



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN
DE LOS GENES *NBS-LRR* EN *Agave tequilana***

Tesis que presenta

GERARDO CAMPOS RIVERO

En opción al título de

DOCTOR 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 Gerardo Campos Rivero titulado "Caracterización y análisis de expresión de los genes NBS-LRR en Agave tequilana" fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en el Laboratorio de Marcadores Moleculares y Genómica Funcional del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer y el Dr. José Alberto Narváez Zapata, dentro de la opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

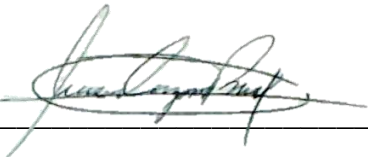
Atentamente:

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 21 de enero 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.



GERARDO CAMPOS RIVERO

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, en especial a la unidad de biotecnología, por proporcionar los equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

Al CONACYT, por la beca otorgada no. 2888867.

Centro de Biotecnología y Genómica del instituto politécnico nacional, por el espacio y el soporte técnico brindado durante la estancia para la evaluación de la patogenicidad de hongos asociados *A. tequilana*

Al laboratorio del Dr. Felipe A. Vázquez flota y a la M en C. Miriam Monforte González, por el espacio y soporte técnico brindado en el laboratorio durante el análisis de expresión de genes

A la Dra. Claudia patricia Larralde corona, por su apoyo y asesoría durante la estancia en el IPN.

A la Dra. Yahaira Tamayo Ordoñez, por la capacitación técnica del equipo Illumina eco real-time.

A mi asesor Dr. Felipe Sánchez Teyer, por la información académica brindada

A mi coasesor Dr. José A. Narváez Zapata, por su importante colaboración en el desarrollo del trabajo.

A la técnica Escalante Erosa, por el apoyo técnico durante el doctorado.

A las técnicas Erika a. De la cruz Arguijo y Socorro Ramírez, por el soporte técnico durante la estandarización de las técnicas enzimáticas, así como para la conservación de las cepas de hongos.

A mi comité evaluador y sinodales, Dra. Montserrat Calderón Santoyo, Dra. Cecilia Hernández Zepeda, Dra. Blondy Canto Canché, Dr. Luis Alfonso Sáenz, Dr. Manuel Martínez Estévez, Dra, Renata Rivera Madrid, Dr. José a. Narváez zapata y al Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer, por la asesoría brindada.

DEDICATORIAS

Agradezco a Dios, por la oportunidad de concluir uno más de mis objetivos y por haberme guiado en el camino.

A mis padres Ofelia Ma. Rivero y Efraín Campos, quienes con su ejemplo, amor, dedicación y apoyo incondicional ayudaron a concluir este proyecto.

A mi novia Samantha, por su apoyo, comprensión y ayuda durante todo el proceso.

Agradezco a mis hermanos Efraín y Gibran quienes estuvieron junto a mí durante todo el proceso apoyando en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio, por todo el apoyo brindado durante el proceso.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| LISTADO DE CUADROS | vii |
| LISTADO DE FIGURAS | viii |
| ABREVIATURAS | xi |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPÍTULO I | 3 |
| ANTECEDENTES | 3 |
| 1.1 Generalidades del género <i>Agave</i> L..... | 3 |
| 1.2 Problemática: El <i>Agave</i> frente al estrés biótico..... | 5 |
| 1.3 Otros microorganismos presentes en <i>A. tequilana</i> y su potencial patogénico | 6 |
| 1.4 Mecanismos de defensa..... | 7 |
| 1.4.1 Respuesta inducible | 7 |
| 1.4.2 Respuesta sistémica adquirida (SAR)..... | 9 |
| 1.4.3 Genes R (NBS-LRR)..... | 9 |
| 1.4 Relación infección-expresión de genes <i>NBS-LRR</i> | 12 |
| 1.5 Genes NBS-LRR y mejoramiento vegetal..... | 15 |
| JUSTIFICACIÓN | 16 |
| HIPÓTESIS | 16 |

| | |
|--|----|
| OBJETIVO GENERAL | 17 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 18 |
| CAPÍTULO II | 19 |
| IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS POTENCIALES ASOCIADOS A <i>Agave tequilana</i> var. azul* | 19 |
| 2.1 INTRODUCCIÓN | 19 |
| 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 2.2.1 Aislamiento de hongos..... | 22 |
| 2.2.2 Extracción de DNA, PCR y secuenciación | 22 |
| 2.2.3 Clonación | 24 |
| 2.2.3.1 Secuenciación y análisis bioinformático de las regiones ITS y 26s..... | 24 |
| 2.2.3.2 Análisis filogenéticos | 25 |
| 2.2.3.3 Conservación y selección de los microorganismos | 26 |
| 2.2.4 Ensayo de patogénesis <i>in vitro</i> | 26 |
| 2.2.5 Actividad enzimática de los extractos crudos. | 27 |
| 2.2.5.1 Obtención del extracto enzimático. | 28 |
| 2.2.5.1.1 Contenido de proteínas por el método de Bradford. | 28 |
| 2.2.5.1.2 Contenido de azúcares en el extracto crudo. | 28 |
| 2.2.5.2 Evaluación de la actividad pectinasa. | 28 |
| 2.3 RESULTADOS | 29 |

| | |
|---|----|
| 2.3.1 Aislamiento e identificación de organismos potencialmente patógenos asociados a <i>Agave tequilana</i> var. azul..... | 29 |
| 2.3.2 Identificación molecular de los organismos purificados..... | 31 |
| 2.3.3 Análisis filogenético de las regiones D1- D2 (LSU) y IST1-5.8s-ITS2 del rDNA | 32 |
| 2.3.4 Ensayo de patogenicidad..... | 40 |
| 2.4 DISCUSIÓN..... | 44 |
| 2.4.1 Identificación de los hongos aislados..... | 44 |
| 2.4.2 Ensayo de patogenicidad..... | 48 |
| CAPÍTULO III | 53 |
| ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES NBS-LRR EN <i>A. tequilana</i> DURANTE LA INFECCIÓN DE <i>Lasiodiplodia</i> | 53 |
| 3.1 INTRODUCCIÓN | 53 |
| 3.2 MATERIALES Y METODOS | 56 |
| 3.2.1 Material vegetal | 56 |
| 3.2.2 Aislamiento y caracterización de genes tipo <i>NBS-LRR</i> de <i>Agave tequilana</i> | 56 |
| 3.2.2.1 Amplificación de genes <i>NBS-LRR</i> en <i>Agave tequilana</i> | 56 |
| 3.2.2.2 Clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados | 56 |
| 3.2.2.3 Identificación de las secuencias..... | 57 |
| 3.2.2.4 Construcción de base de datos de secuencias tipo <i>NBS-LRR</i> del transcriptoma de <i>A. tequilana</i> | 58 |
| 3.2.3 Caracterización de las secuencias <i>NBS_Ateq</i> | 58 |

| | |
|--|----|
| 3.2.4 Análisis de diversidad y evolución en las secuencias NBS_Ateq..... | 58 |
| 3.2.5 Identificación de genes putativos de resistencia en <i>A. tequilana</i> | 59 |
| 3.2.6 Análisis de expresión de las secuencias candidatas de genes NBS-RR..... | 59 |
| 3.2.6.1 Diseño de cebadores específicos para secuencias tipo NBS-LRR de <i>Agave tequilana</i> | 59 |
| 3.2.6.2 Infección de plantas de <i>A. tequilana</i> | 61 |
| 3.2.6.2.1 Protocolo de infección..... | 61 |
| 3.2.6.3 Extracción de RNA del tejido infectado..... | 61 |
| 3.2.6.3.1 Síntesis de cDNA | 62 |
| 3.2.6.4 PCR tiempo real (expresión absoluta)..... | 62 |
| 3.3 RESULTADOS | 63 |
| 3.3.2 Identificación de genes NBS-LRR en el transcriptoma de <i>A. tequilana</i> | 69 |
| 3.3.3 Análisis de la diversidad y evolución de las secuencias NBS_Ateq..... | 73 |
| 3.3.4 Identificación de genes de resistencia a enfermedades | 78 |
| 3.3.5 Análisis de la expresión de los genes tipo NBS-LRR durante la infección del patógeno <i>Lasiodiplodia</i> | 83 |
| 3.3.5.1 Infección del tejido de <i>A. tequilana</i> con la cepa H7A (<i>Lasiodiplodia</i>) | 83 |
| 3.3.5.2 Confirmación de especificidad de los cebadores diseñados para los grupos I, II y V de genes tipo NBS-LRR identificados en <i>Agave tequilana</i> | 84 |
| 3.3.5.3 Análisis de la inducción de la expresión de <i>NBS_Ateq</i> en respuesta a la infección de <i>Lasiodiplodia</i> sp. | 87 |
| 3.4 DISCUSIÓN..... | 94 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.2 Caracterización de los genes <i>NBS_Ateq</i>..... | 96 |
| 3.4.2.1 Caracterización y análisis de la evolución de los genes <i>NBS_Ateq</i> | 96 |
| 3.4.3 Respuesta de los genes <i>NBS_Ateq</i> a la infección de <i>Lasiodiplodia</i> sp..... | 102 |
| CAPITULO IV | 105 |
| DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS..... | 105 |
| 4.1. DISCUSIÓN GENERAL..... | 105 |
| 4.2. CONCLUSIONES | 108 |
| 4.3. PERSPECTIVAS | 108 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 110 |
| ANEXOS | 137 |

LISTADO DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 2.1 Medios de cultivo empleados para la obtención del extracto enzimático crudo | 27 |
| Cuadro 2.2 Géneros identificados por análisis de secuencias D1- D2 (LSU) y IST1-5.8s-ITS2 del DNAr de cepas de hongos aislados en <i>A. Tequilana</i> . | 34 |
| Cuadro 2.3 Cepas identificadas empleando dos genes marcadores (D1-D2 LSDU y ITS1-5.8s-ITS2). | 38 |
| Cuadro 2.4 Necrosis y actividad pectinolítica de las cepas seleccionadas. | 43 |
| Cuadro 3.1 Secuencia de los cebadores empleados para la amplificación de genes tipo <i>NBS-LRR</i> en <i>Agave tequilana</i> . | 60 |
| Cuadro 3.2 Resultados de la búsqueda de homología (blastx) con proteínas R conocidas de otras plantas depositadas en el GenBank. | 67 |
| Cuadro 3.3 Características fisicoquímicas, dominios y análisis funcional de las proteínas NBS_Ateq. | 70 |
| Cuadro 3.4 Tiempo de duplicación y tipo de selección de las secuencias NBS_Ateq. | 77 |
| Cuadro 3.5 Homología entre NBS_Ateq y proteínas R de referencia de la base de datos PRGdb. | 79 |
| Cuadro 3.6 Homología de los fragmentos amplificados con integrantes de los grupos I, II y V. | 86 |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1. Plantación de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul. | 4 |
| Figura 1.2. Esquema de los dominios principales de las proteínas NBS-LRR..... | 12 |
| Figura 1.3. Expresión absoluta de los genes NBS-LRR evaluados por RT-qPCR | 15 |
| Figura 1.4. Estrategia experimental..... | 18 |
| Figura 2.1. Representación esquemática del vector pGEM®-T Easy..... | 24 |
| Figura 2.2. Esquema de la metodología utilizada para realizar el aislamiento e identificación de microorganismos asociados a <i>A. tequilana</i> var. azul. | 25 |
| Figura 2.3. Comparación de la sintomatología presente en la plantación con los síntomas reportados en el “Manual de manejo de enfermedades del <i>Agave</i> ” (Rubio, 2007). | 30 |
| Figura 2.4. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 85 volts por 15 minutos, teñido con bromuro de etidio mostrando el producto de amplificación de la región espaciadora del DNA ribosomal empleando los cebadores universales ITS-1 y ITS-4. | 31 |
| Figura 2.5. Proporción de los organismos identificados en <i>A. tequilana</i> | 33 |
| Figura 2.6. Árbol filogenético obtenido del análisis de las secuencias D1-D2 LSU y ITS1-5.8s-ITS2 concatenadas de las cepas aisladas y sus parientes más cercanos (Cuadro 2.3). | 36 |
| Figura 2.7. Ensayo de patogénesis por el método de punción y contacto de micelio.. | 41 |
| Figura 3.1. Amplificación de una región parcial del dominio NB-ARC de los genes <i>NBS-LRR</i> a partir de DNA de <i>Agave tequilana</i> | 64 |
| Figura 3.2 Agrupamiento construido con 21 secuencias de proteínas R (TNL y CNL) | 66 |
| Figura 3.3. Análisis filogenético y búsqueda de motivos conservados para secuencias NBS_LRR de <i>Agave tequilana</i> | 75 |

Figura 3.4. Infección de tejido de hojas de *A. tequilana* con la cepa H7A de *Lasiodiplodia*.
..... 83

Figura 3.5. Hongo aislado de tejido infectado de *Agave tequilana* infectado con la cepa H7A 84

Figura 3.6. Amplificación con los cebadores específicos NBS_U, NBS_1A, NBS_2A, NBS_5B de DNA de *Agave tequilana*. 85

Figura 3.7. Expresión global en número de copias expresadas a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 HPI de genes tipo *NBS-LRR*..... 88

Figura 3.8. Número de copias expresadas a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 HPI de genes tipo *NBS-LRR* para el grupo NBS_I..... 89

Figura 3.9. Número de copias expresadas a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 HPI de genes tipo *NBS-LRR* para el grupo NBS_II..... 91

Figura 3.10. Número de copias expresadas a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 HPI de genes tipo *NBS-LRR* para el grupo NBS_V. 92

Figura 3.11. Porcentaje de representatividad en la expresión global de la expresión de los grupos I, II, V durante las primeras 48 horas postinfección del hongo *Lasiodiplodia*..... 93

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| Avr | Proteínas de avirulencia |
| CAM | Metabolismo Ácido de las crasuláceas |
| CRT | Consejo Regulador del Tequila |
| ETI | Inmunidad Activada por Efectores |
| HR | Respuesta hipersensible |
| Mya | Millones de años |
| NBS-LRR | Nucleotide-Binding Site-leucine-rich repeat |
| NOM | Norma Oficial Mexicana |
| PAMPs | Patrón Molecular asociado a patógenos |
| PTI | Inmunidad Activada por Patrones |
| QTL | Locus de carácter cuantitativo |
| AFLP | Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados |
| RFLP | Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción |
| pb | Pares de base |
| RNAG | Rendimiento neto de ácido galacturónico |
| MW | Peso molecular |
| iP | Punto isoeléctrico |
| HPI | Horas después de la infección |
| SA | Ácido salicílico |
| SAR | Resistencia Sistémica Adquirida |
| TSA | Transcriptome Shotgun Assembly |

RESUMEN

Agave tequilana es ampliamente cultivada para producir el tequila y otros compuestos de interés comercial. Este cultivo tiene un manejo agronómico intensivo, que incluye un período de cultivo de cinco a diez años para alcanzar la madurez fisiológica antes de poder ser cosechado. Durante este tiempo, las plantas son vulnerables a distintos patógenos que pueden mermar la producción. Los principales patógenos descritos son hongos, por lo que es importante conocer a los microorganismos asociados e identificar los posibles patógenos. En este trabajo se aislaron treinta cepas fúngicas de hojas de esta planta que mostraban algún síntoma de enfermedad, como marchitez, hojas rizadas, manchas negras entre otras. En total fueron identificados 11 géneros a través del análisis de las regiones D1/D2 del rDNA, así como de la región comprendida entre los espaciadores ITS1-ITS2. La mayoría de los organismos identificados pertenecen al filo Ascomycota, donde destacan los géneros *Lasiodiplodia* y *Neoscytalidium* por ser los más abundantes. Otros géneros como *Cladosporium*, *Cytospora*, *Epicoccum*, *Flavodon*, *Myrmaecium*, *Penicillium*, *Peniophora*, *Purpureocillium*, *Trametes* y *Fusarium* también fueron identificados. De algunos de éstos se conocía su potencial patogénico en otras plantas, sin embargo, en algunos otros no se ha descrito su papel como patógenos en plantas de *A. tequilana*. El potencial patogénico de algunas de estas cepas fue evaluado para la selección de cepas que sean capaces de inducir la expresión de los genes *NBS-LRR* en plantas de *A. tequilana*, ya que se sabe que estos genes están involucrados en las respuestas fisiológicas al estrés, particularmente en la infección patogénica. A la par, se realizó la caracterización de los genes tipo NBS en *A. tequilana* donde fueron identificadas regiones parciales del gen *NBS-LRR* en el DNA genómico que posteriormente fueron empleadas para recuperar secuencias del Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) de *A. tequilana*. En total se recuperaron 46 secuencias TSA que se clasificaron dentro de la clase no-TIR, las cuales a su vez se agruparon en cinco subclases (CNL, CN, NL, N y L). Las secuencias identificadas se caracterizaron con base en propiedades fisicoquímicas, estructura de genes y análisis de motivos, anotación funcional y ontología de genes. En general, todas las secuencias analizadas codifican proteínas *NBS-LRR* funcionales. El análisis filogenético mostró que estos genes se agruparon en cinco grupos (grupo I-V). La estructura del gen y la composición del motivo estaban altamente conservadas dentro de cada grupo ($K_a/K_s < 1$) pero fueron divergentes

entre ellas. Estos grupos están bajo una presión de diversificación con excepción del grupo V ($K_a/K_s = 1.23$) el cual es de formación reciente (9 Mya). Se diseñaron cebadores específicos para cada grupo y la respuesta de expresión se verificó experimentalmente. Se usó la cepa patógena H30 (*Lasioidiplodia*) aislada en *A. tequilana* para inducir una respuesta al estrés en estas plantas y analizar la expresión de estos genes. La inducción de transcripción de los genes *NBS-LRR* más alta se obtuvo a las 48 h después de la infección para el grupo I, que tienen hasta 84 y 50 veces más de activación con respecto a los grupos II y V, respectivamente. El perfil de expresión fue diferente entre los diferentes grupos de genes *NBS-LRR*, lo que sugiere que cada grupo puede tener una función específica en la respuesta de defensa a los patógenos.

ABSTRACT

Agave tequilana is widely cultivated to produce tequila and other compounds of commercial interest. This crop has an intensive agronomic management, which includes a cultivation period of five years to reach physiological maturity before it can be harvested. During this time, plants are vulnerable to different pathogens that can reduce production, the main pathogens described are fungi, so it is important to know the associated microorganisms and identify possible pathogens. In this work, thirty fungal strains were isolated from leaves that showed some symptoms of disease, such as wilting, curly leaves, black spots among others. In total 11 genera were identified through the analysis of the D1/D2 regions of the rDNA as well as the region between the ITS1-ITS2 spacers. Most of the organisms identified belong to the Ascomycota, among them the genus *Lasiodiplodia* and *Neoscytalidium* were the most abundant. Other genera such as *Cladosporium*, *Cytospora*, *Epicoccum*, *Flavodon*, *Myrmaecium*, *Penicillium*, *Peniophora*, *Purpureocillium*, *Trametes* and *Fusarium* were also identified. The pathogenic potential of some of these genera is well known in other plants, however, some of them had not been described previously as pathogens of *A. tequilana*. The pathogenic potential of some of these strains was evaluated for the selection of strains that are capable of inducing the expression of NBS-LRR genes in *A. tequilana* plants, since it is known that these genes are involved in physiological stress responses, particularly in pathogenic infection. At the same time, the characterization of the NBS type genes in *A. tequilana* was performed, resulting in the identification of partial regions of the NBS-LRR gene in genomic DNA, that were subsequently used to recover sequences from the transcriptome shotgun assembly (TSA) from *A. tequilana*. In total, 46 TSA sequences were recovered and were classified within the non-TIR class, which are divided into five subclasses (CNL, CN, NL, N and L). The identified sequences were characterized based on physicochemical properties, gene structure and motif analysis, functional annotation and gene ontology. In general, all the sequences analyzed encode functional NBS-LRR proteins. Phylogenetic analysis showed that these genes were grouped into five groups (group I-V). The structure of the gene and the composition of the motif were highly conserved within each group ($K_a/K_s < 1$) but divergent among them. These groups are under a pressure of diversification with the exception of group V ($K_a/K_s = 1.23$) which is of recent formation (9 Mya). Specific primers were designed for each group and the expression response was verified experimentally. A

strain of pathogenic agave *Lasiodiplodia* was used to induce a stress response in the leaves of *A. tequilana*. The highest transcription induction of the NBS-LRR genes was obtained at 48 h after infection for group I, which have up to 84 and 50 times more activation with respect to groups II and V, respectively. The expression profile was different among different families of NBS-LRR genes, suggesting that each group may have a specific role in the defense response to pathogens.

INTRODUCCIÓN

Agave tequilana pertenece a la clase Liliopsida, de la familia Asparagaceae; el tequila es uno de los principales productos obtenidos a partir de estas plantas, el cual, en el periodo del 2017-2018 generó ingresos cercanos a los \$100 mil millones de pesos. Sin embargo, estas plantas son afectadas por diversos patógenos, que en décadas anteriores han llevado a pérdidas en la producción. En general las plantas están continuamente sujetas a estrés biótico y abiótico y esto puede conducir a pérdidas en los rendimientos de los cultivos (Wang *et al.*, 2017) y debido a esto, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa contra el ataque de patógenos (Glazebrook, 2005). Estas defensas pueden ser barreras físicas o mecanismos inducibles como el PTI (*Pattern Triggered Immunity*, por sus siglas en inglés) (García y Lozoja, 2004), aunque estos pueden ser evadidos por los patógenos, para lo cual las plantas han desarrollado otros mecanismos como el ETI (*Effector Triggered Immunity*, por sus siglas en inglés) (Dodds y Rathjen, 2010), en el cual algunas proteínas receptoras (proteína R) reconocen a las proteínas secretadas por los patógenos. Estas proteínas R están codificadas por genes que forman parte de una gran familia (Michelmore y Meyers, 1998; Saha *et al.*, 2013). La mayoría de las proteínas R están codificadas por un grupo de genes llamados NBS-LRR (Jones y Dangl, 2006). La presencia de estos genes NBS-LRR, así como los cambios en la expresión, se relacionan con la resistencia de las plantas contra las enfermedades causadas por diferentes patógenos (Diener y Ausubel, 2005; Xiao *et al.*, 2001; Borhan *et al.*, 2010). En general, se sabe poco sobre la respuesta de estos genes a la infección por hongos patógenos en *A. tequilana*. Por lo que el objetivo principal de este estudio fue caracterizar los genes *NBS-LRR* de *A. tequilana* para su clasificación e inferir su historia evolutiva a través del análisis de sus secuencias. Adicionalmente se evaluó su expresión durante el estrés biótico, causado por hongos del género *Lasiodiplodia* sp, para identificar posibles genes de resistencia contra éste u otros patógenos que puedan servir como marcador molecular para una selección temprana de individuos, para la mejora de este cultivo.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Generalidades del género *Agave* L.

La subfamilia Agavoideae es una de las siete subfamilias pertenecientes a la familia Asparagaceae según la APG IV (Chase *et al.*, 2016), aunque algunos autores consideran laxa esta clasificación y proponen reconocer a la familia Agavaceae, la cual consta de 25 géneros y 637 especies incluidas en dos subfamilias Yuccoideae y Agavoideae (Judd *et al.*, 2016). Se ha reportado que el 75% de estas especies se localizan en México, de las cuales el 69% son endémicas (Narvaez-Zapata y Sanchez-Teyer, 2009; Good-Avila *et al.*, 2006). En México, el género *Agave* tiene importancia económica debido a sus numerosas aplicaciones como materia prima para la producción de bebidas alcohólicas, obtención de fibras, fructanos y biodiesel (Nava-Cruz *et al.*, 2015), entre otras. Entre las especies de agave con mayor influencia económica destacan: *Agave angustifolia*, *A. deserti*, *A. fourcroydes*, *A. lechuguilla*, *A. mapisaga*, *A. sammian*, *A. sisalana*, *A. tequilana*, *A. utahensis* y *A. vilmoriniana* (Alfaro-Rojas *et al.*, 2007).

El género *Agave* pertenece a la clase Liliopsida (monocotiledónea), orden Asparagales y familia Asparagaceae, subfamilia Agavoideae. Se encuentra distribuido principalmente en América hacia los ambientes semiáridos, sin embargo, se ha descrito que puede crecer en diferentes condiciones ambientales (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008). Son plantas perennes, cuyas hojas están dispuestas en espiral y acomodadas en forma rosetas en el ápice de un tallo. Las hojas son suculentas, fibrosas con la base dilatada y carnosa y el extremo final tiende a adelgazarse y terminar en una espina, su forma varía de lineal a lanceolada u ovalada, el tamaño y número de hojas es variable que pueden ir desde 5 hojas hasta 200 o más (García-Mendoza, 2007; Gentry, 2004).

Estas plantas son xerófitas, tienen especializaciones morfológicas como una estrategia para vivir en suelos semiáridos; su ciclo de vida va de 5 a 20 años (García-Mendoza, 2007; Eguiarte *et al.*, 2000) y tienen un metabolismo CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*, por sus siglas en inglés) lo que les permite establecerse en climas semiáridos (Cushman, 2001). Las plantas con este metabolismo tienen una serie de adaptaciones en

la fotosíntesis para poder vivir en estos climas. Una de las principales adaptaciones es la fijación de carbono que realizan durante la noche y el transporte de electrones durante el día, para evitar la pérdida de agua (Al-Turki *et al.*, 2014). Otra adaptación importante que les permite sobrevivir a estos climas, son sus hojas suculentas, que almacenan grandes cantidades de agua, permitiendo resistir periodos prolongados sin lluvia o riego (Sayed, 2001), además, las plantas CAM tienen la posibilidad de adaptar la tasa fotosintética dependiendo de la temperatura (Yamori *et al.*, 2014). Todo esto hace que el género *Agave* pueda establecerse en zonas con poca precipitación y de altas temperaturas.

El género *Agave* tiene como centro de origen México, se sabe que desde hace más de 750 años se producen bebidas alcohólicas a partir de la fermentación de distintas especies de *Agave* (Nava-Cruz *et al.*, 2015). El Tequila es una de las bebidas alcohólicas más populares derivada del *Agave* y de acuerdo a la norma NOM- 006- SCFI- 1994 únicamente puede ser preparada mediante la cocción de la piña de *Agave tequilana* Weber var. azul (Figura 1.1) (Diario Oficial de la Federación, 1993).

Según el consejo regulador del tequila (CRT), en el periodo 2017-2018 se produjeron un total 580 millones de litros, equivalente a 290 millones de litros por año, de los cuales 363 millones de litros fueron exportados hacia Estados Unidos y Europa (CRT Consejo Regulador del Tequila, 2019) ubicándolo como uno de los principales productos de exportación de México.



Figura 1.1. Plantación de *Agave tequilana* Weber var. azul.

1.2 Problemática: El Agave frente al estrés biótico

Existen comunidades microbianas asociadas a las plantas de *Agave*, algunos de estos microorganismos tienen un papel benéfico para ellas, sin embargo, existen otros que son agentes causales de enfermedades que pueden llevar a la muerte de la planta (Beltran-Garcia *et al.*, 2015; Sánchez y Rebolledo, 2010; Farr *et al.*, 2006). Los principales microorganismos que han sido descritos como potencialmente patógenos en *A. tequilana* son *Erwinia* sp y *Fusarium oxysporum* ambos asociados a la pudrición de cogollo y al marchitamiento prematuro en plantas de *A. tequilana* (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2014).

Algunos factores como la propagación asexual y el cultivo intensivo en forma de monocultivo, ha ocasionado serios problemas fitosanitarios (Vega-Ramos *et al.*, 2013), ambos factores presentes en el cultivo de *A. tequilana*. Por ejemplo, el terreno cultivado con *A. tequilana* sobrepasa las 100,000 hectáreas en los estados de Jalisco, Nayarit, Michoacán, Guanajuato y Tamaulipas (Martínez-Palacios *et al.*, 2011) y la principal manera de propagación de estas plantas es asexual (Eguiarte *et al.*, 2000). Todo ello junto con el cambio climático pueden favorecer el surgimiento de nuevas crisis fitosanitarias debido al surgimiento de variantes de los fitopatógenos, incrementando la incidencia de algunas enfermedades, sobre todo por hongos (Dracatos *et al.*, 2019; Flores-López *et al.*, 2016).

En décadas recientes los cultivos de *A. tequilana* de la zona productora de tequila, han sido afectados por algunas enfermedades. En el 2010 el 35% de las plantas de esta región productora, mostraban algún síntoma de enfermedad, principalmente el marchitamiento prematuro y la pudrición de cogollo y raíz (CRT Consejo Regulador del Tequila, 2010), síntomas comúnmente asociados con *Fusarium oxysporum*. Se han aislado distintas cepas de este hongo en cultivos comerciales de *A. tequilana*, y se asume que este es el principal agente causal de la marchitez prematura del *Agave* (Rubio, 2007). Este hongo tiene una amplia diversidad genética que le permite desarrollarse y adaptarse a distintos hospederos y condiciones medioambientales (Vega-Ramos *et al.*, 2013). Al final, el estrés causado por los patógenos lleva a la pérdida de la planta o a la disminución del crecimiento lo que ocasiona una pérdida del rendimiento y una baja en la producción del tequila como sucede en otras plantas como *Gossypium* afectada por *Verticillium dahliae* (Li *et al.* 2018; Atkinson y Urwin, 2012).

1.3 Otros microorganismos presentes en *A. tequilana* y su potencial patogénico

Las plantas no son organismos aislados en el medio ambiente, están en constante interacción con distintos organismos, tanto que son consideradas “Holobiontes” es decir que tienen relaciones simbióticas con varios microorganismos (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015). Algunos estudios sobre la comunidad procariota asociada a *A. tequilana* han demostrado la abundancia y riqueza de este tipo de microorganismos. Los principales taxa identificados son Acinetobacter, Bacillus, Lecleria, Stenotrophomas, Agrobacterium y Rhizobiales (Coleman-Derr *et al.*, 2016), algunos de los cuales tienen roles benéficos sobre el crecimiento de la planta (Goudjal *et al.*, 2018; Alström *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2016; Santoyo *et al.*, 2016; Bérdy, 2005; Bull *et al.*, 2005; Madigan *et al.*, 1984;). Sin embargo, también interactúan con microorganismos patogénicos para *A. tequilana* como *Erwinia* sp (Rubio, 2007).

Dentro de estas comunidades microbianas también se han descrito diferentes géneros de hongos pertenecientes a los ordenes Pleosporales, Sordariales, Hypocreales, Capnodiales, Eutoriales, Botryosphaerales y Valsariales; dentro de los cuales destacan los géneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Neoscytalidium* y *Lasiodiplodia* (Campos-Rivero *et al.*, 2019; Coleman-Derr *et al.*, 2016) los cuales han sido descritos como patógenos en *A. tequilana* y otras especies (Nouri *et al.*, 2018; Campos-Rivero *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2017; Duque-Bautista *et al.*, 2017; Allende *et al.*, 2013; Ávila-Miranda *et al.*, 2010), al igual que los hongos *Colletotrichum* sp, *Cercospora* sp, *Phytophthora* sp, *Alternaria mexicana*, *Rhizoctonia solani* también descritos como patógenos para el género *Agave* (Rubio, 2007).

Debido a este gran número de interacciones con las comunidades microbianas, las plantas han desarrollado mecanismos que las ayudan a reconocer a estos organismos. Estos mecanismos ayudan a promover el establecimiento de los que sean benéficos y defenderse de los patógenos.

1.4 Mecanismos de defensa

Las plantas están constantemente expuestas a patógenos, es por ello que han desarrollado mecanismos de defensa que les permitan sobrevivir a pesar de la presencia de estos microorganismos (Dodds y Rathjen, 2010). Estos mecanismos pueden dividirse en dos grupos:

- Mecanismos de defensa preexistentes.- Formados por características estructurales de la pared celular y la presencia de algún compuesto de actividad antimicrobiana (Jones y Takemoto, 2004).
- Mecanismos de defensa inducibles. - Conformado por la síntesis de *novo* de compuestos antimicrobianos, en respuesta a la presencia de algún patógeno (Cipollini *et al.*, 2003).

1.4.1 Respuesta inducible

La respuesta inducible a microorganismos patogénicos en plantas está basada en dos etapas. La primera es el mecanismo basal de defensa. Este sistema puede ser activado por algunos inductores, los cuales son señales de la presencia del patógeno, tales como la flagelina de las bacterias, los liposacáridos y la quitina presente en hongos (Jones y Takemoto, 2004). Este tipo de moléculas son conocidas como PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) por sus siglas en inglés. En esta etapa participan algunos receptores de membrana que reconocen a los PAMPs, llamados Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR) (Zipfel, 2014). Recientemente se ha descrito que incluso los microorganismos no patogénicos desencadenan la respuesta primaria de defensa, por lo que también se conocen como MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) (Bent y Mackey, 2007).

En la segunda etapa, la defensa le corresponde al mecanismo basado en el reconocimiento de proteínas efectoras secretadas por los patógenos, mediado por proteínas propias de la planta (Giraldo y Valent, 2013). Los factores *avr* son reconocidos por las proteínas R, productos de los genes *R* del hospedero, las cuales le confieren una mayor resistencia; esta etapa es llamada por sus siglas en inglés ETI (Effector-Triggered Immunity)(Keen, 1990). Debido a que las proteínas *Avr* son abundantes y varían de

organismo a organismo y generalmente no están conservadas entre los patógenos, las proteínas R, son codificadas por un amplio número de genes (Michelmore y Meyers, 1998) para poder responder a la gran variedad de efectores producido por diversos patógenos. Se cree que esto es debido a la relación uno a uno entre los genes *R* y los genes *Avr* en el patógeno, lo que se le conoce como resistencia gen por gen (Dodds y Rathjen, 2010). Las proteínas R forman parte del sistema inmune adaptativo el cual está sujeto a diversificación y selección (Bent y Mackey, 2007). Sin embargo, existe otra hipótesis acerca de la forma en la que las proteínas R detectan la presencia de las proteínas *Avr*, por medio del monitoreo de las proteínas objetivos de las proteínas *Avr*. Esta hipótesis llamada “guardián” propone que el reconocimiento de las proteínas *Avr* indirecta, en esta hipótesis las proteínas R monitorean cambios en proteínas del hospedero a causa de la acción de las proteínas *Avr*, lo que resulta en la activación de las proteínas R (van der Biezen y Jones, 1998; Dangl y Jones, 2001).

La interacción directa ha sido demostrada entre algunas proteínas R y *Avr*, por ejemplo, *Pita/AvrPita*, *L/AvrL567*, *PopP2/RRS* entre otros (Dodds *et al.*, 2006; Deslandes *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2000), sin embargo, son pocos los ejemplos que se conocen. En cuanto a las interacciones indirectas son más los ejemplos que se han descrito, el mejor ejemplo que se ha estudiado es el de la proteína RIN4 que interactúa con la proteína de resistencia RPM1. La proteína RIN4 es fosforilada o degradada por *AvrB*, *AvrRpm1* y *AvrRpt2* respectivamente (Kim *et al.*, 2005; Mackey *et al.*, 2002), cambios que son detectados por RPM1 iniciando la cascada de señalización para la defensa de la planta.

La respuesta ETI está asociada con la muerte celular programada; a esta respuesta se le conoce como respuesta hipersensible (HR) (Morel y Dangl, 1997). Una vez reconocidos los patógenos se activa la respuesta hipersensible, la cual limita el crecimiento del patógeno en el sitio de infección (Glazebrook, 2005). La respuesta HR, está caracterizada por la presencia de manchas cafés y/o negras formadas por las células muertas en el sitio de la infección. En este tipo de respuesta se crea una barrera física para impedir la proliferación y propagación de los patógenos (Fu y Dong, 2013; Heath 2000), así mismo esta respuesta se asocia con elevados niveles de la hormona de crecimiento vegetal ácido salicílico (SA), un regulador con una función clave en los mecanismos de respuesta y resistencia a patógenos, así como a la síntesis de proteínas relacionadas a patogénesis,

resultando en la ganancia de resistencia de amplio espectro en contra de infecciones y es por ello que se asocia al establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Fu y Dong, 2013; Durrant y Dong, 2004).

1.4.2 Respuesta sistémica adquirida (SAR)

La respuesta sistémica adquirida (SAR), es un tipo de respuesta secundaria que permite que las partes no infectadas de la planta sean resistentes al ataque de patógenos. Esta respuesta se desencadena por un incremento en la concentración de Ácido Salicílico (SA) durante la respuesta HR, por su parte, el incremento de SA es tomado como una señal por la planta para la inducción de la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta como los genes *PR* (Pathogenesis-related) que codifican para proteínas como las quitinasas y glucanasas (Ward *et al.*, 1991). En la respuesta SAR, la proteína NPR1 es la que censa la señal de SA e interacciona con algunos factores de transcripción TGA, actuando como un coactivador transcripcional de los genes *PR* permitiendo la síntesis de proteínas de defensa para proteger a la planta de futuras infecciones (Gao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2010b; Dong, 2004).

1.4.3 Genes R (NBS-LRR)

Los genes de resistencia en plantas se conocen como genes R, los cuales han sido clasificados en cinco clases, diferenciadas principalmente por los dominios presentes en las proteínas para las cuales codifican (van Ooijen *et al.*, 2007; Ellis *et al.*, 2000):

- Genes que codifican para proteínas con dominios ricos en leucina (LRR) anclados con un dominio transmembrana (Ellis *et al.*, 2000).
- Genes que codifican para proteínas con dominio cinasa de serina y treonina (Ellis *et al.*, 2000).
- Genes que codifican para proteínas con dominio de actividad cinasa, que codifican para proteínas de actividad cinasa pero con un dominio extracelular LRR (Meyers *et al.*, 1999).
- Genes que codifican para proteínas con un dominio transmembranal anclado a un dominio coiled coil (Meyers *et al.*, 1999).

- La clase más numerosa de estos genes está representada por aquellos que codifican para las proteínas con sitios de unión a nucleótidos (NBS), repeticiones ricas en leucinas (LRR) y una región variable en el dominio amino y carboxy-terminal (Figura 1.2) (McHale *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2003; Dangl y Jones, 2001; Ellis *et al.*, 2000) llamados como NBS-LRR.

Dentro de la clase NBS-LRR existen dos subfamilias, ambas involucradas en el reconocimiento del patógeno (Meyers *et al.*, 1999). Éstas están definidas por la presencia de los dominios Toll/interleukin-1 receptor (TIR) o coiled-coil (CC) en el extremo amino terminal, debido a la presencia de estos dominios se clasifican como proteínas TIR-NBS-LRR o CC-NBS-LRR. Las proteínas TIR-NBS-LRR son poco frecuentes en las monocotiledóneas, mientras que las proteínas CC-NBS-LRR están presentes tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (Bai *et al.*, 2002; Meyers *et al.*, 1999).

Cada uno de los dominios presentes en las proteínas NBS-LRR tiene una función específica, algunos participan en la activación de los mecanismos de defensa, así como en el reconocimiento del patógeno. Por ejemplo, el dominio NBS está constituido por tres subdominios conservados, el ARC1, ARC2 y ARC3 que dan forma a la estructura del dominio (Tan y Wu, 2012). Cabe destacar que el subdominio ARC3 está ausente en plantas, aunque los subdominios ARC1 y ARC2 están conservados (Bent y Mackey, 2007). Dentro del dominio NBS se conocen algunos motivos característicos, como el motivo P-loop definido con la secuencia consenso GxxxxGKS/T, el motivo Walker B o cinasa 2 definido como hhhhDD/E (h representa residuos hidrofóbicos), donde el residuo D/E es importante ya que actúa como la base para la reacción de hidrólisis. Otros motivos que han sido identificados son RNBS-A, -B, -C y -D, el motivo MHD localizado en el subdominio ARC-2 y el motivo GLPL (Takken *et al.*, 2006a).

Se ha propuesto que el dominio NBS sirve como un interruptor de encendido y apagado, donde la hidrólisis del ATP induce a cambios configuracionales requeridos para regular la transducción de señales (Leipe *et al.*, 2004). En ausencia del patógeno, la proteína NBS-LRR está en un estado inactivo, en presencia del patógeno la proteína cambia su configuración permitiendo la liberación del dominio NBS el cual, por medio de la adición de fósforo a una molécula de adenosín difosfato (ADP), cambia a su estado activo,

estabilizando el estado conformacional activo e iniciando la activación de la señalización (Slootweg *et al.*, 2013; Eitas y Dangl, 2010; Collier y Moffett, 2009).

La función del dominio N-Terminal es de señalización; como se menciona anteriormente este es variable en las proteínas NBS-LRR, pueden tener la presencia del dominio TIR, cual tiene una topología que consiste en cinco hebras paralelas de láminas β , cinco hélices α y conectado por loops entre las láminas β y α que contiene residuos altamente conservados, los cuales sirven para el reclutamiento de proteínas involucradas en la señalización (Xu *et al.*, 2000). Las proteínas CNL contienen un dominio coiled-coil en el dominio N-Terminal, formado por α hélices, también involucrado en la señalización (Mucyn *et al.*, 2006).

El dominio repetido rico en leucina (LRR) es el único dominio presente en todos los tipos de proteínas R. Este dominio está involucrado en la interacción proteína-proteína durante el reconocimiento repeticiones de láminas β con un núcleo consenso de xxLxLxx (Enkhbayar *et al.*, 2003). En plantas las repeticiones individuales están formadas por residuos que contienen la secuencia consenso de LxxLxxLxLxxC/Nxx. Lo que forma la lámina β , unido a regiones en forma de loop y cada repetición es separada por regiones de longitud variable (Kobe y Kajava, 2001). Distintos estudios han demostrado que el dominio LRR está involucrado en el reconocimiento de Avr específicos, y esta especificidad se ve alterada con cambios menores en estos dominios (Dodds *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2000).

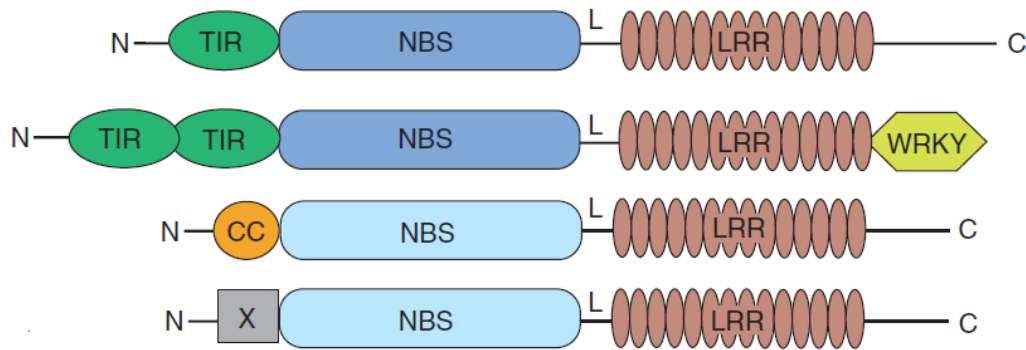


Figura 1.2. Esquema de los dominios principales de las proteínas NBS-LRR. N, dominio amino terminal; TIR, dominio Toll/interleukin-1 receptor; CC, dominio coiled coil; X, dominio sin motivo CC; NBS, nucleotide binding site; L, linker; LRR, dominio repetido rico en leucinas; WRKY, factor de transcripción tipo dedos de Zinc; C, dominio carboxil terminal (Tomado de; McHale *et al.* 2006).

El genoma de las plantas puede codificar para cientos de genes NBS-LRR que pueden ir desde 50 a 653 o más genes dependiendo de la especie, los cuales se pueden dividir en diferentes subclases (Porter *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2009), lo que sugiere que los genes están sometidos a una constante evolución (Marone *et al.*, 2013). Estos genes aparentemente están distribuidos irregularmente en los cromosomas y su distribución y organización depende de la especie (Lozano *et al.*, 2012; Tan y Wu, 2012; Li *et al.*, 2010; Porter *et al.*, 2009; Ameline-Torregrosa *et al.*, 2007). Los genes NBS-LRR están organizados ya sea como genes únicos o como grupos de genes ligados que se asume que es para facilitar la evolución de los genes R (Hulbert *et al.*, 2001), esto con la finalidad de generar nuevos genes R, que ayuden a la resistencia de la planta.

1.4 Relación infección-expresión de genes *NBS-LRR*

Se ha descrito que la presencia de uno solo de estos genes puede conferir resistencia hacia ciertos patógenos, como por ejemplo el gen *Rph1* del tipo NBS el cual confiere resistencia a *Puccinia hordei* en *Hordeum vulgare* (Dracatos *et al.*, 2019) y en *Musa acuminata* ssp. *Malaccensis*, el gen candidato a resistencia RGC2 contra *Fusarium oxysporum forma specialis (f. sp.) cubense (FOC) race 4* (Peraza-Echeverria *et al.*, 2008). Sin embargo, no solo la presencia del gen se asocia a la resistencia, existe evidencia de la relación en el incremento de la expresión de genes *NSB-LRR* en

respuesta a la presencia de patógenos (Li *et al.*, 2018; Dale *et al.*, 2017; Shimizu *et al.*, 2014; Radwan, 2010), también se ha descrito que el nivel de respuesta en los cambios de expresión, está relacionado con el grado de resistencia o susceptibilidad de la planta al patógeno (Xu *et al.*, 2018; Shimizu *et al.*, 2014). En cultivos como girasol (*Helianthus annuus* L.) el incremento de la expresión de la subfamilia de genes tipo *CC-NBS-LRR* en respuesta a la infección causada por el hongo *Puccinia helianthi* es diferencial entre líneas resistentes y susceptibles (Radwan, 2010). En ambos casos se observa una expresión de este gen, sin embargo, se observa una mayor expresión en las líneas resistentes en comparación con las líneas susceptibles. Además, se ha demostrado que el gen candidato a resistencia “RGC260” es segregado a la progenie junto con la característica de resistencia al patógeno (Radwan, 2010), lo que supone una posible asociación entre el nivel de expresión de los genes R y la resistencia.

Se tiene otro ejemplo con algunos genes tipo NBS-LRR identificados en *B. rapa* que responden a la infección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, los cuales tienen una mayor expresión en líneas resistentes. Para dos de estos genes candidatos a resistencia (*Bra012688* y *Bra012689*) se comprobó que están asociados con la característica de resistencia ya que cosegregan junto con ella (Shimizu *et al.*, 2014). Comportamientos similares también son observados en genes tipo CNL (*GbaNA1*) en la especie *Gossypium barbadense* resistente a la infección de *Verticillium dahliae* (Li *et al.*, 2018). Sin embargo, se sabe que una mayor expresión no siempre está relacionada con una mayor resistencia ya que es necesario que las proteínas NBS-LRR sean capaces de reconocer efectores específicos del patógeno; si la proteína no reconoce el efector no podrá mediar el mecanismo de respuesta, a pesar de que ésta se encuentre en abundancia (Shimizu *et al.*, 2014; Dangl y Jones, 2001; Van Der Vossen *et al.*, 2000). Es probable que pueda existir una mayor expresión pero que no genere proteínas NBS funcionales por lo que no tendría efectos sobre la resistencia de la planta, mediada por la presencia de *pseudogenes* (Marone *et al.*, 2013; Meyers *et al.*, 2003). También se han descrito casos en los que la sobreexpresión de estos genes confiere resistencia hacia patógenos por medio de una respuesta no específica. Un ejemplo de esto es el gen NBS *ZmNBS42* aislado de plantas de *Zea mays* L., el cual incrementa su expresión en respuesta a *Bipolaris madis*, sin embargo, al ser sobreexpresado en plantas de *Arabidopsis thaliana* este mejora la resistencia a *Pseudomonas syringae*, probablemente debido a que la

expresión de este gen lleva a una mayor síntesis de ácido salicílico, una hormona vegetal que relaciona la regulación de genes de defensa (*PR*) contra patógenos (Xu *et al.*, 2018).

En 2016, Tamayo-Ordoñez *et al.*, reportaron que la expresión de los genes *NBS-LRR* en respuesta a estrés biótico causado por *Erwinia carotovora* en *A. tequilana* var. azul, presenta niveles más elevados de expresión que algunas especies poliploides como *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* (Figura 1.3). Esto podría sugerir que *A. tequilana* es más resistente que sus contrapartes poliploides, lo que discrepa con reportes previos, ya que se ha descrito que las especies poliploides tienden a ser más tolerantes a estrés abiótico y biótico en comparación con las especies diploides (Yang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013).

En *A. tequilana* es interesante conocer cómo se comporta la expresión de estos genes en presencia alguno de los principales patógenos para esta planta, tales como *Fusarium oxysporum*, *Neoscytalidium sp*, *Cercospora agavicola*, *Colletotrichum sp* o *Lasiodiplodia sp*. y comparar la expresión de estos genes entre plantas infectadas y no infectadas, con el objetivo de conocer si la resistencia está relacionada con la expresión de estos genes *NBS-LRR*. En un futuro esta información puede ser empleada para el desarrollo de programas de selección de genotipos resistentes para evitar una nueva crisis fitosanitaria.

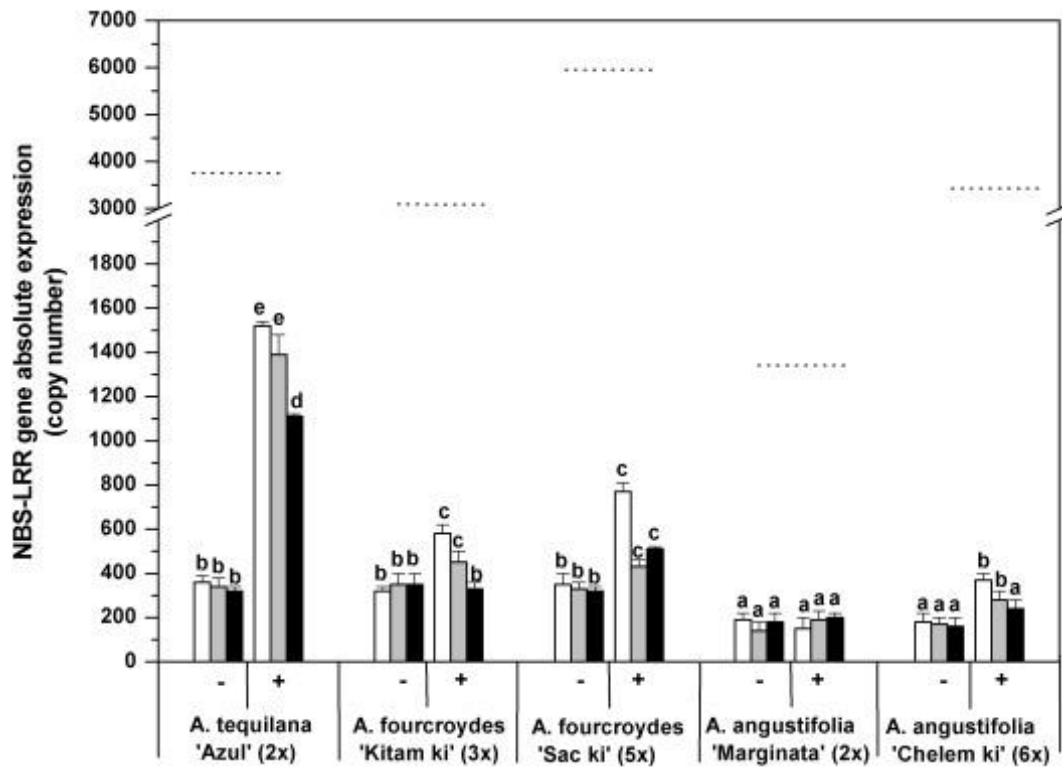


Figura 1.3. Expresión absoluta de los genes NBS-LRR evaluados por RT-qPCR a las 0.5, 5 y 12 h después de la infección con *Erwinia caratovora* (Smith) Yabuuch (+). Explantes infectados (-) explantes sin infectar. La línea punteada indica la representatividad (número de copias) de este gen por cada una de las accesiones de *Agave* (Tomado de; Tamayo-Ordóñez *et al.*, 2016).

1.5 Genes NBS-LRR y mejoramiento vegetal

Actualmente se está en búsqueda de cultivares que resistan el estrés biótico con el fin de mantener la calidad del cultivo y maximizar las ganancias económicas derivadas. En algunas especies como en arroz (*Oryza sativa* L.), se han caracterizado estos genes, lo que permitió el desarrollo de marcadores específicos para hacer la selección asistida por marcadores de genotipos que sean de interés. Mientras que para otras especies como en soya (*Glicine max* L.) se han identificado QTLs, ligando los genes NBS-LRR con la resistencia a patógenos (Kang *et al.*, 2012; Shang *et al.*, 2009), esta información permitirá el desarrollo de nuevas estrategias para el mejoramiento de la resistencia a estrés abiótico. En el mejoramiento de cultivos se han aplicado estrategias que implican los métodos convencionales de cruce o selección de materiales élite y su propagación *in vitro* (Das, 1992; Jain, 2001). Sin embargo, es posible que mediante la caracterización de los genes NSB-LRR se puedan desarrollar marcadores moleculares, cuya aplicación para la

caracterización y selección de genotipos, puede acelerar la obtención de cultivares más resistentes (Gómez *et al.*, 2009; Todorovska *et al.*, 2009).

JUSTIFICACIÓN

El cultivo intensivo de *A. tequilana*, puede afectar la diversidad de los genes *NBS-LRR* y provocar diferencias en la susceptibilidad frente a diferentes patógenos. Aún se desconoce si la mayor expresión de estos genes en esta especie esta relacionada con una mayor resistencia, corroborar la relación entre la expresión de los genes *NBS-LRR* y la resistencia es fundamental para el desarrollo de programas de selección asistida por marcadores moleculares que permitan la selección de plantas con resistencia a ciertos patógenos. El estudio de los genes *NBS-LRR* permitirá la generación de conocimiento básico y aplicado para conocer los mecanismos de regulación y función de estos, los cuales son una opción para el mejoramiento de la resistencia a patógenos en cultivares de importancia comercial. La obtención de plantas menos susceptibles a patógenos a través de los programas de mejora puede producir mejores rendimientos del cultivo y minimizar las pérdidas económicas ocasionadas por los patógenos. Para ello, el objetivo del trabajo es caracterizar los genes *NBS-LRR* que se expresen durante estrés biótico en *A. tequilana*. La información obtenida podrá permitir la selección de genes *NBS-LRR* involucrados en la resistencia frente a patógenos generando la base para un programa de selección asistida por marcadores moleculares.

HIPÓTESIS

Si la expresión de genes *NBS-LRR* en *A. tequilana* está relacionada con la resistencia a patógenos, entonces se espera que en plantas de *A. tequilana* infectadas por hongos patógenos exista mayor expresión de los genes *NBS-LRR* que estén involucrados con el mecanismo de resistencia.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación de los genes *NBS-LRR* con la resistencia a la infección de hongos patógenos asociados a *Agave tequilana* Weber var. azul, por medio del análisis de la expresión de estos genes durante la infección.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y seleccionar hongos patógenos potenciales asociados a la especie *A. tequilana* var. azul.
- Caracterizar secuencias candidatas de los genes *NBS-LRR* en *A. tequilana* Weber var. azul.
- Analizar la expresión de los genes *NBS-LRR* en plantas de *A. tequilana* Weber var. azul durante la infección de los hongos patógenos aislados de *A. tequilana*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

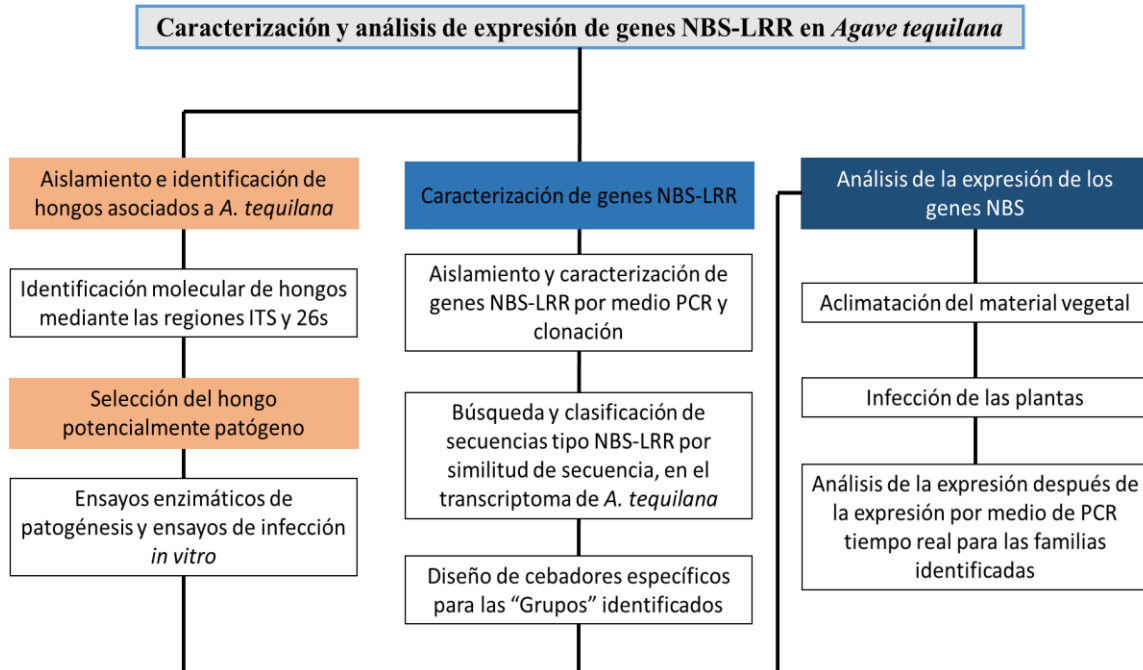


Figura 1.4. Estrategia experimental

CAPÍTULO II

IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS POTENCIALES ASOCIADOS A *Agave tequilana* var. azul*

2.1 INTRODUCCIÓN

Se conoce que algunos microorganismos se encuentran asociados al *Agave*, pero, existe poco conocimiento sobre los beneficios o el daño que estos pudieran ocasionarles a las plantas (Desgarenes *et al.*, 2014). Se han descrito relaciones benéficas que se forman entre los *Agaves* y algunos microorganismos, que ayudan al desarrollo de la planta (Pimienta-Barrios *et al.*, 2009; Obledo *et al.*, 2003) por ejemplo: *Acinetobacter* sp., *A. baumannii*, *A. bereziniae*, *Cronobacter sakazakii*, *Klebsiella oxytoca*, *Gluconobacter oxydans* y algunas cepas no patogénicas del hongo de hongos *Fusarium* sp. (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2014; Obledo *et al.*, 2003).

Sin embargo, también se han descrito asociaciones con hongos y bacterias que generan enfermedades en las plantas, tal es el caso de las bacterias *Erwinia cacticida*, *E. carotovora*, *Pantoea agglomerans* y los hongos principalmente *Fusarium oxysporum* y otros como *Cercospora agavicola*, *Asterina mexicana*, *Colletotrichum* sp. y *Alternaria* sp. (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Rubio, 2007; Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004). Poco es lo que se ha descrito acerca de la actividad patogénica de estos hongos en *Agave*; por lo que es necesario clarificar el potencial patogénico de los microorganismos asociados a los agaves.

***Bioprospecting for fungi with potential pathogenic activity on leaves of *Agave tequilana* Weber var. azul.** Campos-Rivero, G., Sánchez-Teyer L.F., de la Cruz-Arguijo E., Ramírez-González M., Larralde-Corona Claudia P. y Narváez-Zapata J.A. *Journal of Phytopathology*, 167 (5) 283-294. <https://doi.org/10.1111/jph.12797>

Se han descrito distintas herramientas moleculares para la identificación de microorganismos, como: el uso del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP por sus siglas en inglés) (Carolis *et al.*, 2014), ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), RAPD (Randomly Amplified Polymorphism DNA) (Slemmons *et al.*, 2013; Gorzelak *et al.*, 2012), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Abass, 2013; Vega-Ramos *et al.*, 2013), entre otros. Sin embargo, una de las técnicas mayormente empleadas para la identificación de microorganismos es la secuenciación de regiones específicas del DNA, como los espaciadores internos del DNA ribosomal (ITS, por sus siglas en inglés), regiones de la subunidad pequeña (SSU) y la subunidad grande (LSU) (Stockinger *et al.*, 2010). En cuanto a estos marcadores de DNA, el ITS se refiere a dos regiones no codificantes del DNA nuclear; el ITS1 que se localiza entre los genes ribosomales 18S y 5.8S y el ITS2 entre los genes 5.8S y 26S, mientras que la subunidad pequeña (SSU) y la subunidad grande (LSU) se han empleado con mayor frecuencia para la inferencia filogenética de hongos filamentosos (Bruns *et al.*, 1992; Wilmotte *et al.*, 1993). Otras regiones del DNA como el gen del factor de elongación 1α (*TEF-1\alpha*) (O'Donnell *et al.*, 2009; Msiska y Morton, 2009) y el gen de la poligalacturonasa (*Pg1*, *Pg5*, *Pgx1*, *Pgx4*) (Hirano y Arie, 2009) también son empleadas para la identificación de hongos. Para la identificación específica de los hongos, se ha empleado ampliamente el gen de la poligalacturonasa ya que permite una mejor identificación a nivel de formas especiales (organismos que infectan a plantas específicas). No obstante, el acercamiento multigen donde se incluyen los ITS, el 26S y el gen de la poligalacturonasa (O'Donnell *et al.*, 2004) es de las estrategias más empleadas para la clasificación.

Ha habido diferentes estudios que describen la diversidad de hongos filamentosos asociados a plantas del género *Agave*, de los cuales algunos tienen el potencial de ser patógenos en estas plantas, como los hongos del género *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium* (Coleman-Derr *et al.*, 2016). Pero con excepción del género *Fusarium*, no existen reportes que midan el potencial patogénico de estos hongos sobre *A. tequilana*.

Se sabe que los cultivos de *Agaves* son susceptibles a distintas enfermedades que causan pérdidas económicas importantes (Dalton, 2005). Es probable que la limitada

diversidad microbiana observada en cultivos de *A. tequilana* comparados con especies nativas como *A. salmiana* y *A. deserti*, sea consecuencia del monocultivo de esta especie. El monocultivo de *A. tequilana*, es uno de los factores que contribuyen a la pérdida de microorganismos benéficos (Hilton *et al.*, 2013), esta pérdida puede estar influyendo en la mayor susceptibilidad, ya que se sabe que algunas bacterias y hongos tienen la capacidad de potenciar la resistencia de las plantas, así como también incrementar la nutrición de éstas (Desgarenes *et al.*, 2014). Por otra parte, el monocultivo de *A. tequilana* también es uno de los factores que contribuyen a la pérdida de la diversidad genética y esto puede hacer más susceptible a este cultivo a las enfermedades (Vega-Ramos *et al.*, 2013).

A la fecha, es poco lo que se sabe sobre los microorganismos asociados a las plantas de *Agave*, así como su papel benéfico o dañino en estas plantas (Desgarenes *et al.*, 2014). A pesar de que ya han sido identificadas algunas bacterias y hongos como patógenos de *A. tequilana* (Vega-Ramos *et al.*, 2013), se debe determinar el potencial patogénico de estos microorganismos asociados a *A. tequilana*.

Reportes previos mencionan la relación directa de la presencia de la enzima poligalacturonasa con el potencial patogénico de diferentes cepas de hongos (Álvarez *et al.*, 1999; Di Pietro y Roncero 1996), aunque en *Agave* no se ha descrito la relación de la actividad enzimática de la poligalacturonasa para ninguno de los principales patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum* sp, entre otros. Es probable que la actividad enzimática de la poligalacturonasa pudiera estar directamente relacionada con la capacidad de infección en otros hongos, lo que pudiera llevar a la identificación de posibles nuevos patógenos y la confirmación de la capacidad de enfermar a *A. tequilana* de organismos previamente descritos asociados a estas plantas.

Por lo que el objetivo de estudio fue el aislamiento de hongos asociados al *Agave* y la identificación hongos que sean potencialmente patógenos, empleando herramientas moleculares para la identificación y ensayos enzimáticos para la determinación del potencial patogénico.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Aislamiento e identificación de organismos potencialmente patógenos en plantas de *Agave tequilana* var. azul

El muestreo fue realizado en marzo 2016 en la plantación “Mayapan” de *A. tequilana* localizada en la ciudad de Valladolid, Yucatán (20° 43′31.6″N; 88° 21′22.4″W). La colecta se llevó a cabo de acuerdo con el Manual contra las pestes del *Agave* considerando cuadrantes de 30 plantas (Castro-Valera, 2003). Catorce plantas con presencia de algún síntoma de enfermedad de entre 1 y 6 años fueron seleccionadas. Una sección de la hoja fue removida, procurando cubrir el área con el daño. Las secciones de hojas con los síntomas relacionados a punta seca, marchitez foliar o marchitez de raíz fueron almacenados en solución de Ringer y transportadas para el aislamiento de los microorganismos.

2.2.1 Aislamiento de hongos

Las muestras de tejido con síntomas evidentes de enfermedad fueron cortadas en pequeñas secciones y se transfirieron tubos Eppendorf con 500 µl de agua estéril. Se agitó con vórtex y la fase líquida se usó para preparar una solución con Agua estéril (1:10, v:v). Una alícuota de 100 µL de la solución fue dispersada por el método de extensión en superficie en medio PDA (Agar 15 g/L; Dextrosa 20 g/L, extracto de papa 20 g/L; Sigma - Aldrich, México) para el crecimiento de los microorganismos. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 72 h, las colonias de hongos crecidas en el medio se purificaron transfiriendo muestras monospóricas a medio PDA fresco. Los cultivos puros de hongos se mantuvieron a la luz a temperatura ambiente, hasta obtener suficiente micelio para extraer el DNA genómico (Figura 2.2).

2.2.2 Extracción de DNA, PCR y secuenciación

La extracción de DNA se realizó siguiendo el método propuesto por Raeder and Broda (1985). Todas las colecciones se procesaron bajo el siguiente procedimiento: Las cepas aisladas fueron inoculadas en 20 mL de YPD (BD Difco, EE.UU.) y se incubó a 29 °C con agitación a 250 rpm, durante 2 a 3 días. Posteriormente el material celular se cosecho por

centrifugación y se hicieron lavados con agua estéril para eliminar el medio de cultivo restante, de esta forma se obtuvo la biomasa de cada cepa. De la biomasa fresca se agregaron ~40 a 50 mg de material celular (micelio) en tubos de 1.5 mL Axygen®. Éstas fueron congeladas en nitrógeno líquido durante 30 min, enseguida a cada tubo se agregaron 500 µL de solución amortiguadora de extracción a temperatura ambiente (200 mM Tris HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS), se maceró con pistilo, y se incubó durante 10 min. Después se añadieron 500 µl de fenol-cloroformo (1:1, v/v) frío (4 °C), la mezcla se agitó en vórtex durante 5 min y se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregaron 400 µl de cloroformo frío (-20 °C) la mezcla se agitó en vórtex por 1 min antes de centrifugarse a 13,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 4 µL de RNAsa (10 mg ml⁻¹), la mezcla se incubó 30 min a 37 °C con agitación de 300 rpm. Luego se adicionaron 500 µL de isopropanol frío a 4 °C, se mezcló suavemente por inversión, y fue incubada a -20 °C por 15 min. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se desechó. A cada tubo se le añadieron 500 µl de etanol al 70% a -20 °C y se mezcló por inversión suave antes de centrifugarse a 13,000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante se desechó. Para evaporar los residuos del solvente, los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, el DNA obtenido fue resuspendido con 50 µl de agua ultra pura y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La visualización del DNA se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La electroforesis se corrió durante 45 min a 80 volts, se cargaron 5 µl por pozo de las muestras de DNA amplificado (Figura 2.2).

Las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y D1-D2 LSU fueron amplificadas usando los cebadores ITS-1 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' y ITS-4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'; y NL1 5'GCATATCAATAAGCGGGAGGAAAAG3' y NL4 5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3', respectivamente (O'Donnell, 1993; White *et al.*, 1990). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (2720 Thermal Cycler; Applied Biosystems), con un volumen final de 25 µl que consistió en 1.5 mM de MgCl₂, 1X de amortiguador de PCR, 0.8 mM de dNTP, 0.4 µM de cada cebador, 1.5 U de Taq polimerasa y 10 ng de templado de DNA. Las condiciones de amplificación para la región ITS1-5.8S-ITS2 fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de tres pasos: 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 1 min y una elongación final de 10 min a 72 °C. Las condiciones de

amplificación para los cebadores 26s fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, 35 ciclos de tres pasos: 94 °C por 30 s, 61 °C por 30 s, 72 °C por un minuto y una extensión final de 72 °C por 10 minutos (Figura 2.2d). La visualización de los productos de PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñido con SYBR Green utilizando un fotodocumentador de U.V.

2.2.3 Clonación

Los fragmentos obtenidos de ITS-5.8S-ITS2 fueron clonados en el vector pGEM®-T Easy (Figura 2.1) y posteriormente se transformaron células competentes de *E. coli* INVαDH10b por choque térmico. Las células transformadas fueron seleccionadas por resistencia a 50 µg/ml de ampicilina. Se realizó la ligación del fragmento en el vector pGEM®-T Easy como indica el fabricante, para la reacción se emplearon: de 2X buffer de DNA ligasa, 50 ng de pGEM T-easy, 5 µl de producto de PCR, 10U DNA ligasa T4 y se aforó a 10 µl con agua ultrapura.

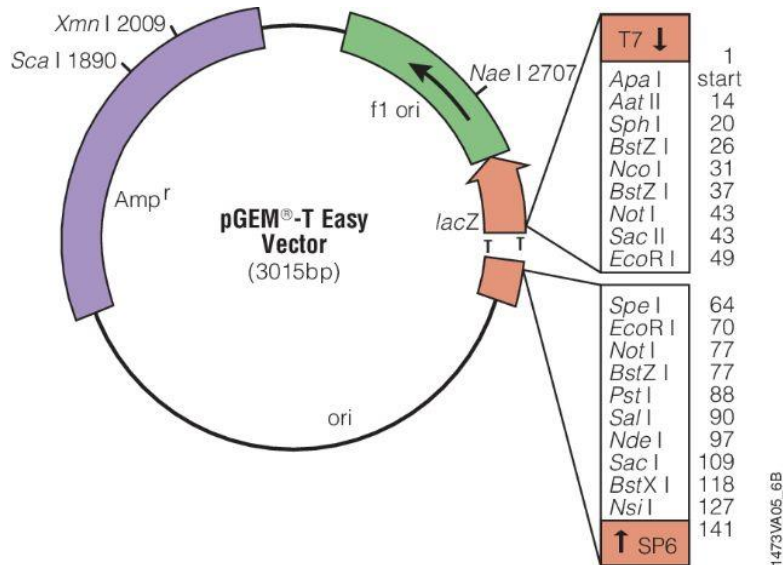


Figura 2.1. Representación esquemática del vector pGEM®-T Easy.

2.2.3.1 Secuenciación y análisis bioinformático de las regiones ITS y 26s

Los productos de amplificación de la región D1-D2 LSU fueron directamente secuenciados empleando los cebadores originales por medio del secuenciador ABI Prism

3130 (Applied Biosystem). Los fragmentos de la región ITS1-5.8S-ITS2 fueron clonados y posteriormente enviados secuenciar a MACROGEN (Gasandong, Geumchen-gu), en Seoul, Corea, empleando el cebador universal M13.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron editadas, para lo cual se procedió a obtener los archivos en formato FASTA, para cada región (ITS1-5.8S-ITS2 y D1-D2 LSU). En cada secuencia se ubicó la secuencia de reconocimiento *Eco* RI “GAATTC” se cortó la secuencia restante e dirección 3’ y la secuencia de reconocimiento *Eco*-RI “ACTAGAGAATTC” y se cortó la secuencia restante en dirección 5’, esto para eliminar la secuencia del vector o cualquier residuo de los mismos (Figura 2.2).



Figura 2.2. Esquema de la metodología utilizada para realizar el aislamiento e identificación de microorganismos asociados a *A. tequilana* var. azul. a) estrategia de aislamiento del tejido con síntomas de enfermedad; b) Aislamiento y purificación de microorganismos a partir del tejido colectado; c) extracción de DNA de cultivos puros para la identificación molecular de los microorganismos aislados; d) amplificación de las regiones ITS y 26S; e) secuenciación y análisis bioinformático para la identificación.

2.2.3.2 Análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas para ambas regiones ITS1-5.8S-ITS2 y D1-D2 LSU, fueron comparadas con la base de datos del GenBank usando la herramienta blastn del programa BLAST®. Las secuencias fueron preliminarmente alineadas por medio de

Clustal W y después se reconstruyó un árbol filogenético usando el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Los taxa más relacionados (género o especie) fueron seleccionados para la construcción del árbol filogenético por medio del modelo de mínima evolución. Para ciertos clados fue necesario confirmar la separación de éstos usando otros algoritmos como el método de unión de vecinos y el método de máxima verosimilitud. Finalmente, un tercer árbol fue construido con las secuencias concatenadas de ambas regiones usando el modelo de mínima evolución. Todos fueron construidos con un remuestreo de 1,000 réplicas.

2.2.3.3 Conservación y selección de los microorganismos

Los organismos aislados se mantuvieron por medio de resiembras periódicas en placas de agar papa dextrosa (PDA). Las esporas de los hongos son conservadas en glicerol al 1.5% a -80 °C, para su uso posterior en los ensayos de infección. Para el inóculo se utilizó micelio obtenido a partir de crecimientos de 72 h en placas con medio PDA. La selección de los microorganismos para los ensayos de patogenicidad se realizará con base a la representatividad de las cepas aisladas y si se han reportado anteriormente como patógeno para *Agave*.

2.2.4 Ensayo de patogénesis *in vitro*

El análisis de patogenicidad fue desarrollado en secciones cortadas de hojas de *A. tequilana*. Para esto la superficie de las hojas fue desinfectada con hipoclorito de sodio al 1%, posteriormente fue enjuagada con agua destilada estéril y se dejó secar a temperatura ambiente. La infección de tejido de plantas de *Agave*, se llevó a cabo por dos métodos. El primero, el método de infección por punción consiste en realizar una herida de 2mm en la superficie del tejido empleando una aguja, posteriormente inocular 10 µl de una solución de esporas en la herida. La suspensión de esporas de los hongos seleccionados fue preparada por medio de la recolección de esporas provenientes de cultivos de una semana, inundando las placas y recolectando la suspensión para después ajustar a una concentración de 1×10^4 por mililitro. El segundo método consistió en la inoculación directa de micelio vegetativo (3 mm²), obtenido del margen exterior de las colonias. Solo las cepas representativas de los principales hongos identificados fueron seleccionadas para el ensayo de patogénesis, además fue incluida la cepa del género

Fusarium sp (Fv4O3) aislada de *Zea mays* como control positivo de patogénesis (Leyva-Madrigal *et al.*, 2017), por último se incluyó un tratamiento sin infección como control negativo.

El desarrollo de la enfermedad fue documentado cada 24 horas durante siete días. El porcentaje de necrosis fue calculado en relación con el total de píxeles que constituye el área necrosada en relación al total de píxeles que constituyen el área total de la sección infectada de la hoja (2 × 2 cm) el conteo de píxeles se realizó usando Photoshop® ver. 2017. Para la selección de los píxeles oscuros se empleó la herramienta Magic Wand tool con una tolerancia de 1. El total de píxeles fue cuantificado usando la herramienta histograma. El porcentaje de necrosis se calculó dividiendo el número de píxeles oscuros de la sección afectada entre el total de píxeles de la sección de hoja × 100. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

2.2.5 Actividad enzimática de los extractos crudos.

La actividad de pectinasa fue evaluada como medida indirecta del potencial patogénico (Asoufi *et al.*, 2007). Se inocularon medios YPD modificados (Cuadro 2.1) con muestras de micelio (2 × 2 mm) para la inducción de la actividad enzimática. y se pusieron en agitación por 72 h a 300 rpm a 30 °C. Las células fueron homogenizadas y después se recuperó el sobrenadante (extracto enzimático crudo total).

Cuadro 2.1 Medios de cultivo empleados para la obtención del extracto enzimático crudo

| Medio | Extracto de levadura (g/L) | Peptona (g/L) | Dextrosa (g/L) | Extracto de hoja de Agave (g/L) |
|-------|----------------------------|---------------|----------------|---------------------------------|
| YPD | 10 | 20 | 20 | 0 |
| YPD-A | 5 | 10 | 5 | 100 |
| YP-A | 10 | 20 | 0 | 100 |

2.2.5.1 Obtención del extracto enzimático.

El extracto enzimático total se obtuvo a las 72 h. Los contenidos totales de los medios de cultivo fueron transferidos a tubos Falcón de 50 mL (Beckman Coulter). Posteriormente estos se centrifugaron a 7000 rpm por 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante en un tubo falcón nuevo y el precipitado se llevó peso seco para conocer la biomasa que se produjo. El sobrenadante obtenido se utilizó directamente como extracto enzimático. El total de proteínas fue determinado por el método de Bradford y la actividad enzimática fue medida por medio del método DNS como la cantidad de ácido galacturónico liberado.

2.2.5.1.1 Contenido de proteínas por el método de Bradford.

Se construyó una curva patrón de concentraciones desde 0.2 hasta 1 mg/ml de albumina sérica bovina. Las mediciones se realizaron como se describe a continuación: Se añadió 1.5 ml del reactivo de Bradford y 0.05 ml de la solución patrón o la muestra. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se procedió a medir por triplicado cada una de las muestras en el espectrofotómetro a 595 nm.

2.2.5.1.2 Contenido de azúcares en el extracto crudo.

Los azúcares residuales en el medio después de la fermentación fue medido por medio de la técnica de DNS para azúcares reductores (apartado 2.2.5.2). Se construyó una curva patrón a partir de una solución stock de glucosa 10 g/L. Esta curva fue empleada para determinar la concentración residual de azúcares en el extracto enzimático crudo, los cuales fueron medidos por triplicado para cada uno de los medios empleados.

2.2.5.2 Evaluación de la actividad pectinasa.

La actividad pectinolítica de los extractos crudos se determinó en reacciones que contenían 9 ml de una solución de pectina al 0.5% y 0.1 ml del extracto crudo. La solución de pectina se preparó en un amortiguador de acetato de sodio 50 mM a pH 5 ($C_2H_3NaO_2$) (Maturano *et al.*, 2012). Las reacciones fueron incubadas a 30 °C por 30 min según Di Pietro and Roncero, (1996) con modificaciones. Posteriormente se realizó la cuantificación de ácido galacturónico, como se menciona en el apartado 2.2.5.1. Se construyó una curva

patrón a partir de soluciones de ac. galacturónico a partir de concentraciones de 0 a 7 mg/ml. La cuantificación del ac. galacturónico liberado por la actividad de los extractos crudos se midió con la misma técnica de DNS.

La cantidad de azúcares reductores liberada se calculó restando la concentración inicial de azúcares del extracto crudo a la cantidad de azúcares reductores liberados después de la reacción enzimática. Una cantidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima que produce un μmol de azúcares por minuto por mg de proteína, bajo las condiciones del ensayo.

Para la preparación del reactivo DNS, se pesaron 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 30 g de tartrato de Na y K y 16 g de NaOH, aforando a 1 L de agua estéril. Se colocó en tubos Eppendorf de 2 ml 0.95 ml de DNS con 0.05 ml de la muestra a analizar, se incubó por 8 min a una temperatura de 80 °C por 8 min, después los tubos fueron colocados en hielo durante 15 min, una vez frío, el contenido de los tubos fue transferido a celdas para leer la absorbancia a 580 nm.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Aislamiento e identificación de organismos potencialmente patógenos asociados a *Agave tequilana* var. azul

Los principales síntomas observados en la plantación fueron: la mancha anular, punta seca, mancha marginal o marchitez foliar, tizón o pudrición seca (Figura 2.3). De acuerdo al manual de plagas y enfermedades del *Agave* estos síntomas pueden ser causados por microorganismos de los géneros *Didymosphaeria* sp, *Nectria* sp, *Fusarium* sp, *Alternaria* sp, *Phoma* sp, *Cercospora agavicola*.

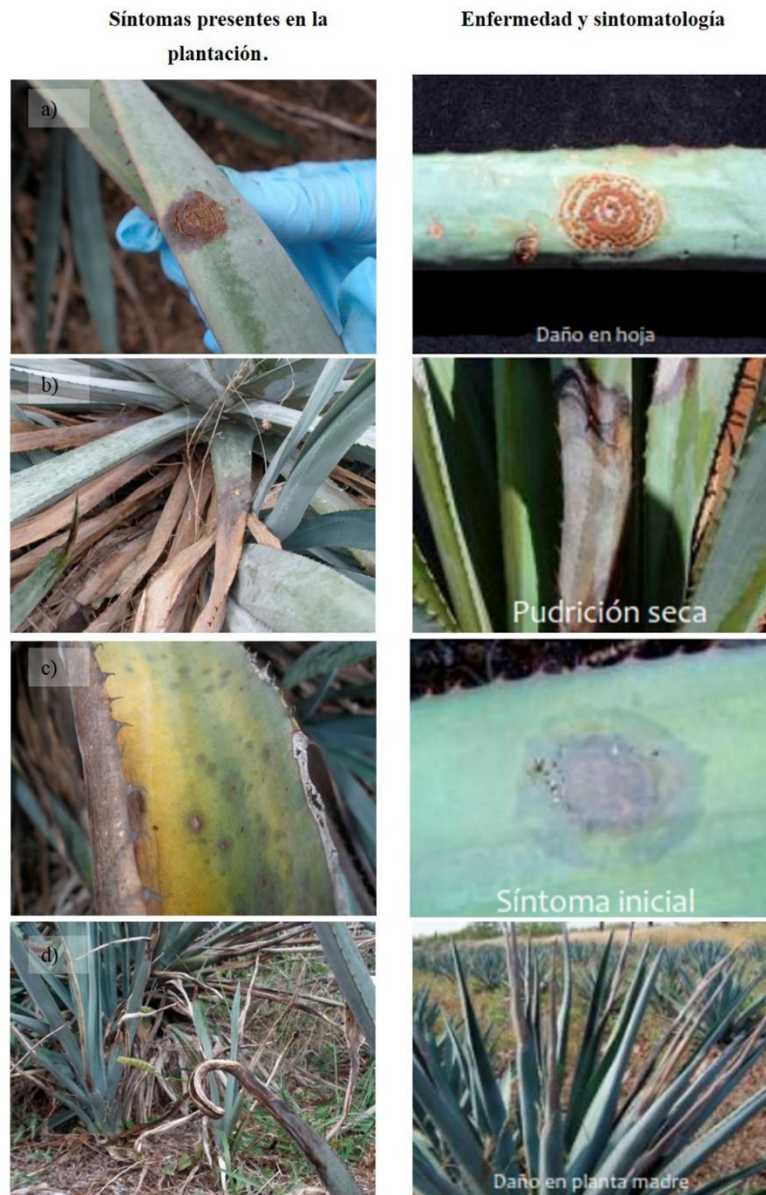


Figura 2.3. Comparación de la sintomatología presente en la plantación con los síntomas reportados en el “Manual de manejo de enfermedades del *Agave*” (Rubio, 2007). Columna de la izquierda corresponde a las plantas de la destilería “Mayapan”; Columna de la derecha corresponde a imágenes tomadas del manual de manejo de enfermedades. a) Mancha anular (*Didymosphaeria* sp y *Nectria* sp); b) Tizon (*Cercospora agavicola*, *Fusarium oxysporum*); c) Mancha marginal o marchitez foliar (*Phoma* sp y *Alternaria* sp); d) Punta seca (*Fusarium* sp y *Alternaria* sp).

De los tejidos colectados, se aislaron en total 30 cepas de hongos filamentosos de los cuales se obtuvieron colonias purificadas con distintas morfologías de colonia (Anexo 1). Estas colonias puras fueron empleadas para la obtención de micelio para la extracción de DNA y para hacer la identificación molecular por medio del secuenciamiento de los fragmentos amplificados para las regiones D1-D2 e ITS1 y ITS4.

2.3.2 Identificación molecular de los organismos purificados

Se obtuvo el DNA genómico total a partir de micelio, obtenidos de los cultivos purificados. Una vez que se obtuvo el DNA, se verificó su integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa (Anexo 2). Se amplificaron las regiones del rDNA LSU D1-D2 y los espaciadores ITS1-5.8S-ITS2 (Figura 2.4). El tamaño de fragmento amplificado corresponde al tamaño esperado para ITS (aproximadamente 500 pb) y D1-D2. Se obtuvieron las secuencias de los fragmentos amplificados, estas fueron depuradas y fueron empleadas para la identificación de los microorganismos mediante la comparación de estas secuencias con secuencias de las mismas regiones de hongos depositadas en el GenBank.

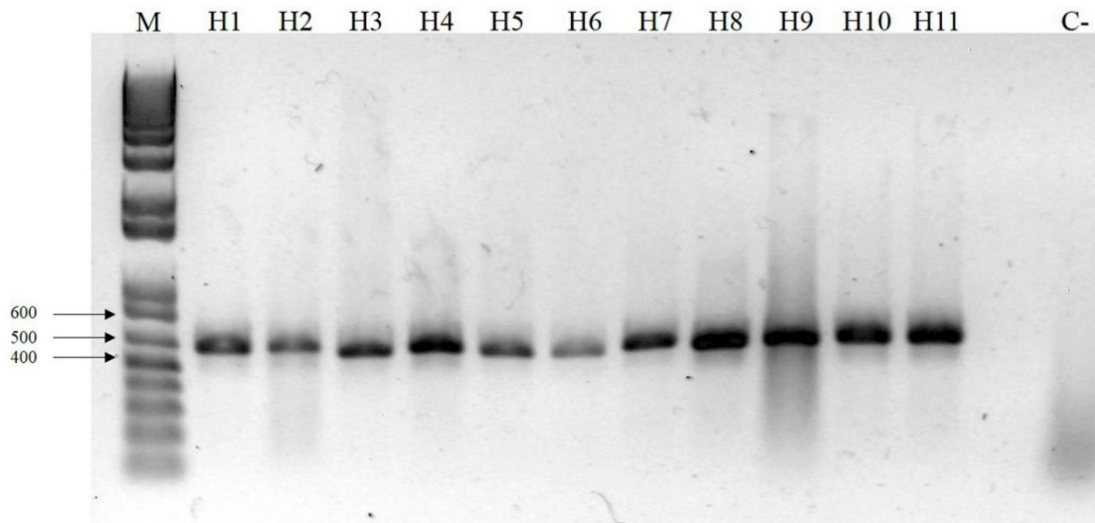


Figura 2.4. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 85 volts por 15 minutos, teñido con bromuro de etidio mostrando el producto de amplificación de la región espaciadora del DNA ribosomal empleando los cebadores universales ITS-1 y ITS-4. Carriles H1- H11: cepas aisladas (ver Tabla 4); M: marcador 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen); C-: control negativo o planta no inoculada.

2.3.3 Análisis filogenético de las regiones D1- D2 (LSU) y IST1-5.8s-ITS2 del rDNA

El análisis de las secuencias de las regiones D1- D2 (LSU) y IST1-5.8s-ITS2 del rDNA de los hongos asociados a plantas de *A. tequilana* permitió la identificación de 13 géneros de hongos. De los cuales los más abundantes fueron *Lasiodiplodia* y *Neoscytalidium* (50%) (Figura 2.5). Del total de los hongos identificados, aproximadamente el 10% pertenecen al *phylum* Ascomycota y el 90% restante pertenecen al *phylum* Basidiomycota.

Del *phylum* Basidiomycota 3 géneros fueron identificados: el género *Peniophora* (3%) del orden Russulales y los géneros *Trametes* (3%) y *Flavodon* (3%) del orden de Polyporales. El 90% restante de las cepas identificadas corresponden al *phylum* Basidiomycota; de este *phylum* fueron identificados los géneros *Lasiodiplodia* (27%), *Neoscytalidium* (23%) del orden de Botryosphaeriales; el género *Epicoccum* (3%) del orden Pleosporales; *Myrmaecium* (7%) del orden Valsariales; *Cladosporium* (3%) del orden Capnodiales; *Penicillium* (13%) del orden Eutoriales; *Cytospora* (3%) del orden Diaporthales y del orden de Hypocreales se identificó a *Purpureocillium* (3%) y *Fusarium* (7%) (Figura 2.5).

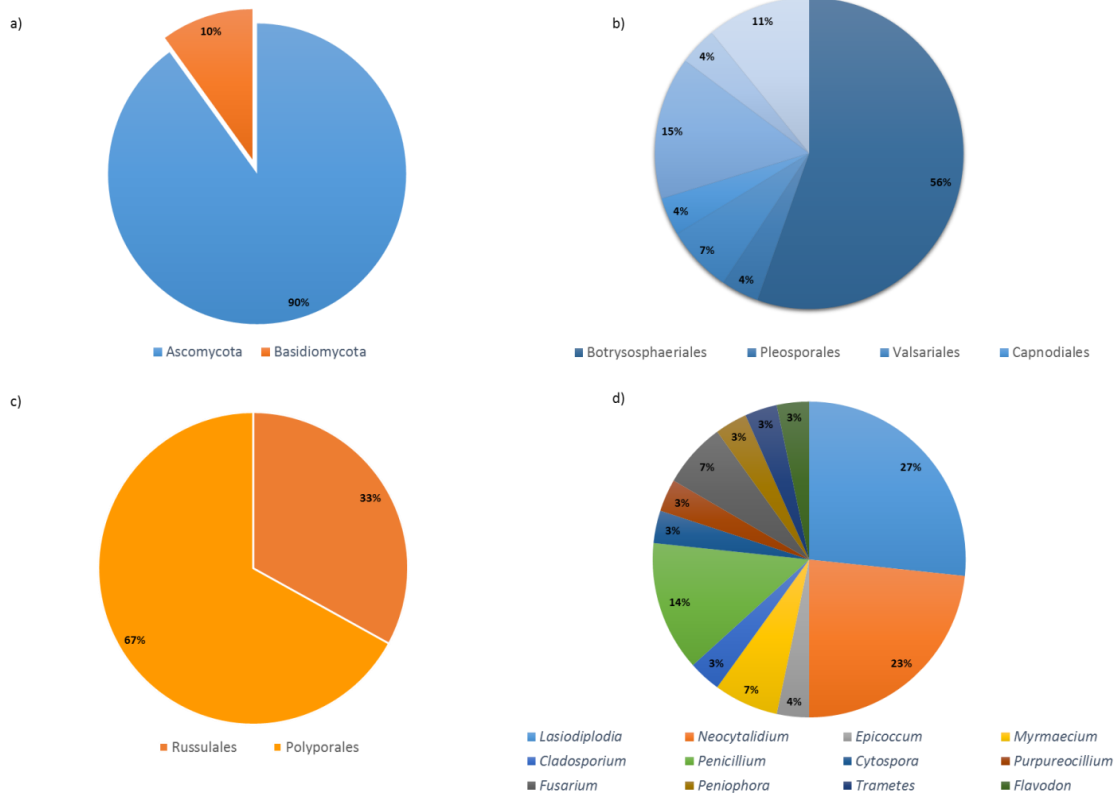


Figura 2.5. Proporción de los organismos identificados en *A. tequilana*. a) Porcentaje de phylum identificados en el análisis. b, c) Proporción de los órdenes identificados para los phylum Basidiomycota y Ascomycota respectivamente; d) Proporción de los géneros identificados

La mayor parte de los hongos identificados pertenecen a la clase Dothideomycetes, esta clase abarca géneros como *Epicoccum*, *Myrmaecium*, *Cladosporium*, *Lasiodiplodia* y *Neocytalidium*. La clase Eurotiomycetes es otra de las más abundantes, a pesar de que solo incluye al género *Penicillium*. Mientras que los aislados de la clase Sordiaromycetes, tienen la misma abundancia e incluyen los géneros *Penicillium*, *Purpureocillium*, *Cytospora* y *Fusarium* (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2 Géneros identificados por análisis de secuencias D1- D2 (LSU) y IST1-5.8s-ITS2 del DNAr de cepas de hongos aislados en *A. Tequilana*.

| Phylum | Clase | Orden | Género |
|----------------|-----------------|------------------|---|
| Ascomycota | Dothideomycetes | Botryosphaerales | <i>Lasiodiplodia</i> <i>Neoscytalidium</i> |
| | | Pleosporales | <i>Epicoccum</i> |
| | | Valsariales | <i>Myrmaecium</i> |
| | | Capnodiales | <i>Cladosporium</i> |
| | Eurotiomycetes | Eutoriales | <i>Penicillium</i> |
| | Sordiaromycetes | Diaporthales | <i>Cytospora</i> |
| | | Hypocreales | <i>Purpureocillium</i> <i>Fusarium</i> |
| | | Basidiomycota | Russulales |
| Agaricomycetes | | | Polyporales |

En general la discriminación taxonómica obtenida en el árbol basado en la región D1-D2 (Anexo 3) fue consistente a nivel de género, mientras que a nivel especie fue menos soportada. Esto probablemente debido las relaciones filogenéticas cercanas que tienen algunos aislados entre sí. Un segundo análisis fue realizado considerando ahora la región ITS1-5.8s-ITS2 (Anexo 4), el cual dio un mejor soporte a la discriminación para algunos de los géneros identificados consistente con lo reportado por otros autores (White *et al.*, 1990). Aunque la topología del árbol (Anexo 4) fue similar a la del árbol basado en las secuencias de la región D1-D2, es decir que ambos árboles que los géneros están organizados en clados correspondientes al orden al que pertenecen, sin embargo, cabe mencionar que algunas muestras no pudieron ser amplificadas para región ITS por lo que las secuencias no fueron incluidas en el análisis.

Finalmente se realizó un análisis con las regiones D1-D2 e ITS1-5.8s-ITS2 concatenadas (Figura 2.6) la topología del árbol fue soportada por bootstrap de 93-100% para la mayoría de los clados correspondientes a los géneros. Se observa la formación de dos clados principales correspondientes a los phylum Ascomycota y Basidiomycota. Específicamente, el nivel taxonómico de Orden está bien delimitado (distancia > 0.02) para todas las cepas de hongos. En este sentido, el clado formado para el orden Botryosphaerales agrupa a los géneros de *Lasiodiplodia* y *Neoscytalidium*; en el clado de los Hypocreales se encuentran los géneros *Fusarium* y *Purpureocillium*. En los clados para los ordenes

Capnodiales, Valsariales, Pleosporales, Eutoriales y Diaporthales solo se incluyen los géneros *Cladosporium*, *Myrmaecium*, *Epicoccum*, *Penicillium* y *Cytospora* respectivamente. Finalmente, en el orden de los Polyporales, solo el género *Flavodon* fue incluido ya que el otro género *Trametes* no fue amplificado para la región ITS1-5.8s-ITS2 y por ello no fue incluido en el análisis concatenado.

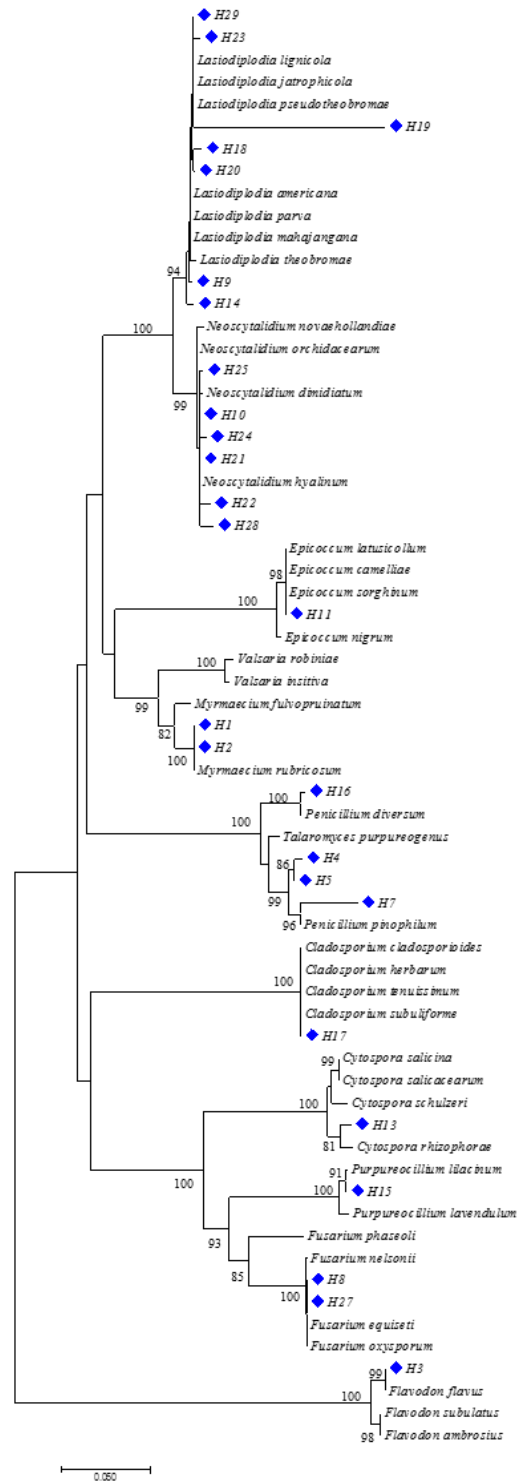


Figura 2.6. Árbol filogenético obtenido del análisis de las secuencias D1-D2 LSU y ITS1-5.8s-ITS2 concatenadas de las cepas aisladas y sus parientes más cercanos (Cuadro 2.3). El análisis filogenético fue realizado usando el método

de mínima evolución con el modelo de Kimura2. Los números indican el bootstrap, derivado de 1,000 remuestreos (solo se muestra los bootstrap para los grupos con un valor > 80). Las cepas aisladas de plantas de *A. tequilana* están marcadas con el símbolo de rombo.

El cuadro 2.3 resume la identificación molecular de todas las cepas de hongos aisladas de acuerdo con su “pariente más cercano” dado por similitud de secuencia con secuencias de hongos previamente depositadas en el GenBank. Las secuencias obtenidas de las cepas aisladas fueron depositadas en el GenBank (número de acceso: MK041250-MK041278 y MK041983-MK041918, para las regiones D1-D2 e ITS1-5.8s-ITS2, respectivamente).

De todos los géneros identificados algunos ya se han reportado como patógenos como *Fusarium* en *Zea maize*, *Neoscytalidium* en *Vitis vinífera* entre otros y *Lasioidiplodia* en *Acacia mangium* (Murillo-Williams y Munkvold 2008; Rolshausen *et al.* 2013; Castro-Medina *et al.* 2014). Es importante mencionar que estos reportes son los primeros en los que se identifica la presencia de estos microorganismos en *Agave tequilana*, como el género *Lasioidiplodia* que ya había sido descrito en otras especies, pero nunca antes en *A. tequilana*.

Cuadro 2.3 Cepas identificadas empleando dos genes marcadores (D1-D2 LSU y ITS1-5.8s-ITS2).

| Cepa | Tipo de hoja | D1/D2 LSU | | | ITS1-5.8S-ITS2 | | |
|------|--------------|--------------------|--|---------------|--------------------|--|---------------|
| | | Número de accesión | Pariente más cercano | Identidad (%) | Número de accesión | Pariente más cercano | Identidad (%) |
| H1 | Media | MK041264 | <i>Myrmaecium rubricosum</i> (LN907512) | 100 | MK041893 | <i>Myrmaecium rubricosum</i> (KP687884) | 99 |
| H2 | Media | MK041265 | <i>Myrmaecium rubricosum</i> (LN907512) | 100 | MK041894 | <i>Myrmaecium rubricosum</i> (KP687884) | 99 |
| H3 | Media | MK041253 | <i>Flavodon flavus</i> (KF856510) | 99 | MK041918 | <i>Flavodon flavus</i> (JN710543) | 97 |
| H4 | Alta | MK041272 | <i>Penicillium pinophilum</i> (HM469418) | 100 | MK041909 | <i>Penicillium diversum</i> (HM469392) | 97 |
| H5 | Alta | MK041273 | <i>Penicillium pinophilum</i> (HM469418) | 100 | MK041910 | <i>Penicillium diversum</i> (HM469392) | 99 |
| H6 | Basal | | No amplificado | | MK041901 | <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (MG833317) | 100 |
| H7 | Basal | MK041274 | <i>Penicillium pinophilum</i> (HM469418) | 95 | MK041911 | <i>Penicillium pinophilum</i> (HQ392503) | 99 |
| H8 | Media | MK041254 | <i>Fusarium equiseti</i> (MF803160) | 99 | MK041912 | <i>Fusarium equiseti</i> (KT277307) | 100 |
| H9 | Basal | MK041256 | <i>Lasiodiplodia parva</i> (LN907364) | 99 | MK041907 | <i>Lasiodiplodia parva</i> (KX227559) | 99 |
| H10 | Media | MK041267 | <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (DQ377924) | 99 | MK041895 | <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (MG833317) | 99 |
| H11 | Alta | MK041252 | <i>Epicoccum sorghinum</i> (MH071388) | 99 | MK041914 | <i>Epicoccum sorghinum</i> (MG969894) | 98 |
| H12 | Media | MK041278 | <i>Peniophora incarnata</i> (JQ746552) | 98 | | No amplificado | |
| H13 | Basal | MK041251 | <i>Cytospora rhizophorae</i> (JQ922147) | 99 | MK041915 | <i>Cytospora rhizophorae</i> (KR056292) | 97 |
| H14 | Basal | MK041257 | <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (MF410073) | 98 | MK041902 | <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (KP747702) | 99 |
| H15 | Alta | MK041276 | <i>Purpureocillium lilacinum</i> (NG_056277) | 100 | MK041916 | <i>Purpureocillium lilacinum</i> (KX609400) | 97 |
| H16 | Basal | MK041275 | <i>Penicillium diversum</i> (HM469392) | 99 | MK041908 | <i>Penicillium diversum</i> (HM469392) | 99 |
| H17 | Basal | MK041250 | <i>Cladosporium subuliforme</i> (LN850756) | 99 | MK041917 | <i>Cladosporium cladosporioides</i> (KX867548) | 99 |
| H18 | Basal | MK041258 | <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (MF410073) | 98 | MK041903 | <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (KT164784) | 99 |
| H19 | Basal | MK041261 | <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (MF410073) | 99 | | <i>Lasiodiplodia parva</i> (KX227559) | 99 |
| H20 | Basal | MK041262 | <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (MF410073) | 99 | MK041904 | <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (KT164784) | 99 |
| H21 | Basal | MK041269 | <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (DQ377924) | 98 | MK041896 | <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (MG833317) | 99 |
| H22 | Basal | MK041268 | <i>Neoscytalidium orchidacearum</i> (KY933092) | 99 | MK041897 | <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (MG833317) | 95 |
| H23 | Basal | MK041260 | <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> | 99 | MK041905 | <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> | 99 |

| (MF410073) | | | | | (KP747702) | | |
|------------|-------|----------|--|-----|------------|--|-----|
| H24 | Basal | MK041270 | <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> (EF585551) | 99 | MK041898 | <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (MG833317) | 98 |
| H25 | Basal | MK041263 | <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (DQ377924) | 98 | MK041899 | <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (MG833317) | 99 |
| H26 | Basal | MK041277 | <i>Trametes polyzona</i> (KC589151) | 99 | | No amplificado | |
| H27 | Basal | MK041255 | <i>Fusarium oxysporum</i> (KY548402) | 99 | MK041913 | <i>Fusarium equiseti</i> (KT277307) | 99 |
| H28 | Alta | MK041271 | <i>Neoscytalidium hyalinum</i> (LN907305) | 99 | MK041900 | <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (MG833317) | 100 |
| H29 | Alta | MK041259 | <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (MF410073) | 100 | MK041906 | <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (KP747702) | 99 |
| H30 | Alta | MK041263 | <i>Lasiodiplodia parva</i> (LN907364) | 99 | | No amplificado | |

2.3.4 Ensayo de patogenicidad

Seis de las treinta cepas identificadas fueron seleccionadas (H8, H9, H18, H20, H29, H30). La selección se realizó por su representatividad en los aislados para el caso de las cepas del género *Lasioidiplodia*, y la cepa H8 se seleccionó por ser del género *Fusarium*, el cual se ha asociado a varias enfermedades de *A. tequilana*.

El ensayo de la “agresividad de las cepas” evaluado mediante la infección *in vitro*, fue realizado mediante dos métodos de inducción como se describe anteriormente. La presencia de necrosis fue evidente en comparación al control después de siete días de la inoculación (Figura 2.7). El porcentaje de necrosis fue evaluado al día siete (Cuadro 2.4).

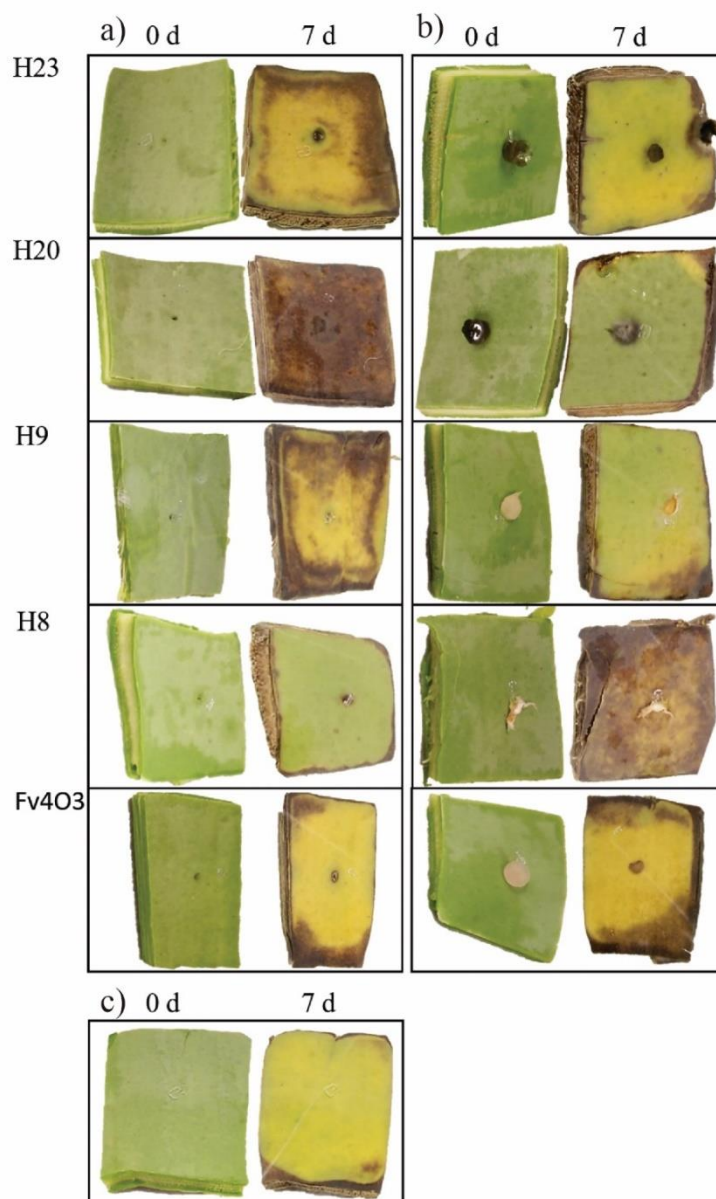


Figura 2.7. Ensayo de patogénesis por el método de punción y contacto de micelio. *Lasiodiplodia* sp. (H23, H20, H9) y *Fusarium* sp. (H8) fueron empleados para la infección de tejido de hoja de *A. tequilana*; los síntomas fueron reportados a los siete días. a) y b) Muestran las hojas infectadas a los días cero y siete, por los métodos de punción y contacto respectivamente; c) Muestra el control negativo al día cero y siete sin infectar. (Fv403) cepa patogénica en maíz usada como control.

Las cepas analizadas de *Lasiodiplodia* difieren entre ellas en los porcentajes de necrosis que ocasionan. Esta variación en la necrosis se observa en los dos métodos de infección empleados para este ensayo. De manera general, la infección por punción fue más efectiva para la inducción de la necrosis para la mayoría de las cepas analizadas de

Lasiodiplodia, con un porcentaje promedio del 71% para el género. Solo las cepas H9 y H29 causaron un porcentaje menor de necrosis (< 38%) usando este método. Es interesante que la cepa H29 produjo una necrosis del 96% cuando el método de contacto fue empleado. Sin embargo, la cepa H30 fue la más agresiva, ya que obtuvo los mayores porcentajes de necrosis considerando ambos métodos de infección (97 y 100% para la infección por micelio y por punción respectivamente).

Para *Fusarium* (H8), se observó un perfil patogénico independientemente del método de infección empleado. Si bien, el porcentaje de necrosis obtenido por el método de punción fue del 47%, esto solo considera la necrosis observable en la superficie del tejido, no contabiliza el daño al interior del tejido donde probablemente sea mayor, mientras que por medio del otro método empleado la necrosis alcanza un porcentaje del 99%. Contrario a la cepa control Fv4O3 (*Fusarium*), que causa un porcentaje bajo de necrosis, 35% y 45 % para el método de contacto directo y punción, respectivamente, por lo que esta cepa control fue descartada como control positivo para futuras investigaciones en plantas de *Agave*.

La agresividad de las cepas aisladas de plantas de *Agave* también fue evaluada de manera indirecta por medio de la actividad pectinolítica como sugiere Di Pietro y Roncero, (1996). Las actividades enzimáticas se obtuvieron en un rango de 4 a 143 unidades enzimáticas ($\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{mg}_{\text{prot}}$) dependiendo de la cepa o el medio de inducción (Cuadro 2.4).

Se observó que todas las cepas tienen una actividad enzimática diferencial dependiendo del medio de inducción. Por ejemplo, en el medio YPD-A y YPA la cepa H18 es la que tiene la mayor actividad, la cepa H8 es la cepa que tiene menor actividad para los extractos evaluados, a pesar que es una de las que presentó mayor incremento de biomasa (datos no mostrados) y la cepa H20 presenta la mayor actividad en el extracto de YP-A. Sin embargo, de manera general, se observa que las cepas evaluadas del género *Lasiodiplodia* muestran mayor actividad enzimática que la cepa del género *Fusarium* en cualquiera de los medios evaluados.

Cuadro 2.4 Necrosis y actividad pectinolítica de las cepas seleccionadas.

| Cepa | Identidad ^a | Actividad pectinolítica (U/mgprot) | | | Necrosis (%) por | |
|------|--|------------------------------------|--------------|-------------|-----------------------|-----------------------|
| | | YPD | YPD-A | YP-A | Infección por micelio | Infección por punción |
| H9 | <i>Lasiodiplodia parva</i> (LN907364) | 42.7 ± 0.14 | 22.9 ± 0.04 | 40.3 ± 0.05 | 11 ± 3 | 38 ± 23 |
| H30 | <i>Lasiodiplodia parva</i> (LN907364) | 80.7 ± 0.21 | 130 ± 0.3 | 30.3 ± 0.04 | 97 ± 3 | 100 ± 0 |
| H18 | <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (MF410073) | 89.4 ± 0.40 | 143.5 ± 0.6 | 46.3 ± 0.06 | 33 ± 5 | 98 ± 3 |
| H20 | <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (MF410073) | 57.7 ± 0.037 | 29 ± 0.1 | 121 ± 0.2 | 21 ± 15 | 99 ± 1 |
| H29 | <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (MF410073) | 85.5 ± 0.39 | 64.2 ± 0.1 | 16.5 ± 0.02 | 96 ± 4 | 13 ± 9 |
| H8 | <i>Fusarium equiseti</i> (MF803160) | 22.6 ± 0.06 | 23.9 ± 0.004 | 4.3 ± 0.03 | 99 ± 0.03 | 47 ± 53 |

^a De acuerdo con el cuadro 2.3

Se calculó el porcentaje de rendimiento neto de ácido galacturónico (RNAG), que se refiere al porcentaje del sustrato (pectina) que se transforma a producto (ác. Galacturónico). Los rendimientos más altos se obtuvieron para todas las cepas con el extracto crudo obtenido del medio YPD, mientras que para los extractos obtenidos del medio YPD-A y YP-A los porcentajes de rendimiento son similares entre ellos. De manera global, el mayor rendimiento (53%) se obtuvo con la cepa H20 (*Lasiodiplodia*) con el extracto crudo obtenido del medio YPD, seguido de la cepa H29 (*Lasiodiplodia*), mientras que el menor rendimiento (15%) se observó con la cepa H8 (*Fusarium*) y H27 (*Lasiodiplodia*) (Anexo 5).

2.4 DISCUSIÓN

2.4.1 Identificación de los hongos aislados

En México, el cultivo de *A. tequilana* es de gran importancia económica y ha sido empleado principalmente para la producción de tequila (Nava-Cruz *et al.*, 2015; Dalton, 2005). Se ha reportado que *A. tequilana* sufrió una crisis fitosanitaria, en la cual se perdieron un gran número de plantas debido a la presencia de algunos fitopatógenos que producen los síntomas de marchitez, necrosis y hasta la muerte de la planta (Castro-Valera, 2003). Las enfermedades del *Agave* pueden reducir el crecimiento de la planta, incluso causar la muerte de ésta (Rubio, 2007). Se ha reportado la ocurrencia de distintos géneros de hongos asociados a *A. tequilana* además de *Fusarium*, como los hongos del género *Cercospora*, *Asterina*, *Colletotrichum* y *Alternaria* y bacterias como *Erwinia* y *Pseudomonas* (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Larrea-Reynoso, 1998; Martínez-Ramírez y Virgen-Calleros, 1998). No obstante, es poco el conocimiento que se tiene sobre el daño que estos organismos pueden causar a las plantas de *Agave* (Desgarenes *et al.*, 2014).

En el presente estudio, la mayoría de los organismos identificados pertenecen al phylum Ascomycota y solo tres pertenecen al phylum Basidiomycota. Al igual que en otro reporte en *Agave* (Coleman-Derr *et al.*, 2016), se aislaron organismos del mismo orden como los Pleosporales y Eutoriales, Hypocreales principalmente y en menor proporción el orden de los Capnodiales. Donde los géneros predominantes fueron *Alternaria*, que está ausente en los aislados del presente estudio y *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* (Coleman-Derr *et al.*, 2016) que si están presentes en nuestra investigación. La proporción por phyla para estos aislados fue similar a reportes previos en *Agave*, donde la mayor cantidad de aislados pertenecen al phylum Ascomycota (96%) y una pequeña proporción (4%) al phylum Basidiomycota (Coleman-Derr *et al.*, 2016). Esta misma tendencia ha sido observada en estudios de la diversidad fúngica en diferentes ecosistemas compuestos por pastizales, arenas de desierto y bosques (Zhang *et al.*, 2016; Grishkan *et al.*, 2015; Tedersoo *et al.*, 2014; Shakya *et al.*, 2013; Porrás-Alfaro *et al.*, 2011). Es probable que los Ascomycotas sean más abundantes debido a que tienen una mayor capacidad de adaptarse a diferentes ambientes, especialmente a las condiciones hostiles donde los nutrientes están en bajas concentraciones o la disponibilidad de agua está restringida (Chen *et al.*, 2017; Coleman-Derr *et al.*, 2016; Tedersoo *et al.*, 2014), ambas condiciones comunes para los suelos donde habitan los *Agaves*.

La distribución de estos organismos en la planta es variable, por ejemplo, algunos géneros se encuentran distribuidos en toda la planta como el género *Lasiodiplodia*, mientras que géneros como *Fusarium* y *Neoscytalidium* se encontraron en hoja basal y media. El género *Penicillium* fue aislado en hojas basal y alta, *Cladosporium*, *Cytospora* y *Trametes* se aislaron solo en hojas basales y los géneros como *Epicoccum* y *Purpureocillium* solo fueron aislados a partir de hojas altas. Lo cual podría indicar una posible especialización en la interacción entre el hongo y la planta, de acuerdo con los mecanismos de infección de cada uno de ellos derivado del nicho en el que se desarrollan (Desgarenes *et al.*, 2014).

El análisis de las regiones D1-D2 e ITS1-5.8S-ITS2 permitió la identificación de la mayoría de los microorganismos aislados a nivel género. La región D1-D2 ha sido empleada para la identificación de algunos hongos filamentosos (Hinrikson *et al.*, 2005), aunque, siendo una región conservada entre algunos grupos de hongos, la identificación es confiable solo para algunas especies (Poll *et al.*, 2010). Mientras que la región ITS frecuentemente empleada para la inferencia filogenética e identificación de cepas, incluso a nivel de especie (Begerow *et al.*, 2010), sin embargo, puede tener una alta similitud en secuencia entre algunas especies dificultando su identificación (Smith *et al.*, 2007). Por lo que el empleo de las dos regiones para la identificación puede ayudar a mejorar la precisión de la identificación (Kwiatkowski *et al.*, 2012). En el presente estudio, el análisis concatenado nos permitió discriminar de forma confiable los géneros de las distintas cepas aisladas, resultando en grupos con mayor valor de bootstrap.

La mayoría de los géneros de las cepas identificadas en este trabajo han sido reportados como patógenos. Por ejemplo, dentro del phylum Ascomycota, la mayoría de los organismos identificados resultaron ser patógenos para plantas. En el orden Botryosphaerales que incluye un grupo importante de hongos asociados con plantas, los cuales algunos tienen implicaciones económicas, ya que se sabe que algunas especies de este orden son causantes de enfermedades en un amplio rango de plantas con importancia económica (Yang *et al.*, 2017; Slippers *et al.*, 2013). Destaca el género *Lasiodiplodia* que fue el género con mayor presencia en los aislados y el cual fue encontrado en los tres tipos de hojas evaluadas. Este se ha descrito como un agente causal de numerosas enfermedades en una gran variedad de hospederos, algunos de ellos son: *Mangifera indica*, *Carica papaya*, *Vitis vinífera* L., *Anacardium occidentale*, entre otros (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017; Netto *et al.*, 2017; Correia *et al.*, 2016; Picos-Muñoz

et al., 2015; Netto *et al.*, 2014), y afecta, tanto a la raíz, tallo o fruto, además de que es un género cosmopolita, presente principalmente en áreas tropicales y subtropicales (Picos-Muñoz *et al.*, 2015; Abdollahzadeh *et al.*, 2010). Sin embargo, en nuestra búsqueda bibliográfica, no se ha descrito como un agente causal de enfermedad en *A. tequilana*. Por lo tanto, el presente constituye el primer estudio en el cual se asocia la presencia del género *Lasiodiplodia* en plantas de *A. tequilana*. El género *Neoscytalidium* que también fue encontrado en agave en el presente estudio, está estrechamente relacionado con el género *Lasiodiplodia*, algunas especies de *Neoscytalidium* han sido relacionadas con cancro del tallo, gomosis, y han sido descrito en plantas como *Ficus carica*, *Hylocereus undatus*, *H. polyrhizus* y *Mangifera indica* (Nouri *et al.*, 2018).

Los hongos del orden Pleosporales, se pueden clasificar como endófitos, sin embargo, se han reportado especies que pueden ser parasíticas de tallos u hojas, así como también saprófitos (Strobel *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2008;). Se han descrito varios géneros anamorfos en este orden, como *Phoma*, *Coniothyrium*, *Ascochyta*, entre otros (Aveskamp *et al.*, 2008). El género *Epicoccum* perteneciente a este orden fue identificado de los aislados de *A. tequilana*, este ha sido descrito como endófito o epifito, así como parasito en hojas o tallos y en algunos casos como saprofito en material vegetal en descomposición (Zhang *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2008;).

Las cepas de *Myrmaecium* del orden Valsariales han sido relacionadas con una gran variedad de especies de plantas como: *Thyrsostachys siamensis*, *Betula pendula*, *Vitis vinífera*, *Quercus robur* y *Cytisus scoparius* (Jaklitsch *et al.*, 2015). Algunas especies sinónimas también se han aislado de plantas de *Agave*, las cuales podrían estar implicadas como agentes causales de enfermedades (Rubio, 2007).

Otro orden identificado fue el de los Capnodiales que incluyen géneros de hongos que pueden ser saprófitos, endófitos y patógenos de plantas (Crous *et al.*, 2009), en este trabajo el género aislado *Cladosporium* que pertenece a dicho orden, del cual la mayoría de las especies descritas son hongos cosmopolitas, saprófitos y en algunos casos son invasores secundarios en infecciones necróticas del tejido de plantas (Bensch *et al.*, 2010). Particularmente, este género ha sido aislado previamente en otras plantas de agave como *A. angustifolia* y *A. americana* (Duque-Bautista *et al.*, 2017).

Hongos del género *Penicillium* del orden Eutoriales y del género *Cytospora* del orden Diaportales, también fueron identificados en los aislamientos realizados en el presente

estudio. El orden Eutoriales, el cual incluye a las especies del género *Penicillium*, fue el segundo orden de mayor abundancia en los aislados (13%). Este grupo de hongos se encuentra de manera abundante en el suelo, y está asociado a algunas enfermedades de plantas causantes del deterioro y la caída del fruto (Allende *et al.*, 2013; Pitt y Hocking, 2009). Aunque también este género se asocia con enfermedades postcosecha y la producción de micotoxinas en algunos cultivos (Santini *et al.*, 2014; Pitt y Hocking, 2009). Por el contrario, en *A. americana*, existen algunos reportes del uso del género *Penicillium* para mejorar el crecimiento de la planta (Zacarías-Toledo *et al.*, 2016), lo que no descarta que en *A. tequilana* este hongo pueda tener un papel benéfico en el crecimiento del cultivo. El orden de Diaporthales está compuesto en su mayoría por especies saprófitas, y solo algunas son patógenas de plantas maderables y algunos cultivos de importancia económica como la soya y el girasol (Rossman *et al.*, 2007). Algunas especies de *Cytospora*, el estado anamórfico de *Valsa* del orden de los Diaportales, es causante de enfermedades en *Eucalyptus* (Adams *et al.*, 2005), el género *Valsa* se ha relacionado a enfermedades en frutos y enfermedades en especies productoras de madera (Xi-wen, 2006).

Otro género identificado el cual se encontró pobremente representado en este estudio, es el *Fusarium*, del orden de los Hypocreales el cual incluye patógenos para plantas, así como especies saprófitas y patógenos facultativos (Lombard *et al.*, 2015; Schroers *et al.*, 2011). El género *Fusarium* ha sido descrito como patógeno para diferentes especies de plantas como *Cucumis sativus* L. (Ye *et al.*, 2004), *Zea mays* L. (Murillo-Williams y Munkvold, 2008); *Solanum lycopersicum* (Manzo *et al.*, 2016); en *Triticum* sp (Golkari *et al.*, 2007); *Echeveria agavoides* (Giuseppe *et al.*, 2015); *Agave tequilana* (Ávila-Miranda *et al.*, 2010; Luna-Hernandez, 1996). El daño ocasionado por este patógeno a los hospederos, es causado por la penetración de la hifa a los tejidos vasculares de la planta, así como la secreción de enzimas hidrolíticas durante la colonización del tejido, los síntomas incluyen marchitamiento, epinastia de las hojas, pérdida de hojas y muerte (Michielse y Rep, 2009). En el presente estudio, solo dos cepas de *Fusarium* fueron obtenidas de las hojas de *Agave*. Sin embargo, existen reportes donde se obtienen una mayor cantidad de aislamientos principalmente en las raíces de *Agave* y se ha identificado como causal de enfermedades en *A. tequilana* (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ávila-Miranda *et al.*, 2010). Otro género identificado de este orden es *Purpureocillium*, género que ha sido descrito ampliamente como saprofito y es comúnmente aislado en muestras de suelo

(Luangsa-Ard *et al.*, 2011), aunque también se ha descrito como un hongo endófito (Gong *et al.*, 2017).

Del phylum Basidiomycota algunas cepas de *Peniophora*, *Flavodon* y *Trametes* fueron identificadas. *Peniophora* ha sido descrito como habitante de las raíces y la madera (Hallenberg *et al.*, 1996), y algunas especies pueden ser parasíticas y cambiar a saprófitas durante su desarrollo (Sell *et al.*, 2011). Las especies del género *Flavodon*, han sido descritas como hongos descomponedores (Binder *et al.*, 2013), mientras que las especies del género *Trametes* están más asociados como habitantes de la raíz (Ginns *et al.*, 1986).

En general, 12 géneros de hongos fueron identificados, la mayoría de estos ya habían sido aislados de plantas de *Agave* y en algunos casos como *Alternaria*, *Fusarium*, *Myrmaecium* son conocidos patógenos para este cultivo (Coleman-Derr *et al.*, 2016; Rubio, 2007; Zenteno-Zevada, 1974). Sin embargo, también se aislaron hongos que no habían sido descrito antes como patógenos para *A. tequilana*, como el género *Lasiodiplodia*. la identificación de este hongo puede ayudar al desarrollo de programas de manejo que prevengan la propagación de este hongo. De los géneros identificados en agave, nueve géneros se han identificado como abundantes en la endosfera de la hoja de *A. tequilana* mediante un enfoque metagenómico, donde las OTUs (por sus siglas en inglés) más comunes pertenecieron a los géneros *Alternaria*, *Penicillium* y *Cladosporium* (Coleman-Derr *et al.*, 2016). En este mismo estudio, se identificó como población principal las OTUs de *Penicillium* y *Fusarium* en la endosfera de la raíz (Coleman-Derr *et al.*, 2016), diferente a lo reportado en nuestro estudio, ya que algunas cepas de estos hongos fueron encontradas en las partes más alejadas al suelo, sin embargo, algunas cepas de *Penicillium*, consistente con estos reportes también se aislaron de las hojas más cercanas al suelo. Algunos hongos que anteriormente fueron caracterizados en hojas de *Agave*, como *Colletotrichum* (Farr *et al.*, 2006) no fueron detectados en este estudio. Esto podría deberse a las diferencias en la comunidad microbiana observadas entre las diferentes especies de *Agave* o a las diferentes en la comunidad microbiana dadas las diferentes regiones geográficas (Coleman-Derr *et al.*, 2016; Desgarenes *et al.*, 2014).

2.4.2 Ensayo de patogenicidad

Cinco cepas de *Lasiodiplodia* y una de *Fusarium* fueron seleccionadas por su representatividad en los aislados y por su potencial patogénico en el género *Agave*,

respectivamente, con el fin de evaluar la agresividad de las cepas en ensayos *in vitro*. En este estudio, las cepas del género *Lasiodiplodia* fueron más agresivas al inducir necrosis por el método de punción. Esto puede ser debido a que el mecanismo de infección descrito para este hongo, requiere daño físico previo del tejido (Ploetz, 2003). Otros informes similares, indican que la agresividad de algunas especies de *Lasiodiplodia* aumenta cuando las cepas se inoculan después de un daño mecánico del tejido vegetal (Netto *et al.*, 2017). En el caso de la cepa H8 (*Fusarium*), se observó un porcentaje alto de necrosis (>99%) en la infección por contacto directo, aunque probablemente en la infección por punción el daño sea al interior del tejido y este no pueda ser observado desde la superficie del tejido. Los síntomas observados concuerdan con lo que se ha reportado para *Fusarium* en otras plantas, se sabe que este hongo durante la colonización, el tejido del huésped puede volverse marrón, junto con la aparición de manchas negras (Michielse y Rep, 2009).

Se ha descrito que los mecanismos de infección de las cepas de *Fusarium* implican la degradación de la lámina media y la pared celular para poder penetrar en los tejidos de las plantas (García-Maceira *et al.*, 2001). La cepa de *Fusarium* aislada de maíz (Fv4O3) utilizada como control de infección indujo un porcentaje bajo de necrosis, comparada con la cepa aislada de *A. tequilana*, lo que sugiere que existe una alta especificidad de las cepas de *Fusarium* aisladas de *A. tequilana*. En este trabajo, fueron pocas las cepas de este género que fueron aisladas de las hojas de *A. tequilana*. Por el contrario en otros estudios, un alto número de cepas fueron aisladas de las raíces de estas plantas (Vega-Ramos *et al.*, 2013), esto puede obedecer a la propia metodología de aislamiento, ya que se sabe que *Fusarium* es un hongo más asociado a las raíces que a la parte aérea de las plantas.

El porcentaje de rendimiento de ácido galacturónico (RNAG) de las cepas de *Fusarium* aisladas de plantas de *A. tequilana*, es similar a los porcentajes reportados en trabajos previos. Valencia-Guerrero reporta que para distintas cepas de *Fusarium* aisladas de Tomate (*Solanum lycopersicum*) y Clavel (*Dianthus caryophyllus*) el porcentaje de RNAG está entre 15- 22%, mientras que el RNAG de la cepa H8 (*Fusarium*) aislada en este trabajo está en el mismo rango dependiendo del medio, mientras que para las cepas de *Lasiodiplodia* (H9, H20, H27, H29, H30) el RNAG está para la mayoría de las cepas, por encima de los valores reportados por Valencia-Guerrero, aunque aún no se tienen reportes similares previos para este género. En nuestro estudio se observó que al menos

para las cepas del género *Lasiodiplodia* no existe una relación directa entre la necrosis causada y el RNAG, ya que a pesar de que las cepas de *Lasiodiplodia* fueron las que obtuvieron mayor porcentaje de RNAG, estas aparentemente no son capaces de infectar el tejido de plantas al menos en ensayos *in vitro*. Los síntomas más severos de la infección se observaron en los tejidos infectados por medio de punción, mientras que mediante la infección sin daño físico no se observan síntomas aparentes de la infección. Este resultado puede deberse a que se ha descrito que el principal mecanismo por medio del cual el género *Lasiodiplodia* infecta al hospedero es por la presencia de un daño físico previo a la planta (Ploetz, 2003). Mientras que, para cepas de *Fusarium* aisladas en este trabajo, los mayores síntomas de la enfermedad se observaron en el tejido que fue inoculado con el micelio sin punción al tejido. Esto es de esperarse ya que, se ha descrito que, el mecanismo de infección y colonización de algunas especies de *Fusarium* involucra la degradación de barreras como la lámina media (compuesta por pectina) y la pared celular para poder penetrar al hospedero (García-Maceira *et al.*, 2001; Huertas-González *et al.*, 2000). Por ejemplo, para *Fusarium* f. sp. *lycopersicum* se ha descrito que una de las primeras enzimas que se secretan cuando el hongo es puesto en contacto con el tejido del hospedero son las enzimas con actividad pectinolítica (Jones *et al.*, 1972). Es probable que, pese a que muestra un menor porcentaje de RNAG en comparación con las cepas de *Lasiodiplodia*, *Fusarium* al tener los mecanismos necesarios para infectar vía degradación de la lámina media, se observen síntomas más severos.

La actividad pectinolítica de las cepas fue evaluada como medida indirecta de la agresividad de la cepa e indicador de patogénesis del hongo como sugieren distintos autores (Valencia-Guerrero *et al.*, 2011; Asoufi *et al.*, 2007), ya que se ha descrito que esta actividad está relacionada con el proceso de infección (García-Maceira *et al.*, 2001). Por lo que para que se lleve a cabo la infección, entre otras enzimas, el hongo secreta enzimas pectinolíticas, que tienen como sustrato la pectina un componente la lámina media. Además, la degradación de la pectina proporciona nutrientes al hongo (De Lorenzo *et al.*, 1997). Por lo que es probable que una mayor actividad pectinolítica de las cepas aisladas, pueda estar indicando una mayor capacidad de infectar el tejido de las plantas.

Las cepas H20 y H30 (relacionadas filogenéticamente con *Lasiodiplodia pseudotheobromae*) tienen una de las actividades más altas y son causantes del mayor porcentaje de necrosis, por lo que fueron seleccionadas para estudios posteriores en los que se requiera la infección de estas plantas. Este tipo de comportamiento, también se ha

reportado entre diferentes cepas de *Lasiodiplodia* en plantas de uva (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2015). La actividad pectinolítica en este género ha sido descrita anteriormente, los hongos de este género son conocidos como hongos pectiloníticos por producir de enzimas que degradan la pared celular (Dekker *et al.*, 2001). Para ambas cepas de *Fusarium*, la actividad enzimática evaluada fue hasta 6 veces menor en comparación con la de las cepas de *Lasiodiplodia*. Un comportamiento similar en las actividades enzimáticas fue observado para dos especies de este género en *Colocasia* spp (Ugwuan y Obeta, 1997).

En conclusión, 12 géneros de hongos fueron identificados mediante el empleo de las regiones D1-D2 e ITS1-5.8S-ITS2 en hojas de *A. tequilana* con síntomas de enfermedad. El phylum Ascomycota cubre la mayoría de los aislamientos en las hojas. Los géneros identificados fueron *Cladosporium*, *Cytospora*, *Epicoccum*, *Flavodon*, *Myrmaecium*, *Neoscytalidium*, *Penicillium*, *Peniophora*, *Purpureocillium*, *Trametes*, *Fusarium* y *Lasiodiplodia*. Las cepas de estos dos últimos géneros exhibieron diferentes perfiles patogénicos según sus porcentajes de necrosis y según el método de infección utilizado. La actividad pectinolítica fue moderada en esta cepa de *Fusarium*, mientras que la de las cepas de *Lasiodiplodia* exhibió hasta 6 veces más actividad enzimática. Finalmente, las diferentes cepas de *Lasiodiplodia* muestran perfiles de patogenicidad altos y variables, lo que sugiere una importante especificidad de la cepa hacia las hojas de *Agave*, que tiene un alto potencial de ser parte del ciclo de la enfermedad observado en este importante cultivo.

**CAPÍTULO III
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES NBS-LRR EN *A. tequilana*
DURANTE LA INFECCIÓN DE *Lasiodiplodia*****3.1 INTRODUCCIÓN**

Las plantas están continuamente sometidas a estrés tanto biótico como abiótico, lo cual puede derivar a pérdidas en el rendimiento de los cultivos (Wang *et al.*, 2017). Debido al estrés al que están sometidas, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa contra el ataque de patógenos (Glazebrook, 2005). Una de estas defensas son las barreras físicas, como la pared celular, ceras y cutícula (García-Pineda y Lozoya-Gloria, 2004). Sin embargo, más allá de estas barreras preexistentes se encuentran mecanismos asociados a receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales forman parte de la inmunidad desencadenada por patrones moleculares o PTI (por sus siglas en inglés), en la cual la respuesta está mediada por receptores PRR (Pattern recognition receptors, por sus siglas en inglés) que reconocen patrones moleculares (PAMPs o patrones moleculares asociados a patógenos) los cuales son definidos como moléculas altamente conservadas entre los microorganismos como la flagelina, algunos liposacáridos, quitina, entre otros (Zipfel, 2008, 2014). Estos mecanismos en plantas permiten el reconocimiento hacia una amplia variedad de patógenos empleando un número limitado de receptores (Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Takemoto, 2004).

Algunos patógenos son capaces de evadir este mecanismo de defensa por medio de la secreción de efectores que inhiben la respuesta PTI, para lo cual las plantas han desarrollado otro mecanismo de defensa llamado Inmunidad Desencadenada por Efectores o ETI (por sus siglas en inglés). ETI está mediado por proteínas receptores citoplasmáticos (Dodds y Rathjen, 2010), las cuales reconocen a las proteínas efectoras (Avr) que son secretadas por los patógenos (Coll *et al.*, 2011).

Estos receptores son conocidos como proteínas R y son codificadas por un amplio número de familias de genes dentro de los genomas (Michelmore y Meyers, 1998), representan aproximadamente el 1% de todo el genoma en plantas, aunque esto varía dependiendo de la especie (Saha *et al.*, 2013). La gran mayoría de genes R codifican para un grupo de genes llamado NBS-LRR (Jones y Dangl, 2006) los cuales se

encuentran agrupados en el genoma y están ampliamente distribuidos entre las plantas (Marone *et al.*, 2013). Los genes que codifican para proteínas R pueden ser clasificados en dos grupos basado en el extremo N-terminal de la proteína para la cual codifican: se clasifican en TIR, es decir que tienen el dominio Toll-interleucina receptor y no-TIR o CC pues poseen el dominio coiled and coil (Meyers *et al.*, 2003).

Las proteínas R del tipo NBS-LRR comparten algunos dominios como el de unión a nucleótidos (NBS), que es capaz de hidrolizar ATP o GTP y funciona como un interruptor de encendido/apagado de la transducción de señales después del reconocimiento del patógeno; el dominio rico en repeticiones de leucina (LRR) de aproximadamente 20-30 aminoácidos repetidos, este dominio está implicado en la interacción proteína-proteína y es determinante para el reconocimiento del patógeno por medio de la unión a moléculas derivadas del patógeno (Wan *et al.*, 2013; Kobe and Kajava, 2001). El dominio central NBS tiene ocho motivos conservados característicos como el cinasa, P-loop, Kinasa 2, RNBS- B, RNBS-C, GLPL, RNBS-D y MHD (Takken *et al.*, 2006 ; Meyers *et al.*, 2003). Algunos de estos motivos altamente conservados han sido utilizados para el aislamiento y caracterización de secuencias tipo NBS. A la fecha, la mayoría de las secuencias tipo NBS han sido aisladas empleando PCR y análisis del genoma por medio de la búsqueda de los motivos NBS conservados. Sin embargo, en años recientes, el uso de bases transcriptómicas también han sido empleadas (Karthika *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017).

La presencia de los genes *NBS-LRR* está relacionada con la resistencia de las plantas contra las enfermedades causadas por diferentes patógenos. Por ejemplo, al menos tres genes tipo *NBS-LRR* (*RFO1*, *RPW8* y *WRR4*) confieren resistencia contra *Fusarium*, *Podosphaera* y *Aspergillus* entre otros (Diener y Ausubel, 2005; Xiao *et al.*, 2001). Además, la expresión de estos genes en plantas transgénicas de *Brassica* ha mejorado la resistencia frente a patógenos (Borhan *et al.*, 2010). También se ha observado que la sobreexpresión de genes como el *RCT1* (TNL) de *Medicago truncatula* en *Medicago sativa* puede estar relacionada con la defensa contra la antracnosis en esta especie (Yang *et al.*, 2008). En plantas como *Arachis hypogaea*, *A. duranensis* se ha observado que la expresión de genes CNL es inducida durante la infección de *Aspergillus flavus*. La expresión de estos genes es inducida por la presencia del patógeno, por ejemplo, en *Arachis hypogaea* y *A. duranensis* se ha observado la inducción de la expresión de los genes tipo CNL durante la infección de *Aspergillus flavus*. La expresión diferencial de estos genes también ha sido observada entre plantas resistentes y susceptibles, como

ocurre en *Helianthus annuus* L., durante la infección de *Puccinia hélianthi* y en *Brassica rapa* var. Pekinesis durante la infección con *Fusarium oxysporum* (Wang *et al.*, 2017; Shimizu *et al.*, 2014; Radwan, 2010). Los datos sugieren que la expresión de estos genes tienen un papel importante en la resistencia (Song *et al.*, 2017; Radwan, 2010).

En *A. tequilana*, la mayoría de los estudios se enfocan en el hongo *F. oxysporum* descrito como uno de los principales causantes de enfermedad en los agaves (Vega-Ramos *et al.*, 2013; Ávila-Miranda *et al.*, 2010;). Sin embargo, no es el único causal de enfermedades en las plantaciones de tequila. Poco es lo que se sabe sobre la respuesta de los genes NBS en respuesta a patógenos, en un estudio previo en *A. tequilana*, *A. fourcroydes* y *A. angustifolia*, se reporta la inducción general de genes tipo CNL durante la infección de *Erwinia coratovora* (Smith) (Tamayo-Ordóñez *et al.*, 2016). Sin embargo, el estudio fue realizado empleando cebadores NBS universales, por lo tanto, el análisis no incluye la respuesta específica de los diferentes grupos de NBS-LRR que podrían existir en *A. tequilana*. La función específica de diferentes miembros de genes NBS-LRR en respuesta a diferentes patógenos es bien conocida, se ha descrito que estos genes pueden clasificarse en subgrupos y en algunos casos pueden tener respuestas específicas a ciertos patógenos (Arya *et al.*, 2014; Rout *et al.*, 2014). Sin embargo, la respuesta específica de los diferentes grupos de genes NBS de *A. tequilana* permanece sin ser investigada. Además, *E. coratovora* no es uno de los principales patógenos descritos para *A. tequilana*, dado que se han descrito más especies de hongos patógenos para estas plantas (Rubio, 2007). De hecho, recientemente, se han descrito y caracterizado una colección de hongos aislados de *A. tequilana*, compuesta por 12 géneros de hongos, con la abundancia de las cepas de *Lasiodiplodia* sp., la cual se demostró su habilidad de inducir síntomas de enfermedad en esta planta (Campos-Rivero *et al.*, 2019).

Por lo que el objetivo de este capítulo radica en caracterizar y evaluar la expresión de los genes NBS-LRR de *A. tequilana* durante estrés biótico causado por hongos del género *Lasiodiplodia* sp. La información obtenida podrá permitir la identificación de genes tipo NBS-LRR involucrados en la resistencia frente a estos patógenos. Los genes identificados pueden tener una posible aplicación como marcador para la selección asistida por marcadores moleculares.

3.2 MATERIALES Y METODOS

3.2.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas de *A. tequilana* Weber var. azul de menos de dos años. Estas plantas fueron adquiridas en la "Destileria Mayapan" ubicada en la ciudad de Valladolid, Yucatán (20° 43'31.6"N; 88°21'22.42"O). Las plantas provienen de campo, por propagación asexual a través de "hijuelos" (retoños de rizomas), y se adaptaron durante un año a las condiciones de invernadero en el Centro de Investigación Científica de Yucatán. Las condiciones ambientales fueron una temperatura promedio de 26 °C, con un máximo de 39 °C y un mínimo de 11 °C, riego controlado (250 ml / 36 h) y luz y humedad no controladas.

3.2.2 Aislamiento y caracterización de genes tipo *NBS-LRR* de *Agave tequilana*

3.2.2.1 Amplificación de genes *NBS-LRR* en *Agave tequilana*

Para aislar e identificar los genes *NBS-LRR* en el genoma de *A. tequilana*, se extrajo el DNA genómico de las hojas, de acuerdo con el protocolo propuesto por Doyle y Doyle, (1987), reduciendo el tiempo de incubación en el tampón CTAB. Se verificó la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se cuantificó la concentración mediante espectrofotometría por medio del equipo NANODROP1000 (Thermo Scientific). Luego se usaron cebadores universales reportados para la amplificación de la región NB-ARC de los genes *NBS-LRR* (Tamayo-Ordóñez *et al.*, 2012). La reacción de PCR se llevó a cabo en 25 µl de volumen final, con 25 ng de DNA genómico, 130 µM de dNTPS, 10 mM de cada cebador (5'-TGGTTACACCGTTGAGGACT-3' (Fw) y 5'-CTGGTCTTCCCCAGTCCAC-3' (Rv)), 2.5 unidades de Taq polimerasa, tampón de PCR 1 X y MgCl₂ 1.5 mM. Las condiciones de reacción incluyen una desnaturalización a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1.5 min a 60 °C, 1 min a 72 °C, y finalmente una extensión de 7 min a 72 °C. El tamaño del producto de la reacción para estos cebadores es de 400pb. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, fueron teñidos con bromuro de etidio.

3.2.2.2 Clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados

Los amplicones obtenidos por PCR de los tamaños esperados fueron clonados en el vector p-GEM®-T Easy. Las reacciones de ligación se realizaron siguiendo las

recomendaciones del fabricante, se utilizaron 50 ng/ μ l del producto de PCR, 1 μ l de ligasa T4, 4 μ l de buffer de ligación y 50 ng / μ l del vector de clonación en un volumen total de 10 μ l. El producto de la ligación se utilizará para transformar células competentes DH10B, mediante choque térmico. Las bacterias recombinantes fueron seleccionadas en un medio con 50 μ g/ml de ampicilina, 50 μ g/ml de X-gal y 30 μ l de IPTG. La extracción de plásmidos se realizó por el método de Birnboim y Doly (1979). Se seleccionaron 10 colonias recombinantes mediante técnicas estériles por cada transformante. Estas colonias fueron colectadas y puestas en agitación (200 rpm) a 37 °C en medio LB líquido con ampicilina (50 μ g/ml) toda la noche; transcurrido el tiempo las bacterias se colectaron por centrifugación a 10000 rpm durante 3 minutos. Las pastillas fueron resuspendidas en 200 μ l amortiguador de resuspensión (50 mM tris-HCl pH 8 y 20mM EDTA); posteriormente, se agregaron 200 μ l del amortiguador de lisis (0.2 M NaOH Y 1 % SDS) y se mezcló por inversión. Las muestras fueron incubadas a 4 ° C durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 150 μ l del amortiguador de precipitación (3.1 M Acetato de potasio, pH 5.5) agitando por inversión e incubando en hielo por 5 minutos. Las muestras fueron incubadas a -20 °C durante 3 horas. Se centrifugó a 14,000 rpm a 4 °C por 20 minutos. Se retiró el sobrenadante dejando secar la pastilla para su posterior resuspensión en 25 μ l de agua ultrapura.

Para la verificar la presencia de los insertos se realizó la digestión del DNA plasmídico con la enzima de restricción *EcoR1*. Las digestiones se incubaron a 37 °C durante tres horas. La mezcla de reacción contenía 50 ng de pDNA, 2u de enzima, 1X del buffer de reacción en un volumen final de 10 μ l, el volumen fue completado con agua ultrapura. Se envió a secuenciar aquellos plásmidos que se confirmaron la presencia del inserto, al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, unidad Reynosa Tamaulipas.

3.2.2.3 Identificación de las secuencias

Con el objetivo de confirmar la identidad de los fragmentos obtenidos, se procedió a analizar las secuencias obtenidas. Se realizó una comparación con secuencias depositadas en el GenBank empleando la herramienta blastx del programa BLAST®, para la búsqueda de secuencias homologas. Se empleó el software MEGA 7 (Kumar, Stecher, y Tamura, 2016) para realizar los alineamientos de secuencias de genes NBS-LRR homólogos de diferentes especies de plantas con el algoritmo ClustalW. Se reconstruyeron las relaciones filogenéticas entre estas secuencias por medio del análisis

de similitud de secuencias aminoacídicas, mediante el método de Neighbor-Joining. Con un remuestreo de 1000 repeticiones.

3.2.2.4 Construcción de base de datos de secuencias tipo NBS-LRR del transcriptoma de *A. tequilana*

Se realizó la búsqueda en el transcriptoma de *Agave tequilana* (PRJNA193469) publicado por Gross *et al.* (2013) de secuencias similares a las secuencias de las clonas con mayor similitud a genes tipo NBS-LRR, por medio de la herramienta tblastn del programa BLAST® usando los parámetros por default para la búsqueda. Las secuencias con mayor similitud fueron descargadas para la construcción de la base de datos de secuencias tipo NBS-LRR en *A. tequilana*. Para este estudio, estas secuencias fueron nombradas incluyendo el número de acción más el sufijo *NBS_Ateq* (gi|xxxxxxx|NBS_Ateq).

3.2.3 Caracterización de las secuencias NBS_Ateq

Se analizaron los dominios presentes en cada una de las secuencias seleccionadas por medio de la herramienta CD-search del CDD-NCBI (Marchler-Bauer y Bryant, 2004), empleando los valores por default, para la identificación de los dominios característicos para los genes tipo NBS-LRR en estas secuencias. El análisis funcional de los NBS_Ateq se realizó utilizando InterProScan (Quevillon *et al.*, 2005); pI (punto isoeléctrico) y MW (peso molecular) de los genes identificados se calcularon utilizando Pepstats (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats). La localización nuclear se predijo con el Sistema predictivo de localización subcelular (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (C.-S. Yu, Lin, y Hwang, 2004).

3.2.4 Análisis de diversidad y evolución en las secuencias NBS_Ateq

Las relaciones filogenéticas entre NBS_Ateq fueron determinadas por MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016), el árbol filogenético fue construido por el método de evolución mínima, con 1000 réplicas de bootstrap; se excluyeron del análisis algunas secuencias muy variables. La estructura, organización y secuencia de los motivos conservados de los genes se analizaron utilizando el software Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation (MEME) (Bailey *et al.*, 2009). Se calcularon las sustituciones sinónimas y no sinónimas así como la tasa de sustitución K_a/K_s de las secuencias NBS_Ateq por medio de DnaSP (6.12.01) (Librado y Rozas, 2009). Valores de $K_a/K_s > 1$ o $K_a/K_s < 1$ se consideró que

representan una selección positiva y purificadora, respectivamente. Para estimar el tiempo evolutivo, los valores de K_s se convirtieron en tiempo de duplicación en millones de años, en función de la relación de sustituciones por sitio sinónimo por año. La fórmula de cálculo para el tiempo de eventos de duplicación fue $T = \left(\frac{K_s}{2\lambda}\right) \times 1.00 E - 06$ mya ($\lambda = 6.50E-09$) (Gaut, Morton, McCaig, y Clegg, 1996) como sugiere (Liu *et al.*, 2019a).

3.2.5 Identificación de genes putativos de resistencia en *A. tequilana*

La identificación de genes de resistencia de plantas en *A. tequilana* se realizó en comparación con 152 genes de resistencia de referencia descargados de Plant Resistance Gene database (PRGdb: http://prgdb.crg.eu/wiki/Main_Page) (Sanseverino *et al.*, 2013). Se empleó la herramienta blastp del programa BLAST® para identificar genes putativos de resistencia, las secuencias homólogas con la mayor cobertura y porcentaje de identidad, fueron utilizadas para clasificar los genes y predecir sus posibles funciones. Las secuencias NBS_Ateq que mostraron una homología > 30% con proteínas R conocidas se identificaron como tipo NBS.

3.2.6 Análisis de expresión de las secuencias candidatas de genes NBS-RR

3.2.6.1 Diseño de cebadores específicos para secuencias tipo NBS-LRR de *Agave tequilana*

Los grupos obtenidos del análisis filogenético fueron nombrados del I al VII. Se diseñaron cebadores específicos por medio del software Primer3plus, para los grupos más representativos, es decir aquellos que con el mayor número de secuencias incluidas. Para el diseño de los cebadores se alinearon las secuencias incluidas en cada grupo, para cada grupo se realizó la búsqueda de regiones conservadas entre las secuencias las cuales fueron empleadas para el diseño de los cebadores (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1 Secuencia de los cebadores empleados para la amplificación de genes tipo *NBS-LRR* en *Agave tequilana*.

| Grupo | Nombre | Secuencia | Tamaño de amplicón |
|-------|------------|-------------------------|--------------------|
| I | NBS1_IA_Fw | TGTTATTCAAACAGCGGGCA | 163 pb |
| | NBS1_IA_Rv | GCTAACCACTCTGCTTCTGT | |
| II | NBS2_A_FW | AGTGAAGGAATTGGCTTACGC | 159 pb |
| | NBS2_A_RV | TGTATGTTGGCGGCAATACG | |
| V | NBS5_B_FW | GATTTCAATCCAGATTTCTGGGG | 183 pb |
| | NBS5_B_RV | CATGTCATGACGAGCAGTGG | |

3.2.6.2 Infección de plantas de *A. tequilana*

3.2.6.2.1 Protocolo de infección

Bajo condiciones estériles se obtuvieron cortes de hojas de 5 x 5 cm de las plantas de *A. tequilana* mantenidas en invernadero, los cuales fueron infectados con una solución de esporas obtenida de la cepa de *Lasiodiplodia* sp (H7A/H20) como se describe a continuación: La cepa fue crecida en medio PDA durante una semana días a 36 ± 2 °C. Después de 7 días, las cajas fueron inundadas con 5 ml de agua destilada estéril para recuperar las esporas. Posteriormente se recuperó el agua y se preparó una solución con una concentración de esporas de 1×10^4 por ml. El conteo de esporas se realizó por medio de cámara de Neubauer.

La infección en los cortes se realizó como se describe a continuación: Secciones de hojas fueron desinfectadas empleando una solución de hipoclorito de sodio al 1%, seguido de enjuague con agua destilada estéril y deja secar a temperatura ambiente (aprox 25 °C). La inoculación del tejido se llevó a cabo mediante punción que consiste en herir la superficie de las hojas (profundidad 2 mm) utilizando una aguja estéril y luego inoculando con 10 μ l de la solución de esporas a la concentración de 1×10^4 en la herida. Se realizó un tratamiento de control sin infección inoculando la herida con agua estéril. Los tejidos inoculados se mantuvieron en placas Petri de manera individual dentro de una estufa bacteriológica con temperatura controlada de 28 °C. El desarrollo de la enfermedad fue monitoreado cada 24 horas después de la infección y se recolectaron muestras del tejido a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas después de la infección (HPI) para la obtención de RNA, en total se emplearon tres replicas biológicas con tres extracciones independientes para cada tiempo monitoreado. La identidad del patógeno fue confirmada a partir del reislamiento del hongo y su identificación molecular por medio de la secuenciación las regiones de rDNA ITS1-5.8S-ITS2 y LSU D1-D2.

3.2.6.3 Extracción de RNA del tejido infectado

El RNA se obtuvo por medio de TRIZOL® (Invitrogen, USA) como se describe a continuación: Se maceraron 100 mg de tejido con nitrógeno líquido, se adicionó 1 ml de TRIZOL® y β -mercaptoetanol al 2%, se homogenizó el tejido y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, se agregaron 200 μ l de cloroformo por cada μ l de TRIZOLI®, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4 °C, se transfirió la fase superior a un

nuevo tubo. Posteriormente se agregaron 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA de la fase acuosa. Se agitó en repetidas ocasiones, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 75% para lavar la pastilla, se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, al final se resuspendió la pastilla con agua tratada con DEPC. Se verificó la integridad y pureza del RNA mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificó en el equipo NANODROP 2000 Spectrophotometer THERMO Scientific. El RNA obtenido fue tratado con DNAsa I de la marca PROMEGA siguiendo las recomendaciones del fabricante para la eliminación de DNA genómico. La eliminación del DNA se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y por medio de PCR utilizando como molde 50 ng del RNA tratado, empleando cebadores de DNA ribosomal 18s. La amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.2.6.3.1 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se realizó empleando el kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System (PROMEGA), siguiendo las especificaciones del fabricante. Las muestras de RNA fueron ajustadas a una misma concentración (100 µg). A partir de esta solución se procedió a obtener la cadena complementaria usando como molde el RNA obtenido. Los componentes de la reacción se describen a continuación: 4 µl de MgCl₂, 2 µl Buffer 10X de la enzima RT, 2 µl de la mezcla de dNTPs 10 mM, 0.5 µl del inhibidor de ribonucleasa Rnasin 1u/µl, 0.6 µl de la enzima transcriptasa inversa 15u/ µg, 1 µl de oligo (dT) 0.5 µg, 9.9 µl de agua libre de nucleasa. Para un volumen final de 20 µl. la mezcla de reacción fue incubada por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubó a 42 °C por 15 min y a 95 °C por 5 min. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso.

3.2.6.4 PCR tiempo real (expresión absoluta)

Se construyeron curvas estándar para analizar el número de copias expresadas de estos genes de acuerdo con la metodología descrita por Tamayo-Ordóñez *et al.*, (2016). Se usaron cebadores universales para analizar el número global de copias expresadas y se diseñaron tres conjuntos de cebadores específicos para cada uno de los principales grupos de genes *NBS-LRR* identificados (I, II, V). Las curvas estándar se construyeron usando los fragmentos de *NBS-LRR* clonados como plantillas para cada grupo de genes identificados. La inserción de una sola copia de cada gen se verificó mediante

secuenciación en los fragmentos NBS-LRR clonados seleccionados. La inserción de una única copia de cada gen se verificó mediante secuenciación en los fragmentos de NBS-LRR clonados seleccionados. El número de copias fue calculado convirtiendo la concentración en ng siguiendo la fórmula propuesta por Whelan, Russell, y Whelan, (2003) y Lu, Xie, y Chen (2012): $\text{DNA (copias)} = 6.02 \times 10^{23}(\text{copias mol}^{-1}) \times \text{DNA cantidad (g)}/\text{DNA longitud (pb)} \times 660 (\text{g mol}^{-1}\text{pb}^{-1})$. La curva estándar y los valores de Ct para las diferentes concentraciones con un factor de dilución de 10^{-1} (100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 ng/ μl) de DNA de cada grupo evaluado se determinaron mediante el software EcoStudy en el Sistema de PCR en tiempo real Eco (Illumina). La curva estándar se obtuvo trazando la concentración de DNA (x) y los valores de Ct (y) para las diferentes concentraciones de DNA, se realizó un análisis de regresión lineal para cada curva obtenida. La PCR en tiempo real para determinar el número de copias expresadas durante la infección del hongo *Lasiodiplodia* (H20) se realizó en el sistema de PCR en tiempo real (Illumina). La PCR en tiempo real se realizó en el sistema de PCR en tiempo real (Illumina) utilizando un ensayo de PCR basado en SYBR Green. Se utilizaron tres réplicas biológicas independientes de cada muestra y tres réplicas técnicas de cada réplica biológica para el análisis de qRT-PCR. La reacción de PCR contiene 5 μl de SYBR Master 2X (Applied Biosystems) (1X), 1 μl de cDNA (200 ng / μl), 0.25 μl (20 μm) de cada cebador y 3.5 μl de agua ultrapura hasta un volumen final de 10 μl . Las condiciones de PCR fueron 94 °C durante 5 min, seguidas de 40 ciclos de 94 °C durante 1 min, 56 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min, se realizaron curvas de fusión para cada par de cebadores y se realizó una extensión final a 72 °C durante 1 min.

3.3 RESULTADOS

2.3.1 Amplificación de genes NBS-LRR en *Agave tequilana*

La reacción se llevó a cabo con el DNA de 11 individuos, los fragmentos obtenidos de mediante PCR, correspondieron al tamaño esperado de 400 pb (Figura 3.1), el amplificado de los individuos 4 y 11 no se observan en la figura.

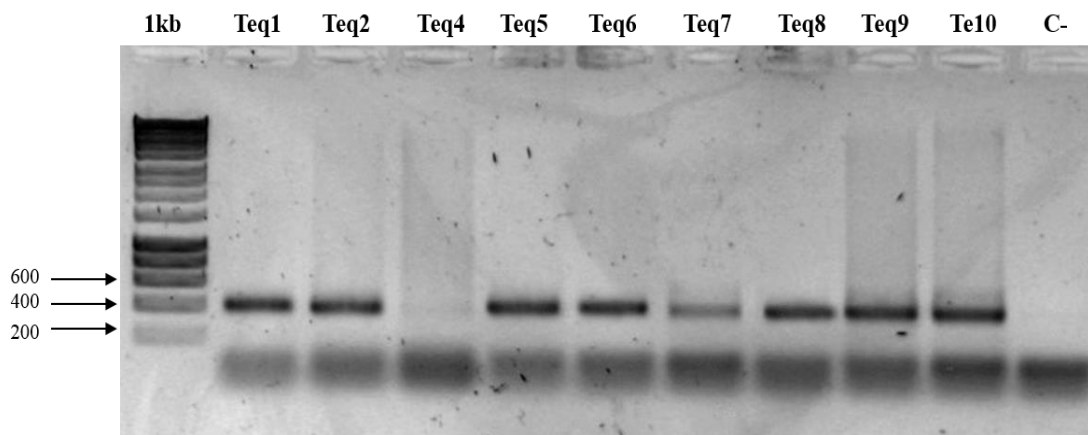


Figura 3.1. Amplificación de una región parcial del dominio NB-ARC de los genes *NBS-LRR* a partir de DNA de *Agave tequilana*. Visualización en geles de agarosa al 1%. Electroforesis realizada por 45 min a 85 volts, marcador de 1kb (Hyperladder I, Bioline); Teñido con bromuro de etidio.

La identidad de estos fragmentos fue confirmada por medio del análisis de las secuencias obtenidas mediante clonación y posterior secuenciación. Las secuencias de los insertos correspondientes a las 11 clonas obtenidas (NBS_A2, NBS_A6, NBS_A12, NBS_A13, NBS_A20, NBS_T4, NBS_T7, NBS_T8, NBS_T9, NBS_T11), mostraron identidad mayor al 98%, con una cobertura mayor al 98% con excepción de la clona NBS_T9. esta región de 400pb es una región parcial de secuencias del TSA de *a. tequilana* correspondiente al dominio NBS de proteínas de este tipo, región para la cual los cebadores fueron diseñados.

Las secuencias amplificadas con los cebadores universales fueron traducidas y presentaron homología con proteínas R tipo NBS-LRR depositadas en el GenBank. El nivel de identidad de estas secuencias con la región NB-ARC de proteínas R de otras plantas varió de entre un 37% y 41% para las clonas para la clona NBS_T11 y NBS_A13 respectivamente; esto permitió identificarlas como secuencias parciales de proteínas NBS-LRR con homología con proteínas de este tipo de plantas monocotiledóneas principalmente de *Oryza punctata* y *Phoenix dactylifera* (Cuadro 3.2). Para confirmar la relación de estas secuencias clonadas con otras proteínas tipo NBS-LRR, se realizó un análisis filogenético. Se incluyeron proteínas del tipo TNL de *Rosa rugosa*, *Arabidopsis thaliana* y L6 de *Linum usitatissimum*, así como, proteínas del tipo CNL como Pi2 de *Oryza punctata*, RPM1 de *Oryza brachyantha*, Lr10 de *Triticum turgidum*, RPP13 de *Arabidopsis thaliana*, una proteína tipo CNL de *Helianthus annuus*, junto con ocho secuencias

traducidas de genes que codifican para proteínas NBS-LRR en diferentes especies de *Agave*.

El agrupamiento de estas proteínas es dependiente de la clase de NBS, las proteínas tipo CNL y TNL se agrupan en clados distintos (Figura 3.2). El clado no-TIR (CNL) esta compuesto por tres subgrupos, uno formado por las secuencias NBS aisladas en este trabajo junto con otras proteínas tipo CNL descritas para plantas monocotiledóneas como *Triticum turgidum*, *Oriza punctata* y *Oriza brachyantha* (subgrupo I). El clado de no TIR (CNL) está compuesto por tres subgrupos, dos formados por las proteínas CNL de monocotiledóneas y otro por CNL de plantas dicotiledóneas. El subgrupo I incluye secuencias de NBS aisladas en este trabajo junto con proteínas de tipo NBS obtenidas en el transcriptoma de *A. tequilana* y otras proteínas de tipo CNL descritas en plantas monocotiledóneas como LR 10 de *T. turgidum*, RPM1 de *O. punctata* y Pi2 de *O. brachyantha*. En el subgrupo II se agrupan las secuencias de tipo NBS de diferentes especies de *Agave* (*A. angustifolia*, *A. fourcroydes* y *A. tequilana* junto con la proteína RPM1 de *A. thaliana*. La proteína CNL de plantas dicotiledóneas (*H. annuus* y *A. thaliana*) están incluidas en el subgrupo III. El último clado consiste solo en secuencias de tipo TNL de especies dicotiledóneas como *R. rugosa*, *A. thaliana* y *L. usitatissimum* (Figura 13). De acuerdo con la homología de las secuencias con otras proteínas tipo NBS-LRR y con el agrupamiento obtenido con el análisis filogenético, se confirmó que los fragmentos amplificados corresponden a región parcial del dominio NB-ARC de estos genes en *A. tequilana*.

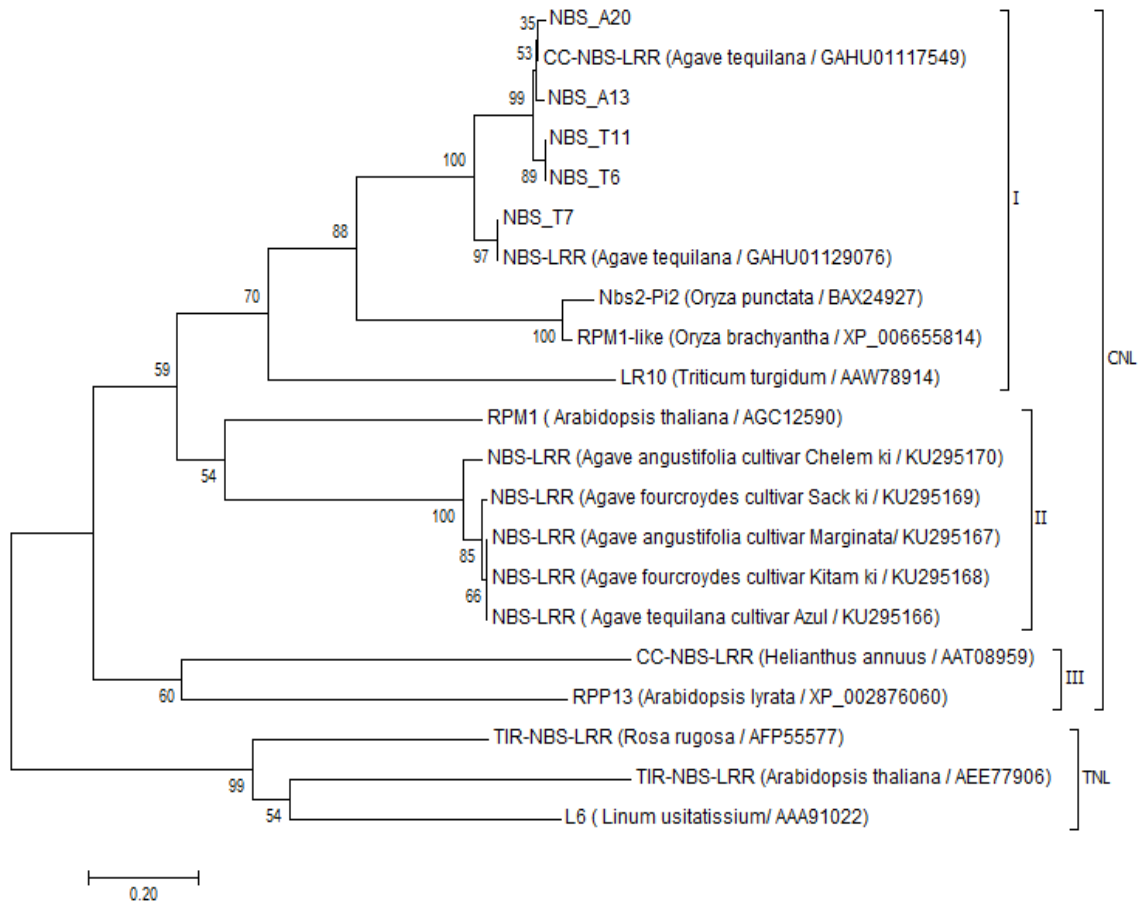


Figura 3.2. Agrupamiento construido con 21 secuencias de proteínas R (TNL y CNL). Las secuencias de las proteínas R conocidas fueron descargadas del GenBank con los siguientes números de accesión: Pi2 (BAX24927), RPM1 (XP_00g55814), LR10 (AAW78914), RPM1 (AGC12590), CNL (AAT08959), RPP13 (XP_002876060), TNL (AFP55577), TNL (AEE77906), L6 (AAA91022), se incluyeron secuencias traducidas de genes que codifican para proteínas tipo NBS para algunas especies de *Agave* encontradas en el GenBank con los números de accesión (GAU01117549, GAU1129076, KU295166, KU295167, KU295268, KU295169, KU295170).

Cuadro 3.2 Resultados de la búsqueda de homología (blastx) con proteínas R conocidas de otras plantas depositadas en el GenBank.

| CLONA | DESCRIPCIÓN | ESPECIE | MAX SCORE | TOTAL SCORE | QUERY COVER | E-VALUE | IDENTIDAD % | No. ACCESION |
|---------|---|------------------------------------|-----------|-------------|-------------|----------|-------------|--------------------------------|
| NBS_A2 | Disease resistance protein RPM1 | <i>Sorghum bicolor</i> | 94.7 | 94.7 | 97% | 8.00E-20 | 40 | XP_002437863.1 |
| NBS_A6 | PREDICTED: disease resistance protein RPM1-like | <i>Ziziphus jujuba</i> | 105 | 105 | 98% | 4.00E-24 | 39 | XP_015880635.1 |
| NBS_A12 | PREDICTED: disease resistance protein RPM1-like | <i>Phoenix dactylifera</i> | 104 | 104 | 98% | 2.00E-23 | 40 | XP_008790858.2 |
| NBS_A13 | PREDICTED: disease resistance protein RPM1-like | <i>Phoenix dactylifera</i> | 105 | 105 | 98% | 9.00E-24 | 41 | XP_008790858.2 |
| NBS_A20 | PREDICTED: putative disease resistance RPP13-like protein 3 | <i>Elaeis guineensis</i> | 101 | 101 | 98% | 2.00E-22 | 42% | XP_010931153.2 |
| NBS_T4 | Putative NBS-LRR type R protein, Nbs2-Pi2 | <i>Oryza punctata</i> | 94.7 | 94.7 | 97% | 7.00E-20 | 42 | BAX24927.1 |
| NBS_T6 | NBS-LRR disease resistance protein, putative | <i>Oryza sativa Japonica Group</i> | 74.3 | 74.3 | 83% | 5.00E-13 | 38 | ABA97381.1 |

| | | | | | | | | |
|----------------|---|--------------------------|------|------|-----|----------|----|--------------------------------|
| NBS_T7 | Putative NBS-LRR type R protein, Nbs2-Pi2 | <i>Oryza punctata</i> | 93.6 | 93.6 | 97% | 2.00E-19 | 38 | BAX24927.1 |
| NBS_T8 | Putative NBS-LRR type R protein, Nbs2-Pi2 | <i>Oryza rufipogon</i> | 91.7 | 91.7 | 97% | 9.00E-19 | 38 | BAX24711.1 |
| NBS_T9 | PREDICTED: disease resistance protein RPM1-like | <i>Oryza brachyantha</i> | 101 | 101 | 88% | 6.00E-22 | 39 | XP_006655814.1 |
| NBS_T11 | Putative NBS-LRR type R protein | <i>Oryza punctata</i> | 74.3 | 74.3 | 70% | 1.00E-12 | 37 | BAX24927.1 |

3.3.2 Identificación de genes NBS-LRR en el transcriptoma de *A. tequilana*

Se realizó una búsqueda de secuencias tipo NBS-LRR en el transcriptoma de *A. tequilana*, comparando con las secuencias aminoacídicas de los fragmentos clonados empleando la herramienta tblastn del programa BLAST®. En total 46 secuencias tipo NBS-LRR (NBS_Ateq) fueron identificadas del transcriptoma de *A. tequilana*. Todas las secuencias analizadas pertenecen al tipo no TIR según el análisis de dominios conservados. La mayoría de ellas tienen los tres dominios característicos (CC, NBS y LRR). Sin embargo, algunos carecen de uno o más de estos. Según el análisis de dominios, las secuencias se clasificaron en cinco subclases: CNL, CN, NL, N y L (Cuadro 3.3). El 62% de los genes corresponden a la clase CNL, el 24% a la clase NL, el 7% a la clase CN y el 2% a la clase N y 4% a la clase L.

El ORF correspondiente para cada *NBS_Ateq* fue traducido y caracterizado con los programas Pepstat, InterProScam y cello.life.nctu.edu.tw para la descripción del número de aminoácidos, peso molecular, localización, dominios, sitios de interacción con otras proteínas y función molecular (Cuadro 3.3). El tamaño predicho varía de 1232 a 162 aminoácidos, así mismo, se observó una variación en el peso molecular y el punto isoeléctrico, los cuales varían de 139431.57 (gi|533002515|NBS_Ateq) a 17959.68 kDa (gi|533063090|NBS_Ateq) y de 10.0613 (gi|533063090|NBS_Ateq) a 5.88 (gi|1532981307|NBS_Ateq) respectivamente. El promedio del punto isoeléctrico para las diferentes clases identificadas es 7.75, 8.042, 8.030, 10.06 y 9.88 para los tipos CNL, CN, NL, N y L respectivamente. El 93% de las proteínas NBS-LRR tienen una ubicación prevista en el citoplasma, solo 3 proteínas mostraron un dominio no citoplasmático o la presencia de un péptido señal de transporte que las coloca directamente en la membrana (gi|533063088|NBS_Ateq, gi|533063090|NBS_Ateq, gi|533083676|NBS_Ateq).

Cuadro 3.3 Características fisicoquímicas, dominios y análisis funcional de las proteínas NBS_Ateq.

| Grupo | Nombre | # aminoácidos | Peso molecular | Punto isoelectrico | Localización celular predicha | Dominios predichos | Sitios de interacción | Función molecular | |
|-------|----------------------------|----------------------------|----------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------|
| I | >gi 533045928 N BS_Ateq | 1047 | 117966.45 | 6.8983 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión | |
| | >gi 533045907 N BS_Ateq | 1045 | 118528.1 | 7.1411 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión | |
| | >gi 533045912 N BS_Ateq | 1076 | 121441.28 | 7.0209 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión | |
| | >gi 533045694 N BS_Ateq | 1037 | 117102.93 | 6.4364 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión | |
| | >gi 532893577 N BS_Ateq | 1041 | 118109.17 | 7.5061 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión | |
| | >gi 533030763 N BS_Ateq | 1114 | 126968.22 | 6.394 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión | |
| | >gi 533002515 N BS_Ateq | 1232 | 139431.57 | 7.0045 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión | |
| | >gi 532924243 N BS_Ateq | 1082 | 123358.23 | 6.913 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión | |
| | >gi 532991156 N BS_Ateq | 947 | 106653.62 | 6.4626 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión | |
| | >gi 532981307 N BS_Ateq | 1032 | 117927.03 | 5.8851 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión Unión a proteína | |
| | >gi 532974233 N BS_Ateq | 1042 | 118277.92 | 6.6488 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión Unión a proteína | |
| | >gi 533055969 N BS_Ateq | 1038 | 117332.52 | 6.6294 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión Unión a proteína | |
| | >gi 533053514 N BS_Ateq | 875 | 100513.32 | 9.1992 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión | |
| | >gi 533014494 N BS_Ateq | 905 | 102870.16 | 7.6813 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión | |
| | >gi 533020292 N BS_Ateq | 714 | 80567.36 | 8.0375 | Citoplasmática | NL | N.P | ADP unión | |
| | >gi 533043533 N BS_Ateq | 714 | 81508.73 | 8.4025 | Citoplasmática | NL | N.P | ADP unión | |
| | II | >gi 532972329 N BS_Ateq | 906 | 102897.11 | 8.5005 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |
| | | >gi 533044854 N | 928 | 105482.39 | 8.2052 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |

| | | | | | | | | |
|-----|----------------------------|-----|-----------|---------|-------------------------------------|------|---------|-----------|
| | BS_Ateq | | | | | | | |
| | >gi 532936927 N BS_Ateq | 902 | 102167.67 | 7.6553 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 532995192 N BS_Ateq | 656 | 74806.26 | 7.5578 | Citoplasmática | NL | N.P | ADP unión |
| | >gi 533019755 N BS_Ateq | 664 | 75641.09 | 7.2225 | Citoplasmática | NL | N.P | ADP unión |
| | >gi 533013839 N BS_Ateq | 716 | 81117.74 | 7.8653 | Citoplasmática Membrana interna* | NL | N.P | ADP unión |
| | >gi 532931821 N BS_Ateq | 445 | 50201.69 | 7.3089 | Citoplasmática | N**L | N.P | N.P |
| | >gi 533028961 N BS_Ateq | 802 | 90855.12 | 9.3321 | Citoplasmática | NL | N.P | ADP unión |
| | >gi 532997477 N BS_Ateq | 905 | 102425.87 | 7.6071 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 532992532 N BS_Ateq | 902 | 102789.32 | 8.6092 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 533083674 N BS_Ateq | 903 | 103115.95 | 8.5748 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 532902355 N BS_Ateq | 686 | 78369.05 | 8.9047 | Citoplasmática | NL | N.P | ADP unión |
| III | >gi 533083677 N BS_Ateq | 917 | 105294.27 | 9.4672 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 533083676 N BS_Ateq | 455 | 52306.94 | 9.8875 | Citoplasmática Membrana interna | L | N.P | N.P |
| IV | >gi 533063093 N BS_Ateq | 284 | 32250.68 | 8.8699 | Citoplasmática | CN | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 533063090 N BS_Ateq | 162 | 17959.68 | 10.0613 | Citoplasmática Membrana interna* | N | N.P | ADP unión |
| | >gi 533022698 N BS_Ateq | 937 | 105211.4 | 9.4122 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 533063088 N BS_Ateq | 832 | 94488.34 | 8.6654 | Citoplasmática Membrana interna* | NL | N.P | ADP unión |
| V | >gi 533063092 N BS_Ateq | 663 | 75898.16 | 8.5818 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 533063095 N BS_Ateq | 572 | 65442.06 | 8.3779 | Citoplasmática | CN | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 533063091 N BS_Ateq | 413 | 48043.31 | 7.6901 | Citoplasmática | NL | N.P | ADP unión |
| | >gi 533063096 N BS_Ateq | 914 | 104082.5 | 7.7015 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |

| | | | | | | | | |
|-----|---|-----|-----------|--------|----------------|-----|---------|-----------|
| | >gi 533063089 N BS_Ateq | 662 | 75871.32 | 7.3438 | Citoplasmática | NL | N.P | ADP unión |
| VI | >gi 532997490 N BS_Ateq | 969 | 109785.44 | 8.3295 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 532876617 N BS_Ateq | 551 | 62759.81 | 6.8801 | Citoplasmática | CN | RanGAP2 | ADP unión |
| VII | >gi 533083673 N BS_Ateq | 917 | 105294.27 | 9.4672 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 532993674 N BS_Ateq | 454 | 52175.74 | 9.8875 | Citoplasmática | L | N.P | N.P |
| | >gi 533015050 N BS_Ateq | 902 | 102440.42 | 7.8231 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 532902354 N BS_Ateq | 872 | 100378.04 | 8.4847 | Citoplasmática | CNL | RanGAP2 | ADP unión |
| | >gi 532849137 N BS_Ateq | N.D | N.D | N.D | N.D | N.D | N.D | N.D |
| N.D | No determinado | | | | | | | |
| N.P | No predicho | | | | | | | |
| * | Sin dominio citoplasmático; péptido señal | | | | | | | |
| N** | Dominio parcial | | | | | | | |

3.3.3 Análisis de la diversidad y evolución de las secuencias NBS_Ateq

Para inferir las relaciones evolutivas de los genes NBS-LRR identificados, se construyó un árbol filogenético usando el método de mínima evolución (Figura 3.3). Las secuencias NBS_Ateq se organizaron en siete grupos en el cladograma reconstruido. Los clados que incluyen el mayor número de secuencias son el I, II y V, el resto agrupa entre dos y cuatro secuencias. Dentro del grupo I, la mayoría de las secuencias presenta los tres dominios característicos (CNL), solo dos secuencias dentro de este grupo presentan la ausencia del dominio CC. Los grupos II, III, IV, V, VI son grupos más heterogéneos ya que albergan secuencias tipo CNL, NL. Finalmente, el grupo VII incluye secuencias del tipo CNL y L. se determinó que existe una presión negativa (Purificación) para los grupos I, II, III, IV y VI según sus valores de K_a/K_s (< 1). Solo el grupo V muestra un valor de $K_a/K_s > 1$, lo que sugiere que este grupo está sujeto a una selección positiva. Los tiempos estimados de formación para estos grupos de acuerdo con los valores de K_s fueron muy variables, siendo 85.7, 23.8, 197.1, 3.2, 9.1, 91.2 y 56.2 millones de años para los grupos I, II, III, IV, V, VI y VII, respectivamente. Aquí, es importante mencionar que en las familias III, IV y VII, el tiempo evolutivo se calculó considerando solo unas pocas secuencias; por lo tanto, estos valores pueden no ser tan precisos (Cuadro 3.4).

Por medio del análisis de motivos conservados por MEME, se identificaron los motivos característicos y el orden de estos en las 46 secuencias NBS_Ateq (Figura 3.3). En la mayoría de las secuencias tipo CNL se encontraron 4 motivos conservados en el dominio CC (Anexo 6). Aunque dos secuencias específicas NBS_Ateq (gi | 532995192 y gi | 533019755) no tienen algunos de los motivos encontrados para este dominio. En el dominio NBS, los motivos característicos se encontraron en un orden estricto: P-loop, RNBS-A, Cinasa 2, RNBS-B, RNBS-C, GLPL, RNBSD, MHD (Figura 3.3). Otra característica encontrada fue el residuo de triptófano en el motivo cinasa 2. Con respecto al dominio LRR, se encontraron diez motivos conservados. Este dominio fue el más variable entre todas las secuencias NBS_Ateq (Anexo 7).

La estructura de las diferentes secuencias analizadas varía dependiendo de cada uno de los grupos identificados, por ejemplo, para el grupo Ia (Figura 3.3), todas las secuencias incluidas tienen una distribución espacial similar de los motivos. Sin embargo, esta distribución difiere del resto de los grupos, aunque la mayoría comparte los mismos

motivos conservados. En los logotipos de las secuencias se puede observar que, aunque algunas firmas se conservan dentro de los motivos, algunos presentan variaciones en la secuencia, especialmente los motivos RNBS-A, RNBS-B, RNBS-C, mientras que los más conservados son los motivos cinasa 2, GLPLA y P-loop (Figura 3.3). Comparado las regiones conservadas entre las diferentes grupos se encontraron algunos cambios puntuales característicos para cada uno de los grupos en algunos de los motivos identificados. La identificación de los motivos característicos y la identificación de regiones conservadas para las secuencias que forman parte de cada grupo, permitió el diseño de cebadores específicos.

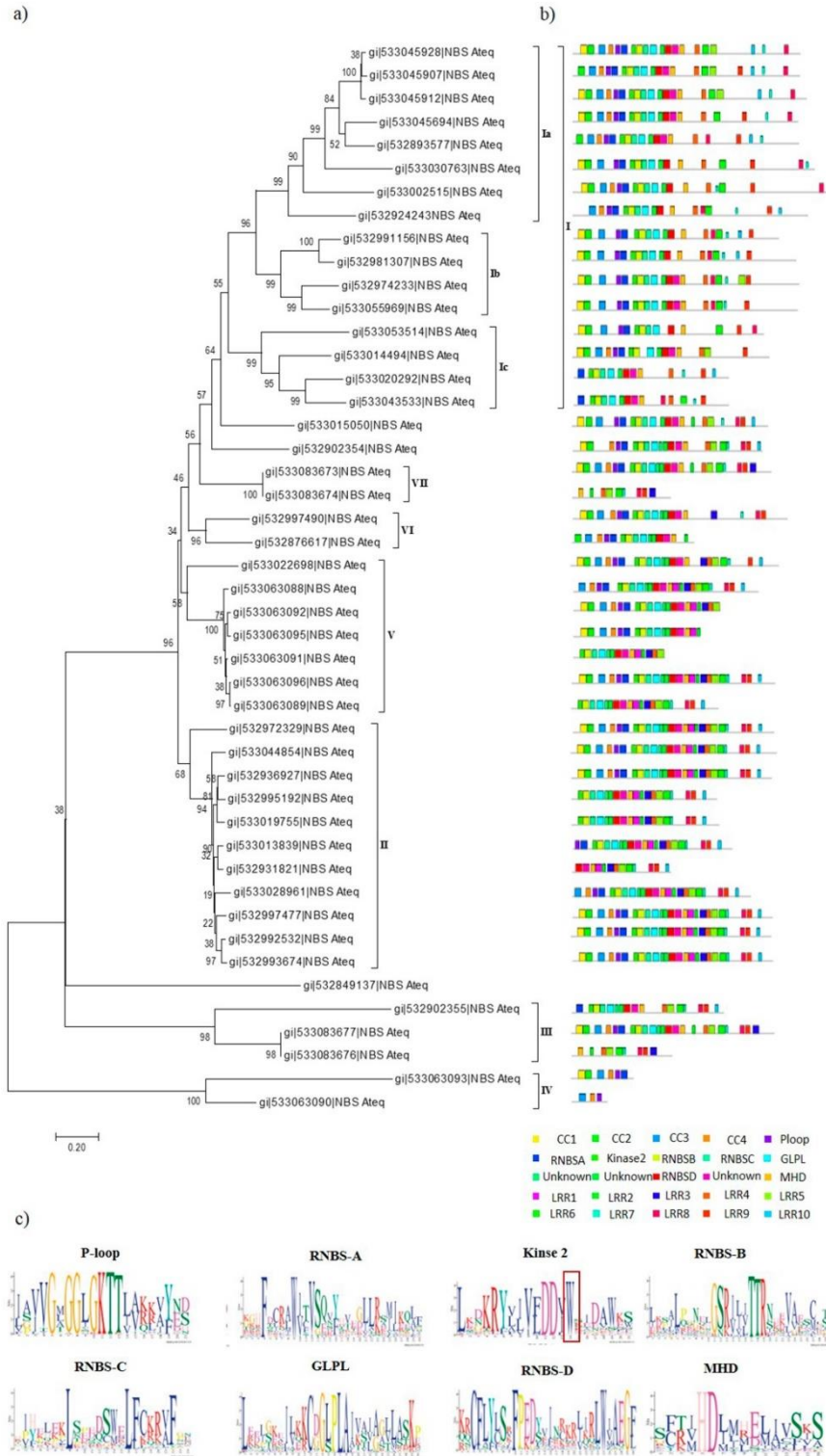


Figura 3.3. Análisis filogenético y búsqueda de motivos conservados para secuencias NBS_LRR de *Agave tequilana*. a) El árbol filogenético se generó usando secuencias completas de genes transcritos del tipo NBS_LRR seleccionados del transcriptoma de *A. tequilana* (Gross *et al.*, 2013) usando MEGA 7 por el método de evolución mínima y un bootstrap de 1000; b) Estructura y organización del motivo conservado de los genes

NBS_Ateq identificados, predicho por Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation (MEME); c) Logos de los motivo principales del dominio NBS identificado en el análisis de secuencias NBS_Ateq (MEME). Las secuencias de los motivos encontrados por meme están disponibles en el material suplementario (Anexo 6-7).

Cuadro 3.4 Tiempo de duplicación y tipo de selección de las secuencias NBS_Ateq.

| Grupos | Combinaciones | Ka | | Ks | | Mya | Ka/Ks | | Tipo de selección |
|--------|---------------|----------|-------------------|----------|-------------------|---------|----------|--------------------|-------------------|
| | | Promedio | Rango | Promedio | Rango | | Promedio | Rango | |
| I | 120 | 0.8306 | 1.1947- 0.0534 | 1.1144 | 1.6412- 0.0514 | 85.72 | 0.7515 | 1.2392- 0.4912 | Purificación |
| II | 45 | 0.1638 | 0.4369- 0.0616 | 0.31 | 0.9602- 0.1207 | 23.8507 | 0.5613 | 0.7759- 0.4007 | Purificación |
| III | 2 | 0.6309 | 0.6309 | 2.5628 | 2.5628 | 197.13 | 0.24171 | 0.24171 | Purificación |
| IV | 1 | 0.0142 | 0.0142 | 0.0416 | 0.0416 | 3.2 | 0.3413 | 0.3413 | Purificación |
| V | 21 | 0.1705 | 0.5106- 0.0144 | 0.1184 | 0.3495- 0.0144 | 9.115 | 1.2324 | 1.7302- 0.6760 | Diversificación |
| VI | 1 | 0.3923 | 0.3923 | 1.1854 | 1.1854 | 91.846 | 0.3309 | 0.3309 | Purificación |
| VII | 6 | 0.8282 | 0.9116- 0.7728 | 0.8784 | 1.0027- 0.7662 | 56.23 | 0.9487 | 1.02910- 0.8349 | Purificación |

3.3.4 Identificación de genes de resistencia a enfermedades

Las secuencias analizadas presentaron homología con las proteínas de referencia de plantas monocotiledóneas de la base de datos de Genes de Resistencia Vegetal (PRGdb, <http://prgdb.org>), aunque, algunos casos presentaron homología con proteínas de plantas dicotiledóneas, principalmente *Solanum bulbocastanum* y *Arabidopsis thaliana*. La mayoría de las proteínas identificadas son del tipo CNL y confieren resistencia contra hongos. Cada grupo de genes NBS identificado para las secuencias NBS_Ateq (Figura 3.3) presenta homología con cierto tipo de proteína de resistencia (Cuadro 3.5). Las secuencias del grupo I son homologas a proteínas de resistencia como RB de *Solanum bulbocastanum*, Rps1 de *Glycine max*, Pit de *Oryza sativa*, RPP13 y HRT de *Arabidopsis thaliana* que confieren resistencia a los hongos *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*, *Magnaporthe grisea*, *Pseudoperonospora cubensis* y al virus Turnip crinkle. Las secuencias del grupo II y VI tienen homología principalmente para proteínas de resistencia contra *Magnaporthe grisea* como Pi2, Piz-t y Pikm2-TS de *Oryza sativa*. También se encontró homología con Sr35 de *Triticum* y RPM1 de *Arabidopsis thaliana* reportada contra *Pseudomonas syringae*. Secuencias del grupo III tienen homología con la proteína RPM1 y Rxo. Las de los grupos IV y V con Pi9 que confiere resistencia a *Magnaporthe grisea* en *Oryza sativa*. Por último, las secuencias del grupo VII con la proteína Pi2.

Cuadro 3.5 Homología entre NBS_Ateq y proteínas R de referencia de la base de datos PRGdb.

| Grupo | Nombre | Homólogo | Especie | Clase | Tipo | Cobertura | Valor E | % Identidad | Patógeno | Enfermedad |
|-------|------------------------|---------------|--------------------------------------|---------------|------|-----------|-----------|-------------|-----------------------------------|--|
| | >gi 533045928 NBS_Ateq | 170005_RB | <i>Solanum bulbocastanum</i> | Magnoliopsida | CNL | 97% | 0 | 36.60% | n.d | n.d |
| | >gi 533045907 NBS_Ateq | 170005_RB | <i>Solanum bulbocastanum</i> | Magnoliopsida | CNL | 99% | 2.00E-178 | 34.81% | n.d | n.d |
| | >gi 533045912 NBS_Ateq | 170005_RB | <i>Solanum bulbocastanum</i> | Magnoliopsida | CNL | 98% | 0 | 34.29% | n.d | n.d |
| | >gi 533045694 NBS_Ateq | 148_Rpi-blb1 | <i>Solanum bulbocastanum</i> | Magnoliopsida | CNL | 99% | 0 | 37.77% | <i>Phytophthora infestans</i> | Tizón tardío de tomate |
| | >gi 532893577 NBS_Ateq | 148_Rpi-blb1 | <i>Solanum bulbocastanum</i> | Magnoliopsida | CNL | 99% | 1.00E-180 | 35.80% | <i>Phytophthora infestans</i> | Tizón tardío de tomate |
| | >gi 533030763 NBS_Ateq | 148_Rpi-blb1 | <i>Solanum bulbocastanum</i> | Magnoliopsida | CNL | 99% | 0 | 34.79% | <i>Phytophthora infestans</i> | Tizón tardío de tomate |
| | >gi 533002515 NBS_Ateq | 148_Rpi-blb1 | <i>Solanum bulbocastanum</i> | Magnoliopsida | CNL | 98% | 8.00E-179 | 35.38% | <i>Phytophthora infestans</i> | Tizón tardío de tomate |
| | >gi 532924243 NBS_Ateq | 1501_Rps1-k-1 | <i>Glycine max</i> | Magnoliopsida | NL | 96% | 0 | 36.72% | <i>Phytophthora sojae</i> | Pudrición de la raíz y el tallo de la soja |
| | >gi 532991156 NBS_Ateq | 161460_Pit | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 99% | 3.00E-173 | 37.17% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| I | >gi 532981307 NBS_Ateq | 161460_Pit | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 94% | 0 | 36.75% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 532974233 NBS_Ateq | 161460_Pit | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 95% | 0 | 39.25% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 533055969 NBS_Ateq | 161460_Pit | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 93% | 0 | 38.16% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 533053514 NBS_Ateq | 1492_RPP13 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Magnoliopsida | CNL | 95% | 1.00E-94 | 31.67% | <i>Pseudoperonospora cubensis</i> | Moho suave de las cucurbitáceas |
| | >gi 533014494 NBS_Ateq | 1484_HRT | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Magnoliopsida | CNL | 99% | 5.00E-132 | 32.88% | Virus de la arruga del nabo | Virus de la arruga del nabo |
| | >gi 533020292 NBS_Ateq | 1484_HRT | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Magnoliopsida | CNL | 99% | 1.00E-97 | 33.20% | Virus de la arruga del nabo virus | Virus de la arruga del nabo |
| | >gi 533043533 NBS_Ateq | 1484_HRT | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Magnoliopsida | CNL | 98% | 2.00E-107 | 33.98% | Virus de la arruga del nabo | Virus de la arruga del nabo |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------------------------|-----------------|---|---------------|-----|-----|-----------|--------|-----------------------------|--------------------------------------|
| | >gi 532972329 NBS_Ateq | 161444_Pi2 | <i>Oryza sativa</i> (Indica group) | Liliopsida | CNL | 99% | 3.00E-136 | 34.48% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 533044854 NBS_Ateq | 161444_Pi2 | <i>Oryza sativa</i> (Indica group) | Liliopsida | CNL | 98% | 4.00E-134 | 33.63% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 532936927 NBS_Ateq | 161443_Piz-t | <i>Oryza sativa</i> (Indica group) | Liliopsida | CNL | 99% | 6.00E-136 | 33.13% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 532995192 NBS_Ateq | 170001_Sr35 | <i>Triticum monococcum</i> | Liliopsida | CNL | 99% | 4.00E-93 | 33.86% | n.d | n.d |
| | >gi 533019755 NBS_Ateq | 170001_Sr35 | <i>Triticum monococcum</i> | Liliopsida | CNL | 95% | 4.00E-85 | 33.58% | n.d | n.d |
| II | >gi 533013839 NBS_Ateq | 161444_Pi2 | <i>Oryza sativa</i> (Indica group) | Liliopsida | CNL | 98% | 3.00E-101 | 31.97% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 532931821 NBS_Ateq | 161454_Pikm2-TS | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 97% | 1.00E-56 | 31.94% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 533028961 NBS_Ateq | 161444_Pi2 | <i>Oryza sativa</i> (Indica group) | Liliopsida | CNL | 98% | 8.00E-116 | 33.11% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 532997477 NBS_Ateq | 161444_Pi2 | <i>Oryza sativa</i> (Indica group) | Liliopsida | CNL | 99% | 8.00E-126 | 31.13% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 532992532 NBS_Ateq | 161444_Pi2 | <i>Oryza sativa</i> (Indica group) | Liliopsida | CNL | 99% | 1.00E-134 | 32.24% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 533083674 NBS_Ateq | 1491_RPM1 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Magnoliopsida | CNL | 98% | 3.00E-79 | 35.36% | <i>Pseudomonas syringae</i> | Añublo bacteriano |
| | >gi 532902355 NBS_Ateq | 1491_RPM1 | <i>Zea mays</i> | Liliopsida | N | 98% | 6.00E-176 | 43.64% | n.d | n.d |
| III | >gi 533083677 NBS_Ateq | 1491_RPM1 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Magnoliopsida | CNL | 99% | 1.00E-176 | 35.04% | <i>Pseudomonas syringae</i> | Añublo bacteriano |
| | >gi 533083676 NBS_Ateq | 1491_RPM1 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Magnoliopsida | CNL | 98% | 3.00E-79 | 35.36% | <i>Pseudomonas syringae</i> | Añublo bacteriano |
| IV | >gi 533063093 NBS_Ateq | 161442_Pi9 | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 82% | 3.00E-44 | 38.91% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 533063090 NBS_Ateq | 161442_Pi9 | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 93% | 4.00E-25 | 41.43% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| V | >gi 533022698 NBS_Ateq | 161442_Pi9 | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 99% | 3.00E-152 | 34.46% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 533063088 NBS_Ateq | 161442_Pi9 | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 97% | 9.00E-138 | 34.94% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------------------------|--------------|---|---------------|-----|-----|-----------|--------|-----------------------------|--------------------------------------|
| | >gi 533063092 NBS_Ateq | 161442_Pi9 | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 95% | 1.00E-119 | 37.29% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 533063095 NBS_Ateq | 161442_Pi9 | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 94% | 1.00E-104 | 36.69% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 533063091 NBS_Ateq | 170001_Sr35 | <i>Triticum monococcum</i> | Liliopsida | cNL | 93% | 6.00E-93 | 42.60% | n.d | n.d |
| | >gi 533063096 NBS_Ateq | 161442_Pi9 | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 96% | 2.00E-155 | 34.92% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 533063089 NBS_Ateq | 170001_Sr35 | <i>Triticum monococcum</i> | Liliopsida | CNL | 87% | 5.00E-110 | 37.75% | n.d | n.d |
| VI | >gi 532997490 NBS_Ateq | 161443_Piz-t | <i>Oryza sativa</i> (Japonica group) | Liliopsida | CNL | 98% | 3.00E-137 | 34.17% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| | >gi 532876617 NBS_Ateq | 161444_Pi2 | <i>Oryza sativa</i> (Indica group) | Liliopsida | CNL | 98% | 8.00E-105 | 36.81% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| VII | >gi 533083673 NBS_Ateq | 1491_RPM1 | | | | 99% | 1.00E-176 | 35.04% | n.d | n.d |
| | >gi 532993674 NBS_Ateq | 161444_Pi2 | <i>Oryza sativa</i> (Indica group) | Liliopsida | CNL | 99% | 2.00E-138 | 33.74% | <i>Magnaporthe grisea</i> | Enfermedad de la explosión del arroz |
| n.d | >gi 532849137 NBS_Ateq | 161464_KR1 | <i>Glycine max</i> | Magnoliopsida | TNL | 22% | 5.6 | 35.71% | Virus del mosaico | Virus del mosaico |
| | >gi 533015050 NBS_Ateq | 1491_RPM1 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Magnoliopsida | CNL | 99% | 1.00E-153 | 33.08% | <i>Pseudomonas syringae</i> | Añublo bacteriano |
| | >gi 532902354 NBS_Ateq | 170022_Rxo1 | <i>Zea mays</i> | Liliopsida | N | 99% | 0 | 39.62% | | |

n.d: no determinado

3.3.5 Análisis de la expresión de los genes tipo NBS-LRR durante la infección del patógeno *Lasiodiplodia*

3.3.5.1 Infección del tejido de *A. tequilana* con la cepa H7A (*Lasiodiplodia*)

Se llevó a cabo la infección de cortes de hojas de *Agave tequilana* usando la metodología antes descrita. Los tejidos infectados fueron monitoreados cada 24 h durante siete días. Durante las primeras horas los cambios no son evidentes, es hasta las 48 horas en los tejidos infectados que se observa crecimiento del micelio en la superficie de los tejidos junto con la aparición de necrosis a la periferia del punto de infección, mientras que el control no muestra signos de la infección. En el día siete se observa un mayor crecimiento del micelio y el crecimiento de la mancha necrótica al centro del tejido, para algunas muestras el micelio crece incluso a los extremos del tejido infectado siendo que el punto de infección fue al centro, lo que implica que hubo un crecimiento del hongo al interior del tejido (Figura 3.4).

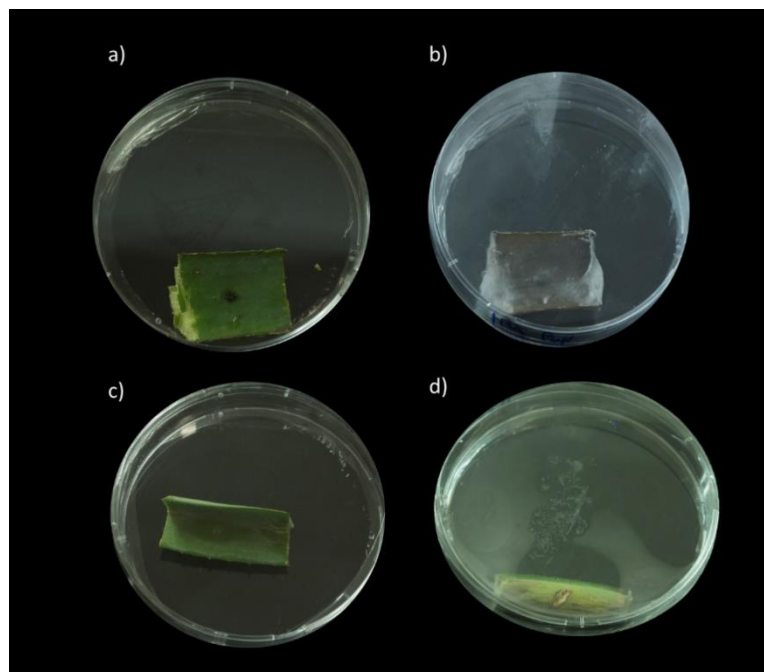


Figura 3.4. Infección de tejido de hojas de *A. tequilana* con la cepa H7A de *Lasiodiplodia*. **a,c)** Tejido en el día 0 control inoculado con agua destilada estéril y con las esporas de *Lasiodiplodia*. A los 7 días después de la inoculación no se observan signos de la presencia de la infección en los tejidos. **b,d)** Infección en plantas inoculadas con la cepa H7A.

A partir del tejido infectado se procedió al re-asilamiento del hongo para confirmar la infección por la cepa H7A. Se retiró parte del micelio con aguja estéril y se inoculó en placas con PDA, las cuales fueron incubadas a 36 °C durante 7 días. La cepa cultivada, mostraron la morfología esperada (Figura 3.5), así mismo se confirmó su identidad mediante secuenciación de las regiones del rDNA (ITS1-5.8S-ITS2 y D1-D2) como se describe en el capítulo 2.

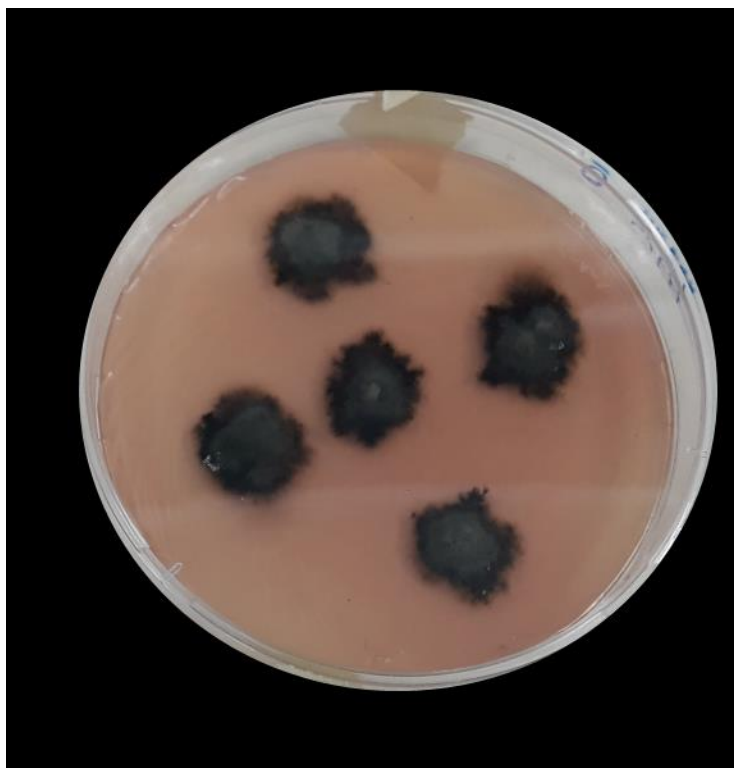


Figura 3.5. Hongo aislado de tejido infectado de *Agave tequilana* infectado con la cepa H7A, para la obtención de DNA y la confirmación de la identidad del hongo

3.3.5.2 Confirmación de especificidad de los cebadores diseñados para los grupos I, II y V de genes tipo NBS-LRR identificados en *Agave tequilana*

Los productos de amplificación obtenidos para los cebadores específicos para los grupos NBS correspondieron al tamaño esperado (Figura 3.6). Las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante la herramienta BLAST® del NCBI con el transcriptoma de *Agave*, dando similitud solo con secuencias que están incluidas dentro de los diferentes grupos. Por ejemplo, la secuencia amplificada para NBS_I, dio similitud mayor al 98% con ocho secuencias del transcriptoma, las cuales están incluidas en el grupo I; las secuencias amplificadas grupo II mostraron similitud mayor al 94% solo para cuatro secuencias que están incluidas dentro de este grupo, resultados similares se observaron para la

secuencia obtenida para el grupo V, que mostro identidades mayores al 98% (Cuadro 3.6).

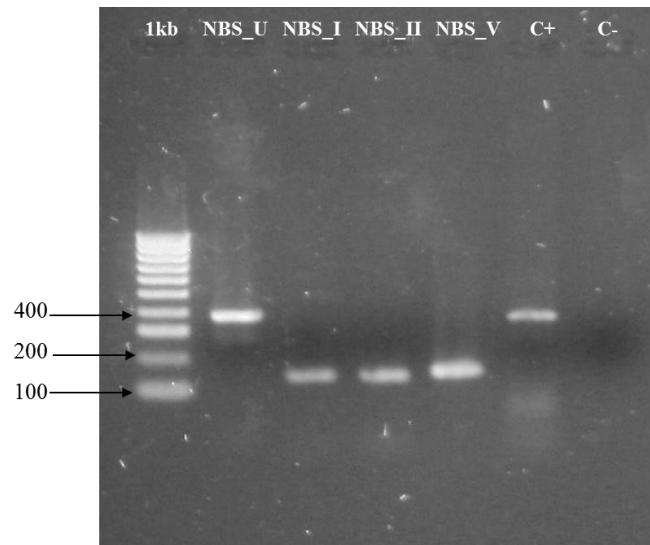


Figura 3.6. Amplificación con los cebadores específicos NBS_U, NBS_1A, NBS_2A, NBS_5B de DNA de *Agave tequilana*, incluyendo control positivo (DNA de *A. tequilana* + cebador universal) y control negativo (mezcla de reacción sin DNA molde). Visualización en geles de agarosa al 1%. Electroforesis realizada por 45 min a 85 volts, marcador de 1kb (Hyperladder I, Bionline), teñido con bromuro de etidio.

Cuadro 3.61 Homología de los fragmentos amplificados con integrantes de los grupos I, II y V.

| Identificador | Puntaje máximo | Puntaje total | Cobertura % | Valor -E | Identidad % | Grupo |
|---------------|----------------|---------------|-------------|----------|-------------|-------|
| gi 533045928 | 298 | 298 | 91 | 5e-78 | 100 | |
| gi 533045907 | 296 | 296 | 92 | 2e-77 | 99 | |
| gi 533045694 | 296 | 296 | 92 | 2e-77 | 99 | I |
| gi 532893577 | 296 | 296 | 92 | 2e-77 | 99 | |
| gi 533030763 | 296 | 296 | 92 | 2e-77 | 99 | |
| gi 533019755 | 291 | 291 | 93 | 8e-76 | 99 | |
| gi 532997477 | 285 | 285 | 93 | 4e-74 | 99 | |
| gi 533013839 | 285 | 285 | 93 | 4e-74 | 99 | II |
| gi 532992532 | 246 | 246 | 93 | 2e-72 | 94 | |
| gi 532849136 | 239 | 239 | 83 | 3e-60 | 97 | |
| gi 533063089 | 340 | 340 | 93 | 1e-90 | 100 | |
| gi 533063096 | 340 | 340 | 93 | 1e-90 | 100 | |
| gi 533063088 | 318 | 318 | 93 | 5e-84 | 98 | V |
| gi 533063091 | 318 | 318 | 93 | 5e-84 | 98 | |
| gi 53306092 | 318 | 318 | 93 | 5e-84 | 98 | |

3.3.5.3 Análisis de la inducción de la expresión de *NBS_Ateq* en respuesta a la infección de *Lasiodiplodia* sp.

Se llevó a cabo la construcción de curvas estándar para el análisis del número de copias expresadas para cada uno de los grupos de NBS-LRR seleccionados. En total se construyeron cuatro curvas estándar, una para cada grupo (I, II, V) y una para analizar la expresión con el cebador universal. Para cada una de las curvas se realizó un análisis de regresión lineal, el valor de R^2 para todas fue de $R^2 > 0.98$. Así mismo se calculó la ecuación de la recta, para poder interpolar los datos, lo que nos permitió determinar el número de copias expresadas en un rango de 3.04×10^2 a 3.04×10^8 copias, para los grupos I, II y V incluyendo la expresión global (Anexo 8).

Se realizó un análisis de expresión absoluta para determinar el número global de copias expresadas de genes tipo *NBS-LRR* así como de los grupos I, II y V. En general, se determinó que la expresión global de los genes *NBS_Ateq* fue inducida por *Lasiodiplodia* sp. se obtuvo un pico de inducción 1.15 veces mayor en las plantas infectadas con respecto a las plantas no infectadas a las 48 HPI. En este tiempo, se encontró diferencias significativas equivalentes a 27,476 más copias más que en el tratamiento sin infección (Mock). Sin embargo, se determinó la expresión de los genes *NBS_Ateq* también se induce en dos momentos previos, inicialmente a las 6 y 24 HPI. En comparación a la expresión global de los genes *NBS-LRR* en el testigo (Mock), a las 6 y 24 HPI la expresión es 13% mayor, mientras que a las 48 HPI, la expresión incrementa en un 115% (Figura 3.7).

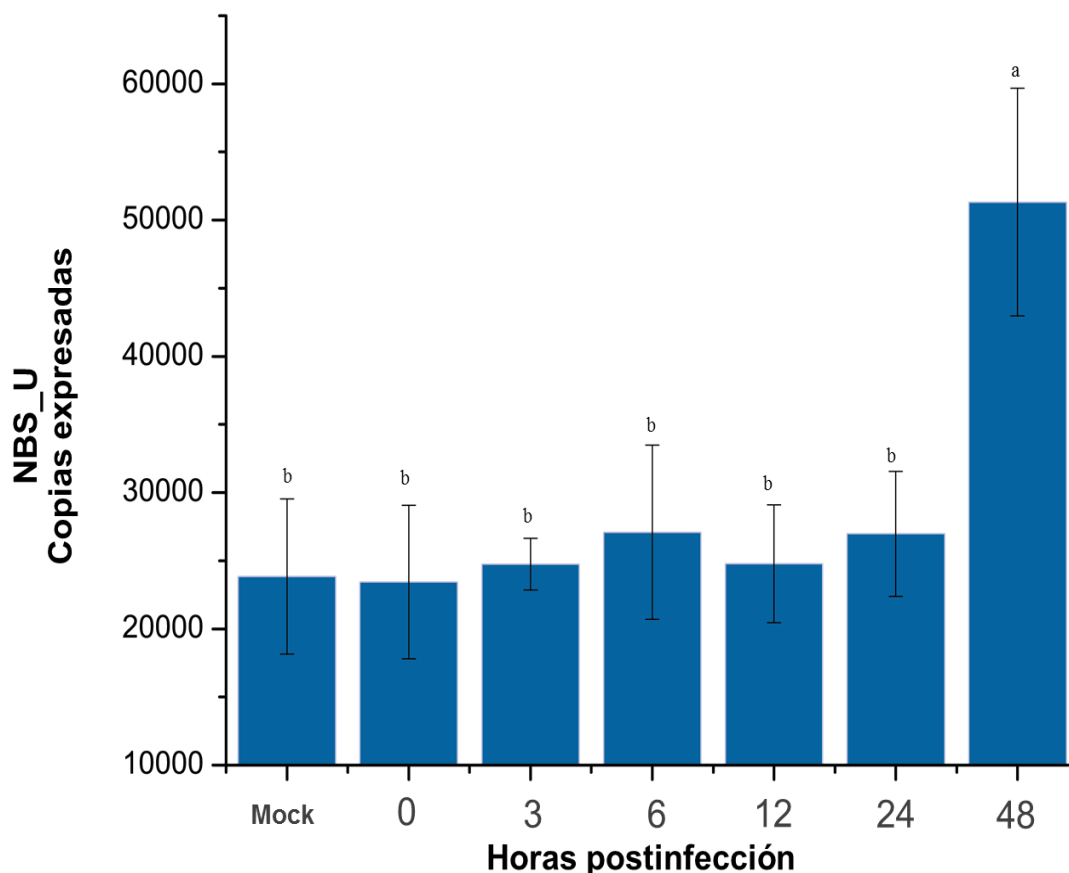


Figura 3.7. Expresión global en número de copias expresadas a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 HPI de genes tipo *NBS-LRR*. a- indica diferencia significativa, significancia de 0.05, con la prueba de Tukey. La barra expresa la Desviación Estándar.

La expresión específica para los grupos tuvo una tendencia similar, pero con rango de valores distintos. Con excepción del grupo II el cual presentó un patrón único. La expresión del grupo I permanece sin cambios hasta las 12 HPI en comparación a la expresión para este grupo en el testigo (Mock), la inducción inicia hasta las 24 HPI y a las 48 HPI que alcanza el punto máximo de expresión. Este patrón es consistente con los tiempos en la que la expresión global también alcanza su máximo nivel de expresión (Figura 3.8). Comparado con el testigo (Mock), a las 3 y 12 HPI existe un incremento del 35% y 32% respectivamente, equivalente a 163 y 150 copias más que en el tratamiento sin infección. En una segunda etapa (24 HPI), la expresión incrementa 160% (740 más copias expresadas), pasadas otras 24 horas (48 HPI), el incremento final es de 2,948% (13569 más copias expresadas) más que la expresión de este grupo en el tratamiento sin infección.

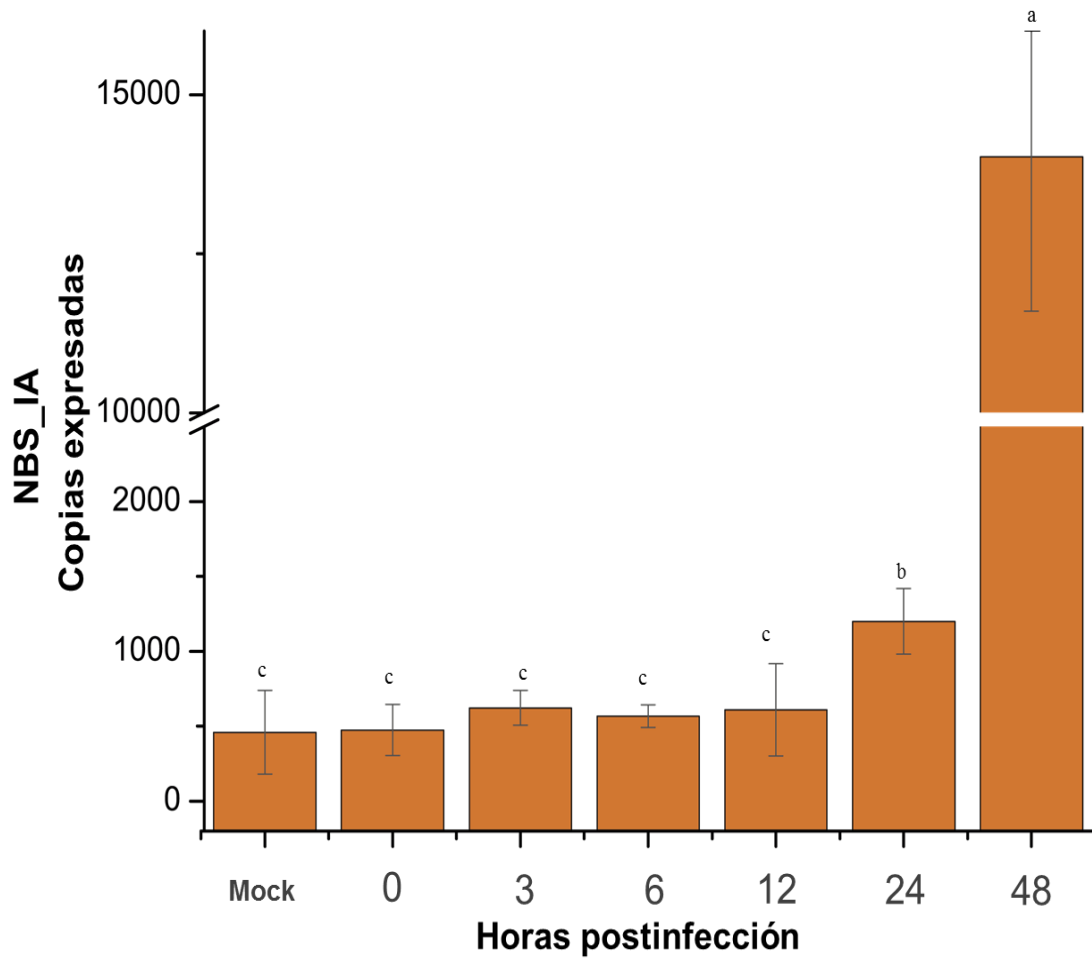


Figura 3.8. Número de copias expresadas a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 HPI de genes tipo *NBS-LRR* para el grupo *NBS_I*. a- indica diferencia significativa, significancia de 0.05, con la prueba de Tukey. La barra expresa la Desviación Estándar.

En el grupo II, el incremento de la expresión no se presenta en etapas si no que es gradual a partir de las 3 HPI, posteriormente alcanza su máximo a las 12 HPI y comienza a disminuir entre las 24 y 48 (Figura 3.9). El incremento en la expresión de este grupo con respecto al tratamiento sin infectar va desde un 48% más a las 3 HPI (32 copias expresadas más), 331% más a las 6 HPI (219 copias expresadas más), luego alcanza el punto máximo de 492 % más a las 12 HPI (326 copias expresadas más), a partir de aquí la expresión decae siendo 315% y 148% a las 24 y 48 HPI (209 y 98 copias expresadas más respectivamente). Mientras que la inducción del grupo V es tardía, el número de copias expresadas permanece constante las primeras 24 HPI, el mayor pico de expresión aparece a las 48 HPI (Figura 3.10). Durante este momento el número de copias expresadas es 3,439% mayor que en comparación al tratamiento sin infección. En porcentaje de incremento en la expresión, este grupo es la que tiene el mayor incremento con respecto al testigo, sin embargo, en número de copias es el grupo que menos copias expresa (282 copias expresadas), mientras que, en sus puntos máximos de expresión del grupo I y II expresan 14, 019 y 492 copias respectivamente.

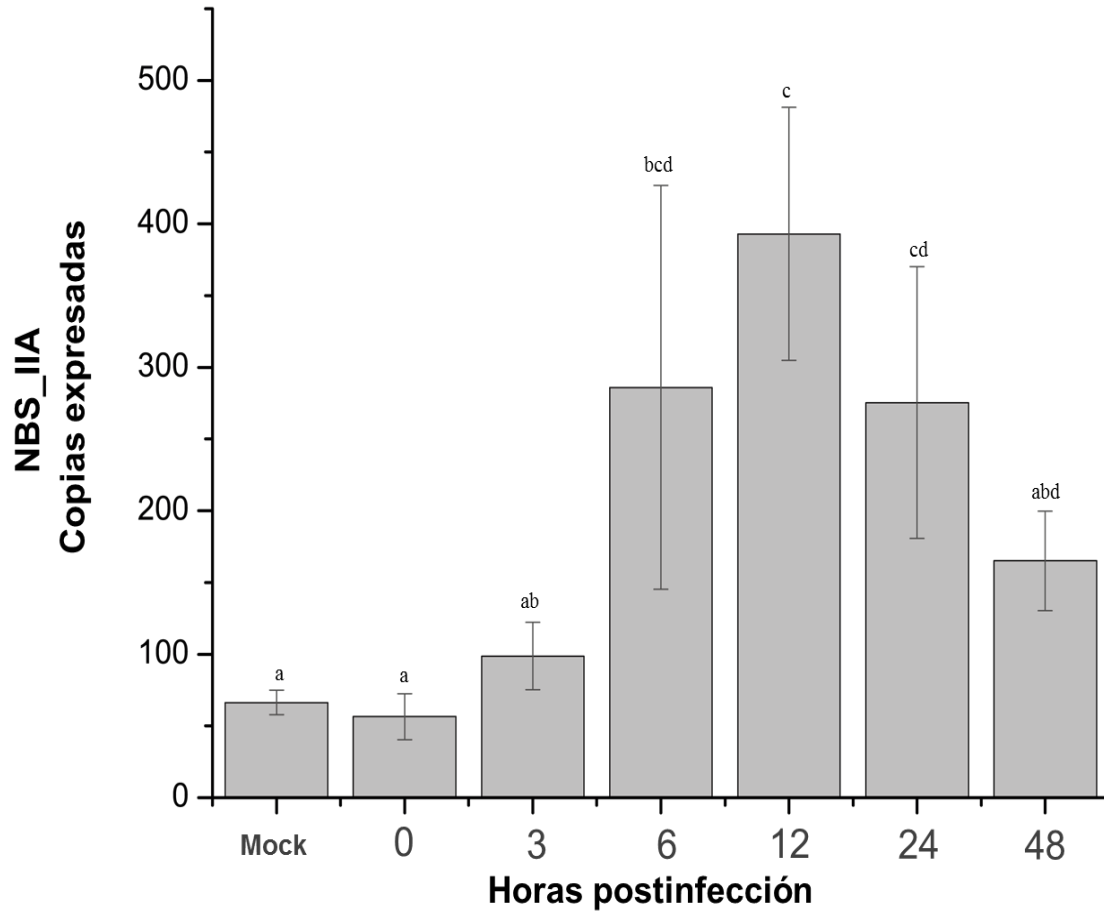


Figura 3.9. Número de copias expresadas a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 HPI de genes tipo *NBS-LRR* para el grupo NBS_II. b,c,d- indican diferencias significativas, significancia de 0.05, con la prueba de Tukey. La barra expresa la Desviación Estándar.

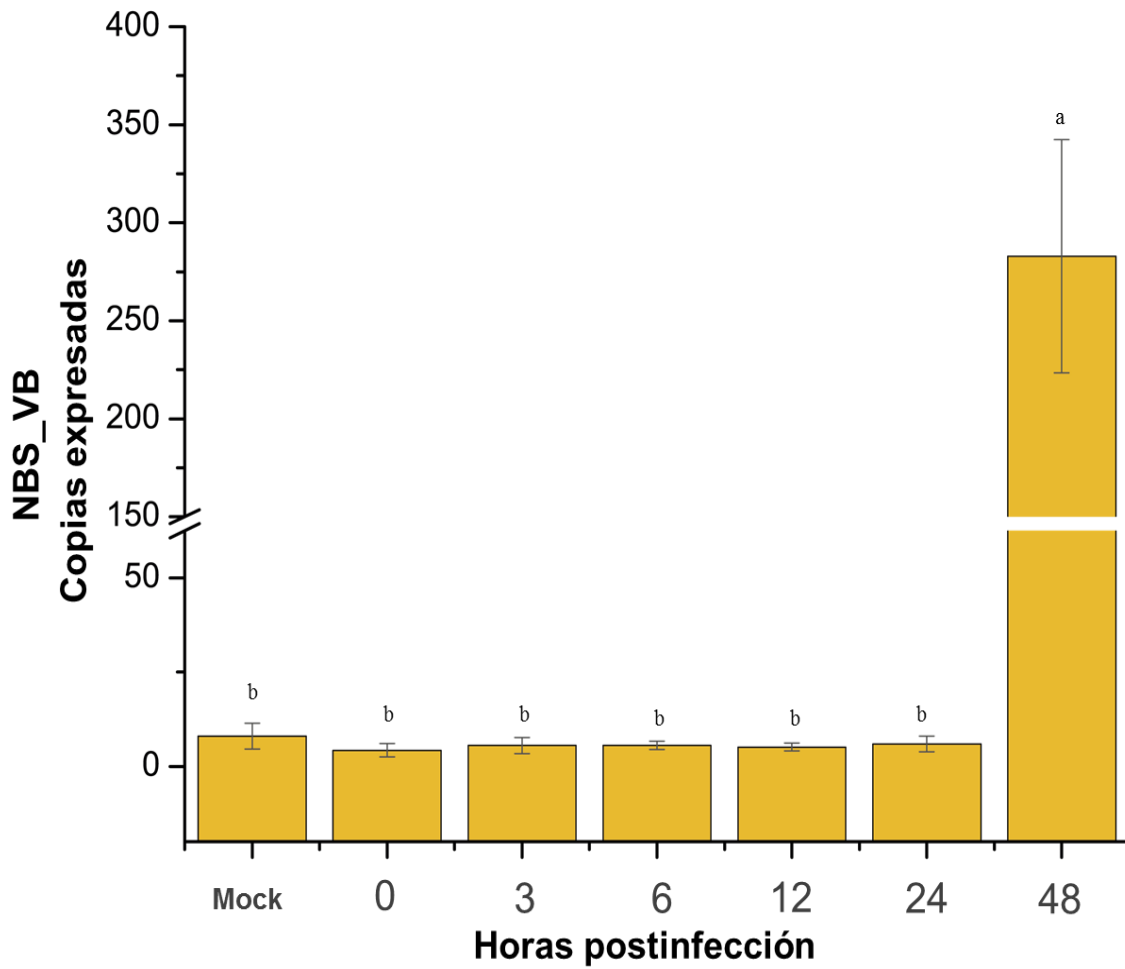


Figura 3.10. Número de copias expresadas a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 HPI de genes tipo *NBS-LRR* para el grupo *NBS_V*. a- indica diferencia significativa, significancia de 0.05, con la prueba de Tukey. La barra expresa la Desviación Estándar.

El porcentaje de participación en la expresión global de cada uno de los grupos en su punto máximo de inducción, es diferente y varía entre el 27%, el 1.5% y 0.55% para los grupos I, II y V respectivamente. Sin embargo, la sumatoria de todas las copias expresadas por grupo no contribuyen mucho con la expresión global, por ejemplo, a las 0 HPI, la sumatoria de las copias expresadas por grupo representa el 2.2%, a las 3 HPI el 2.9%, a las 6 HPI el 3.1%, a las 12 HPI el 4%, a las 24 HPI el 5.4, solo a las 48 HPI el, la sumatoria del número de copias explica más de un 28% de la expresión global (Figura 3.11).

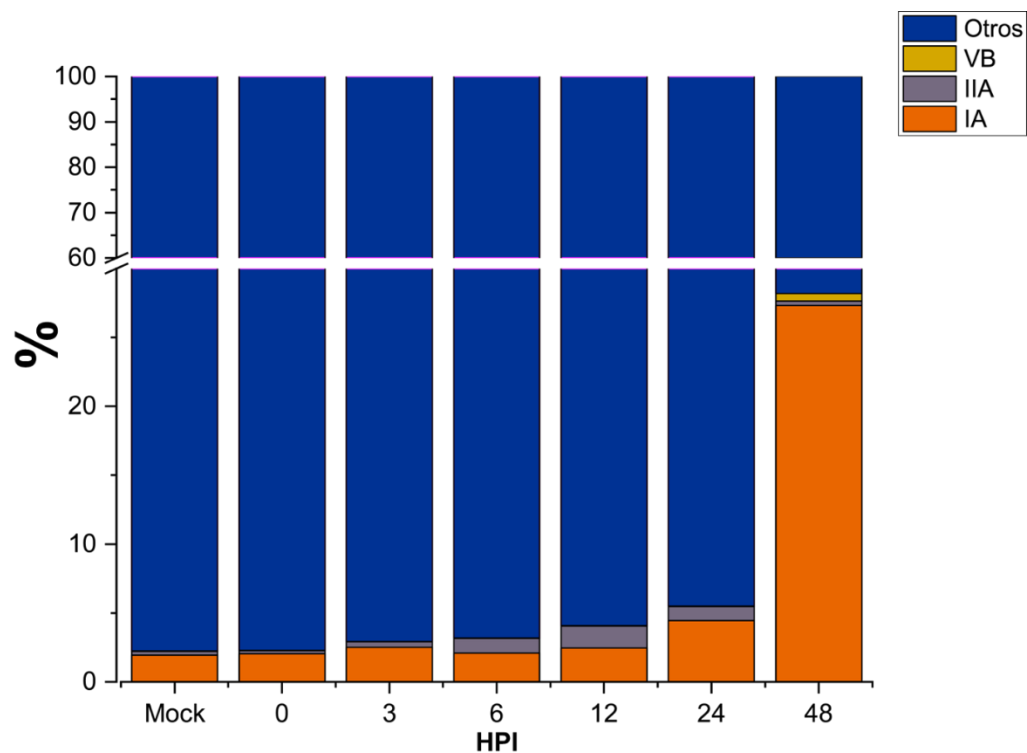


Figura 3.11. Porcentaje de representatividad en la expresión global de la expresión de los grupos I, II, V durante las primeras 48 horas postinfección del hongo *Lasiodiplodia*

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 Identificación de genes NBS-LRR en *A. tequilana*

El valor máximo de identidad obtenido para las secuencias NBS_Ateq fue de 41% con RPM1 de *Sorghum bicolor*, esto es de esperarse ya que a nivel aminoacídico el porcentaje de identidad de otras secuencias tipo NBS con proteínas R conocidas varía entre un 30% y 70% (Rout *et al.*, 2014). La organización de estos genes en el genoma, así como en respuesta a la adaptación de los patógenos a los mecanismos de defensa de las plantas, son factores que contribuyen a la variación de estas secuencias (McHale *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2000; Michelmore y Meyers, 1998). El análisis inicial de las secuencias amplificadas de genes candidatos a NBS-LRR se realizó por medio de diferentes herramientas bioinformáticas a nivel aminoacídico, debido a que la variación de secuencia en nucleótidos es frecuente, sobre todo en las familias de genes multigénicas (Tamayo-Ordóñez *et al.*, 2016). Sin embargo, estas sustituciones no necesariamente implican cambios en los aminoácidos codificados.

Las secuencias tipo NBS-LRR previamente aisladas de especies de *Agave* (KU295166, KU295168, KU295268, KU295268 KU295169, KU295170) y las secuencias clonadas, se agruparon de manera específica, las no-TIR fueron separadas de las tipo TIR, esto es consistente con reportes previos para este tipo de proteínas en otras plantas (Alamery *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, las secuencias no-TIR de monocotiledóneas y de dicotiledóneas se agrupan juntas. Este hallazgo sugiere que del dominio NB-ARC de proteínas CNL provienen de un ancestro en común. La separación entre TNL y CNL es indicativo de una antigua segregación de estas dos clases (McHale *et al.*, 2006). La homología con otras proteínas NBS y agrupación obtenida con secuencias no-TIR sugiere que las secuencias clonadas en *A. tequilana* corresponden a genes NBS de la clase no-TIR. La ausencia de secuencias (TIR) es común en otras monocotiledóneas (Karthika *et al.*, 2019; Habachi-Houimli *et al.*, 2018; Puch-Hau *et al.*, 2015) probablemente sea debido a que las proteínas tipo TIR para plantas surgen después de la divergencia entre monocotiledóneas y dicotiledóneas (Pan *et al.*, 2000).

La comparación de la región parcial del dominio NBS aislado con el transcriptoma de *A. tequilana* permitió la identificación de 46 secuencias NBS-LRR. Es probable que estas secuencias solo correspondan a una porción del total de los genes NBS-LRR que podrían

haber en esta especie, ya que se ha descrito que el número de genes NBS en otras especies es mayor. Por ejemplo, se han encontrado 243 en *Cocos nucifera* L. (Rajesh *et al.*, 2015), 365 en *Helianthus annuus* (Neupane *et al.*, 2018), 331 en *Glycine max* (Nepal *et al.*, 2017), 96 en *Hordeum vulgare* L. cv. Bowman (Habachi-Houimli *et al.*, 2018). Los análisis transcriptómicos también han mostrado un alto número de transcritos NBS, por ejemplo en *Syzygium luehmannii* se identificaron 1039 (Tobias *et al.*, 2017), 639 en *Pinus flexilis* (Liu *et al.*, 2019). Aunque la evidencia indica que el número de genes NBS-LRR es muy variable entre especies y que no tiene relación directa con el tamaño del genoma (Wan *et al.*, 2012), es de esperar que en *A. tequilana* existan mayor número de estos genes ya que se ha descrito que son abundantes en el genoma (hasta 1.8% del genoma) (Lozano *et al.*, 2012). Además, el número de copias estimado por genoma en plantas *in vitro* de *A. tequilana* es elevado (3,980 copias) (Tamayo-Ordóñez *et al.*, 2016), experimentalmente se demostró que la expresión aditiva de los grupos solo explica entre el 2.2%, 2.9%, 3.1%, 4%, 5.4% y el 28% de la expresión global. Esto implica que existen más copias de estos genes que responden a la infección del hongo, concordando con la teoría de que en *A. tequilana* el número de copias de este gen es mayor. Sin embargo, existen algunas excepciones de otros genomas de plantas que contienen un bajo número de copias como, por ejemplo: 38 en *Raphanus sativus* (Wang *et al.*, 2017), 28 en *Curcuma longa* (Joshi *et al.*, 2012), 54 en *Carica papaya* (Sharma *et al.*, 2017).

Basados en los dominios predichos y en la presencia del residuo de triptófano (W) en el motivo cinasa 2, se concluyó que las secuencias analizadas del transcriptoma corresponden al tipo no-TIR, principalmente al tipo CNL. Esto corrobora la información obtenida del análisis filogenético. Las secuencias fueron clasificadas en 5 subclases (CNL, NL, N, CN y L), este tipo de variación en cuanto a los dominios encontrados para las proteínas predichas se ha reportado en otras especies de plantas; en las que se observan diferentes combinaciones entre los dominios característicos inclusive la ausencia del dominio NBS (Wang *et al.*, 2017; Arya *et al.*, 2014; Shimizu *et al.*, 2014). La ausencia del dominio CC, o de algún otro dominio, no limita su potencial como gen de resistencia, ya que se ha descrito que responden a la infección de diferentes patógenos y al estímulo de hormonas (Arya *et al.*, 2014). En el presente estudio, la subclase CNL fue la más abundante, seguida de las subclases CN y CN el resto de los grupos representan menos del 7% del total de secuencias NBS_Ateq analizadas. Estos resultados concuerdan con reportes previos en otras monocotiledóneas, donde la clase con mayor

número de genes es la CNL, al menos en especies como *Curcuma longa*, *Oryza sativa*, *Brachypodium distachyon*, *Sorghum bicolor* y *Zea mays* (Cheng *et al.*, 2012; Joshi *et al.*, 2012; Tan y Wu, 2012; Cheng *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2004), inclusive en algunas dicotiledóneas se ha reportado un mayor número de genes del tipo CNL como en *Solanum aculeatissimum* (Zhou *et al.*, 2016). Sin embargo, existen excepciones como en *Hordeum vulgare* y *Curcuma amada* (Karthika *et al.*, 2019; Habachi-Houimli *et al.*, 2018), así como que en algunas dicotiledóneas como *Arachis duranensis* (Song *et al.*, 2017), *Solanum tuberosum* (Lozano *et al.*, 2012) y *Populus trichocarpa* (Ma *et al.*, 2019) en donde predomina la clase NL. Si bien, no existe un patrón de las clases y la abundancia de estas entre las diferentes especies, las clases o grupos y el número de genes que contienen es variable entre las especies (Gu *et al.*, 2015). Parece ser que, en plantas monocotiledóneas, la clase CNL tiende a ser la más abundante, lo que podría estar indicando que esta sea la clase más antigua en las monocotiledóneas, tomando en cuenta el tipo de evolución de este tipo de genes que tiende a la diversificación por eventos de duplicación (Zhang *et al.*, 2014; Michelmore y Meyers, 1998).

3.4.2 Caracterización de los genes *NBS_Ateq*

3.4.2.1 Caracterización y análisis de la evolución de los genes *NBS_Ateq*

Las secuencias *NBS_Ateq* analizadas tienen mayor similitud con proteínas descritas contra ciertos patógenos como: *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*, *Magnaporthe grisea*, *Pseudoperonospora cubensis* y a al virus Turnip crinkle así como a *Pseudomonas syringae*. Esto podría predecir la función de estas como proteínas de defensa en *A. tequilana*. La predicción de la función de genes candidatos a resistencia por medio de la búsqueda de homólogos ha sido acertada en casos como el gen *RGC2* en *Musa acuminata* (Dale *et al.*, 2017; Peraza-Echeverria *et al.*, 2008) homólogo del gen *I2* que confiere resistencia a *Fusarium* (Simons *et al.*, 1998) y para el gen *SacMi* en *Solanum aculeatissimum* (Xu *et al.*, 2018; X. Zhou *et al.*, 2016), homólogo a *Mi-1* que confiere resistencia a *Meloidogyne incognita* (Vos *et al.*, 1998), aunque no precisamente para el mismo patógeno descrito.

De acuerdo con las características predichas para las proteínas *NBS_Ateq*, se puede concluir que los transcritos analizados pueden dar lugar a proteínas NBS-LRR funcionales. Ya que comparten características morfológicas y químicas con otras proteínas de resistencia. Por ejemplo, se sabe que el número de aminoácidos para este

tipo de proteínas es muy variable, diferentes autores reportan proteínas tipo NBS-LRR entre 203 y 1561 aa (Liu *et al.*, 2019a; Islam *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2011; Marra *et al.*, 2006), similar a lo encontrado en *A. tequilana*, aunque existen algunos otros reportes de proteínas más grandes de 3429 aa (Liu *et al.*, 2019), a consecuencia de la variación existente en el número de aminoácidos el peso molecular de este tipo de proteínas es igual de variable. De la misma manera, las secuencias NBS_Ateq, comparten valores similares del punto isoeléctrico con algunas proteínas tipo NBS-LRR conocidas, así como para proteínas candidatas a tipo NBS-LRR. El punto isoeléctrico se reporta para este tipo de proteínas en un rango de 4.4 a 9.21 (Goyal *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2011; Marra *et al.*, 2006), similar a lo encontrado en el presente estudio. Los valores del punto isoeléctrico para las NBS_Ateq son de 5.8 a 9.46 para las CNL, de 9.33 a 7.2 para las NL y de 8.86 a 6.8 para las tipo CN. Además, la mayoría de las secuencias traducidas, mostraron un sitio de interacción para la proteína RanGAP2, la cual es una proteína con función de activación de GTPasa y se ha descrito que es necesaria para el funcionamiento de algunas proteínas NBS-LRR (Tameling *et al.*, 2010).

La mayoría de las proteínas NBS_Ateq tienen una localización intracelular, principalmente en el citoplasma; esto es de esperarse ya que de acuerdo con el mecanismo descrito para este tipo de proteínas, estas reconocen al patógeno una vez que ha ingresado a la célula (García-Pineda y Lozoya-Gloria, 2004). Se sabe que la localización de estas proteínas es dinámica, es decir tanto en el núcleo como en el citoplasmática (Bai *et al.*, 2012), en menor cantidad se pueden encontrar en la membrana (Zhang *et al.*, 2018; van Ooijen *et al.*, 2007; Dangl y Jones, 2001). En *A. tequilana* tres proteínas tipo NBS-LRR fueron descritas con esta característica, como en *Zingiber officinale* y *Curcuma amada* (Karthika *et al.*, 2019) y en *Vitis vinífera* donde se describieron proteínas tipo NBS-LRR con dominio de membrana y péptidos señal para el transporte hacia membrana u otros organelos (Goyal *et al.*, 2019). Esta variación en tamaño, punto isoeléctrico, localización celular, variación de los dominios puede ser respuesta a la presión de evolución a la que están sometidos este tipo de genes a causa del constante ataque y adaptación de los patógenos. Se sabe que estos genes están en constante cambio (McHale *et al.*, 2006). La formación de nuevas variantes puede ayudar a la defensa contra las nuevas estrategias de infección de los patógenos, el modelo Zig-Zag describe como existe una carrera de “armas” entre las plantas y los patógenos (Keller *et al.*, 2016), este modelo describe que algunos patógenos son capaces de anular la respuesta ETI de las plantas y pasar de ser

avirulentos a virulentos. Por lo cual la planta se ve obligada a la generación de nuevas proteínas NBS-LRR capaces de reconocer los nuevos efectores de los patógenos (Jones y Dangl, 2006), para garantizar la sobrevivencia de la planta. Esta respuesta a la rápida evolución de los patógenos, resulta en la generación de nuevos genes NBS-LRR con nuevas características.

La generación del polimorfismo de los genes R implica mecanismos de duplicación, intercambios de secuencia, seguida de la divergencia de estas secuencias por mutaciones generalmente en el dominio LRR, así como, la recombinación desigual entre genes relacionados que ayuda a diversificar más la secuencia de estos genes y a la expansión de esta familia de genes (Leister, 2004). Por último, la presión del patógeno selecciona aquellas que dan como resultado una resistencia dando como resultado el mantenimiento de la diversidad de los genes R (Mondragon-Palomino y Gaut, 2005; Kuang *et al.*, 2004; Meyers *et al.*, 2003; Ellis *et al.*, 2000). Como consecuencia de estos mecanismos, los genes NBS-LRR se encuentran agrupados en cluster, lo que facilita la evolución de éstos (Hulbert *et al.*, 2001). Es probable que los genes *NBS_Ateq* también se encuentren organizados formando cluster con genes pertenecientes a un mismo grupo, si el cluster proviene de una duplicación en tandem o bien cluster que provienen de eventos de transposición, duplicación ectópica o duplicación segmentaria en caso de que en un solo cluster se agrupen miembros de diferentes grupos de *NBS_Ateq* (McDowell y Simon, 2006; Leister, 2004). Aunque es necesario estudios más profundos para confirmar formación y el origen de cluster de genes NBS_LRR en *A. tequilana*.

En el árbol filogenético basado en las secuencias NBS_Ateq (Figura 3.3) no se encontró una distribución homogénea de las subclases de genes NBS-LRR (CNL, CN, NL, N, L) en los grupos, es decir que los grupos están compuestos por genes NBS_Ateq de dos o más subclases de genes NBS-LRR, lo que es común para este tipo de secuencias. Este mismo tipo de distribución han sido reportados en análisis filogenéticos de genes NBS para especies como *Cocos nucifera*, *Brassica napus* y *Arabidopsis thaliana* (Alamery *et al.*, 2018; Rajesh *et al.*, 2015; Lozano *et al.*, 2012; Meyers *et al.*, 2003). La formación de grupos heterogéneos observada en el árbol filogenético probablemente sea debido a que los genes incluidos en cada cluster provienen de un ancestro común y derivado de eventos de duplicación segmental hayan perdido alguno de los dominios característicos. Este mecanismo de duplicación ha sido descrito como uno de los que contribuye al tipo de organización y a la diversificación de este tipo de genes (Leister, 2004).

Según Friedman y Baker (2007), la evolución de los genes R y la cantidad es dependiente del tamaño y la complejidad de los cluster en los que se organizan estos genes. Es decir, que con base en el agrupamiento obtenido y a la diversidad de secuencias incluidas en los grupos, se puede inferir que el número de genes NBS en *Agave tequilana* es mayor a lo aquí descrito, además que es probable que la organización de estos genes en los cromosomas se den en cluster, donde probablemente la mayoría de los miembros de cada grupo estén en un mismo cromosoma, donde el grupo I, este en el cluster más grande y complejo, este tipo de organización donde las agrupaciones obtenidas de los árboles filogenéticos coinciden con los cluster formados en los cromosomas ha sido descrito en *Brachypodium distachyon* (Tan y Wu, 2012).

La agrupación observada en el árbol filogenético puede indicar la complejidad en la evolución de los genes NBS-LRR en *A. tequilana*; el hecho de que los genes CNL, CN, NL, N y L no se agrupen de manera independiente es indicativo de que no existe una característica única en la evolución de estos genes (Zhao *et al.*, 2016). La formación las agrupaciones implica una diversidad en las secuencias, lo que posiblemente lleve a variaciones en la función de estas proteínas, tal como se sugiere en *Raphanus sativus* (Wang *et al.*, 2017). Por ejemplo en el grupo I de NBS_Ateq se observan 3 subgrupos, de los cuales el subgrupo formado por gi|533045928|, gi|533045907|, gi|533045912|, gi|533045694 y gi|532893577| presentan homología con la proteína de resistencia RB descrita en *Solanum bulbocastanum*; el subgrupo formado por gi|532991156|, gi|532981307|, gi|532974233| y gi|533055969| presentan homologías con la proteína Pit de resistencia contra *Magnaporthe grisea* descrita en *Oryza sativa*; por ultimo dentro de este clado, el subgrupo formado por gi|533014494|, gi|533020292| y gi|533043533| que tienen homología con la proteína HRT descrita para resistencia hacia el virus de la arruga del nabo en *A. thaliana*. Patrones similares se observan en el grupo V, donde todos los miembros presentan homología con la proteína Pi9 de *Oriza sativa* contra *Magnaporthe grisea*, con excepción de gi|533063091| y gi|533063089| que son homologas a Sr35 de *Triticum monococcum*, lo que podría sugerir una especialización en la funcionalidad de dichos genes y la posible función de estos genes en *A. tequilana*.

La proporción K_a/K_s es usada como indicador del tipo de presión de selección que actúa sobre los genes. Una proporción >1 implica selección positiva o de diversificación; una proporción <1 implica que la mayoría de las sustituciones no sinónimas han sido eliminadas, es decir una selección de purificación o selección negativa (Michelmore y

Meyers, 1998). Se determinó que para la mayoría de los grupos de NBS_Ateq analizados (I, II, III, IV y VI) el valor de K_a/K_s es <1 , indicando que estos genes han evolucionado bajo una selección negativa (Purificación), lo que coincide con lo reportado para estos tipos de genes en otras plantas, por ejemplo en *Pinus flexilis* J (Liu *et al.*, 2019) y *Hordeum vulgare* L (Habachi-Houimli *et al.*, 2018); el hecho que la mayoría de los grupos estén sometidos a este tipo de selección puede implicar que la selección de purificación tiene un rol importante en el proceso de evolución para los genes NBS_Ateq, aunque es necesario ampliar el conocimiento para tener la certeza de esto. Sin embargo, para el grupo V se determinó que la proporción la proporción K_a/K_s es > 1 , es decir que está sometida a una selección positiva o de diversificación. En otras especies como *Pinus flexilis* J y *Brassica napus* (Fu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019) también se han encontrado que algunos grupos de NBS, están bajo distintas presiones de selección, esta diferencia en el tipo de presión de selección probablemente se deba a que son de reciente formación y que están en proceso de especialización. El valor de K_a/K_s para estos genes es muy variable entre las especies; esto debido a los diferentes condiciones medio ambientales, patógenos, duplicaciones recientes, poliploidización, selección artificial que afectan la evolución de estos genes (Yang y Wang, 2016; Gu *et al.*, 2015), en la mayoría de ellas es <1 , por esta razón se asume que la selección de purificación es uno de los mecanismos principales para este tipo de genes, sobre todo en especies de cultivo (Kuang *et al.*, 2004).

La edad estimada de surgimiento de los grupos NBS_Ateq concuerdan con lo esperado, ya que el número de genes es proporcional a los eventos de duplicación así como el polimorfismo en las secuencias R (Mondragon-Palomino y Gaut, 2005; Kuang *et al.*, 2004; Meyers *et al.*, 2003; Ellis *et al.*, 2000); el grupo I, que tiene el mayor número de genes NBS_Ateq incluidos probablemente debido a la acumulación de duplicaciones a través del tiempo, es el más ancestral (85.72 millones de años), mientras que el grupo V, que está sometida a selección de diversificación, es una de las más variables en secuencia y es la más joven (9.11 millones de años) lo que puede sugerir que es resultado de una reciente duplicación. Sin embargo, los grupos III, IV, VI, VII son la excepción, aunque como se menciona anteriormente, las secuencias incluidas en cada grupo son pocas y es probable que existan más genes NBS-LRR que no estén incluidos en el análisis, por lo cual la estimación para estos grupos no es tan precisa.

3.4.2.2 Motivos conservados

Las proteínas deducidas del transcriptoma de *A. tequilana* presentan los motivos característicos y en el orden estricto para el dominio NBS característico de las proteínas tipo NBS-LRR (Hulbert *et al.*, 2001; Takken *et al.*, 2006). La presión de selección tiene un impacto en la evolución de los diferentes motivos de los dominios de las proteínas NBS-LRR; el efecto sobre estos es heterogéneo (Kuang *et al.*, 2004; Mondragón-palomino *et al.*, 2002), es decir afecta de manera diferente a los distintos motivos. En la región N-terminal correspondiente al dominio CC se identificaron cuatro motivos conservados entre los diferentes grupos NBS_Ateq, 8 motivos conocidos (P-loop, RNBS-A, Kinase-2, Kinase3 o RNBS-B, RNBS-C, GLPL, RNBS-D y el motivo MHD) y al menos 3 motivos conservados sin función descrita en el dominio NBS y diez motivos en la región LRR.

Dentro del dominio NBS los motivos más conservados son P-loop, kinase-2 y GLPL y los motivos RNBS-A, RNBS-C y RNBS-D son los más variables, similar a otras especies como *Brachypodium distachyon* (Tan y Wu, 2012), *Cocos nucifera* (Puch-Hau *et al.*, 2015), *Hordeum vulgare* (Andersen *et al.*, 2016) y *Curcuma amada* (Karthika *et al.*, 2019) y la región más variable es el dominio LRR. La presencia de estos motivos conservados en el dominio NBS sugiere su posible función en la resistencia a enfermedades (McHale *et al.*, 2006). La conservación de los motivos P-loop, kinase-2, GLPL y MHD es importante ya que están involucrados en la activación de la proteína, la transducción de la señal y en la estructura de estas proteínas (Wang *et al.*, 2015; Iyer *et al.*, 2004; Leipe *et al.*, 2004; Meyers *et al.*, 1999). La variación de los motivos RNBS-A, RNBS-B y RNBS-C puede deberse a que estas regiones están sometidas a selección diversificadora, lo que puede estar llevando a la especiación en las funciones, como lo sugiere Wan *et al.* (2012), al menos para las regiones RNBS-B y RNBS-C en *Capsicum annum*. Similar a lo que ocurre en el dominio LRR, el cual se ha demostrado que está bajo este tipo de selección, lo que la hace ser variable en tamaño y composición (Kuang *et al.*, 2004; Ellis *et al.*, 2000).

La variación en la secuencia NBS-LRR sugiere que la presión de selección por los patógenos puede conducir a cambios en secuencia y tamaño de los dominios NBS-LRR (Zhang *et al.*, 2010a), originando que el agrupamiento por similitud de secuencias de NBS_Ateq se deba a la especialización de estas hacia la respuesta a cierto tipo de patógeno.

3.4.3 Respuesta de los genes NBS_Ateq a la infección de *Lasiodiplodia* sp.

Con la finalidad de estudiar la expresión de los genes *NBS-LRR* en *Agave tequilana* en respuesta a *Lasiodiplodia* sp, se realizó un análisis de la expresión absoluta de los genes *NBS-LRR* de manera global, así como de los principales grupos aquí caracterizados. Se sabe que la clase no-TIR tiene un rol importante en la resistencia a enfermedades, se ha descrito la función de esta clase como genes de resistencia en diferentes especies como *Oriza sativa* L. (Gupta *et al.*, 2012), *Triticum durum* (Gong *et al.*, 2013) and *Mussa* spp (Dale *et al.*, 2017).

El incremento en la expresión en ocasiones está relacionado con la resistencia, la presencia de los patógenos incrementa la expresión de estos genes (Xun *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2013; Horvath *et al.*, 2012), por ejemplo, en cultivos como *Helianthus annuus* y *Brassica rapa* se ha descrito que un mayor incremento de la expresión de genes CNL en líneas resistentes en comparación con líneas susceptibles y esta mayor expresión confiere la resistencia (Shimizu *et al.*, 2014; Radwan, 2010).

En *A. tequilana* la respuesta de los genes *NBS-LRR* es similar; ya que todas los grupos se ven inducidos por la presencia del patógeno *Lasiodiplodia*, este tipo de respuesta también ha sido descrita para los genes *NBS-LRR* de *Citrullus lanatus* en respuesta al hongo *Didymella bryoniae* (Hassan *et al.*, 2019) y en *Fragaria vesca* en respuesta a *Colletotrichum gloeosporioides* (Li *et al.*, 2013a), donde la expresión de diferentes genes tipo *NBS-LRR* se ve inducida por el mismo patógeno y cada uno de esos genes presentó un perfil diferente de inducción.

El tiempo de inducción de los grupos *NBS_Ateq* en *A. tequilana* es variable, algunos grupos son inducidos de manera temprana y para otros la respuesta es tardía. El grupo I se induce más que las otros, lo que podría implicar este grupo tiene un papel importante en la resistencia. De acuerdo con la relación de la expresión con la resistencia y el resto de ellas tenga una función secundaria al menos contra este patógeno. El patrón de la expresión del grupo I y V coincide con el patrón obtenido de la expresión global de los genes *NBS*, esto puede ser indicativo de que estos dos sean los principales actores en la defensa contra este patógeno. Sin embargo, de acuerdo con el número de copias expresadas el grupo I podría ser la principal y el grupo V, posiblemente esté actuando como auxiliar a la respuesta de defensa. Mientras que el grupo II, actúa probablemente en respuesta temprana en contra la infección de manera más general, y luego esta es

silenciada entre las 24 y 48 HPI, dando lugar a la expresión de los otros grupos involucrados. Este comportamiento sugiere que los grupos inducidos por la presencia del patógeno participan en la respuesta de defensa, se ha reportado en otros estudios que los genes NBS-LRR trabajan coordinados para evitar la infección de ciertos patógenos (Yuan *et al.*, 2011; van der Hoorn y Kamoun, 2008). El hecho de que los distintos grupos presenten patrones temporales de expresión diferentes, puede ser indicativo de que tienen una función específica, por ejemplo, en *Zea mays* y en *Brassica oleracea* se sugiere que este comportamiento se debe inclusive a funciones tejido específicas para estos genes (Liu *et al.*, 2019a; Zhou *et al.*, 2018; Cheng *et al.*, 2012).

Si bien se han descrito genes R, como *Fom1*, *FOC1*, *Pia*, *SacMi* que confieren resistencia específicamente un patógeno (Lv *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Brotman *et al.*, 2013); el hecho que todos los grupos se vean inducidos, como ocurre en otras plantas como *Malus domestica* (Arya *et al.*, 2014) concuerda con la hipótesis “Guardián o Señuelo” de la función de las proteínas NBS-LRR, en la que el reconocimiento del patógeno no necesariamente es según el modelo “gene por gen” (Belkhadir *et al.*, 2004), sino que lo reconoce de manera indirecta por medio de moléculas “señuelo”, lo que le confiere la capacidad de detectar una gama más amplia de patógenos a una sola proteína (Martínez-Pacheco, 2017; van der Hoorn y Kamoun, 2008), y probablemente el hecho que los tiempos en los que estas son inducidas tenga que ver con su función en el mecanismo de respuesta de los genes R en *A. tequilana*.

Este es el primer reporte del rol de las proteínas NBS-LRR en contra de la infección de *Lasiodiplodia*, patógeno descrito en *Agave tequilana* (Campos-Rivero *et al.*, 2019) y de afectación importante para cultivos como: *Mangifera indica*, *Annona* sp., *Vitis vinifera* L. y *Anacardium occidentale* (Netto *et al.*, 2017; Picos-Muñoz *et al.*, 2015; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2015; Úrbez-Torres *et al.*, 2008). El conocimiento de los principales grupos involucrados en la respuesta de este patógeno, puede llevar al desarrollo de estrategias para la mejora de cultivos para la resistencia de éste y otros hongos. Es probable que genes NBS-LRR del grupo I tengan potencial para el desarrollo de estos marcadores que contribuyan al mejoramiento vegetal por medio de la selección asistida por marcadores, considerando sus características y su perfil de inducción.

Diferentes estrategias han sido aplicadas para este objetivo; en *Brassica oleracea*, por medio del análisis de EST se identificaron marcadores SNP que corresponden a un QTL,

que contiene genes tipo TNL, los cuales pueden ser empleados para la selección asistida por marcadores para la resistencia a *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (Kifuji *et al.*, 2013), o la identificación de genes variantes de NBS-LRR del genoma por medio del análisis de SNPs (Lee *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2018), otra estrategia es el uso de marcadores microsatelites que estén asociados a estos genes de resistencia, como por ejemplo los microsatelites FEM14/FEM47 que flanquean a un gen tipo CNL, que confiere resistencia a *Erwinia amylovora* (Fahrentropp *et al.*, 2013). O bien la selección asistida por medio de RGA seleccionados con base en sus perfiles de expresión, como se sugiere para *Cocos nucifera*, en el que se identificaron genes RGA tipo NBS-LRR en el transcriptoma que solo se expresan en las especies resistentes, los cuales pueden ser empleados para la selección asistida de plantas con la presencia de estos genes (Rajesh *et al.*, 2015), o la selección asistida por medio de RGA que tengan una mayor expresión, que puede ser basal, ya que se ha demostrado en algunos casos que la mayor expresión basal de estos genes, se puede asociar a la resistencia a ciertos patógenos (Rout *et al.*, 2014), o una mayor inducción de la expresión en presencia del patógeno en comparación con individuos susceptibles (Radwan, 2010).

CAPITULO IV

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1. DISCUSIÓN GENERAL

El género *Agave* tiene importancia económica en México debido a que es empleado para la obtención de distintos productos de importancia económica tales como bebidas alcohólicas, biocombustibles, frútanos y fibras naturales (Nava-Cruz *et al.*, 2015), entre otros. Una de las especies de mayor importancia económica en México es el *Agave tequilana*, que es empleado principalmente para la producción del tequila.

En general, las enfermedades de las plantas afectan de manera considerable la producción agrícola. El cultivo de *Agave* se ha visto afectado por varios fitopatógenos tales como las bacterias *Erwinia cacticida*, *E. carotovora*, *Pantoea agglomerans*, y hongos principalmente del género *Fusarium* como *F. oxysporum*, y de otros géneros como *Cercospora agavicola*, *Asterina mexicana*, *Colletotrichum* sp y *Alternaria* sp. (Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004; Vega-Ramos *et al.*, 2013; Tamayo-Ordóñez *et al.*, 2016). Estos fitopatógenos reducen el crecimiento normal y pueden llevar a la muerte a las plantas afectadas (Rubio 2007).

Se ha reportado que *A. tequilana* sufrió una crisis fitosanitaria en la cual se perdieron grandes cantidades de plantas a causa de patógenos, alguno de los síntomas que se presentaban fue el enrollamiento anormal de las hojas, necrosis, secamiento de las hojas y la muerte de plantas (Aceves, 2003). Se ha descrito que el agente causal de esta enfermedad es *Fusarium oxysporum* (Luna-Hernández 1996; Rubio 2007). Sin embargo, es poco lo que se conoce de los microorganismos se encuentran asociados al *Agave* y el conocimiento que se tiene sobre el daño que estos pudieran ocasionarles a estas plantas (Desgarenes *et al.*, 2014). Por ello es importante el estudio de la diversidad biológica de los microorganismos asociados a estas plantas, tanto para el desarrollo del conocimiento básico, como para la aplicación de este conocimiento en futuras investigaciones.

Este trabajo permitió identificar hongos que posiblemente estén asociados a enfermedades en *A. tequila*. La diversidad de estos organismos es abundante y se observa una relación entre ésta y la distancia del suelo. Los resultados indican que la mayor diversidad de géneros fue encontrada en las hojas basales (más cercanas al suelo), mientras que en las hojas más distales al suelo la diversidad fue disminuyendo,

resultados similares han sido descritos previamente (Porras-Alfaro *et al.*, 2011; Coleman *et al* 2016). Esto probablemente esté relacionado con la mayor disponibilidad de nutrientes en el suelo con el cual están en contacto las hojas basales, aunado a esto, para que los hongos puedan vivir en las hojas requieren tener los mecanismos de alimentación necesarios para poder establecerse. Sin embargo, la distribución de los organismos posiblemente patógenicos es en toda la planta.

De las cepas aisladas, dos de ellas fueron seleccionadas por su representatividad en los aislados y por estar asociada a enfermedades en *Agave*. Estas cepas pertenecientes a los géneros *Lasiodiplodia* y *Fusarium* fueron empleadas para realizar ensayos de patogenicidad. A pesar que la cepa de *Fusarium* ha sido reportada como patógena para *A. tequilana* (Rubio, 2007), fue una de las que menor actividad enzimática tuvo. A pesar de ello, esta cepa fue capaz de inducir los síntomas de necrosis en el tejido sin necesidad de inducir un daño mecánico previo al mismo, posiblemente debido a que este género tiene los mecanismos necesarios para lograr infectar a la planta y evadir las barreras físicas como la pectina (García-Maceira, Di Pietro, Huertas-González, Ruiz-Roldán, y Roncero, 2001). Sin embargo, las cepas de *Lasiodiplodia*, las cuales se encontraron en mayor representatividad en los tejidos de estudio, fueron las que mayor daño indujeron, aunque fue necesario la presencia de un daño mecánico previo para poder infectar, lo que podría indicar una especialización de este hongo hacia la planta (Ploetz, 2003). Cualesquiera de las cepas evaluadas pueden ser empleada para estudios que requieran la infección de plantas de *A. tequilana*, ya que todas mostraron capacidad infectiva, sin embargo, es importante recalcar que, dadas las características de amplia distribución en la planta, mayor representatividad, mayor actividad pectinolítica y mayor agresividad, las cepas de *Lasiodiplodia* son mejores candidatos para este propósito. Es por esto que se decidió emplear una cepa de este género para el análisis de respuesta de genes R a la infección en *A. tequilana*.

La gran mayoría de genes R codifican para un grupo de genes llamado NBS-LRR (Jones y Dangl, 2006) y están ampliamente distribuidos entre las plantas (Marone, Russo, Laidò, De Leonardis, y Mastrangelo, 2013). Se ha descrito que la presencia los genes NBS-LRR está relacionada con la resistencia de las plantas contra las enfermedades causadas por diferentes patógenos (Diener y Ausubel, 2005; Xiao *et al.*, 2001) y así mismo la expresión de estos genes (Borhan *et al.*, 2010; Dale *et al.*, 2017) por lo que el estudio de la

respuesta de estos genes en *A. tequilana*, puede sentar las bases para la estrategia de mejoramiento de la resistencia en estas plantas.

Como sucede en otras plantas monocotiledóneas solo se encontró la presencia de genes que codifican para proteínas tipo no-TIR (Habachi-Houimli *et al.*, 2018; Karthika, Prasath, y Anandaraj, 2019; Puch-Hau *et al.*, 2015) probablemente debido a que estas son ancestrales y las proteínas tipo TIR surgieron después de la divergencia entre monocotiledóneas y dicotiledóneas (Pan, Wendel, y Fluhr, 2000). Las 46 secuencias tipo NBS aisladas del transcriptoma de *A. tequilana*, son variables tanto en número de aminoácidos, como en propiedades fisicoquímicas, sin embargo, la organización de los motivos estructurales y la presencia de sitios de interacción con otras proteínas como la RanGAP2 es conservada, lo que nos puede sugerir que estos transcritos codifican para proteínas funcionales, debido a que el orden y la presencia de estos sitios de interacción son indispensables para el funcionamiento de estas proteínas (Hulbert, Webb, Smith, y Sun, 2001; Tameling *et al.*, 2010). A pesar de que conservan la estructura, organización y secuencia de los motivos característicos descritos para este tipo de proteínas, en el análisis filogenético estas se agrupan en cinco clados, dentro de los cuales, los miembros de cada uno de ellos comparten homologías con proteínas R para defensa hacia el mismo tipo de patógeno. Es decir, en el grupo I, la mayoría tiene homología con la proteína Pit, en el grupo V con Pi9, etc; lo que sugiere una especialización en la función de estas proteínas.

Como se ha descrito anteriormente, el incremento en la expresión está relacionado con la resistencia y la presencia de los patógenos incrementa la expresión de estos genes. (Horvath *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Xun *et al.*, 2019). Por lo que, observar cambios en los niveles de expresión de estos genes en *A. tequilana* al ser infectado con la cepa del genero *Lasiodiplodia* podría indicar cual o cuales grupos de genes NBS-LRR están participando en la defensa contra la infección de este hongo. Al menos en este estudio se determinó que la expresión de los grupos I, II y V es inducida. Aunque cada grupo mostro perfiles diferentes en la expresión, basados en el número de copias expresadas el grupo I podría ser la principal y el grupo V, posiblemente esté actuando como auxiliar a la respuesta de defensa, mientras que el grupo II, actúa probablemente en respuesta temprana en contra la infección de manera más general, similar a lo que ocurre en otras plantas (van der Hoorn y Kamoun, 2008; Yuan *et al.*, 2011).

El conocimiento de la respuesta de los diferentes grupos de genes NBS-LRR en *Agave tequilana*, puede llevar al desarrollo de estrategias para la mejora de cultivos. Es probable que el grupo I, dado a su mayor expresión y mayor cambio en los niveles de expresión en respuesta a la infección, este involucrado en la respuesta hacia este patógeno, lo que lo hace un candidato para posteriores estudios para el desarrollo de marcadores moleculares para la selección.

4.2. CONCLUSIONES

- El análisis de la comunidad fúngica asociada a plantas de *A. tequilana*, así como los análisis de actividad pectinolítica y ensayos de infección *in vitro*, permitieron la identificación de un nuevo patógeno del género *Lasiodiplodia*.
- Se aislaron 46 secuencias tipo NBS-LRR en el transcriptoma de *A. tequilana*, las cuales, de acuerdo con sus características fisicoquímicas, estructurales y similitud con otras proteínas de referencia tipo NBS-LRR, se puede inferir que son funcionales.
- Los genes tipo NBS-LRR son inducidos por la presencia del patógeno, lo cual sugiere que tienen un papel importante en la respuesta de defensa al menos para los hongos del género *Lasiodiplodia*

4.3. PERSPECTIVAS

- Evaluar la inducción de la expresión de los grupos de genes NBS-LRR identificados en *A. tequilana* durante la infección de *Fusarium oxysporum* y comparar los perfiles de expresión obtenidos para la infección de *Lasiodiplodia*, para determinar si existe una respuesta específica hacia cada género.
- Realizar un análisis transcriptómico más amplio, para identificar un mayor número de secuencias tipo NBS-LRR y realizar un análisis filogenético para identificar nuevos grupos o corroborar el agrupamiento obtenido.
- Evaluar la respuesta del grupo I a la infección de distintos patógenos en plantas de *A. tequilana*, en grupos contrastantes para correlacionar la inducción de la expresión con la mayor resistencia a la infección

- Determinar la localización física de cada grupo de NBS-LRR para evidenciar la representatividad y aportar información relacionada con la historia evolutiva de esta familia de genes.

BIBLIOGRAFIA

- Abass, M. H. (2013). A PCR ITS-RFLP method for identifying fungal contamination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissue cultures. *African Journal of Biotechnology*, 12(32), 5054–5059.
- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Goltapeh, E. M., Zare, R., y Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25, 1–10.
- Adams, G. C., Wingfield, M. J., Common, R., y Roux, J. (2005). Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae) from Eucalyptus. *Studies in Mycology*, 52.
- Alamery, S., Tirnaz, S., Bayer, P., Tollenaere, R., Chaloub, B., Edwards, D., & Batley, J. (2018). Genome-wide identification and comparative analysis of *NBS-LRR* resistance genes in *Brassica napus*. *Crop and Pasture Science*, 69(1), 72.
- Alfaro-Rojas, G., Legaria Solano, J. P., y Rodríguez Pérez, J. E. (2007). Diversidad genética en población de agave pulqueros (*Agave* spp.) del nororiente del estado de México. *Rev. Fitotec. Mex*, 30(1), 1–12.
- Allende, R., Picos, P., Márquez, I., José, C., García, R., y Josefina, L. (2013). Identificación morfológica y molecular de *Penicillium oxalicum* causante de pudrición de tallos y frutos de tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(1), 13–19.
- Álvarez, B. P., Cámara, M. ., Fernández, T. ., González, J., y Estévez, V. . (1999). Inmunodetección de una exopoligalacturonasa en plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, 25, 529–536.
- Alström, S., Högberg, N., Finlay, R., Ekblad, A., Gkarmiri, K., y Mahmood, S. (2017). Identifying the active microbiome associated with roots and rhizosphere soil of oilseed rape. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(22), 1–14.
- Al-Turki, T. A., Masrahi, Y. S., y Sayed, O. H. (2014). Photosynthetic adaptation of *Euphorbia fractiflexa* (Euphorbiaceae) and survival in arid regions of the Arabian Peninsula. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 107–111. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.774442>
- Ameline-Torregrosa, C., Wang, B.-B., O'Bleness, M. S., Deshpande, S., Zhu, H., Roe, B., ... Cannon, S. B. (2007). Identification and characterization of Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat genes in the model plant *Medicago truncatula*. *Plant*

- Physiology*, 146(1), 5–21.
- Andersen, E. J., Ali, S., Reese, R. N., Yen, Y., & Neupane, S. (2016). Diversity and Evolution of Disease Resistance Genes in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Evolutionary Bioinformatics*, 12, 99–108.
- Arya, P., Kumar, G., Acharya, V., & Singh, A. K. (2014). Genome-wide identification and expression analysis of NBS-encoding genes in *Malus x domestica* and expansion of NBS genes family in Rosaceae. *PLoS ONE*, 9(9), e107987.
- Asoufi, H., Hameed, K. M., y Mahasneh, A. (2007). The Cellulase and Pectinase Activities Associated with the Virulence of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in Jordan Valley. *The Plant Pathology Journal*, 23(4), 233–238.
- Atkinson, N. J., y Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. *Journal of Experimental Botany*. 63(10), 3523-3543.
- Aveskamp, M.M., Gruyter, De, J., C. P. W. (2008). Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Diversity*, 31, 1–18.
- Ávila-Miranda, M. E., López-Zazueta, J. G., Arias-Castro, C., Rodríguez-Mendiola, M. A., Guzmán de Peña, D. A., A., V. N. J., y Peña Cabriales, J. J. (2010). Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 12, 166–180.
- Bai, J., Pennill, L. A., Ning, J., Lee, S. W., Ramalingam, J., Webb, C. A., ... Hulbert, S. H. (2002). Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. *Genome Research*, 12(12), 1871–1884.
- Bai, S., Liu, J., Chang, C., Zhang, L., Maekawa, T., Wang, Q., ... Shen, Q. (2012). Structure-Function analysis of Barley NLR immune receptor MLA10 reveals its cell compartment specific activity in cell death and disease resistance. *PLoS Pathogens*, 8(6), 21–25.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., ... Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server), W202–W208.
- Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., y Maier, W. (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 99–108. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2585-4>
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., & Dangl, J. L. (2004). Plant disease resistance protein

- signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 391–399.
- Beltran-Garcia, M. J., White, J. F., Prado, F. M., Prieto, K. R., Yamaguchi, L. F., Torres, M. S., ... Di Mascio, P. (2015). Nitrogen acquisition in *Agave tequilana* from degradation of endophytic bacteria. *Scientific Reports*, 4(1), 6938.
- Bensch, K., Groenewald, J. Z., Dijksterhuis, J., Starink-Willemse, M., Andersen, B., Summerell, B. A., ... Crous, P. W. (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*, 67, 1–94.
- Bent, A. F., y Mackey, D. (2007). Elicitors, Effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), 399–436.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26.
- Bimboim, H. ., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.
- Binder, M., Justo, A., Riley, R., Salamov, A., Lopez-Giraldez, F., Sjökvist, E., ... Hibbett, D. S. (2013). Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. *Mycologia*, 105(6), 1350–1373.
- Borhan, M. H., Holub, E. B., Kindrachuk, C., Omid, M., Bozorgmanesh-Frad, G., & Rimmer, S. R. (2010). WRR4, a broad-spectrum *TIR-NB-LRR* gene from *Arabidopsis thaliana* that confers white rust resistance in transgenic oilseed brassica crops: Short communication. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 283–291.
- Brotman, Y., Normantovich, M., Goldenberg, Z., Zvirin, Z., Kovalski, I., Stovbun, N., ... Perl-Treves, R. (2013). Dual resistance of melon to *Fusarium oxysporum* races 0 and 2 and to papaya ring-spot virus is controlled by a pair of head-to-head-oriented nb-lrr genes of unusual architecture. *Molecular Plant*, 6(1), 235–238.
- Bruns, T. D., Vilgalys, R., Barns, S. M., Gonzalez, D., Hibbett, D. S., Lane, D. J., ... Sogin, M. L. (1992). Evolutionary relationships within the fungi: Analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1(3), 231–241.
- Bull, A. T., Stach, J. E. ., Ward, A. C., y Goodfellow, M. (2005). Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(1), 65–79.
- Campos-Rivero, G., Sánchez-Teyer, L. F., De la Cruz-Arguijo, E. A., Ramírez-González, M. S., Larralde-Corona, C. P., y Narváez-Zapata, J. A. (2019). Bioprospecting for fungi with potential pathogenic activity on leaves of *Agave tequilana* Weber var.

- azul. *Journal of Phytopathology*, 167(5), 283–294.
- Carolis, E. De, Hensgens, L. A. M., Vella, A., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Senesi, S., y Tavanti, A. (2014). Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. *Medical Mycology*, 52(2), 123–130.
- Castro-Medina, F., Mohali, S. R., Úrbez-Torres, J. R., y Gubler, W. D. (2014). First Report of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* Causing Trunk Cankers in *Acacia mangium* in Venezuela. *Plant Disease*, 98(5), 686–686.
- Castro-Valera, R. (2003). Incidencia y Distribución de Marchitez y Pudrición del Cogollo del Agave (Agave tequilana Weber variedad azul) en la zona sur de Jalisco. Tesis de Doctorado Universidad de Guadalajara.
- Chase, M. W., Christenhusz, M. J. M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., ... Weber, A. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20.
- Chen, Y. L., Xu, T. Le, Veresoglou, S. D., Hu, H. W., Hao, Z. P., Hu, Y. J., ... Chen, B. D. (2017). Plant diversity represents the prevalent determinant of soil fungal community structure across temperate grasslands in northern China. *Soil Biology and Biochemistry*, 110, 12–21.
- Cheng, X., Jiang, H., Zhao, Y., Qian, Y., Zhu, S., & Cheng, B. (2010). A genomic analysis of disease-resistance genes encoding nucleotide binding sites in *Sorghum bicolor*. *Genetics and Molecular Biology*, 33(2), 292–297.
- Cheng, Y., Li, X., Jiang, H., Ma, W., Miao, W., Yamada, T., & Zhang, M. (2012). Systematic analysis and comparison of nucleotide-binding site disease resistance genes in maize. *FEBS Journal*, 279(13), 2431–2443.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803–814.
- Cipollini, D., Purrington, C. B., y Bergelson, J. (2003). Costs of induced responses in plants. *Basic and Applied Ecology*, 85(4), 79–85.
- Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., ... Tringe, S. G. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*, 209(2), 798–811.
- Coll, N. S., Epple, P., & Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune

- system. *Cell Death and Differentiation*, 18(8), 1247–1256.
- Collier, S. M., y Moffett, P. (2009). NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends in Plant Science*, 14(10), 521–529.
- Correia, K. C., Silva, M. A., de Moraes, M. A., Armengol, J., Phillips, A. J. L., Câmara, M. P. S., y Michereff, S. J. (2016). Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant Pathology*, 65(1), 92–103.
- Crous, P. W., Schoch, C. L., Hyde, K. D., Wood, A. R., Gueidan, C., de Hoog, G. S., y Groenewald, J. Z. (2009). Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Studies in Mycology*, 64, 17–47.
- CRT Consejo Regulador del Tequila. (2010). Actualización de la base de datos y diagnostic fitosanitario de Agave tequilana Weber var. Azul en la denominación de origen tequila. Disponible en: <http://www.crt.or.mx/images/documentos/inventatioagave2010b.pdf> [Acceso 3 octubre 2011]
- CRT Consejo Regulador del Tequila. (2019). Producción total de tequila. Disponible en: , from <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/> [Acceso septiembre 11 2019]
- Cushman, J. C. (2001). Crassulacean Acid Metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiology*, 127(4), 1439–1448.
- Dale, J., James, A., Paul, J. Y., Khanna, H., Smith, M., Peraza-Echeverria, S., ... Harding, R. (2017). Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nature Communications*, 8(1), 1–8.
- Dalton, R. (2005). Saving the agave. *Nature*, 438(7071), 1070–1071.
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), 826–833.
- Das, T. (1992). Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31(3), 253–255.
- De Lorenzo, G., Castoria, R., Bellincampi, D., y Cervone, F. (1997). Fungal Invasion Enzymes and Their Inhibition. In *Plant Relationships* (pp. 61–83). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10370-8_5
- Dekker, R. F. H., Vasconcelos, A.-F. D., Barbosa, A. M., Giese, E. C., y Paccola-Meirelles, L. (2001). A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of lignocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.;

- influence of carbon source. *Biotechnology Letters*, 23(24), 1987–1993.
- Desgarennés, D., Garrido, E., Torres-Gomez, M. J., Peña-Cabriales, J. J., y Partida-Martínez, L. P. (2014). Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(3), 844–857.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., ... Marco, Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 8024–8029.
- Di Pietro, A., y Roncero, M. I. G. (1996). Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici: Purification, characterization, and production during infection of tomato plants. *Biochemistry and Cell Biology*.
- Diario Oficial de la Federación. (1993). *Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones*. Mexico.
- Diener, A. C., & Ausubel, F. M. (2005). Resistance to *Fusarium oxysporum* 1, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics*, 171(1), 305–321.
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I. A., Ayliffe, M. A., ... Ellis, J. G. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(23), 8888–8893.
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5), 547–552.
- Doyle, J. K., & Doyle, J. L. (1987). Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem Bull*, 19(11), 11–15.
- Dracatos, P. M., Bartoš, J., Elmansour, H., Singh, D., Karafiátová, M., Zhang, P., ... Park, R. F. (2019). The Coiled-Coil NLR Rph1, confers Leaf Rust resistance in Barley cultivar Sudan. *Plant Physiology*, 179(4), 1362–1372.
- Duque-Bautista, H., Zurita-Vásquez, G. G., Pacheco-Hernández, Y., y Villa-Ruano, N. (2017). Etiología de la mancha necrótica del *Agave angustifolia*: Una aproximación in vitro hacia su control biológico. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(2), 326–337.

- Durrant, W. E., y Dong, X. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 185–209.
- Eguiarte, L. E., Souza, V., y Silva-Montellano, A. (2000). Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Botanical Sciences*, (66), 131.
- Eitas, T. K., y Dangl, J. L. (2010, August 1). NB-LRR proteins: Pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Current Trends.
- Ellis, J., Dodds, P., & Pryor, T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 278–284.
- Enkhbayar, P., Kamiya, M., Osaki, M., Matsumoto, T., y Matsushima, N. (2003). Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 54(3), 394–403.
- Fahrenttrapp, J., Broggin, G. A. L., Kellerhals, M., Peil, A., Richter, K., Zini, E., & Gessler, C. (2013). A candidate gene for fire blight resistance in *Malus × robusta* 5 is coding for a CC-NBS-LRR. *Tree Genetics and Genomes*, 9(1), 237–251.
- Farr, D. F., Aime, M. C., Rossman, A. Y., y Palm, M. E. (2006). Species of *Colletotrichum* on Agavaceae. *Mycological Research*, 110(12), 1395–1408.
- Flores-López, H. E., Chávez-Durán, Á. A., Ruíz-Corral, J. A., De la Mora-Orozco, C., y Rodríguez-Moreno, V. M. (2016). Efecto del cambio climático sobre las zonas de riesgo por marchitez en el Agave tequilana Weber variedad Azul en Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (13), 2497–2510.
- Friedman, A. R., & Baker, B. J. (2007, December 1). The evolution of resistance genes in multi-protein plant resistance systems. *Current Opinion in Genetics and Development*. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.08.014>
- Fu, Y., Zhang, Y., Mason, A. S., Lin, B., Zhang, D., Yu, H., & Fu, D. (2019). NBS-Encoding Genes in *Brassica napus* Evolved Rapidly After Allopolyploidization and Co-localize With Known Disease Resistance Loci. *Frontiers in Plant Science*, 10(January), 1–18.
- Fu, Z. Q., y Dong, X. (2013). Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 839–863.
- Gao, Q.-M., Zhu, S., Kachroo, P., y Kachroo, A. (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 06.
- García-Maceira, F. I., Di Pietro, A., Huertas-González, M. D., Ruiz-Roldán, M. C., y

- Roncero, M. I. G. (2001). Molecular Characterization of an Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* Expressed during Early Stages of Infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2191–2196.
- García-Maceira, F. I., Di Pietro, A., Huertas-González, M. D., Ruiz-Roldán, M. C., & Roncero, M. I. G. (2001). Molecular Characterization of an Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* Expressed during Early Stages of Infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2191–2196.
- García-Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencia*, (87), 14–23. Ciencias. (087). Disponible en: [http://www.revistaciencias.unam.mx/images/stories/Articles/87/02/Los agaves de Mexico.pdf](http://www.revistaciencias.unam.mx/images/stories/Articles/87/02/Los%20agaves%20de%20Mexico.pdf)
- García-Pineda, E., & Lozoya-Gloria, E. (2004). Genes de Resistencia a Enfermedades en Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(3), 414–422.
- Gaut, B. S., Morton, B. R., McCaig, B. C., & Clegg, M. T. (1996). Substitution rate comparisons between grasses and palms: synonymous rate differences at the nuclear gene Adh parallel rate differences at the plastid gene rbcL. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(19), 10274–10279.
- Gentry, H. S. (2004). *Agaves of Continental North America*. (U. of A. Press., Ed.) (I). Arizona.
- Ginns, J., Gilbertson, R. L., y Ryvardeen, L. (1986). North American Polypores. *Mycologia*, 78(5), 873.
- Giraldo, M. C., y Valent, B. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 800–814.
- Giuseppe, O., Bertetti, D., Gullino, M. L., y Garibaldi, A. (2015). *Fusarium oxysporum* f. sp. *echeveriae*, a novel forma specialis causing crown and stem rot of *Echeveria agavoides*. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(1), 64–74.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205–227.
- Golkari, S., Gilbert, J., Prashar, S., y Procunier, J. D. (2007). Microarray analysis of *Fusarium graminearum*-induced wheat genes: Identification of organ-specific and differentially expressed genes. *Plant Biotechnology Journal*, 5(1), 38–49.
- Gómez, P., Rodríguez-Hernández, A. M., Moury, B., y Aranda, M. A. (2009, September 9). Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: Breeding, mechanisms and durability. *European Journal of Plant Pathology*. Springer

Netherlands.

- Gong, B., Liu, G., Liao, R., Song, J., y Zhang, H. (2017). Endophytic fungus *Purpureocillium* sp. A5 protect mangrove plant *Kandelia candel* under copper stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 530–536.
- Gong, C., Cao, S., Fan, R., Wei, B., Chen, G., Wang, X., ... Zhang, X. (2013). Identification and phylogenetic analysis of a CC-NBS-LRR encoding gene assigned on chromosome 7B of wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 15330–15347.
- Good-Avila, S. V., Souza, V., Gaut, B. S., y Eguiarte, L. E. (2006). Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9124–9129.
- Gorzela, M. A., Hambleton, S., y Massicotte, H. B. (2012). Community structure of ericoid mycorrhizas and root-associated fungi of *Vaccinium membranaceum* across an elevation gradient in the Canadian Rocky Mountains. *Fungal Ecology*, 5(1), 36–45.
- Goudjal, Y., Zamoum, M., Sabaou, N., y Zitouni, A. (2018). Endophytic Actinobacteria from Native Plants of Algerian Sahara. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 109–124). Elsevier.
- Goyal, N., Bhatia, G., Sharma, S., Garewal, N., Upadhyay, A., Upadhyay, S. K., & Singh, K. (2019). Genome-wide characterization revealed role of NBS-LRR genes during powdery mildew infection in *Vitis vinifera*. *Genomics*, 312-322.
- Grishkan, I., Jia, R. L., Kidron, G. J., y Li, X. R. (2015). Cultivable microfungus communities inhabiting biological soil crusts in the tengger desert, China. *Pedosphere*, 25(3), 351–363.
- Gross, S. M., Martin, J. A., Simpson, J., Abraham-Juarez, M., Wang, Z., & Visel, A. (2013). De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC Genomics*, 14(1), 563.
- Gu, L., Si, W., Zhao, L., Yang, S., & Zhang, X. (2015). Dynamic evolution of NBS-LRR genes in bread wheat and its progenitors. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(2), 727–738.
- Gupta, S. K., Rai, A. K., Kanwar, S. S., Chand, D., Singh, N. K., & Sharma, T. R. (2012). The single functional blast resistance gene Pi54 activates a complex defence mechanism in rice. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 757–772.
- Habachi-Houimli, Y., Khalfallah, Y., Mezghani-Khemakhem, M., Makni, H., Makni, M., &

- Bouktila, D. (2018). Genome-wide identification, characterization, and evolutionary analysis of NBS-encoding resistance genes in barley. *3 Biotech*, 8(11), 453.
- Hallenberg, N., Larsson, E., y Mahlapuu, M. (1996). *Phylogenetic studies in Peniophora. Mycol. Res* (Vol. 100).
- Hassan, M., Rahim, M., Jung, H.-J., Park, J.-I., Kim, H.-T., & Nou, I.-S. (2019). Genome-Wide Characterization of NBS-Encoding Genes in Watermelon and Their Potential Association with Gummy Stem Blight Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 902.
- Heath, M. C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 315–319.
- Hilton, S., Bennett, A. J., Keane, G., Bending, G. D., Chandler, D., Stobart, R., y Mills, P. (2013). Impact of shortened crop rotation of oilseed rape on soil and rhizosphere microbial diversity in relation to yield decline. *PLoS ONE*, 8(4).
- Hinrikson, H. P., Hurst, S. F., Lott, T. J., Warnock, D. W., y Morrison, C. J. (2005). Assessment of Ribosomal Large-Subunit D1-D2, Internal Transcribed Spacer 1, and Internal Transcribed Spacer 2 Regions as Targets for Molecular Identification of Medically Important *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2092–2103.
- Hirano, Y., y Arie, T. (2009). Variation and Phylogeny of *Fusarium oxysporum* Isolates Based on Nucleotide Sequences of Polygalacturonase Genes. *Microbes and Environments*, 24(2), 113–120.
- Horvath, D. M., Stall, R. E., Jones, J. B., Pauly, M. H., Vallad, G. E., Dahlbeck, D., ... Scott, J. W. (2012). Transgenic resistance confers effective field level control of bacterial spot disease in tomato. *PLoS ONE*, 7(8): e42036.
- Huang, W.-Y., Cai, Y.-Z., Hyde, K. D., Corke, H., y Sun, M. (2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*, 33, 61–75.
- Huertas-González, M. D., Garcia-Maceira, F. I., Méglecz, E., Ruiz-Roldán, M. C., Di Pietro, A., Sancho-Zapatero, R., ... Jose Páez, M. (2000). Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. *Rev Iberoam Micol*, 17, 47–53.
- Hulbert, S. H., Webb, C. a, Smith, S. M., & Sun, Q. (2001). Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1), 285–312.

- Hwang, C.-F., Bhakta, A. V., Truesdell, G. M., Pudlo, W. M., y Williamson, V. M. (2000). Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich Repeat region of the Mi gene product in regulation of localized cell death. *The Plant Cell*, 12(8), 1319.
- Islam, Z., Ahn, S. Y., & Yun, H. K. (2015). Analysis of structure and differential expression of *Pseudomonas syringae* 5-like (RPS5-like) genes in pathogen-infected *Vitis flexuosa*. *Turkish Journal of Biology*, 39(5), 775–789.
- Iyer, L. M., Leipe, D. D., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *Journal of Structural Biology*, 146(1–2), 11–31.
- Jain, S. M. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118(2), 153–166.
- Jaklitsch, W. M., Fournier, J., Dai, D. Q., Hyde, K. D., y Voglmayr, H. (2015). Valsaria and the Valsariales. *Fungal Diversity*, 73(1), 159–202.
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., y Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal*, 19(15), 4004–4014.
- Jiménez-Hidalgo, I., Virgen-Calleros, G., Martínez-de la Vega, O., Vandemark, G., y Olalde-Portugal, V. (2004). Identification and Characterisation of Bacteria Causing Soft-rot *Agave tequilana*. *European Journal of Plant Pathology*, 110(3), 317–331.
- Jones, D. A., & Takemoto, D. (2004). Plant innate immunity - Direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 48–62.
- Jones, J., & Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.
- Jones, T. M., Anderson, A. J., y Albersheim, P. (1972). Host-pathogen interactions IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Physiological Plant Pathology*, 2(2), 153–166.
- Joshi, R. K., Kar, B., & Nayak, S. (2012). Survey and characterization of NBS-LRR (R) genes in *Curcuma longa* transcriptome. *Bioinformatics*, 6(9), 360–363.
- Judd, W. S., Campbell, E. A., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., y Donoghue, M. J. (2016). *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. (S. Associates, Ed.) (4th ed.). UK.
- Kang, Y. J., Kim, K. H., Shim, S., Yoon, M. Y., Sun, S., Kim, M. Y., ... Lee, S. H. (2012). Genome-wide mapping of NBS-LRR genes and their association with disease resistance in soybean. *BMC Plant Biology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-139>

- Karthika, R., Prasath, D., & Anandaraj, M. (2019). Transcriptome-wide identification and characterization of resistant gene analogs (RGAs) of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) under stress induced by pathogen. *Scientia Horticulturae*, 81–88.
- Keen, N. T. (1990). Gen-for-gen complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics*, 24, 447–463.
- Keller, H., Boyer, L., & Abad, P. (2016). Disease susceptibility in the Zig-Zag model of host-microbe interactions: Only a consequence of immune suppression? *Molecular Plant Pathology*, 17(4), 475–479.
- Kifuji, Y., Hanzawa, H., Terasawa, Y., Ashutosh, & Nishio, T. (2013). QTL analysis of black rot resistance in cabbage using newly developed EST-SNP markers. *Euphytica*, 190(2), 289–295.
- Kim, H.-S., Desveaux, D., Singer, A., Patel, P., Sondek, J., y Dangl, J. L. (2005). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(18), 6496–6501.
- Kobe, B., & Kajava, A. V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6), 725–732.
- Kobe, B., y Kajava, A. V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6), 725–732.
- Kuang, H., Woo, S.-S., Meyers, B. C., Nevo, E., & Michelmore, R. W. (2004). Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in Lettuce. *The Plant Cell*, 16(11), 2870–2894.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7),
- Kwiatkowski, N. P., Babiker, W. M., Merz, W. G., Carroll, K. C., y Zhang, S. X. (2012). Evaluation of Nucleic Acid Sequencing of the D1/D2 Region of the Large Subunit of the 28S rDNA and the Internal Transcribed Spacer Region Using SmartGene IDNS Software for Identification of Filamentous Fungi in a Clinical Laboratory. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 14(4), 393–401.
- Larrea-Reynoso, E. (1998). Estudios preliminares para el control de los hongos *Fusarium*, *Verticillium*, *Asterina* y de una bacteria no clasificada en agave azul (*Agave tequilana* Weber var. azul). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 16, 125.
- Lee, S.-B., Kim, N., Hur, Y.-J., Cho, S.-M., Kim, T.-H., Lee, J., ... Park, D.-S. (2019). Fine

- mapping of qBK1, a major QTL for bakanae disease resistance in rice. *Rice*, 12(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0295-9>
- Leipe, D. D., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2004). STAND, a class of P-Loop NTPases including animal and plant regulators of Programmed Cell Death: Multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Biology*, 343(1), 1–28.
- Leister, D. (2004, March 1). Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. *Trends in Genetics*. Elsevier Current Trends.
- Leyva-Madriral, K. Y., Sandoval-Castro, E., Calderón-Vázquez, C. L., Larralde-Corona, C. P., y Maldonado-Mendoza, I. E. (2017). Pathogenic and genetic variability of *Fusarium verticillioides* from maize in northern Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 39(4), 486–496.
- Li, C. juan, Liu, Y., Zheng, Y. xiong, Yan, C. xia, Zhang, T. ting, & Shan, S. hua. (2013). Cloning and characterization of an NBS-LRR resistance gene from peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 84(1), 70–75.
- Li, J., Zhang, Q.-Y., Gao, Z.-H., Wang, F., Duan, K., Ye, Z.-W., & Gao, Q.-H. (2013a). Genome-wide identification and comparative expression analysis of NBS-LRR-encoding genes upon *Colletotrichum gloeosporioides* infection in two ecotypes of *Fragaria vesca*. *Gene*, 527(1), 215–227.
- Li, N. Y., ma, X. F., Short, D. P. G., Li, T. G., Zhou, L., Gui, Y. J., ... Dai, X. F. (2018). The island cotton NBS-LRR gene GbaNA1 confers resistance to the non-race 1 *Verticillium dahliae* isolate Vd991. *Molecular Plant Pathology*, 19(6), 1466–1479.
- Li, X., Cheng, Y., Ma, W., Zhao, Y., Jiang, H., y Zhang, M. (2010). Identification and characterization of NBS-encoding disease resistance genes in *Lotus japonicus*. *Plant Systematics and Evolution*, 289(1–2), 101–110.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.
- Liu, J., Schoettle, A. W., Sniezko, R. A., Yao, F., Zaman, A., Williams, H., & Rancourt, B. (2019). Limber pine (*Pinus flexilis* James) genetic map constructed by exome-seq provides insight into the evolution of disease resistance and a genomic resource for genomics-based breeding. *The Plant Journal*, 98(4), 745–758.
- Liu, Z., Xie, J., Wang, H., Zhong, X., Li, H., Yu, J., & Kang, J. (2019a). Identification and

- expression profiling analysis of NBS–LRR genes involved in *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* resistance in cabbage. *3 Biotech*, *9*(5), 202.
- Lombard, L., van der Merwe, N. A., Groenewald, J. Z., y Crous, P. W. (2015). Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology*, *80*, 189–245.
- Lozano, R., Ponce, O., Ramirez, M., Mostajo, N., & Orjeda, G. (2012). Genome-wide identification and mapping of nbs-encoding resistance genes in *Solanum tuberosum* group phureja. *PLoS ONE*, *7*(4): e34775.
- Lu, Y., Xie, L., & Chen, J. (2012). A novel procedure for absolute real-time quantification of gene expression patterns. *Plant Methods*, *8*(1), 1–11.
- Luangsa-Ard, J., Houbraken, J., van Doorn, T., Hong, S. B., Borman, A. M., Hywel-Jones, N. L., y Samson, R. A. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters*, *321*(2), 141–149.
- Luna-Hernandez, G. (1996). *Pudrición del tallo de Agave tequilana Weber, var. azul en el estado de Jalisco, México*. Universidad Autonoma de Chapingo.
- Lv, H., Fang, Z., Yang, L., Zhang, Y., Wang, Q., Liu, Y., ... Wang, X. (2014). Mapping and analysis of a novel candidate *Fusarium* wilt resistance gene FOC1 in *Brassica oleracea*. *BMC Genomics*, *15*(1), 1094.
- Ma, J., Wan, D., Duan, B., Bai, X., Bai, Q., Chen, N., & Ma, T. (2019). Genome sequence and genetic transformation of a widely distributed and cultivated poplar. *Plant Biotechnology Journal*, *17*(2), 451–460.
- Mackey, D., Holt Iii, B. F., Wiig, A., y Dangl, J. L. (2002). RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis* Ellis *et al.*, 2000). Additionally, the LRRs encoded by. *Cell*, *108*, 743–754.
- Madigan, M., Cox, S. S., y Stegeman, R. A. (1984). Nitrogen fixation and nitrogenase activities in members of the family Rhodospirillaceae. *Journal of Bacteriology*, *157*(1), 73–78.
- Manzo, D., Ferriello, F., Puopolo, G., Zoina, A., D'Esposito, D., Tardella, L., ... Ercolano, M. R. (2016). *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* induces distinct transcriptome reprogramming in resistant and susceptible isogenic tomato lines. *BMC Plant Biology*, *16*(1), 53.
- Marchler-Bauer, A., & Bryant, S. H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research*, *32*(Web Server), W327–W331.
- Marone, D., Russo, M. A., Laidò, G., De Leonadis, A. M., & Mastrangelo, A. M. (2013).

- Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: Active guardians in host defense responses. *International Journal of Molecular Sciences*. Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S. L., Ruocco, M., ... Lorito, M. (2006). Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Current Genetics*, 50(5), 307–321.
- Martin, G. B., Bogdanove, A. J., y Sessa, G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 23–61.
- Martínez-Pacheco, J. (2017). Proteínas R Y Percepción De Efectores Patogénicos en la familia Solanaceae. *Revista de Protección Vegetal*, 32(1), 1–9.
- Martínez-Palacios, A., Gómez-Sierra, J. M., Sáenz-Romero, C., Pérez-Nasser, N., y Sánchez-Vargas, N. (2011). Diversidad genética de *Agave cupreata* Trel. y Berger. Consideraciones para su conservación. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(3), 159–165.
- Martínez-Ramírez, J., y Virgen-Calleros, G. (1998). Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber var. azul. In *Foro de Análisis de la problemática de la cadena productiva agave-tequila* (pp. 20–25).
- Martínez-Rodríguez, J. D. C., De La Mora-Amutio, M., Plascencia-Correa, L. A., Audelo-Regalado, E., Guardado, F. R., Hernández-Sánchez, E., ... Ogura, T. (2014). Cultivable endophytic bacteria from leaf bases of *Agave tequilana* and their role as plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1333–1339.
- Maturano, Y. P., Rodríguez Assaf, L. A., Toro, M. E., Nally, M. C., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L. I., ... Vazquez, F. (2012). Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*.155(1-2),43-50
- McDowell, J. M., & Simon, S. A. (2006). Recent insights into R gene evolution. *Molecular Plant Pathology*, 7(5), 437–448.
- McHale, L., Tan, X., Koehl, P., & Michelmore, R. W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: Adaptable guards. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-4-212>
- Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W., y Young, N. D. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal*, 20(3), 317–332.
- Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W.,

- & Young, N. D. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal*, 20(3), 317–332.
- Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., & Michelmore, R. W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15(4), 809–834.
- Michelmore, R. W., y Meyers, B. C. (1998). Clusters of Resistance Genes in Plants Evolve by Divergent Selection and a Birth-and-Death Process. *Genome Research*, 8(11), 1113–1130.
- Michielse, C. B., y Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 311–324.
- Mondragon-Palomino, M., & Gaut, B. S. (2005). Gene Conversion and the evolution of three Leucine-Rich Repeat gene Families in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution*, 22(12), 2444–2456.
- Mondragón-palomino, M., Meyers, B. C., Michelmore, R. W., & Gaut, B. S. (2002). Patterns of Positive Selection in the Complete NBS-LRR Gene Family of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, 12(9), 1305–1315.
- Morel, J. B., y Dangl, J. L. (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation*, 4(8), 671–683.
- Msiska, Z., y Morton, J. B. (2009). Phylogenetic analysis of the Glomeromycota by partial β -tubulin gene sequences. *Mycorrhiza*, 19(4), 247–254.
- Mucyn, T. S., Clemente, A., Andriotis, V. M. E., Balmuth, A. L., Oldroyd, G. E. D., Staskawicz, B. J., y Rathjen, J. P. (2006). The Tomato NBARC-LRR Protein Prf Interacts with Pto Kinase in Vivo to Regulate Specific Plant Immunity. *THE PLANT CELL*, 18(10), 2792–2806.
- Murillo-Williams, A., y Munkvold, G. P. (2008). Systemic infection by *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three temperature regimes. *Plant Disease*, 92(12), 1695–1700.
- Narvaez-Zapata, J. A., y Sanchez-Teyer, L. F. (2009). Agaves as a Raw Material: Recent Technologies and Applications. *Recent Patents on Biotechnology*, 3(3), 185–191.
- Nava-Cruz, N. Y., Medina-Morales, M. A., Martinez, J. L., Rodriguez, R., y Aguilar, C. N. (2015). Agave biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 546–559.
- Nepal, M., Andersen, E., Neupane, S., & Benson, B. (2017). Comparative Genomics of

- Non-TNL Disease Resistance Genes from Six Plant Species. *Genes*, 8(10), 249.
- Netto, M. S. B., Assunção, I. P., Lima, G. S. A., Marques, M. W., Lima, W. G., Monteiro, J. H. A., ... Câmara, M. P. S. (2014). Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity*, 67(1), 127–141.
- Netto, M. S. B., Lima, W. G., Correia, K. C., da Silva, C. F. B., Thon, M., Martins, R. B., ... Câmara, M. P. S. (2017). Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of Anacardium in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Biology*, 121(4), 437–451.
- Neupane, S., Andersen, E. J., Neupane, A., & Nepal, M. P. (2018). Genome-Wide Identification of NBS-Encoding Resistance Genes in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genes*, 9(8), 384.
- Nouri, M. T., Lawrence, D. P., Yaghmour, M. A., Michailides, T. J., y Trouillas, F. P. (2018). *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Canker, Shoot Blight and Fruit Rot of Almond in California. *Plant Disease*, 102(8), 1638–1647.
- O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation. In *fungal systematics* (pp. 225–233).
- O'Donnell, Kerry, Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A., ... Sarver, B. A. J. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 46(12), 936–948.
- O'Donnell, Kerry, Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Magnon, K. C., Cox, P. A., Revankar, S. G., ... Robinson, J. S. (2004). Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: Evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5109–5120.
- Obledo, E. N., Barragán-Barragán, L. B., Gutiérrez-González, P., Ramírez-Hernández, B. C., Ramírez, J. J., y Rodríguez-Garay, B. (2003). Increased photosynthetic efficiency generated by fungal symbiosis in *Agave victoria-reginae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(3), 237–241.
- Pan, Q., Wendel, J., & Fluhr, R. (2000). Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 50(3), 203–213.
- Peraza-Echeverria, S., Dale, J. L., Harding, R. M., Smith, M. K., y Collet, C. (2008).

- Characterization of disease resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from banana and correlation of a transcriptional polymorphism with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4. *Molecular Breeding*, 22(4), 565–579.
- Pereira, S. I. A., Monteiro, C., Vega, A. L., y Castro, P. M. L. (2016). Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: Isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities. *Ecological Engineering*, 87, 91–97.
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., y Allende-Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 54(1), 54–74.
- Pimienta-Barrios, E., Zañudo-Hernández, J., y López-Alcocer, E. (2009). Efecto de las micorrizas arbusculares en el crecimiento, fotosíntesis y anatomía foliar de plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Acta Botánica Mexicana*, 89, 63–78.
- Pinos-Rodríguez, J. M., Zamudio, M., y González, S. S. (2008). The effect of plant age on the chemical composition of fresh and ensiled *Agave salmiana* leaves. *South African Journal of Animal Sciences*, 38(1), 43–50.
- Pitt, J. I., y Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage*. *Fungi and Food Spoilage*. Springer. New York. pp. 524
- Ploetz, R. (2003). *Diseases of tropical fruit crops*. (CABI, Ed.). Wallingford, UK. pp. 449
- Poll, C., Brune, T., Begerow, D., y Kandeler, E. (2010). Small-scale Diversity and Succession of Fungi in the Detritosphere of Rye Residues. *Microbial Ecology*, 59(1), 130–140.
- Porrás-Alfaro, A., Herrera, J., Natvig, D. O., Lipinski, K., y Sinsabaugh, R. L. (2011). Diversity and distribution of soil fungal communities in a semiarid grassland. *Mycologia*, 103(1), 10–21.
- Porter, B. W., Paidi, M., Ming, R., Alam, M., Nishijima, W. T., y Zhu, Y. J. (2009). Genome-wide analysis of *Carica papaya* reveals a small NBS resistance gene family. *Molecular Genetics and Genomics*, 281(6), 609–626.
- Puch-Hau, C., Oropeza-Salín, C., Peraza-Echeverría, S., Gongora-Paredes, M., Córdova-Lara, I., Narvaez-Cab, M., ... Sáenz-Carbonell, L. (2015). Molecular cloning and characterization of disease-resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from *Cocos nucifera* L. *Physiological and Molecular Plant*

- Pathology*, 89, 87–96.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., & Lopez, R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server), W116–W120.
- Quiñones-Aguilar, E., López-Pérez, L., Solís-Sánchez, A., Vega-Ramos, K., Uvalle-Bueno, J., Qui-Zapata, J., y Rincón-Enríquez, G. (2014). Biocontrol of soft rot agave by bacteriophages. *Sustainable and Integral Exploitation of Agave*, (January), 52–56.
- Radwan, O. (2010). Isolation and expression of an NBS-LRR protein-encoding resistance gene candidate that segregates with a rust resistance gene in sunflower. *Journal of Phytopathology*, 158(6), 433–443.
- Raeder, U., y Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1(1), 17–20.
- Rajesh, M. K., Rachana, K. E., Naganeeswaran, S. A., Shafeeq, R., Thomas, R. J., Shareefa, M., ... Anitha, K. (2015). Identification of expressed resistance gene analog sequences in coconut leaf transcriptome and their evolutionary analysis. *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY*, 39, 489–502.
- Rodríguez-Gálvez, E., Maldonado, E., & Alves, A. (2015). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 141(3), 477–489.
- Rodríguez-Gálvez, Edgar, Guerrero, P., Barradas, C., Crous, P. W., y Alves, A. (2017). Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology*, 121(4), 452–465.
- Rolshausen, P. E., Akgül, D. S., Perez, R., Eskalen, A., y Gispert, C. (2013). First Report of Wood Canker Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on Grapevine in California. *Plant Disease*, 97(11), 1511–1511.
- Rout, E., Nanda, S., Nayak, S., & Joshi, R. K. (2014). Molecular characterization of NBS encoding resistance genes and induction analysis of a putative candidate gene linked to Fusarium basal rot resistance in *Allium sativum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 85, 15–24.
- Rubio, C. R. (2007). Enfermedades del cultivo de agave. In J. Perez y J. Del Real (Eds.), *Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana Weber en la zona de denominación de origen del tequila* (pp. 169–195). Jalisco.
- Saha, D., Rana, R. S., Sureja, A. K., Verma, M., Arya, L., & Munshi, A. Das. (2013). Cloning and characterization of NBS-LRR encoding resistance gene candidates

- from Tomato Leaf Curl New Delhi Virus resistant genotype of *Luffa cylindrica* Roem. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 81, 107–117.
- Sánchez, V., y Rebolledo, O. (2010). Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con *Agave tequilana* en la región de Los Altos Sur, Jalisco y valoración de su capacidad antagónica contra *Thielaviopsis paradoxa*. *Revista Mexicana de Micología*, 32, 11–18.
- Sanseverino, W., Hermoso, A., D'Alessandro, R., Vlasova, A., Andolfo, G., Frusciante, L., ... Ercolano, M. R. (2013). PRGdb 2.0: Towards a community-based database model for the analysis of R-genes in plants. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 1167–1171.
- Santini, A., Mikušová, P., Sulyok, M., Krska, R., Labuda, R., y Šrobárová, A. (2014). *Penicillium* strains isolated from Slovak grape berries taxonomy assessment by secondary metabolite profile. *Mycotoxin Research*, 30(4), 213–220.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., y Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99.
- Sayed, O. H. (2001). Crassulacean Acid Metabolism 1975-2000, a check list. *Photosynthetica*, 39(3), 339–352.
- Schroers, H. J., Gräfenhan, T., Nirenberg, H. I., y Seifert, K. A. (2011). A revision of *Cyanonectria* and *Geejayessia* gen. nov., and related species with *Fusarium*-like anamorphs. *Studies in Mycology*, 68, 115–138.
- Sell, I., Kotiranta, H., y Kaart, T. (2011). Habitat requirements of *Peniophora junipericola* (Basidiomycota, Russulales). *Annales Botanici Fennici*, 48(3), 232–236.
- Shakya, M., Gottel, N., Castro, H., Yang, Z. K., Gunter, L., Labbé, J., ... Schadt, C. W. (2013). A multifactor analysis of fungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature *Populus deltoides* trees. *PLoS ONE*, 8(10), 1230–1233.
- Shang, J., Tao, Y., Chen, X., Zou, Y., Lei, C., Wang, J., ... Zhu, L. (2009). Identification of a new rice blast resistance gene, *Pid3*, by genomewide comparison of paired nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. *Genetics*, 182(4), 1303–1311.
- Sharma, R., Rawat, V., & Suresh, C. G. (2017). Genome-wide identification and tissue-specific expression analysis of nucleotide binding site-leucine rich repeat gene family in *Cicer arietinum* (Kabuli chickpea). *Genomics Data*, 14(May), 24–31.

-
- Shimizu, M., Fujimoto, R., Ying, H., Pu, Z. jing, Ebe, Y., Kawanabe, T., ... Okazaki, K. (2014). Identification of candidate genes for fusarium yellows resistance in Chinese cabbage by differential expression analysis. *Plant Molecular Biology*, *85*(3), 247–257.
- Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., ... Vos, P. (1998). Dissection of the *Fusarium* I2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell*, *10*(6), 1055–1068.
- Slemmons, C., Johnson, G., y Connell, L. B. (2013). Application of an automated ribosomal intergenic spacer analysis database for identification of cultured Antarctic fungi. *Antarctic Science*, *25*(1), 44–50.
- Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A. J. L., Groenewald, J. Z., Lombard, L., Wingfield, M. J., ... Crous, P. W. (2013). Phylogenetic lineages in the botryosphaeriales: A systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology*, *76*, 31–49.
- Slootweg, E. J., Spiridon, L. N., Roosien, J., Butterbach, P., Pomp, R., Westerhof, L., ... Goverse, A. (2013). Structural determinants at the interface of the ARC2 and Leucine-Rich Repeat domains control the activation of the plant immune receptors Rx1 and Gpa2. *Plant Physiology*, *162*(3), 1510–1528.
- Smith, M. E., Douhan, G. W., y Rizzo, D. M. (2007). Intra-specific and intra-sporocarp ITS variation of ectomycorrhizal fungi as assessed by rDNA sequencing of sporocarps and pooled ectomycorrhizal roots from a *Quercus* woodland. *Mycorrhiza*, *18*(1), 15–22.
- Song, H., Wang, P., Li, C., Han, S., Zhao, C., Xia, H., ... Wang, X. (2017). Comparative analysis of NBS-LRR genes and their response to *Aspergillus flavus* in *Arachis*. *PLoS ONE*, *12*(2), 1–14.
- Stockinger, H., Krüger, M., y Schüßler, A. (2010). DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, *187*(2), 461–474.
- Strobel, G., Singh, S. K., Riyaz-UI-Hassan, S., Mitchell, A. M., Geary, B., y Sears, J. (2011). An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. *FEMS Microbiology Letters*, *320*(2), 87–94.
- Takken, F. L., Albrecht, M., & Tameling, W. IL. (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*.
- Tamayo-Ordóñez, M. C., Rodríguez-Zapata, L. C., & Sánchez-Teyer, L. F. (2012). Construction and characterization of a partial binary bacterial artificial

- chromosome (BIBAC) of *Agave tequilana* var. azul (2X) and its application for gene identification. *African Journal of Biotechnology*, 11(93), 15950–15958.
- Tamayo-Ordóñez, M. C., Rodríguez-Zapata, L. C., Narváez-Zapata, J. A., Tamayo-Ordóñez, Y. J., Ayil-Gutiérrez, B. A., Barredo-Pool, F., y Sánchez-Teyer, L. F. (2016). Morphological features of different polyploids for adaptation and molecular characterization of CC-NBS-LRR and LEA gene families in *Agave* L. *Journal of Plant Physiology*, 195, 80–94.
- Tameling, W. I. L., Nooijen, C., Ludwig, N., Boter, M., Sloopweg, E., Goverse, A., ... Joosten, M. H. A. J. (2010). RanGAP2 mediates nucleocytoplasmic partitioning of the NB-LRR Immune receptor Rx in the Solanaceae, thereby dictating Rx function. *The Plant Cell*, 22(12), 4176–4194.
- Tan, S., & Wu, S. (2012). Genome Wide Analysis of Nucleotide-Binding Site Disease Resistance Genes in *Brachypodium distachyon*. *Comparative and Functional Genomics*, 2012, 1–12.
- Tao, G., Liu, Z. Y., Hyde, K. D., Lui, X. Z., y Yu, Z. N. (2008). Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal Diversity*, 33, 101–122.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., ... Abarenkov, K. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6213), 1256688.
- Tobias, P. A., Guest, D. I., Külheim, C., & Park, R. F. (2017). De Novo Transcriptome Study Identifies Candidate Genes Involved in Resistance to *Austropuccinia psidii* (Myrtle Rust) in *Syzygium luehmannii* (Riberry). *Phytopathology*, 108(5), PHYTO-09-17-029.
- Todorovska, E., Christov, N., Slavov, S., Christova, P., y Vassilev, D. (2009). Biotic stress resistance in Wheat—breeding and genomic selection implications. *Biotechnology y Biotechnological Equipment*, 23(4), 1417–1426.
- Ugwuan, J. O., y Obeta, J. A. N. (1997). Some Pectinolytic and Cellulolytic Enzyme Activities of Fungi Causing Rots of Cocoyams. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(4), 432–436.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J. C., Guevara, J., & Gubler, W. D. (2008). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, 92(4), 519–529.
- Valencia-Guerrero, M. F., Quevedo-Hidalgo, B., Franco-Correa, M., Díez-Ortega, H.,

- Parra-Giraldo, C. M., y Rodríguez-Bocanegra, M. X. (2011). Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium* spp., aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. *Universitas Scientiarum*, 16(2), 147–159.
- van der Biezen, E. A., y Jones, J. D. G. (1998). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology*, 8(7), R226–R228.
- van der Hoorn, R. A. L., & Kamoun, S. (2008). From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell*, 20(8), 2009–2017.
- Van Der Vossen, E. A. G., Van Der Voort, J. N. A. M. R., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Sandbrink, H., Baulcombe, D. C., ... Klein-Lankhorst, R. M. (2000). Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: A virus and a nematode. *Plant Journal*, 23(5), 567–576.
- van Ooijen, G., van den Burg, H. A., Cornelissen, B. J. C., & Takken, F. L. W. (2007). Structure and function of resistance proteins in Solanaceous plants. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), 43–72.
- Vandenkoornhuise, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., y Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1089–1098.
- Vega-Ramos, K. L., Uvalle-Bueno, J. X., & Gómez-Leyva, J. F. (2013). Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. *Biochemical Genetics*, 51(3–4), 243–255.
- Vos, P., Simons, G., Jesse, T., Wijbrandi, J., Heinen, L., Hogers, R., ... Zabeau, M. (1998). The tomato Mi-1 gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology*, 16(13), 1365–1369.
- Wan, H., Wan, H., Yuan, W., Yuan, W., Bo, K., Bo, K., ... Chen, J. (2013). Genome-wide analysis of NBS-encoding disease resistance genes in *Cucumis sativus* and phylogenetic study of NBS-encoding genes in Cucurbitaceae crops. *BMC Genomics*, 14(1), 109.
- Wan, H., Yuan, W., Ye, Q., Wang, R., Ruan, M., Li, Z., ... Yang, Y. (2012). Analysis of TIR- and non-TIR-NBS-LRR disease resistance gene analogous in pepper: characterization, genetic variation, functional divergence and expression patterns. *BMC Genomics*, 13(1), 502.
- Wang, C., Yang, Y., Yuan, X., Xu, Q., Feng, Y., Yu, H., ... Wei, X. (2014). Genome-wide association study of blast resistance in indica rice. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1–11.

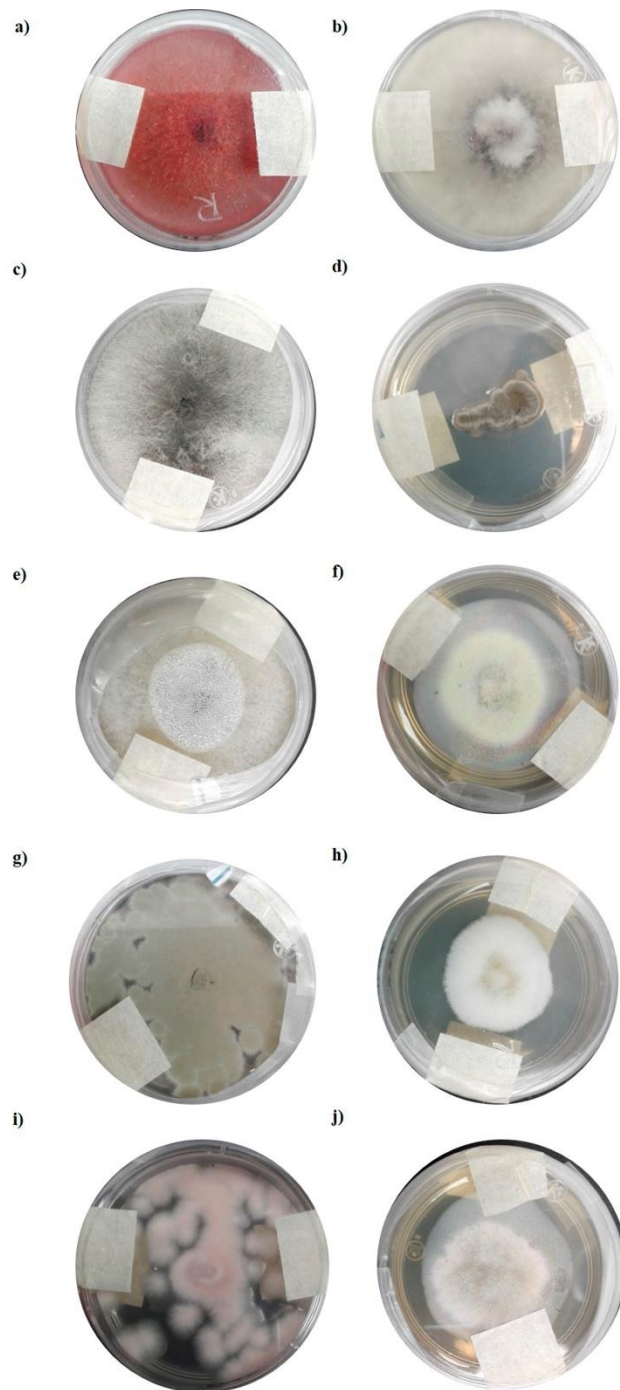
-
- Wang, G., Ji, J., Ei-kasmi, F., Dangl, J. L., & Johal, G. (2015). Molecular and functional analyses of a maize autoactive NB-LRR protein identify precise structural requirements for activity. *PLoS Pathogens*, *11*(2), 1–32.
- Wang, Y., Song, Z., Zhang, W., Xu, L., Su, X., M'mbone Muleke, E., & Liu, L. (2017). Identification and characterization of expressed TIR- and non-TIR-NBS-LRR resistance gene analogous sequences from radish (*Raphanus sativus* L.) de novo transcriptome. *Scientia Horticulturae*, *216*, 284–292.
- Wang, Z., Wang, M., Liu, L., y Meng, F. (2013). Physiological and Pproteomic responses of diploid and tetraploid black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) subjected to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(10), 20299–20325.
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., ... Ryals, J. A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, *3*(10), 1085.
- Whelan, J. A., Russell, N. B., & Whelan, M. A. (2003). A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, *278*(1–2), 261–269.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In *PCR Protocols* (pp. 315–322).
- Wilmotte, A., Van De Peer, Y., Goris, A., Chapelle, S., De Baere, R., Nelissen, B., ... De Wachter, R. (1993). Evolutionary Relationships Among Higher Fungi Inferred from Small Ribosomal Subunit RNA Sequence Analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, *16*(3), 436–444.
- Xiao, S., Ellwood, S., Calis, O., Patrick, E., Li, T., Coleman, M., & Turner, J. G. (2001). Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. *Science*, *291*(5501), 118–120.
- Xi-wen, D. O. N. G. (2006). Occurrence regularity of the canker disease of landscaping trees infected by *Valsa sordida* Nits. *Forest Pest and Disease*, *4*, 003.
- Xu, Y., Liu, F., Zhu, S., & Li, X. (2018). Expression of a maize NBS gene ZmNBS42 enhances disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, *37*(11), 1523–1532.
- Xu, Yingwu, Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L., y Tong, L. (2000). Structural basis for signal transduction by the TIR domains. *Nature*, *408*(November), 111–115.
- Xu, Yunjian, Liu, F., Zhu, S., y Li, X. (2018). Expression of a maize NBS gene ZmNBS42

- enhances disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, 37(11), 1523–1532.
- Xun, H., Yang, X., He, H., Wang, M., Guo, P., Wang, Y., ... Liu, B. (2019). Over-expression of GmKR3, a TIR–NBS–LRR type R gene, confers resistance to multiple viruses in soybean. *Plant Molecular Biology*, 99(1–2), 95–111.
- Yamori, W., Hikosaka, K., y Way, D. A. (2014). Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynthesis Research*, 119(1–2), 101–117.
- Yang, C., Zhao, L., Zhang, H., Yang, Z., Wang, H., Wen, S., ... Liu, B. (2014). Evolution of physiological responses to salt stress in hexaploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32), 11882–11887.
- Yang, S., Gao, M., Xu, C., Gao, J., Deshpande, S., Lin, S., ... Zhu, H. (2008). Alfalfa benefits from *Medicago truncatula*: The RCT1 gene from *M. truncatula* confers broad-spectrum resistance to anthracnose in alfalfa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(34), 12164–12169.
- Yang, T., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., Jami, F., Abdollahzadeh, J., Lombard, L., y Crous, P. W. (2017). Families, genera, and species of Botryosphaeriales. *Fungal Biology*, 121(4), 322–346.
- Yang, X., & Wang, J. (2016). Genome-wide analysis of NBS-LRR genes in Sorghum Genome revealed several events contributing to NBS-LRR gene evolution in grass species. *Ecolutionary Bioinformatics*, 12, 9–21.
- Ye, S. F., Yu, J. Q., Peng, Y. H., Zheng, J. H., y Zou, L. Y. (2004). Incidence of *Fusarium* wilt in Cucumis sativus L. is promoted by cinnamic acid, an autotoxin in root exudates. *Plant and Soil*, 263(1–2), 143–150.
- Yu, C.-S., Lin, C.-J., & Hwang, J.-K. (2004). Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n -peptide compositions. *Protein Science*, 13(5), 1402–1406.
- Yu, H., Shahid, M. Q., Li, R., Li, W., Liu, W., Ghouri, F., & Liu, X. (2018). Genome-wide analysis of genetic variations and the detection of rich variants of NBS-LRR encoding genes in common wild rice lines. *Plant Molecular Biology Reporter*, 36(4), 618–630.
- Yuan, B., Zhai, C., Wang, W., Zeng, X., Xu, X., Hu, H., ... Pan, Q. (2011). The Pik-p resistance to Magnaporthe oryzae in rice is mediated by a pair of closely linked CC-NBS-LRR genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(5), 1017–1028.

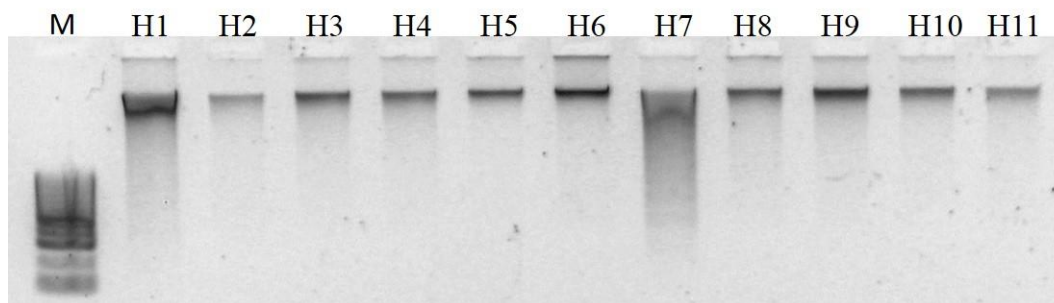
-
- Zacarías-Toledo, R., González-Mendoza, D., Rodríguez Mendiola, M. A., Villalobos-Maldonado, J. J., Gutiérrez-Oliva, V. F., Dendooven, L., ... Gutiérrez-Miceli, F. A. (2016). Plant Growth and Sugars Content of *Agave americana* L. Cultivated with Vermicompost and Rock Phosphate and Inoculated with *Penicillium* sp. and *Glomus fasciculatum*. *Compost Science y Utilization*, 24(4), 259–265.
- Zenteno-Zevada, M. (1974). Bibliografía sobre hongos fitopatógenos en México. *Boletín de La Sociedad Mexicana de Micología*.
- Zhang, M., Wu, Y., Lee, M., Liu, Y., Rong, Y., Santos, T. S., ... Nelson, R. L. (2010). Numbers of genes in the NBS and RLK families vary by more than four-fold within a plant species and are regulated by multiple factors. *Nucleic Acids Research*, 38(19), 6513–6525.
- Zhang, R., Murat, F., Pont, C., Langin, T., & Salse, J. (2014). Paleo-evolutionary plasticity of plant disease resistance genes. *BMC Genomics*, 15(1), 187.
- Zhang, S., Ding, F., Peng, H., Huang, Y., & Lu, J. (2018). Molecular cloning of a CC – NBS – LRR gene from *Vitis quinquangularis* and its expression pattern in response to downy mildew pathogen infection. *Molecular Genetics and Genomics*, 293(1), 61–68.
- Zhang, T., Jia, R. L., y Yu, L. Y. (2016). Diversity and distribution of soil fungal communities associated with biological soil crusts in the southeastern Tengger Desert (China) as revealed by 454 pyrosequencing. *Fungal Ecology*, 23, 156–163.
- Zhang, X., Chen, S., y Mou, Z. (2010). Nuclear localization of NPR1 is required for regulation of salicylate tolerance, isochorismate synthase 1 expression and salicylate accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 167(2), 144–148.
- Zhang, Y., Wang, H. K., Fournier, J., Crous, P. W., Jeewon, R., Pointing, S. B., y Hyde, K. D. (2009). Towards a phylogenetic clarification of *Lophiostoma*/Massarina and morphologically similar genera in the Pleosporales. *Fungal Diversity*, 38(April 2016), 225–251.
- Zhao, Y., Weng, Q., Song, J., Ma, H., Yuan, J., Dong, Z., & Liu, Y. (2016). Bioinformatics Analysis of NBS-LRR Encoding Resistance Genes in *Setaria italica*. *Biochemical Genetics*, 54(3), 232–248.
- Zhou, T., Wang, Y., Chen, J. Q., Araki, H., Jing, Z., Jiang, K., ... Tian, D. (2004). Genome-
-

- wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. *Molecular Genetics and Genomics*, 271(4), 402–415.
- Zhou, X., Bao, S., Liu, J., & Zhuang, Y. (2016). De Novo Sequencing and Analysis of the Transcriptome of the Wild Eggplant Species *Solanum Aculeatissimum* in Response to *Verticillium dahliae*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(6), 1193–1203.
- Zhou, X., Liu, J., Bao, S., Yang, Y., & Zhuang, Y. (2018). Molecular cloning and characterization of a wild eggplant *solanum aculeatissimum* NBS-LRR gene, involved in plant resistance to *meloidogyne incognita*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2).
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20(1), 10–16.
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, 35(7), 345–351

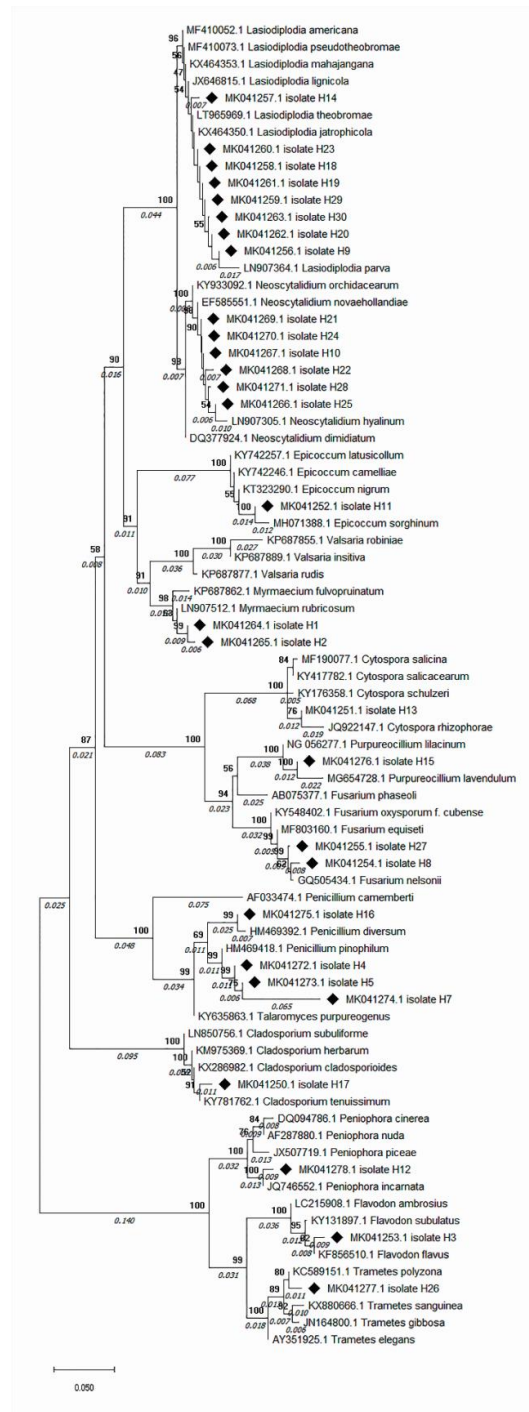
ANEXOS



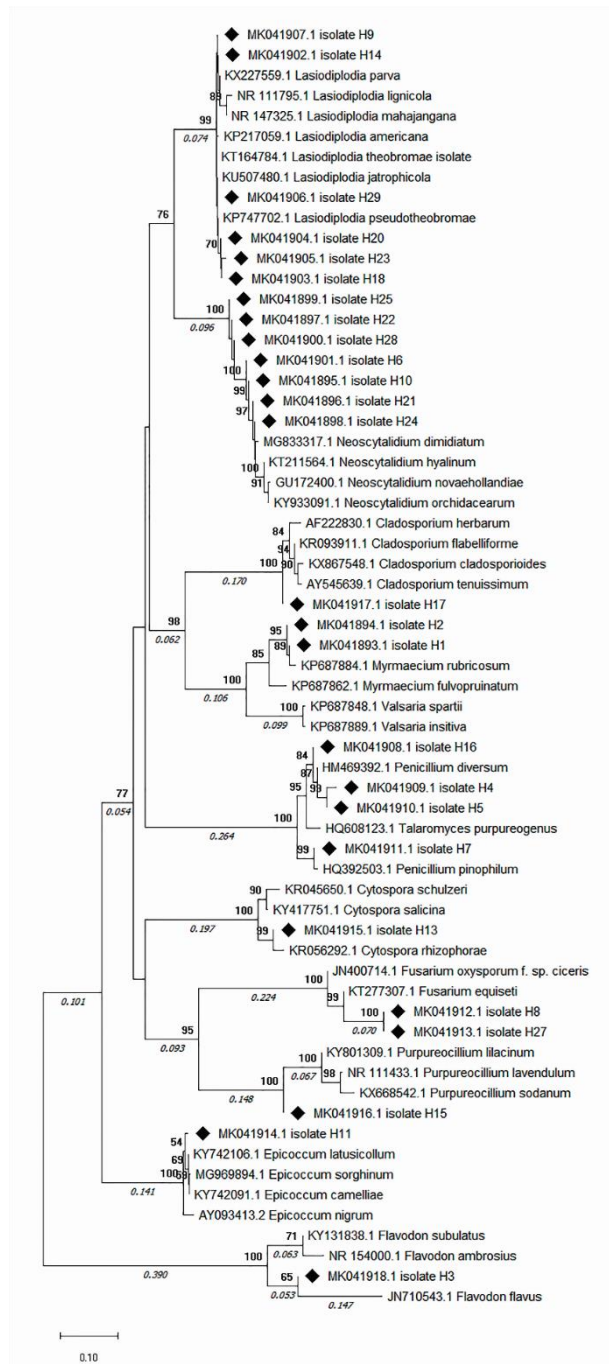
Anexo 1. Morfología de las principales cepas aisladas de plantas de *Agave tequilana* con signos de enfermedad. Cultivadas en medio de PDA. a) H1 (*Myrmaecium rubricosum*); b) H29 (*Lasiodiplodia* sp.); c) H28 (*Neoscytalidium* sp.); d) H17 (*Cladosporium cladosporoides*); e) H13 (*Cytospora rhizophorae*); f) H7 (*Penicillium pinophilum*); g) H16 (*Penicillium diversum*); h) H8 (*Fusarium oxysporum*); i) H15 (*Purpureocillium lilacinum*); j) H11 (*Phoma* sp.).



Anexo 2. DNA genómico obtenido a partir de micelio de cultivos purificados. Visualización en gel de agarosa al 1%. Electroforesis realizada por 45 minutos a 85 volts. M, marcador de 1kb marca invitrogen; Teñido con bromuro de etidio.



Anexo 3. Árbol filogenético obtenido del análisis de las secuencias D1-D2 LSU de las cepas aisladas y sus parientes más cercanos (Cuadro 2.3). El análisis filogenético fue realizado usando el método de mínima evolución con el modelo de Kimura2. Los números indican el bootstrap, derivado de 1,000 remuestreos. El análisis fue realizado en MEGA software versión 7. Las cepas aisladas de plantas de *A. tequilana* están marcadas con el símbolo de rombo.

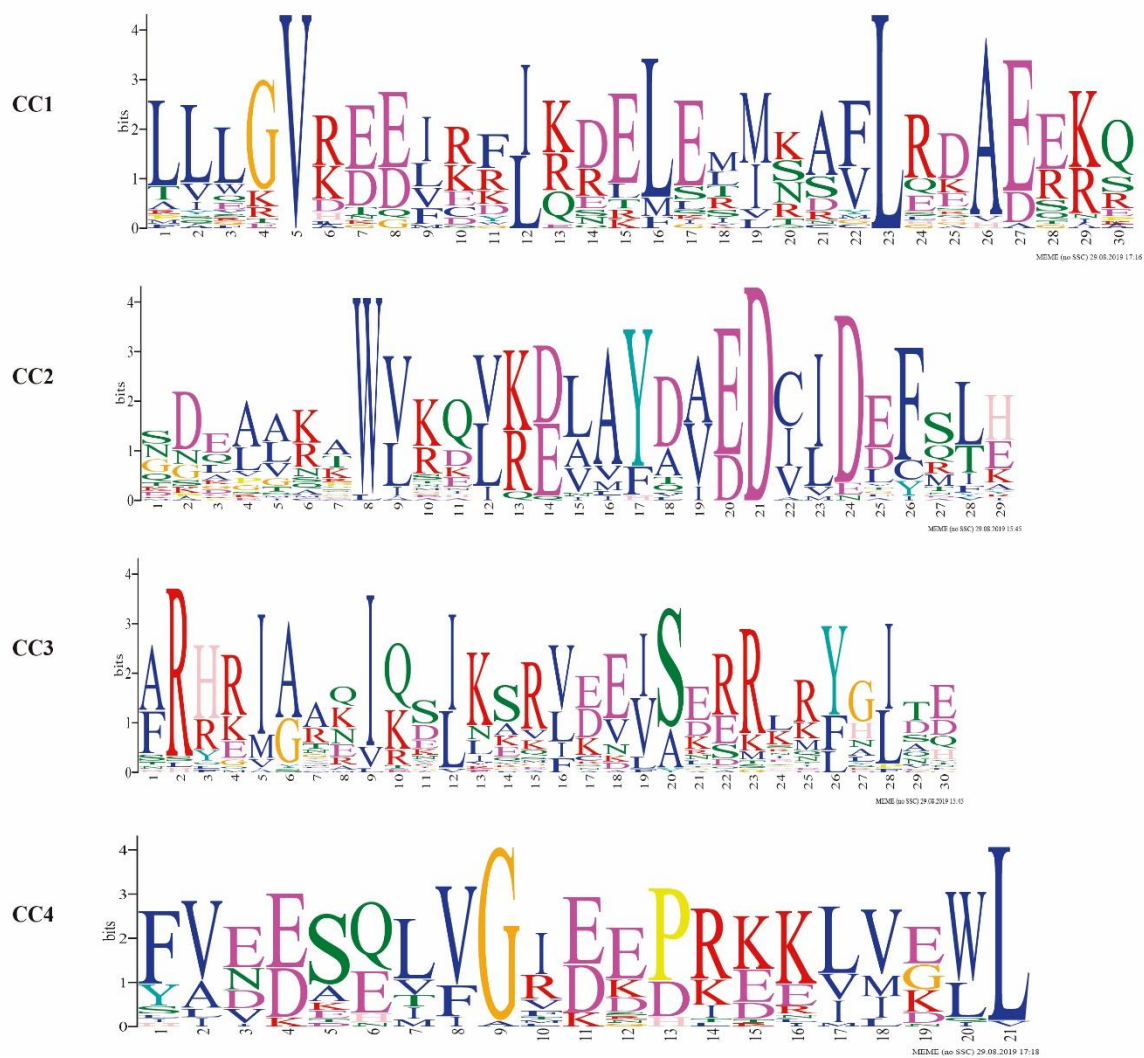


Anexo 4. Árbol filogenético obtenido del análisis de las secuencias ITS1-5.8s-ITS2 de las cepas aisladas y sus parientes más cercanos (Cuadro 2.3). El análisis filogenético fue realizado usando el método de mínima evolución con el modelo de Kimura2. Los números indican el bootstrap, derivado de 1,000 remuestreos. El análisis fue realizado en MEGA software versión 7. Las cepas aisladas de plantas de *A. tequilana* están marcadas con el símbolo de rombo.

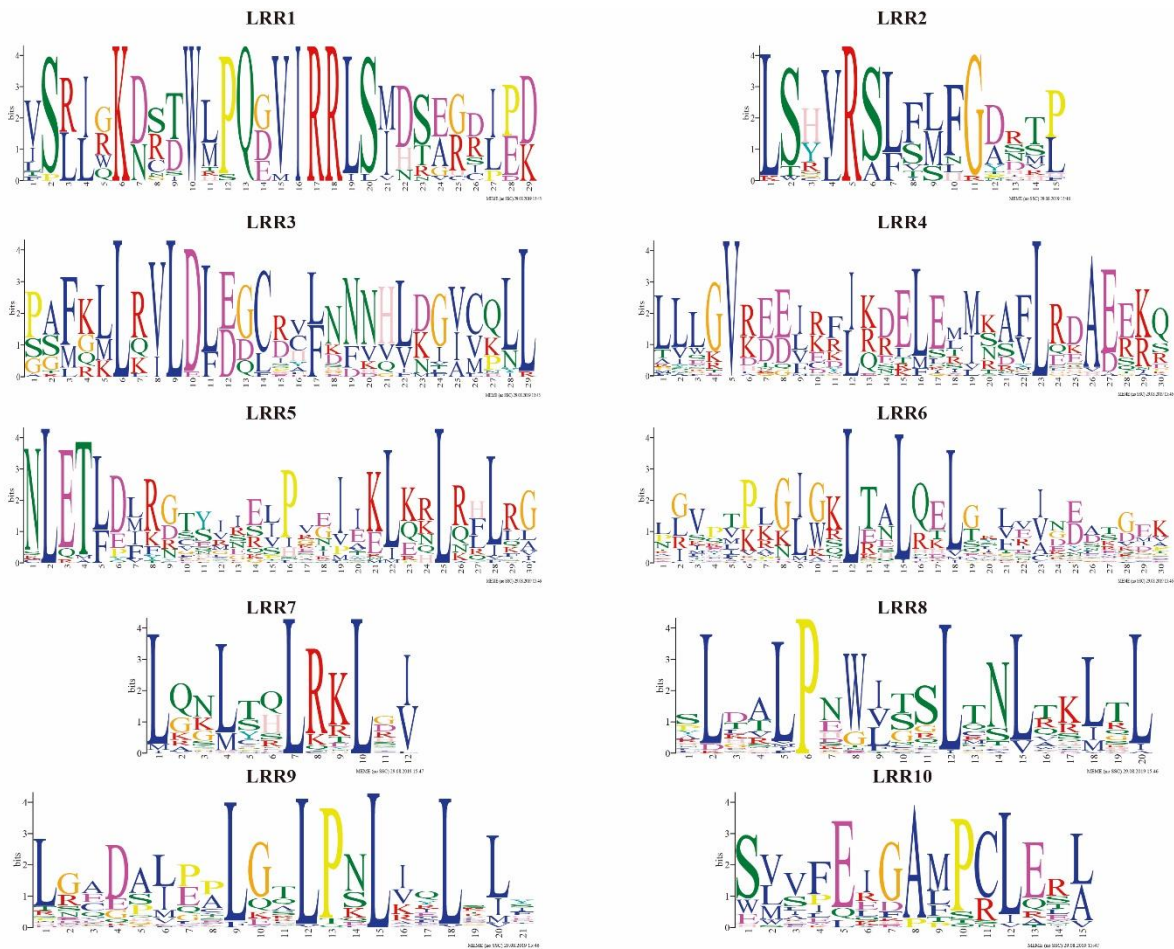
Anexo 5. Rendimiento neto (%) de ac. galacturónico de las cepas aisladas de *A. tequilana*

| Cepas | RNAG en YPD | RNAG en YPD-A | RNAG en YP-A |
|--------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| H18 | 24.3 | 18.9 | 16.4 |
| H8 | 21.1 | 21.9 | 15.0 |
| H30 | 41.1 | 26.7 | 41.2 |
| H9 | 44.6 | 30.1 | 27.6 |
| H20 | 53.0 | 33.4 | 28.9 |
| H29 | 49.6 | 32.7 | 17.7 |

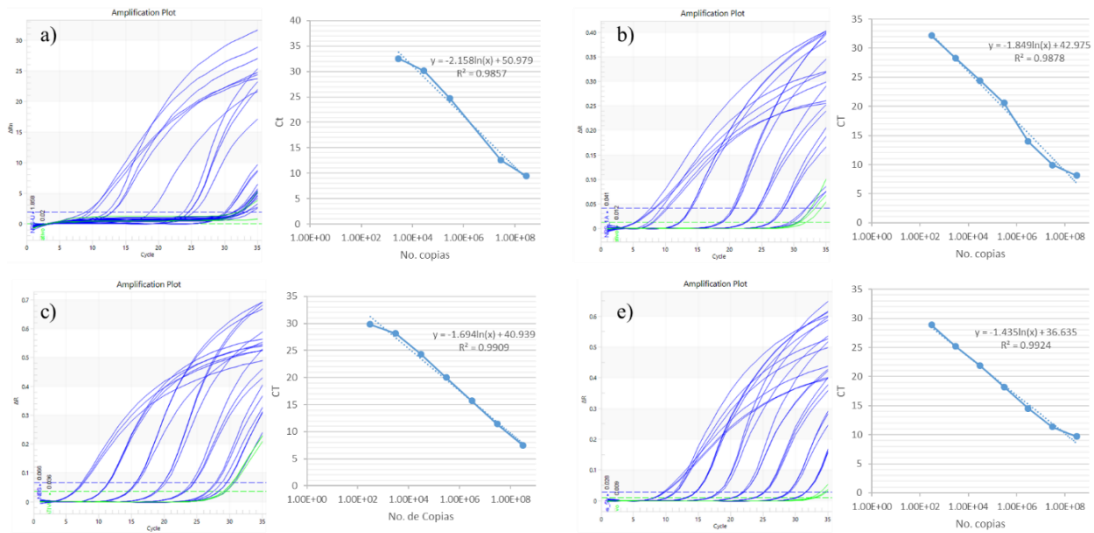
H8: *Fusarium* sp; H30 y H9: *Lasiodiplodia parva*; H20, H29, H18: *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.



Anexo 6. Logo de las secuencias conservadas del dominio CC en proteínas tipo NBS-LRR de *A.tequilana*



Anexo 7. Logo de las secuencias conservadas del dominio LRR en proteínas tipo NBS-LRR de *A.tequilana*



Anexo 8. Curva estándar construida con los cebadores NBS_U, NBS_1A, NBS_2A, NBS_5B, empleados para el análisis de número de copias expresadas para los genes tipo NBS en *A. tequilana*. Expresión global (a) Grupo I (b), II (c) y V (d). Se muestran las curvas de amplificación (eje X: ciclo, eje Y: fluorescencia) y la regresión lineal de las curvas (eje X: ng, eje Y: Ct)