A. fumigatus*; *A. fischeri*, *A. lentulus* y *A. novofumigatus*, se encontraron los 12 genes homólogos que intervienen en la biosíntesis de gliotoxina (“hit” 1, 2 y 3, respectivamente). En los organismos filogenéticamente cercanos a *P. fijiensis* no se encontraron genes homólogos, por lo tanto, no existe relación sinténica del “cluster” con estos hongos emparentados.



**Figura 3.33** Análisis sinténico para el “cluster” biosintético de la gliotoxina de *P. fijiensis* y otros hongos. Las direcciones de las flechas indican la dirección de la transcripción y los colores la relación de homología entre genes de los genomas evaluados.

### 3.4 Análisis del “cluster” biosintético de ácido fusárico (AF)

Niehaus *et al.* (2014) reportaron que la biosíntesis del ácido fusárico es regulada por un gen central, el gen FUB1 que codifica una PKS y corregula cuatro genes cercanos que forman parte de la ruta; FUB2, FUB3, FUB4 Y FUB5 (Figura 3.34).



**Figura 3.34** Esquematación del grupo de genes putativos de la biosíntesis de ácido fusárico en *Fusarium fujikuroi*. Se puede apreciar la dirección de la transcripción de los genes (Tomado de Niehaus *et al.*, 2014).

#### 3.4.1 Identificación de los genes relacionados a la ruta de biosíntesis de ácido fusárico

En el cuadro 3.7 se presentan los resultados de la búsqueda en el genoma de referencia de *P. fijiensis* y en el transcriptoma de conidios de este fitopatógeno de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis del ácido fusárico.

**Cuadro 3.7** Genes de la ruta de biosíntesis del ácido fusárico identificados *in silico* en el genoma de referencia de *P. fijiensis* y en el transcriptoma de conidios de este hongo.

Genes del modelo <i>A. nidulans</i> Ácido fusárico	Encontrado en genoma de <i>P. fijiensis</i>	% Identidad	% Cobertura	Encontrado en transcriptoma de conidios de <i>P. fijiensis</i>	% Identidad	% Cobertura
FUB1 PKS	✓	43.3	62.4	X		
FUB2 Proteína hipotética	✓	39	71.3	X		
FUB3 Aspartato kinasa	✓	55.8	68.6	✓	40	32
FUB4 Serina Hidrolasa	✓	45.4	57.8	X		
FUB5 Homoserina O-aciltransferasa	✓	65.7	67.5	✓	52	90

### 3.4.2 “Cluster” biosintético de AF identificado en *P. fijiensis*

La figura 3.35 representa el “cluster” hipotético de la biosíntesis de ácido fusárico en *P. fijiensis*. Se identificaron los cinco genes de la ruta, indicando que está completa.



**Figura 3.35** “Cluster” biosintético de ácido fusárico, construido con el programa Geneious (Versión 5.4.7). Se observan los cinco genes identificados en el genoma de *P. fijiensis*. Las flechas indican la dirección de la transcripción del gen.

### 3.4.3 Análisis de expresión de genes putativos de la biosíntesis de AF

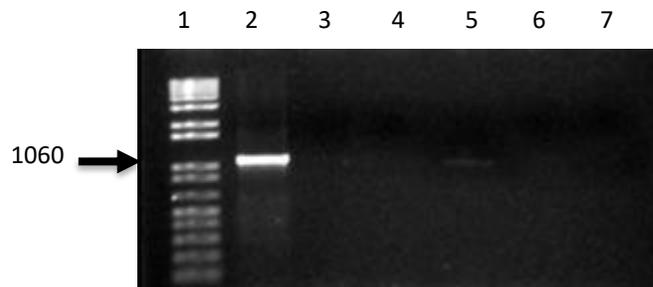
Se seleccionaron dos de los genes putativos involucrados en la biosíntesis de ácido fusárico. En el cuadro 3.8 se encuentran las secuencias de los oligonucleótidos que se diseñaron para analizar su expresión.

**Cuadro 3.8.** Oligonucleótidos específicos para amplificar genes de la probable ruta de ácido fusárico en *P. fijiensis*.

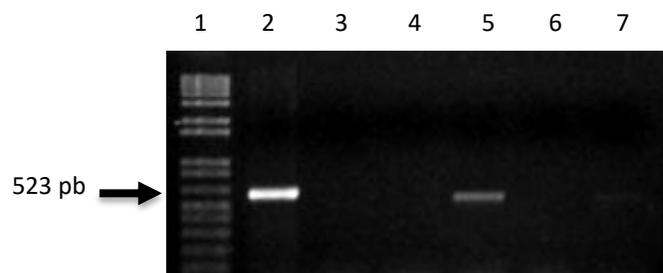
Gen	Secuencia	pb	Tm	%GC	Amplificación en ADN genómico
<b>FUB1</b>	Fw: GCTTTGGCTATGGAGGTGCCA	21	61	57.1	1,060 pb
	R: TGCGGAGAGTGGTAGGCAGT	20	61	60	
<b>FUB4</b>	Fw: TCCTATGCCTCCACGGACAAG	21	62	57.1	523 pb
	Rv: CCAGAGTGGAACACAACCTTGTGAGA	25	62	48	

Estos oligonucleótidos fueron probados usando ADN genómico (Figura 3.9) y los resultados de las Tm’s óptimas fueron usados para realizar los RT-PCR.

Se observó una ligera expresión del gen FUB1 a las 8 h de germinación (Figura 3.36). También se observó la expresión del gen FUB4 a las 8 h y una señal menor en la muestra analizada de micelio (Figura 3.37).



**Figura 3.36** Análisis de expresión por RT-PCR del gen FUB1 en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios. Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (carril 1). Carriles 4, 5, 6 y 7 corresponden respectivamente a 0, 8 y 16 h de conidios en germinación y la muestra de micelio. Se observa amplificación del gen con los oligonucleótidos específicos usando ADN genómico (carril 2) y una ligera señal de amplificación en 8 h. Control negativo usando agua libre de nucleasas (carril 3).



**Figura 3.37** Analisis de expresión por RT-PCR de la expresión del gen FUB4 en *P. fijiensis* durante la germinación de conidios. Marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (carril 1). Carriles 4, 5, 6 y 7 corresponden respectivamente a 0, 8 y 16 h de conidios en germinación y a la muestra de micelio. Se observa amplificación del gen con los oligonucleótidos específicos usando ADN genómico (carril 2) y señal de amplificación en 8h y micelio. Control negativo usando agua libre de nucleasas (carril 3).

### 3.4.5 Análisis sinténico del “cluster” de ácido fusárico

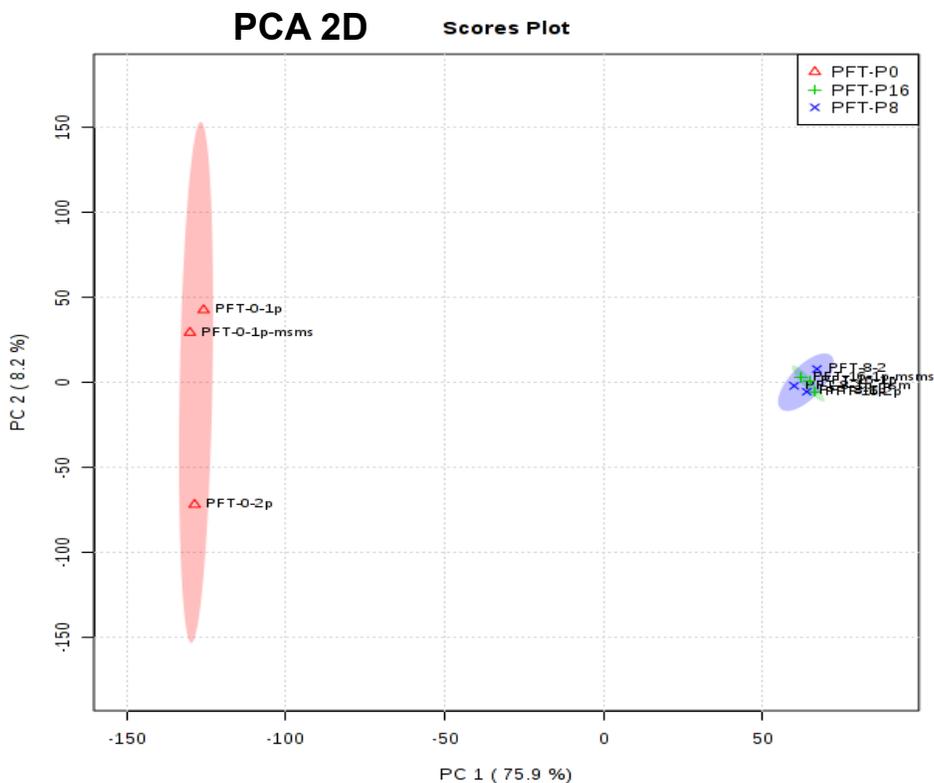
La figura 3.38 muestra la relación sinténica del “cluster” de biosíntesis de ácido fusárico. Se observó que dos de los genes involucrados en la biosíntesis coinciden en el “scaffold” 2 del genoma de *P. fijiensis* (“hit” 8); genes FUB1 (rojo) y FUB4 (rosa). Se observó un reordenamiento del gen FUB4, separándose de FUB1 por una proteína hipotética. FUB1, es una proteína multidominio que actúa como factor de transcripción (Niehaus *et al.*, 2014). En los genomas de los organismos emparentados filogenéticamente con *Fusarium fujikuroi*; *F. proliferatum*, *F. mangiferae* y *F. oxysporum* se observó conservación sinténica del “cluster” completo (“hit” 1, 2 y 3 respectivamente). En los organismos filogenéticamente cercanos a *P. fijiensis* no se encontraron genes homólogos, por lo tanto, no existe relación sinténica del “cluster” con ellos.



**Figura 3.38** Análisis sinténico para el “cluster” biosintético del ácido fusárico de *P. fijiensis* y otros hongos. Las direcciones de las flechas indican la dirección de la transcripción y los colores la relación de homología entre genes de los genomas evaluados.

### 3. 5 Análisis metabólico

El análisis de componentes principales en dos dimensiones (PCA 2D, por sus siglas en inglés), el cual considera diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas. Se agrupó a los compuestos identificados por tiempo de vuelo con una masa molecular similar. En el gráfico se observa que los compuestos detectados en las muestras de conidios analizadas, en diferentes tiempos de germinación, se concentran en dos grupos, es decir, existe diferencia estadísticamente significativa entre los compuestos de las muestras del tiempo 0 y los compuestos de las muestras de los tiempos 8 y 16, pero existe similitud entre los compuestos de las muestras del tiempo 8 y 16, formando un solo grupo. También se pueden observar señales de diferentes dimensiones, esto es porque en el tiempo 0 se identifica una mayor cantidad de compuestos, comparado con las muestras colectadas a las 8 y 16 horas de germinación. (Figura 3.39).



**Figura 3.39** Análisis de Componentes Principales (PCA 2D) de los metabolitos colectados a partir de los conidios en germinación. El grupo formado por los compuestos de las muestras del tiempo 0 son diferentes y están en mayor cantidad comparados con el grupo formado por los compuestos de los tiempos 8 y 16.

En el cuadro 3.9 se presentan los compuestos que mostraron coincidencias más cercanas para la masa M+H y M+Na, hasta el primer punto decimal. Aquellos en los que no se encontraron coincidencias se señalan con la palabra “ninguna” en la casilla correspondiente.

**Cuadro 3.9** Coincidencias en las masas moleculares entre los aductos identificados por LC-MS/MS QTOF y otros metabolitos.

Compuesto	Fórmula	M+H	Coincidencia más cercana		
			M+H	M+Na	
<b>STC</b>	C18H12O6	325.071215	ninguna	347.05316	ninguna
<b>Ácido fusárico</b>	C10H13NO2	<b>180.102454</b>	<b>180.122</b>	202.084399	ninguna
<b>Fusaridiona A</b>	C27H31NO4	434.233134	434.2566	456.215079	456.2694
<b>Bikaverina</b>	C20H14O8	383.076695	ninguna	405.05864	405.0764
<b>Ácido nosolorinico</b>	C20H18O7	371.113079	371.1017	393.095024	ninguna
<b>Patulina</b>	C7H6O4	155.034435	155.0466	177.01638	177.0545
<b>Ácido kojico</b>	C6H6O4	143.034435	143.0701	165.01638	165.0562
<b>Monacolina K</b>	C24H36O5	405.2641	405.2618	427.246045	427.244
<b>Compactina</b>	C23H34O5	391.24845	391.2458	413.230395	413.2771
<b>Ocratoxina</b>	C20H18ClNO6	404.090092	ninguna	426.072037	ninguna
<b>Pseurotina A</b>	C22H25NO8	432.165844	ninguna	454.147789	ninguna
<b>Tentoxina</b>	C22H30N4O4	415.234531	415.2113	437.216476	437.2142
<b>Apicidina</b>	C34H49N5O6	624.37611	624.3806	646.358054	646.335
<b>Gliotoxina</b>	C13H14N2O4S2	327.047327	ninguna	349.029272	ninguna
<b>Melanina</b>	C18H10N2O4	319.071883	ninguna	341.053828	ninguna
<b>Austinol</b>	C25H30O8	459.201895	459.2803	481.18384	ninguna
<b>Anditomina</b>	C25H30O5	411.21715	411.2292	433.199095	ninguna
<b>Yanuthone K</b>	C24H34O4	387.253535	387.249	409.23548	409.2356
<b>Aristolocuqueno</b>	C15H24	205.195625	205.195	227.17757	227.1759
<b>Terretonina</b>	C26H32O9	489.21246	489.2272	511.194405	ninguna
<b>Aflatrem</b>	C32H39NO4	502.295734	502.2579	524.277679	524.2685
<b>Sordarina</b>	C27H40O8	493.280145	493.2901	515.26209	ninguna
<b>Fusicocano</b>	C20H36	277.289525	277.2168	299.27147	299.2366
<b>Ácido terreic</b>	C7H6O4	155.034435	155.0466	177.01638	177.0545
<b>Terreina</b>	C8H10O3	155.07082	155.083	177.052765	177.0545
<b>Terrequinona</b>	C32H30N2O3	491.233468	491.2396	513.215413	513.2246

---

---

<b>Agroclavina</b>	C16H18N2	239.154823	239.1491	261.136768	261.1314
<b>Brevianamida F</b>	C16H17N3O2	284.139902	284.1455	306.121847	ninguna

La identificación (confirmación) de compuestos por LC-MS/MS se basa en la coincidencia de los valores enteros y hasta el tercer decimal (Lei *et al.*, 2011). Los compuestos de interés en este trabajo se resaltaron en rojo en el cuadro 9, y se registraron. Los datos identificados de masas más cercanas a las esperados. Sin embargo, no se observaron coincidencias en los aductos encontrados que permitan asegurar que corresponden a las masas de los compuestos esterigmatocistina y gliotoxina. Solamente se observó una coincidencia en la masa del ácido fusárico coincidiendo en el primer punto decimal en la columna M+H.

### CAPÍTULO IV

#### DISCUSIÓN GENERAL

Con la producción de conidios *in vitro*, se obtuvieron esporas viables en cantidades significativas, para utilizarse en experimentos *in vivo* o *in vitro*. Previamente se han reportado algunos trabajos para la obtención de conidios *in vitro* de *P. fijiensis*. Por ejemplo, Peraza-Echeverría *et al.* (2008) obtuvieron aproximadamente  $2.5 \times 10^6$  conidios por mililitro (c/ml). En ese trabajo se utilizó medio de cultivo modificado con jugo V8 (Herdez, CDMX, México), luz blanca fría y fotoperiodo continuo, combinado con luz UV. Por otro lado, Leyva-Mora *et al.*, (2008) evaluaron diferentes medios de cultivo como carboximetil celulosa, agar-mycophil, agar papa-dextrosa, jugo V8, agar papa-zanahoria, y obtuvieron  $1.88 \times 10^5$  c/ml en el medio de agar papa-zanahoria y  $3.33 \times 10^4$  c/ml con el medio agar papa-dextrosa. Pech (2013), usando la metodología propuesta por Leyva-Mora *et al.* (2008) obtuvo  $8.8 \times 10^4$  c/ml usando el medio agar papa-dextrosa; esos conidios se utilizaron para obtener bibliotecas de transcritos. En el presente trabajo se obtuvieron conidios para extraer material genético (ADN y ARN) y realizar el análisis metabólico, obteniendo  $1.58 \times 10^5$  c/ml. Estas cifras indican que se duplicó la producción de conidios comparándolo con lo obtenido por Pech (2013) y son similares a lo reportado por Leyva-Mora *et al.* (2008). En comparación con Peraza-Echeverría *et al.* (2008) se obtuvieron menos conidios, sin embargo, el método usado en este trabajo es fácil y económico, porque no requiere lámparas de luz UV, que son de costo elevado y de vida corta.

A raíz del análisis transcriptómico de conidios en geminación *in vitro* de *P. fijiensis* se encontraron transcritos relacionados con las rutas de biosíntesis de esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico. Esto permitió suponer que *P. fijiensis* debe producir alguna micotoxina relacionada con alguno de estos compuestos, por lo que se procedió a realizar la búsqueda de los genes homólogos en el genoma reportado de *P. fijiensis*. El “cluster” de esterigmatocistina está formado por 17 genes en *A. nidulans*. En *P. fijiensis* se identificaron *in silico* 15 de esos genes, faltando los homólogos StcO, StcQ. El “cluster” de biosíntesis de gliotoxina está formado por 12 genes en *A. fumigatus*, y se identificaron *in silico* 11 de estos genes en *P. fijiensis* faltando el gen GliM. La amplificación por PCR usando oligonucleótidos degenerados y ADNg como templado, generó amplicones que correspondieron los tamaños esperados, pero las secuencias obtenidas no confirmaron la

presencia de estos genes. Sin embargo, no se descarta que dichos genes estén presentes en el genoma de *P. fijiensis*, ya que sólo se diseñó y probó un par de cebadores en cada caso, por lo que el esfuerzo no fue exhaustivo. También debe considerarse que la cobertura de secuenciación de la cepa CIRAD 86 es de 7.11x, comparado con hongos con un mejor escrutinio a nivel genómico, como el caso *P. musae* o *P. eumusae*, cuyas coberturas de secuenciación son 122x y 165x, respectivamente (Chang *et al.*, 2016), por lo que muchos genes que sí están físicamente en el genoma, no están representados en la secuencia del genoma de referencia. Adicionalmente, en *P. fijiensis* hay una gran cantidad “gaps” (espacios) genómicos y los “scaffolds” no se han ordenado en cromosomas (Arango *et al.*, 2016).

Una alternativa que explicaría la ausencia de StcO y StcQ sería que *P. fijiensis* sintetizara alguna aflatoxina u otra micotoxina policétida relacionada estructuralmente, pero diferente a la esterigmatocistina. Por ejemplo, el hongo fitopatógeno *Dothistroma septosporum* (antes *Mycosphaerella pini*) produce dotistromina, una micotoxina policétida cuya ruta predicha de biosíntesis posee 11 genes homólogos con alto porcentaje de identidad con los genes de biosíntesis de esterigmatocistina y aflatoxina B1, mientras que otros genes están ausentes o tienen bajo porcentaje de identidad. Dotistromina tiene una estrecha similitud estructural con la versicolorina B, un precursor biosintético de esterigmatocistina y la aflatoxina B1 (Schwelm y Bradshaw, 2010).

La genómica comparativa es una importante rama de la investigación biológica, pues al comparar los genomas entre organismos, es posible identificar regiones con diferencias o similitudes en el ordenamiento de los loci; estos estudios de genómica comparativa se basan en la identificación de genes homólogos (genes que comparten un origen evolutivo común). Los genes homólogos se subclasifican como ortólogos si están separados por un evento de especiación, o parálogos, si están separados por un evento de duplicación en el mismo genoma. Las comparaciones entre genomas eucariotas revelan diversos grados en los que los genes homólogos permanecen en posiciones similares en los cromosomas, y esto se conoce como conservación sinténica (Wang *et al.*, 2012; Rubin *et al.*, 2000).

Muchas rutas de biosíntesis de compuestos orgánicos, como la síntesis de toxinas en organismos eucariontes, están mediadas por genes corregulados, que codifican proteínas con una función específica en el proceso de transformación de una molécula hasta el compuesto final. Estos genes se localizan físicamente en los cromosomas agrupamientos

génicos (Fischbach y Voigt 2010), aunque también pueden evolucionar, observándose cambios de posición, restructurándose por varias mutaciones, como la duplicación del genoma completo, duplicación segmentaria, inversiones, translocaciones, reordenamientos, inserciones y deleciones (Medema *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012). Conocer el contexto evolutivo de un grupo de genes puede revelar mucho acerca de su función. Los análisis sinténicos aportan esta importante información, permitiendo conocer las regiones conservadas evolutivamente y las variantes que existen entre ellas. Esto permite comprender la evolución, estructura y regulación de los “clusters” génicos. La sintenia permite la identificación de genes codificantes de proteínas, elementos funcionales no codificantes y elementos regulatorios (Medema *et al.*, 2012; Frazer *et al.*, 2003).

En los resultados de las sintenias obtenidas, se observó que, en su mayoría, los genes de las rutas de esterigmatocistina y gliotoxina se encuentran dispersos en los diferentes andamios genómicos del genoma de *P. fijiensis*, pero no se descarta que estos puedan estar corregulados, pues la mayoría de los genes identificados permanecieron cercanos unos de otros formando subgrupos, conservando la posible funcionalidad en la biosíntesis de algún compuesto. Además, el estar en diferentes andamios no significa que estén en diferentes cromosomas.

Aunque en la mayoría de los microorganismos, los genes de biosíntesis de compuestos suelen agruparse en una sola región genómica, existen excepciones en donde los genes biosintéticos se encuentran dispersos en el genoma, pero conservando su funcionalidad. Por ejemplo, Schwelm y Bradshaw (2010), mencionan que el “cluster” génico de la toxina T en *Cochliobolus heterostrophus*, el “cluster” de tricoteceno en *Fusarium* spp y el “cluster” de aflatrem en *Aspergillus flavus*, se encuentran divididos en distintas regiones genómicas, siendo funcionales en cada uno de estos hongos (Chen *et al.*, 2019; Nicholson *et al.*, 2009). El “cluster” génico de la biosíntesis de dotistromina es otro ejemplo de que los genes involucrados en la síntesis de compuestos, pueden estar distribuidos en diferentes partes del genoma e intervenir en una ruta activa. El “cluster” de síntesis de dotistromina se encuentra disperso en seis diferentes regiones genómicas de *Dothistroma septosporum*; cada uno de estos subgrupos de genes reciben el nombre de “miniclusters” (Bradshaw *et al.*, 2013).

Los “clusters” de biosíntesis de la esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico, identificados en el genoma de *P. fijiensis*, están divididos por inserciones de una o varias

---

proteínas hipotéticas o por eventos de translocación, ubicándose en diferentes andamios genómicos (Figuras 3.23, 3.33 y 3.38).

En *Aspergillus nidulans*, el “cluster” de biosíntesis de esterigmatocistina se concentra en una misma región genómica de 52.6 kb (Ámon *et al.*, 2018; JGI IMG/ABC, 2018). En *P. fijiensis*, los genes homólogos de la ruta se observaron distribuidos; 7 genes en el “scaffold” 12, y 3 en el “scaffold” 8 (Figura 3.23, “hits” 11, 21 y 34).

Similarmente, el “cluster” de biosíntesis de gliotoxina en el genoma de *A. fumigatus*, se ubica en una sola región genómica de 25.4 Kb (Scharf *et al.*, 2012; Gardiner y Howlett, 2005). En *P. fijiensis* esta ruta no es continua en el genoma, y se identificaron cuatro de los genes biosintéticos en el “scaffold” 4 y otros 2 en el “scaffold” 7 (Figura 3.33, “hits” 9 y 10 respectivamente).

En el caso de la biosíntesis del ácido fusárico, la ruta se concentra en una misma región genómica de 16.1 Kb en el genoma de *Fusarium fujikuroi* (Niehaus *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2010), mientras que en el genoma de *P. fijiensis* se identificaron 2 genes en el scaffold 2, presentando reordenamiento (Figura 3.38, “hit” 8).

Es decir, los genes de las tres rutas no están continuos en el genoma de *P. fijiensis*, pero sí se observa sintenia en partes de estas rutas respecto al orden de los genes en las rutas modelo en los genomas de los hongos respectivos de referencia.

La presencia de los genes homólogos de estas rutas de biosíntesis en *P. fijiensis*, pero no en hongos filogenéticamente cercanos como *P. musae* y *P. eumusae* sugieren que *P. fijiensis* adquirió estas rutas por transferencia horizontal, de alguna especie perteneciente al género *Aspergillus* o *Fusarium*, pues en ningún otro miembro de la familia Mycosphaerellaceae han sido identificados. Para que la transferencia horizontal de genes sea considerada como un evento ocurrido entre organismos, usualmente se consideran los siguientes criterios: 1) El organismo comparado debe ser filogenéticamente distante al modelo. 2) Los genes homólogos al modelo deben estar ausentes en organismos filogenéticamente cercanos al organismo comparado. 3) El porcentaje de identidad de los genes homólogos es  $\geq 40$  (Fitzpatrick, 2012; Rosewich y Kistler, 2000). La transferencia horizontal es un proceso demostrado en otros hongos, como *Phaeosphaeria nodorum* y *Fusarium oxysporum*.

La presencia de los genes homólogos de las rutas de biosíntesis de esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico en el genoma de *P. fijiensis* sugiere que este hongo puede sintetizar compuestos con estructura química similar. Esto le conferiría ventaja evolutiva

para ampliar su rango de hospederos y para competir con otros microorganismos, ya que este fenómeno tiene el potencial de ampliar el rango de hospederos y favorecer la patogenicidad y virulencia (Arango-Isaza et al., 2016).

La búsqueda por Blastx de los genes de las rutas de biosíntesis, consideró los “hits” con porcentajes de identidad  $\geq 30$  %. Esto podría considerarse como un parámetro laxo, pero en un estudio realizado por Ye *et al.* (2018) se comprobó que los bajos porcentajes de identidad aún son significativos y que los genes son funcionalmente ortólogos. En ese trabajo se analizó el transcriptoma de *Dichotomomyces cejpii* (un hongo aislado de sedimentos marinos que produce gliotoxina, Fan *et al.* 2016); se encontraron transcritos relacionados con la biosíntesis de gliotoxina, pero los genes tuvieron porcentajes de identidad  $< 32$  %. Por ejemplo, los genes GliG y GliI en *D. cejpii*, mostraron porcentajes de identidad del 31.6 % y 28.9 % con los genes respectivos de *A. fumigatus*. Usando ADNc de *D. cejpii*, los genes GliG y GliI fueron expresados heterológicamente, la función caracterizada demostró que esos genes están involucrados en la biosíntesis de gliotoxina en *D. cejpii*.

En el caso de *P. fijiensis*, fue congruente con lo esperado, los genes StcJ y StcK mostraron corregulación y ambos se expresaron a las 8h. Ambas son subunidades de síntesis de ácidos grasos y junto con la PKS (StcA) intervienen en el primer paso de la biosíntesis de la esterigmatocistina, convirtiendo el acetyl-CoA en Acetyl-CoA carboxylasa y malonyl-CoA (Georgianna y Payne, 2009).

StcA se expresó desde el tiempo cero, pero también se observó a las 8 y 16h de germinación, así como en el micelio, lo que sugiere que este sea un gen de expresión constitutiva. Este gen codifica una policétido sintasa que conserva los seis dominios de la PKS involucrada en la ruta de biosíntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans* (Itoh *et al.*, 2017; Klejnstrup *et al.*, 2012) y es clave para la formación del primer precursor de la esterigmatocistina (Schwelm y Bradshaw, 2010).

También se observó la expresión del gen StcU en los tres tiempos de germinación analizados; este gen codifica una cetoreductasa que convierte la versicolorina A en esterigmatocistina (Schwelm y Bradshaw 2010; Mustacich y Powis. 2000). Esto apoya la síntesis de esterigmatocistina, pero en *P. fijiensis* pudiera no ser el producto final. Noar y Daub (2016), mencionaron que la PKS (PKS10-2) presenta 91% de identidad con la PKS del “cluster” de cercosporina de *Cercospora nicotianae* y 71% con la PKS de la biosíntesis

de una aflatoxina de *A. parasiticus* y con la PKS de la biosíntesis de esterigmatocistina de *A. nidulans*.

En la ruta de biosíntesis de la gliotoxina intervienen 12 enzimas (JGI IMG/ABC, 2018; Scharf *et al.*, 2012; Gardiner y Howlett, 2005). En *P. fijiensis* se identificaron *in silico* 11 enzimas, faltando el homólogo de GliM, que corresponde a una O-metiltransferasa. La amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos y ADNg generó un producto que corresponde al tamaño esperado, pero la secuencia no correspondió a GliM, por lo que no se pudo confirmar que la ruta esté completa.

Los análisis de expresión de GliZ y GliT apoyan que la ruta sea afuncional. El gen GliZ, considerado el factor de transcripción del cluster de biosíntesis de la gliotoxina (Bok *et al.*, 2006), se expresa en los conidios colectados a las cero horas. También se observó la expresión del gen GliT a las 0 y 8h de germinación; GliT codifica una tioredoxina involucrada en la biosíntesis de gliotoxina (Gardiner y Howlett, 2005).

En la ruta de biosíntesis de ácido fusárico intervienen cinco enzimas (Niehaus *et al.*, 2014), y las cinco enzimas fueron identificadas *in silico* en *P. fijiensis*. El producto amplificado por PCR con los oligonucleótidos específicos y ADNg generó los amplicones correspondientes al tamaño esperado en cada caso. De los dos genes evaluados en la biosíntesis del ácido fusárico se observó la expresión de FUB4 a las 0h. Este gen codifica una serina hidrolasa, una importante proteína en la ruta de biosíntesis (Niehaus *et al.*, 2014).

Los factores de transcripción y otros genes limitantes de las vías de biosíntesis, cuyas expresiones no se observaron, pueden ser analizadas por medio de RT-qPCR, lo cual es una técnica con mayor sensibilidad comparado con la técnica usada en este trabajo.

En Sigatoka negra se ha demostrado que la producción de metabolitos secundarios, juega un papel importante en la patogenicidad y virulencia del agente causal, pero gran parte de las estructuras de los compuestos que *P. fijiensis* secreta no han sido bien elucidados. La evidencia genómica y transcriptómica de *P. fijiensis* sugiere la producción de metabolitos secundarios adicionales a los reportados en trabajos previos.

Es importante destacar que los compuestos policétidos (como la esterigmatocistina y ácido fusárico) y péptidos no ribosomales (como la gliotoxina), son los principales compuestos que emplean los hongos como factores de patogenicidad, virulencia y defensa ante el ataque de depredadores y antagonistas (Calvo y Cary, 2015). En este sentido, si *P. fijiensis* produjera un compuesto policétido similar a esterigmatocistina, podría ser usado en la

protección de sus estructuras reproductivas, ante la depredación de insectos fungívoros. En un ensayo realizado por Doll *et al.* (2013) en *A. nidulans*, se observó que los cleistotecios permanecieron intactos luego de ser expuestos al ataque del insecto fungívoro *Folsomia candida*. Los autores supusieron que los metabolitos secundarios concentrados en esas estructuras los protegían de la depredación. El perfil metabolómico obtenido en dicho estudio reveló la síntesis de micotoxinas policétidas como la esterigmatocistina. Más adelante, Ámon *et al.* (2018) demostraron, por medio de un sistema reportero de la proteína cian fluorescente (*cian fluorescent protein* o CFP) etiquetada con la señal de localización nuclear (*nuclear localization signal* o NLS), que la síntesis de esterigmatocistina se lleva a cabo en las hifas cercanas a las estructuras reproductivas y esclerocios. Es decir, la esterigmatocistina se deposita en las paredes de los cleistotecios, brindando esta protección a las ascas. Congruentemente la eliminación de los genes *AflR*, *StcJ* o *StcU*, reduce significativamente la producción de conidios en *A. nidulans*. Esto sugiere que la expresión de los genes de esta ruta biosintética se relaciona también con el proceso de conidiogénesis (Wilkinson *et al.*, 2004).

La gliotoxina es un péptido no ribosomal, tipo epidithiodioxopiperazina (ETP), con actividad citotóxica, genotóxica y apoptótica sobre líneas celulares animales (Bok *et al.*, 2006). Estas toxinas no son factores de patogenicidad o virulencia sobre las plantas (Scharf *et al.*, 2012; Reeves *et al.*, 2004), sino que juegan un papel fundamental en la competencia contra otros microorganismos por el nicho ecológico. La gliotoxina ha sido usada como un agente antifúngico para prevenir el tizón del arroz, causado por *Magnaporthe grisea* (Carberry *et al.*, 2012). Algunos aislados de *Trichoderma virens* que producen gliotoxina, han sido comercializados para el control biológico de hongos fitopatógenos (Scharf *et al.*, 2016). Es posible que esta toxina en *P. fijiensis* le permita competir con éxito con otros hongos, pues el desarrollo de la infección comienza con la germinación de los conidios sobre la superficie de las hojas del banano. Esto representa un escenario en el que *P. fijiensis* debe competir con otros microorganismos, que podrían limitar la disponibilidad del agua libre, necesaria para iniciar y completar el proceso de germinación de esporas.

La posible producción de ácido fusárico en *P. fijiensis* representaría una importante ventaja evolutiva, pues le brindaría protección frente a otros microorganismos antagonistas, además de que actuaría como un factor de patogenicidad. El ácido fusárico se encuentra ampliamente distribuido en los miembros del género *Fusarium*. Estudios previos

demuestran que esta toxina policétida juega un papel importante en la ecología de los organismos que lo producen. El ácido fusárico posee propiedades antimicrobianas, pues han sido evaluadas diferentes concentraciones de este compuesto sobre cepas de *Bacillus subtilis* y *B. mojavensis*, como resultado sus desarrollos fueron inhibidos (Bacon *et al.*, 2006). El ácido fusárico también muestra bioactividad supresora del crecimiento micelial del oomiceto *Phytophthora infestans* y del hongo *Botrytis cinerea* (Son *et al.*, 2008), además de que tiene elevada actividad fitotóxica, causando necrosis y clorosis en el tejido vegetal. Se ha reportado que el hongo *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), agente causal del mal de Panamá, produce este compuesto. El ácido fusárico desempeña un papel importante durante el proceso patogénico y aumenta la virulencia. Li *et al.* (2013) reportaron que el ácido fusárico se acumula en raíz, pseudotallo y en hojas de banano infectado por *Foc*.

Se realizó un estudio metabolómico para saber si los conidios en germinación de *P. fijiensis* producen metabolitos secundarios y cuáles son. Los resultados revelaron aspectos importantes del patógeno en el proceso de germinación de esporas, pues se encontró una variedad de metabolitos, aunque sus identidades no pudieron definirse con exactitud. En una revisión realizada por Tsuge *et al.* (2013) describieron que los conidios en germinación de *Alternaria alternata* tienen la capacidad de secretar micotoxinas para inducir la susceptibilidad de las células del hospedero, al suprimir sus reacciones de defensa. *P. fijiensis* pudiera haber desarrollado mecanismos de secreción similar, para inducir la patogenicidad y para proteger sus inóculos.

En la metabolómica no dirigida se observó que existen diferencias entre los compuestos identificados en la muestra del tiempo 0 h, respecto a las 8 h y 16 h. Por otro lado, los compuestos identificados a las 8 h y 16 h se agrupan en un solo punto del gráfico PCA 2D, es decir, existe similitud entre los compuestos de ambos tiempos de germinación. Estos tipos de análisis son comúnmente utilizados en metabolómica no dirigida (Hautberge *et al.*, 2019; Dunn *et al.*, 2013). Esto sugiere que los compuestos detectados en tiempo 0 pudieran ser los sustratos o precursores de los metabolitos, mientras que en los tiempos 8 h y 16 h se están identificando compuestos con mayor masa molecular, moléculas más complejas y probablemente algunos compuestos finales.

Consistente con la observación a las 0 h de conidiación, se observó mayor expresión de los genes evaluados, y también en ese momento se observó mayor contenido de metabolitos secundarios, aunque se desconoce la identidad de la mayoría de ellos. Esto

sugiere que cuando los conidios son liberados de los conidióforos hacia sus potenciales hospederos, inician con un activo programa de producción de metabolitos secundarios que los protegen del medio ambiente, de antagonistas y posibles depredadores, y otros más que servirán como factores de patogenicidad y virulencia.

Lamentablemente, en el análisis metabolómico no se encontraron coincidencias que se ajusten hasta el tercer punto decimal con el aducto formado con el ion H o Na, para los compuestos esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico. Solo se reporta la coincidencia (M+Na) en el primer decimal para ácido fusárico. Es recomendable explorar si estos compuestos tienen coincidencia con algún otro ion común como C, N, O, Cl, S u otro elemento.

Una posibilidad es que los productos finales de las rutas identificadas no sean esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico, sino compuestos de las mismas familias químicas, o estos metabolitos se producen en conidios en otros momentos no analizados. Futuros trabajos sobre *P. fijiensis* deberán profundizar en esos análisis para demostrar el papel de los metabolitos secundarios en el proceso del establecimiento de los conidios para infectar a su hospedero.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1 CONCLUSIONES

- Se desarrolló un protocolo fácil, rápido y económico para la obtención de conidios *in vitro*.
- La identificación de los genes homólogos de las rutas de biosíntesis de esterigmatocistina, gliotoxina y ácido fusárico, en el genoma y transcriptoma de conidios de *P. fijiensis*, y los resultados de los análisis de expresión por RT-PCR, apoyan que este hongo tiene el potencial genético para producir metabolitos secundarios relacionados con estos compuestos.
- Quince de los 17 genes que intervienen en la ruta de biosíntesis de esterigmatocistina, y 11 de los 12 genes de la ruta de biosíntesis de gliotoxina fueron identificados en el genoma reportado de *P. fijiensis*. Los genes faltantes no pudieron confirmarse usando cebadores degenerados, pero no se descarta su presencia en el genoma. Es recomendable diseñar nuevos pares de cebadores, que flanqueen regiones conservadas, de  $\leq 500$  pb.
- Todos los genes de biosíntesis del ácido fusárico fueron encontrados *in silico*, lo que indica que la ruta de biosíntesis está completa en el genoma de *P. fijiensis* y pudiera ser funcional.
- Los análisis sinténicos mostraron baja conservación sinténica, entre los “clusters” de referencia y los andamios genómicos de *P. fijiensis*.
- Existe correlación entre la expresión de los genes evaluados a las cero horas y los resultados del metaboloma, pues en este tiempo se observó mayor cantidad de compuestos diferentes, pudiendo ser compuestos intermedios producidos o modificados por los genes que se expresan en este mismo tiempo.
- Se observó una tendencia de mayor expresión en los conidios colectados a las 0 h de germinación, mientras las expresiones disminuyen o desaparecen a las 8 y 16 h de conidiación, lo que sugiere que esos metabolitos se sintetizan cuando el conidio emerge, y sirven de precursores de otros metabolitos cuando el

conidio germina. Esto es congruente con los resultados metabolómicos similares para los tiempos 8 y 16 h, y diferentes del metaboloma a las 0 h.

- Los resultados del metaboloma confirman que los conidios de *P. fijiensis* producen metabolitos secundarios.

## 5.2 PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos, surgen nuevas oportunidades que en el futuro se deberán analizar, por ejemplo:

- Los factores de transcripción y otros genes homólogos limitantes de las vías de biosíntesis de estos compuestos, en *P. fijiensis* deben ser expresados y caracterizados para confirmar su función.
- Los análisis genómicos y transcriptómicos revelan nuevos posibles blancos moleculares, que pudieran servir en el desarrollo de nuevos fungicidas para controlar a la Sigatoka negra.
- El diseño de mejores estrategias para la identificación puntual de compuestos que *P. fijiensis* pudiera producir. La suma de los resultados de los análisis genómicos, transcriptómicos y metabolómicos, proveen pistas de los compuestos que pueden estarse produciendo.

### BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, A. y Diaz, M. (2007). Guía práctica de plagas y enfermedades en plátano y guineo. Colegio de Ciencias Agrícolas, pp. 1-39.
- Alakonya, A. E., J. Kimunye, G. Mahuku, D. Amah, B. Uwimana, A. Brown y R. Swennen (2018). Progress in understanding *Pseudocercospora* banana pathogens and the development of resistant *Musa* germplasm. *Plant Pathology*, 67, 759-770.
- Amalfitano, C., Pengue, R., Andolfi, A., Vurro, M., Zonno, M. C., & Evidente, A. (2002). HPLC analysis of fusaric acid, 9, 10-dehydrofusaric acid and their methyl esters, toxic metabolites from weed pathogenic *Fusarium* species. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(5), 277-282.
- Ámon, J., Keisham, K., Bokor, E., Kelemen, E., Vágvölgyi, C., & Hamari, Z. (2018). Sterigmatocystin production is restricted to hyphae located in the proximity of hülle cells. *Journal of Basic Microbiology*, 58(7), 590-596.
- 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).
- Arnér, E. S., & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267(20), 6102-6109.
- Asencio, E. (2004), Experiencia en el manejo de las principales enfermedades en el cultivo de plátano (*Musa aab*, simmonds) de exportación en áreas comerciales de la empresa Cobigua, en la costa sur de Guatemala. Tesis profesional de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, Guatemala. 5-9.
- Bacon, C. W., Hinton, D. M., & Hinton Jr, A. (2006). Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 100(1), 185-194.

- Beltrán-García, M. J., Manzo-Sánchez, G., Orozco-Santos, M. y Ogura, T. (2009) "Sigatoka negra: el cáncer de la producción de banano". *Revista Ciencia y Desarrollo*, Vol. 35 (232), 58-63.
- Bonilla, H. (2015). Evaluación de programas fitosanitarios para el control de Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) en el cultivo de plátano. Tesis profesional de Ingeniería. Universidad Rafael Landívar. Coatepeque, Guatemala. 6-8.
- Bok, J., Chung, D., Balajee, S., Marr, K., Andes, D., Nielsen, K., Frisvad, J., Kirby, K. & Keller, N. P. (2006). GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infection and Immunity*, 74(12), 6761-6768.
- Borges, D., & Díaz, A., & San Juan, A., & Gómez, E. (2010). Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 44 (3), 49-55.
- Boruta, T. (2018). Uncovering the repertoire of fungal secondary metabolites: From Fleming's laboratory to the International Space Station. *Bioengineered*, 9(1), 12-16.
- Braga, G. U., Rangel, D. E., Fernandes, É. K., Flint, S. D., & Roberts, D. W. (2015). Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Current genetics*, 61(3), 405-425.
- Brown, D., Yu, J., Kelkar, H., Fernandes, M., Nesbitt, T., Keller, N. & Leonard, T. (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(4), 1418-1422.
- Brown, D., Butchko, R., Busman, M., & Proctor, R. (2012). Identification of gene clusters associated with fusaric acid, fusarin, and perithecial pigment production in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(7), 521-532.
- Bradshaw, R. E., Slot, J. C., Moore, G. G., Chettri, P., de Wit, P. J., Ehrlich, K. C., Austen R. D., Ganley, R. D., Malin, A. O., Antonis, R., Carbone, I. & Cox, M. P. (2013). Fragmentation of an aflatoxin-like gene cluster in a forest pathogen. *New Phytologist*, 198(2), 525-535.
- Canto, B. y Castillo, G. (2011) Un mil usos: el plátano. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana*. 24 (1), 1.

- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447-459.
- Calvo, A., & Cary, J. (2015). Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Frontiers in Microbiology*, 6, 62.
- Carberry, S., Molloy, E., Hammel, S., O'Keeffe, G., Jones, G. W., Kavanagh, K., & Doyle, S. (2012). Gliotoxin effects on fungal growth: mechanisms and exploitation. *Fungal Genetics and Biology*, 49(4), 302-312.
- CEDRSSA. (2019). Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. Disponible en: [http://www.cedrssa.gob.mx/post\\_la\\_produccion\\_y\\_el\\_comercio\\_del\\_nicotino.html](http://www.cedrssa.gob.mx/post_la_produccion_y_el_comercio_del_nicotino.html). [Acceso 04 de mayo de 2020].
- 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 fijiensis* and *Pseudocercospora eumusae* and Increased Virulence on the Banana Host. *Plos Genetics*, 12(8), e1005904.
- Chen, Y., Kistler, H. C., & Ma, Z. (2019). Erratum: *Fusarium graminearum* Trichothecene Mycotoxins: Biosynthesis, Regulation, and Management. *Annual Review of Phytopathology*, 0, 482-483.
- Churchill, A., (2011) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 307-328.
- Cruz-Cruz, C. A., García-Sosa, K., Escalante-Erosa, F., & Peña-Rodríguez, L. M. (2009). Production of hydrophilic phytotoxins by *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of General Plant Pathology*, 75(3), 191-195
- Demain, A. y Fang, A. (2000). The Natural Functions of Secondary Metabolites. *History of Modern Biotechnology*, 69 (1) 1-39.
- Ding, Z., Yang, L., Wang, G., Guo, L., Liu, L., Wang, J., & Huang, J. (2018). Fusaric acid is a virulence factor of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense on banana plantlets. *Tropical Plant Pathology*, 43 (4) 297-305.

- Dong, X., Xiong, Y., Ling, N., Shen, Q., & Guo, S. (2014). Fusaric acid accelerates the senescence of leaf in banana when infected by *Fusarium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1399-1408.
- Dufosse, L., Fouillaud, M., Caro, Y., Mapari, S. & Sutthiwong, N. (2014). Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 56-61.
- Dunn, W. B., Erban, A., Weber, R. J., Creek, D. J., Brown, M., Breitling, R., Hankemeier, T., Goodacre, R., Neumann, S., Kopka, J. & Viant, M. R. (2013). Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, 9(1), 44-66.
- FAO. (2016). World Banana Production FAOSTAT database collections [Online]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/007/y5102s/y5102s04.htm> [Acceso 20 de abril 2018].
- Fan, Z., Sun, Z. H., Liu, Z., Chen, Y. C., Liu, H. X., Li, H. H., & Zhang, W. M. (2016). Dichotocejpins A–C: New diketopiperazines from a deep-sea-derived fungus *Dichotomomyces cejpilii* FS110. *Marine Drugs*, 14(9), 164.
- Feng, G. H., & Leonard, T. J. (1998). Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2275-2277.
- Financiera Rural, 2014. Panorama del plátano. Dirección General adjunta de planeación estratégica, análisis sectorial y tecnologías de la información. SHCP. México. Disponible en: <http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/panoramas/panoramaPlátano> [Acceso 20 abril 2018].
- Fischbach, M., & Voigt, C. A. (2010). Prokaryotic gene clusters: a rich toolbox for synthetic biology. *Biotechnology Journal*, 5(12), 1277-1296.
- Fitzpatrick, D. A. (2012). Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 329(1), 1-8.
- Fouré, E. (1985). Black leaf streak disease of banana and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. Irfa, Paris, France.
- Fouré, E. y Gany, J. (2008). A biological forecasting system to control Black Leaf Streak disease of bananas and plantains, *Fruits*, (63), 311–317.

- Frazer, K. A., Elnitski, L., Church, D. M., Dubchak, I., & Hardison, R. C. (2003). Cross-species sequence comparisons: a review of methods and available resources. *Genome Research*, 13(1), 1-12.
- Gaffoor, I., & Trail, F. (2006). Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1793-1799.
- Ganry, J., Fouré, E., Lapayre de Bellaire, L., & Lescot, T. (2012). An integrated approach to control the Black leaf streak disease (BLSD) of bananas, while reducing fungicide use and environmental impact. International Cooperation, Agreenium, CIRAD. Montpellier, Francia.
- Gardiner, D. & Howlett, B. (2005). Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 248(2), 241-248.
- Georgianna, D. R., & Payne, G. A. (2009). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, 46(2), 113-125.
- Griffiths, S., Mesarich, C. H., Saccomanno, B., Vaisberg, A., De Wit, P. J., Cox, R., & Collemare, J. (2016). Elucidation of cladofulvin biosynthesis reveals a cytochrome P450 monooxygenase required for anthraquinone dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(25), 6851-6856.
- Griffiths, S. A., Cox, R. J., Overdijk, E. J., Mesarich, C. H., Saccomanno, B., Lazarus, C. M., & Collemare, J. (2018). Assignment of a dubious gene cluster to melanin biosynthesis in the tomato fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. *Plos One*, 13(12), e0209600.
- Hanada, Rogério E, Gasparotto, Luadir, & Pereira, José Clério R. (2004). Eficiência de desinfestantes na erradicação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* aderidos à superfície de bananas. *Fitopatologia Brasileira*, 29(1), 94-96.
- Henderson, J., Pattemore, J., Porchun, S., Hayden, H., Brunschot, S., Grice, K., Peterson, R., Thomas-Hall, S. & Aitken, E. (2006). Black Sigatoka disease: New technologies to strengthen eradication strategies in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 35(2), 181–193.
- Hoss, R., J. Helbig y H. Bochow (2000). Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black Sigatoka disease

- pathosystem (*Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis*). Journal of Phytopathology 148, 387-394.
- Hoyos-Leyva, J., & Jaramillo-Jiménez, P., & Giraldo-Toro, A., & Dufour, D., & Sánchez, T., & Lucas-Aguirre, J. (2012). Caracterización física, morfológica y evaluación de las curvas de empastamiento de *musáceas* (*Musa* spp.). Acta Agronómica, 61 (3), 214-229.
- Itoh, E., Shigemoto, R., Oinuma, K. I., Shimizu, M., Masuo, S., & Takaya, N. (2017). Sirtuin A regulates secondary metabolite production by *Aspergillus nidulans*. The Journal of General and Applied Microbiology, 63(4), 228-235.
- Keller, N., & Hohn, T. (1997). Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. Fungal Genetics and Biology, 21(1), 17-29.
- Kim, J. H., Lee, J. H., & Choi, W. (2013). Identification of genes expressed during conidial germination of the pepper anthracnose pathogen, *Colletotrichum acutatum*. Journal of Life Science, 23(1), 8-14.
- Klejnstrup, M. L., Frandsen, R. J., Holm, D. K., Nielsen, M. T., Mortensen, U. H., Larsen, T. O., & Nielsen, J. B. (2012). Genetics of polyketide metabolism in *Aspergillus nidulans*. Metabolites, 2(1), 100-133
- Klich, M., Mullaney, E., Daly, C., & Cary, J. (2000). Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoroseus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 53(5), 605-609.
- Lei, Z., Huhman, D. V., & Sumner, L. W. (2011). Mass spectrometry strategies in metabolomics. Journal of Biological Chemistry, 286(29), 25435-25442.
- Leiva-Mora, M., Alvarado-Capó, Y., Acosta-Suárez, M., Cruz-Martín, M., Sánchez, C., & Roque-Morales, B. (2008). Enhanced sporulation, morphological and pathogenic characterization of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of Musa Black leaf streak. Centro Agrícola, 35(2), 33-39.
- Li, C., Zuo, C., Deng, G., Kuang, R., Yang, Q., Hu, C., & Yang, J. (2013). Contamination of bananas with beauvericin and fusaric acid produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Plos One, 8(7), e70226.
- Lindao, M. (2010). Desarrollo de una aplicación informática que utilice modelos Probit y Logit para la determinación del efecto de productos sobre *Mycosphaerella fijiensis*. Tesis profesional de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Colombia. pp. 8-9.
-

- Marín, D. y Romero, R. (1998). El combate de la Sigatoka negra. Divulgación científica al servicio del productor bananero nacional. Revista CORBANA, 104-129.
- Marín, D., Romero, R., Guzmán, M., y Sutton, T. (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87: 208-222.
- Martínez, I., Villata, R., Soto, E., Murillo, G. y Guzmán, M. (2011). Manejo de la Sigatoka negra en el cultivo del banano. CORBANA. San José, Costa Rica. Hoja Divulgativa, 2-2011.
- Medema, M. H., Van Raaphorst, R., Takano, E., & Breitling, R. (2012). Computational tools for the synthetic design of biochemical pathways. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3), 191-202.
- Medema, M. H., Takano, E., & Breitling, R. (2013). Detecting sequence homology at the gene cluster level with MultiGeneBlastx. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1218-1223.
- Merchán, Víctor M. E. (2000). Prevención y manejo de la Sigatoka negra. Boletín Diulgativo. (2), 4-11.
- Mustacich, D., & Powis, G. (2000). Thioredoxin reductase. *Biochemical Journal*, 346(1), 1-8.
- Nadal-Medina, Rocío, Manzo-Sánchez, Gilberto, Orozco-Romero, José, Orozco-Santos, Mario, & Guzmán-González, Salvador. (2009). Diversidad genética de bananos y plátanos (*Musa* spp.) determinada mediante marcadores RAPD. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(1), 01-07.
- Nakyanzi, M. (2002). Molecular and pathogenic diversity of isolates of *Mycosphaerella fijiensis* that cause black Sigatoka disease of banana in East Africa. Thesis PhD. University of Greenwich. Natural Resources Institute. pp. 22-24.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70(3), 461-477.
- Niehaus, E. M., von Bargen, K. W., Espino, J. J., Pfannmüller, A., Humpf, H. U., & Tudzynski, B. (2014). Characterization of the fusaric acid gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(4), 1749-1762.
- Nicholson, M. J., Koulman, A., Monahan, B. J., Pritchard, B. L., Payne, G. A., & Scott, B. (2009). Identification of two aflatoxin biosynthesis gene loci in *Aspergillus flavus* and metabolic engineering of *Penicillium paxilli* to elucidate their function. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7469-7481.

- Noar, R., & Daub, M. (2016 a). Transcriptome sequencing of *Mycosphaerella fijiensis* during association with *Musa acuminata* reveals candidate pathogenicity genes. *BMC Genomics*, 17(1), 690.
- Noar, R., & Daub, M. E. (2016 b). Bioinformatics prediction of polyketide synthase gene clusters from *Mycosphaerella fijiensis*. *Plos One*, 11(7), e0158471.
- Noar, R., Thomas, E., & Daub, M. E. (2019). A novel polyketide synthase gene cluster in the plant pathogenic fungus *Pseudocercospora fijiensis*. *Plos One*, 14(2), e0212229.
- Orozco-Santos, M., Orozco-Romero, J., Perez-Zamora, O., Manzo-Sánchez, G., Farias-Larios, J. y Da Silva Moraes, W. (2008). Cultural practices for the management of black Sigatoka in bananas and plantains. *Tropical Plant Pathology*, 33(3), 189-196.
- Orozco-Santos, M., García-Mariscal, K., Manzo-Sánchez, G., Guzmán-González, S., Martínez-Bolaños, L., Beltrán-García, M., & Canto-Canché, B. (2013). La sigatoka negra y su manejo integrado en banano. INIFAP. Libro Técnico 1, 20-24.
- Perrier, X., De Langhe, E., Donohue, M., Lentfer, C., Vrydaghs, L., Bakry, F., Carreel, F., Hyppolyte, I., Horry, J., Jenny, C., Lebot, V., Risterucci, A., Tomekpe, K., Duotrelle, H., Ball, T., Manwaring, J., Maret, T. & Denham, T. (2011). Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11311–11318.
- Pech, E., (2013). Expresión de genes en conidios de *Mycosphaerella fijiensis* en cultivo invitro. Tesis profesional de pregrado. Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el Estado de Campeche (ITESCAM). Campeche, México. 28-57.
- Peraza-Echeverría, L., Rodríguez-García, C. M., & Zapata-Salazar, D. M. (2008). A rapid, effective method for profuse *in vitro* conidial production of *Mycosphaerella fijiensis*. *Australasian Plant Pathology*, 37(5), 460-463.
- Rank, C., Nielsen, K., Larsen, T., Varga, J., Samson, R., & Frisvad, J. (2011). Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology*, 115(4-5), 406-420.
- Reeves, E. P., Messina, C. G. M., Doyle, S., & Kavanagh, K. (2004). Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia*, 158(1), 73-79.
- Rekha, A., (2011) Diversidad genética y genómica en banano (especies y cultivares de *Musa*) basada en el análisis D2 y marcadores RAPD. *INFOMUSA*, 10(2), 29-34.
- Rosewich, U. L., & Kistler, H. C. (2000). Role of horizontal gene transfer in the evolution of fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 38(1), 325-363.

- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K. & Cherry, J. M. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 287(5461), 2204-2215.
- Scharf, D. H., Heinekamp, T., Remme, N., Hortschansky, P., Brakhage, A. A., & Hertweck, C. (2012). Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(2), 467-472.
- Scharf, D. H., Brakhage, A. A., & Mukherjee, P. K. (2016). Gliotoxin bane or boon? *Environmental Microbiology*, 18(4), 1096-1109.
- Schwelm, A., & Bradshaw, R. E. (2010). Genetics of dothistromin biosynthesis of *Dothistroma septosporum*: an update. *Toxins*, 2(11), 2680-2698.
- Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2), 285-295.
- Shimizu, K., and N. P. Keller. (2001). Genetic involvement of cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 157, 591-600.
- Shirani-Bidabadi, S., Mahmood, M., Baninasab, B. y Ghobadi, C. (2012). Influence of salicylic acid on morphological and physiological responses of banana (*Musa acuminata* cv. 'Berangan', AAA) shoot tips to *in vitro* water stress induced by polyethylene glycol. *Plant Omics Journal*, 5, 33-39.
- SIAP. (2019). Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera [Online]. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>. [Acceso 29 de diciembre de 2019].
- Son, S. W., Kim, H. Y., Choi, G. J., Lim, H. K., Jang, K. S., Lee, S. O., Sung, N. & Kim, J. C. (2008). Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(3), 692-698.
- SPPC. (2012). Sistema Producto Plátano Chiapas, A. C. Plan rector 2012. Comité Estatal Sistema Producto Plátano Chiapas. Tapachula, Chiapas. Disponible en: [http://www.fec-chiapas.com.mx/sistema/biblioteca\\_digital/planrector-nonprot.pdf](http://www.fec-chiapas.com.mx/sistema/biblioteca_digital/planrector-nonprot.pdf) [Acceso 20 de Abril 2018].
- Stergiopoulos, I., van den Burg, H. A., Ökmen, B., Beenen, H. G., van Liere, S., Kema, G. H., & de Wit, P. J. (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of

- cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), 7610-7615.
- Stergiopoulos, I., V. Cordovez, B. Ökmen, H.G. Beenen, G.H. Kema y P.J.G.M. de Wit (2014). Positive selection and intragenic recombination contribute to high allelic diversity in effector genes of *Pseudocercospora fijiensis*, causal agent of the black leaf streak disease of banana. *Molecular Plant Pathology*, 15(5), 447-460.
- Stierle, A.A., Upadhyay, R., Hershenhorn, J., Strobel, G.A. and Molina, G. (1991) The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of Black Sigatoka disease of bananas and plantains. *Experientia*, 47, 853–859.
- Takahara, H., Toyoda, K., Tsuji, G., Kubo, Y., Inagaki, Y., Ichinose, Y., & Shiraishi, T. (2005). Identification of genes expressed during spore germination of *Mycosphaerella pinodes*. *Journal of General Plant Pathology*, 71(3), 190-195.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M. & Otani, H. (2013). Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 44-66.
- Vázquez-Euán, R., Chi-Manzanero, B., Hernández-Velázquez, I., Tzec-Simá, M., Islas-Flores, I., Martínez-Bolaños, L., Garrido-Ramírez, E. & Canto-Canché, B. (2019). Identification of new hosts of *pseudocercospora fijiensis* suggests innovative pest management programs for black sigatoka disease in banana plantations. *Agronomy*, 9(10), 666.
- Wakulinski W. 1989. Phytotoxicity of *Fusarium* metabolites in relation to pathogenicity. In *Fusarium Mycotoxins. Taxonomy and Pathogenicity*, Elsevier, 257-268.
- Wang, Y., Tang, H., DeBarry, J. D., Tan, X., Li, J., Wang, X. & Kissinger, J. C. (2012). MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Research*, 40(7), 49-49.
- Wilkinson, H. H., Ramaswamy, A., Sim, S. C., & Keller, N. P. (2004). Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia*, 96(6), 1190-1198.
- Yu, J., Butchko, R., Fernandes, M., Keller, N., Leonard, T., & Adams, T. H. (1996). Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene aflR from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Current Genetics*, 29(6), 549-555.
-

Ye, W., Zhang, W., Liu, T., Huang, Z., Zhu, M., Chen, Y., Li, Y., & Li, S. (2018). De novo transcriptome sequencing of the deep-sea-derived fungus *Dichotomomyces cejpilii* and analysis of gliotoxin biosynthesis genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1910.