



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DE
VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUCIDAS POR DOS
CEPAS DE *Pseudocercospora fijiensis* CONTRASTANTES
EN VIRULENCIA**

Tesis que presenta

JAIR ERNESTO DÍAZ RAMÍREZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2021

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 **Jair Ernesto Díaz Ramírez** titulado “**Caracterización del contenido proteico de vesículas extracelulares producidas por dos cepas de *Pseudocercospora fijiensis* contrastantes en virulencia**” fue realizado en las Unidades de Biotecnología, en la línea de investigación de Agrobiotecnología, en el laboratorio de Biotecnología Microbiana, y en el Laboratorio 06 en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y del Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 02 de febrero de 2021.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma:



Nombre: Jair Ernesto Díaz Ramírez

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

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por la oportunidad de estudiar la Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 921950) durante el periodo 2018-2020 y también por el apoyo económico que proviene del proyecto “ENFOQUE AGROGENOMICO EN EL ESTUDIO DE LA SIGATOKA NEGRA” CB-2013 (clave 220957).

A mis directores de tesis, la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y al Dr. Ignacio Islas Flores por todas sus enseñanzas.

A los integrantes de mi comité tutorial, la Dra. Ileana Echevarría Machado y el Dr. Esaú Ruiz por sus aportaciones durante los exámenes tutoriales.

Al M.C. Miguel Tzec-Simá, quien además de ser un gran ayudante de investigación llegó a ser un gran amigo.

Al M.C. Bartolomé Chí-Manzanero, por el apoyo técnico.

A la M.C. Ligia Brito por su magnífico apoyo durante las primeras etapas de este proyecto.

Al Biol. Felipe Barredo por su invaluable apoyo para obtener las imágenes de microscopía de barrido.

A la M.C. Angela Ku por el apoyo durante la microscopía de contraste de fases y el manejo del microscopio confocal.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Microbiana, M.C. Ricardo Barahona, M.C. Osvaldo Jhosimar Couoh Dzul, la M.C. Denise Gutiérrez. Agradezco también a los compañeros del Laboratorio 06 de Bioquímica, la Dra. Yamily Burgos Canul, al Lic. en Genómica. Damián Mayo, y a los estudiantes de licenciatura Sarai Vivas, María Belem Sánchez y Brayán Navarrete.

Agradezco especialmente al M.C José Rufino Gómez Tah y a la Dra. Karla Gisel Carreón-Anguiano, gracias por todo.

A mis compañeras y amigas de posgrado: Lina, Claudia y Perla, gracias por el tiempo juntos y todo su apoyo y alegría.

A mis compañeros y amigos de posgrado: Ernesto, Jesus, Edder, Francisco y Eros por hacer más divertido el posgrado.

DEDICATORIA

A mis padres.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN.....	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCIÓN.....	1
1. CAPÍTULO I.....	2
ANTECEDENTES	2
1.1 IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA DEL BANANO	2
1.1.1 Plagas y enfermedades en cultivos de banano.	3
1.2 <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	6
1.2.1 Importancia de las proteínas secretadas en la virulencia	7
1.3 Vesículas extracelulares	10
1.3.1 Tipos de vesículas extracelulares	10
1.3.2 Producción de vesículas extracelulares como un mecanismo universal.....	11
1.3.3 Vesículas extracelulares fúngicas	12
1.3.4 Contenido de las VE´s fúngicas	15
1.3.5 Aislamiento de VE´s.....	17

1.3.6 Importancia del estudio de las VE´s.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	21
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	23
2. CAPÍTULO II.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1 Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas C1233 y Oz2b.....	24
2.2 Aislamiento de vesículas mediante ultracentrifugación para la producción y colecta de las vesículas extracelulares (VE´s).....	24
2.3 Aislamiento de vesículas mediante “Paquete de purificación de exosomas de medios de cultivo celular”.....	26
2.4 Observación de las VE´s mediante microscopía de contraste de fases.....	27
2.5 Microscopía confocal.....	27
2.6 Microscopía electrónica de barrido.....	28
2.7 Determinación del tamaño de las VE´s mediante Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	29
2.8 Cuantificación de proteínas.....	29
2.9 Análisis de proteínas por electroforesis SDS-PAGE.....	29
2.10 Precipitación de proteínas para su separación de los lípidos de las VE´s.....	30
2.11 Digestión de proteínas.....	30

2.12 Preparación de las proteínas recuperadas de las VE´s para su análisis proteómico	31
2.13 Análisis bioinformático de los proteomas de las VE aisladas a partir de las cepas C1233 u Oz2B	32
2.14 Bioensayo del efecto del contenido de las VE´s en hojas de plantas de banano	34
3. CAPÍTULO III	35
RESULTADOS	35
3.1 Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas C1233 y Oz2b	35
3.2 Aislamiento de VE´s mediante el método de ultracentrifugación	36
3.3 Cuantificación de las proteínas contenidas en las VE´s	37
3.3 Observación de VE´s en microscopía de contraste de fases	38
3.4 Observación de VE´s en microscopía confocal	39
3.5 Observación de VE´s en microscopía electrónica de barrido	40
3.6 Análisis de proteínas por electroforesis SDS-PAGE	41
3.7 Medición de las VE´s mediante DLS	42
3.8 Análisis bioinformáticos	43
3.8.1 Búsqueda de candidatos a efectores	49
3.8.1.1 Candidatos a efectores exclusivos de las VE´s de la cepa C1233	55
3.8.1.2 Candidatos a efectores exclusivos de las VE´s de la cepa Oz2b	57
3.8.1.3 Candidatos a efectores de las VE´s compartidos por ambas cepas	57
3.9 Efecto del contenido de las VE´s en hojas de banano	59

4. CAPÍTULO IV	63
DISCUSIÓN.....	63
4.1 Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas C1233 y Oz2b	63
4.2 Aislamiento de vesículas extracelulares mediante ultracentrifugación y paquete comercial	63
4.3 Observaciones mediante microscopía	65
4.4 Medición del tamaño de las VE´s mediante DLS	66
4.5 Análisis bioinformático de los proteomas de las VE´s aisladas a partir de las cepas C1233 u Oz2b	67
4.6 Efecto de la inoculación de las VE´s en hojas de plantas de banano	71
5. CAPÍTULO V	73
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	73
5.1 Conclusiones	73
5.2 Perspectivas	73
Anexos	74
Referencias	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Tamaño y biogénesis de las vesículas extracelulares (Modificado de Chen <i>et al.</i> , 2018).	10
Figura 2.1 Esquematación del diseño del experimento de infiltración en las hojas de banano susceptibles y resistentes a <i>P. fijiensis</i>	34
Figura 3.1 Acumulación de peso fresco durante el ciclo de cultivo <i>in vitro</i> de las cepas de <i>P. fijiensis</i> C1233 y Oz2b	35
Figura 3.2 Acumulación de peso seco durante el ciclo de cultivo <i>in vitro</i> de las cepas de <i>P. fijiensis</i> C1233 y Oz2b	36
Figura 3.3 Aspecto visual de las pastillas de VE´s después de la centrifugación final.....	37
Figura 3.4 Micrográficas de VE´s aisladas y analizadas por microscopía de contraste de fases.....	39
Figura 3.5 Microfotografías de VE´s aisladas de los medios de cultivo de las cepas C1233 y Oz2b y teñidas con Rojo Nilo y detectadas por microscopía confocal.....	40
Figura 3.6 Microfotografías de microscopía electrónica de barrido de las VE´s aisladas de la cepa C1233.....	41
Figura 3.7 Perfil proteico de las VE´s obtenidas de las cepas C1233 y Oz2b.	42
Figura 3.8 Análisis de Dispersión de Luz Dinamica (DLS) en las cepas C1233 y Oz2b ...	43
Figura 3.9 Diagrama de Venn que ilustra la distribución de las proteínas obtenidas en las VE´s de dos cepas de <i>P. fijiensis</i> estudiadas en el presente trabajo.....	44
Figura 3.10 Clasificación de acuerdo al “Gene Ontology” de las proteínas secuenciadas a partir de las VE´s de dos cepas de <i>P. fijiensis</i>	45
Figura 3.11 Distribución de las secuencias procedentes de las VE´s de la cepa C1233 de <i>P. fijiensis</i> en las familias InterPro.....	46

Figura 3.12 Distribución de las secuencias procedentes de las VE's de la cepa Oz2b de <i>P. fijiensis</i> en las familias InterPro.....	47
Figura 3.13 Clasificación del proteoma de las VE's de la cepa C1233 de <i>P. fijiensis</i> con base en la identificación obtenida a partir de la base de datos ENZYME.....	48
Figura 3.14 Clasificación del proteoma de las VE's de la cepa Oz2b de <i>P. fijiensis</i> con base en la identificación obtenida a partir de la base de datos ENZYME	48
Figura 3.15 Fotografías representativas de las hojas de banano, a las 96 horas después de la infiltración con las VE's.....	59
Figura 3.16 Promedios de los tamaños de lesión en plantas de Enano Gigante infiltradas con VE's de la cepa C1233 de <i>P. fijiensis</i> y controles.....	60
Figura 3.17 Promedios de los tamaños de lesión en plantas de Enano Gigante infiltradas con VE's de la cepa Oz2b de <i>P. fijiensis</i> y controles.....	61
Figura 3.18 Promedios de los tamaños de lesión en plantas de Calcuta-IV infiltradas con VE's de la cepa C1233 de <i>P. fijiensis</i> y controles	61
Figura 3.19 Promedios de los tamaños de lesión en plantas de Calcuta-IV infiltradas con VE's de la cepa Oz2b de <i>P. fijiensis</i> y controles.	62
Figura 3.20 Promedios de los tamaños de lesión en hojas de banano infiltrados con 200 ng de VE's de <i>P. fijiensis</i>	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Producción de banano en México	3
Tabla 1.2 Enfermedades y plagas de bananos	4
Tabla 1.3 Primeros reportes de vesículas extracelulares.	12
Tabla 1.4 Especies fúngicas con reportes de VE´s.	14
Tabla 3.1 Cuantificación de proteína de las diferentes VE´s.	38
Tabla 3.2 Análisis de ontología de las proteínas secuenciadas a partir de las VE´s de dos cepas de <i>P. fijiensis</i>	44
Tabla 3.3 Características predichas mediante análisis bioinformático en las secuencias de proteínas de las VE´s de las cepas C1233 y Oz2b.	49
Tabla 3.4 Predicción de efectores en las secuencias proteicas identificadas en las VE´s de <i>P. fijiensis</i>	50
Tabla 3.5 Características de los probables efectores identificados en las VE´s de la cepa C1233 de <i>P. fijiensis</i>	50
Tabla 3.6 Características de los probables efectores identificados en las VE´s de la cepa Oz2b de <i>P. fijiensis</i>	54
Tabla 4.1 Tamaño de las VE´s fúngicas estimado mediante DLS.	67

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSV	Virus del rayado del banano (de sus siglas en inglés, Banana streak virus)
CMV	Virus del mosaico del pepino (de sus siglas en inglés, Cucumber mosaic virus)
e.g.	Por ejemplo (latín)
ESCRT	Del inglés <i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
<i>et al</i>	Y otros (latín)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (de sus siglas en inglés, Food and Agriculture Organization of the United Nations)
<i>g</i>	Fuerza de gravedad <i>g</i>
GO	Ontología de genes (de sus siglas en inglés, Gene Ontology)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GXM	Glucuronoxilomanano
ISEV	Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (de sus siglas en inglés International Society for Extracellular Vesicles)
kDa	Kilodalton

MM	Medio Mínimo de cultivo
PDA	Medio de cultivo de papa-dextrosa-agar (de sus siglas en inglés, Potato dextrose agar)
Pfam	Base de datos de familias de proteínas (de sus siglas en inglés, Protein families database)
PHI	Base de datos de la interacción patógeno-hospedero (de sus siglas en inglés, Pathogen-Host Interaction database)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RE	Retículo endoplasmico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (de sus siglas en inglés, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SN	Sigatoka negra
VE´s	Vesículas extracelulares

RESUMEN

El estudio de las vesículas extracelulares (VE's) y su contenido han cobrado relevancia en los últimos años debido principalmente al papel que desempeñan en la patogénesis y como una forma de transporte no canónica de biomoléculas. Entre los componentes que son transportados por las VE's se incluyen ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, pigmentos y otras moléculas bioactivas. Sin embargo, el conocimiento de las VE's en especies fúngicas aun es limitado. En este trabajo se investigó la producción de VE's en el hongo hemibiotrófico *Pseudocercospora fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra en plátanos y bananos. Para ello se estandarizó un protocolo de extracción de VE's a partir del medio de cultivo de dos cepas de *P. fijiensis*. Las VE's obtenidas se observaron a través de microscopía de contraste de fases, microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal; en las micrografías se observaron estructuras redondeadas con un tamaño menor a los 1000 nanómetros; además, la tinción con el colorante Rojo Nilo reveló que las estructuras poseían lípidos, lo cual está en concordancia con reportes de otras especies. Las mediciones del tamaño de las VE's realizadas mediante Dispersión de Luz Dinámica mostraron tamaños similares a los observados mediante microscopía, al registrarse dos poblaciones de 25 a 250 nm y de 25 a 500 nm. Las proteínas contenidas en las VE's fueron precipitadas y secuenciadas mediante nanoHPLC-MS/MS, identificándose 98 secuencias de proteínas provenientes de las VE's de la cepa C1233 y 71 provenientes de las VE's de la cepa Oz2b; 39 proteínas se encontraron en ambas cepas. En la mayoría de las secuencias recuperadas no se detectó péptido señal de secreción; los términos GO, las familias identificadas y la proporción de enzimas encontradas fue muy similar para ambas cepas. Durante la búsqueda de efectores proteicos se identificaron 25 candidatos a efectores en las VE's de la cepa C1233 y 16 en las VE's de la cepa Oz2b, entre ellos se encontraba un homólogo del efector Ecp2 previamente caracterizado en *Cladosporium fulvum*, lo que hace a este trabajo el primer reporte del transporte de efectores de *P. fijiensis* mediante VE's. Las VE's aisladas de las cepas de *P. fijiensis* se infiltraron en las hojas de un cultivar susceptible y otro resistente a la Sigatoka negra, con las concentraciones de proteína y bajo las condiciones utilizadas en este estudio, no se obtuvieron resultados concluyentes, con respecto a los análisis de virulencia.

ABSTRACT

The study of extracellular vesicles (EVs) has become more and more relevant in recent years, because of their role in pathogenesis as well as a non-canonical way of transport of biomolecules. Components that are transported by EVs include nucleic acids, proteins, lipids, pigments, and other bioactive molecules. However, the knowledge of EVs in fungal species is still limited. In this work, it was investigated the production of EVs in the hemibiotrophic fungus *Pseudocercospora fijiensis*, the causal agent of black Sigatoka disease of banana and plantain. To achieve the goal, one protocol of isolation of EVs was standardized from the culture medium of two *P. fijiensis* strains. Recovered EVs were observed through phase-contrast microscopy, scanning electron microscopy, and confocal microscopy; rounded structures with a size smaller than 1000 nanometers were observed; the staining with the Nile Red dye revealed that the structures had lipids, which is in agreement with reports from other species. The size of the EVs was measured by dynamic light scattering, finding similar sizes to those observed by microscopy; two populations of 25 to 250 nm and 25 to 500 nm respectively were registered. The proteins contained in the EVs were precipitated and sequenced using nanoHPLC-MS/MS, thus identifying 98 protein sequences from the VE's of the C1233 strain and 71 from the EVs of the Oz2b strain; 39 proteins were shared between both strains. Curiously, most of the recovered proteins have no secretion signal peptide; the GO terms, the families identified and the proportion of enzymes were found very similar between both strains. When the EVs proteomes were screened for effectors, 25 effector candidates were identified in the EVs of the C1233 strain and 16 in the EVs of the Oz2b strain. Among the list of effector candidates there was one homolog of the previously characterized Ecp2 effector of *Cladosporium fulvum*, being this work the first report about the transport of effectors through EVs in *P. fijiensis*. The VE's isolated from the *P. fijiensis* strains, were infiltrated in the leaves of a susceptible cultivar and another resistant to black Sigatoka, with the protein concentrations and under the conditions used in this study, no conclusive results were obtained, with regards to virulence tests.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como Sigatoka negra ocasionada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis* es la principal amenaza en el cultivo de bananos en México. La enfermedad produce manchas necróticas de color negro, lo que reduce el área fotosintética de la planta y ocasiona una maduración prematura de los frutos. Actualmente la enfermedad es controlada mediante la aplicación de fungicidas sintéticos, lo que ocasiona un incremento en los costes de producción, contaminación ambiental y limita la exportación de los frutos, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para combatir la enfermedad, sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos del hongo y los procesos que ocurren durante la infección.

Durante la interacción planta-patógeno ocurre un intercambio de moléculas, entre ellas las proteínas, las cuales pueden influir en el desarrollo de la enfermedad; los reportes del secretoma de *P. fijiensis* demuestran que dichas proteínas son capaces de generar una respuesta hipersensible; en dichos reportes destaca un grupo de proteínas que han sido nombradas como “atípicas”, al no poseer una función predicha en el exterior de la célula y no tener péptido señal de secreción, lo que sugiere la presencia de rutas de secreción proteica no canónicas.

Durante los últimos años las vesículas extracelulares han destacado por ser un medio de secreción no convencional de distintos componentes, entre ellos proteínas, y se ha identificado que tienen un papel importante en el intercambio de biomoléculas y la patogénesis; sin embargo, los estudios en hongos son aún pocos, y los relacionados a hongos fitopatógenos son aún más escasos por lo que hasta antes de este estudio no se conocían estudios que reportaran la producción de VE´s en *P. fijiensis*.

Con el desarrollo de este estudio se exploró y analizó la producción de VE´s en *P. fijiensis*, con un énfasis especial en la caracterización del contenido proteico de las VE´s, investigando las proteínas que son transportadas por esa vía y la búsqueda de posibles efectores fúngicos que pudieran jugar algún papel en la patogénesis.

1. CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA DEL BANANO

Procedente del Sudeste Asiático, el banano es una planta que se cultiva desde hace ~10,000 años y cuyos primeros registros se encontraron en Papúa Nueva Guinea en el siglo VII a. C. (Denham y Donohue, 2009). El centro de origen de plátanos y bananos se extiende desde la India hasta Papúa Nueva Guinea, e incluye a Malasia e Indonesia (Langhe, 1996). El cruzamiento natural de varios diploides no comestibles de *Musa acuminata* dio como resultado, híbridos partenocárpicos, con esterilidad femenina, fruto comestible y triploides en su estructura genómica. Estos diploides y triploides de *Musa acuminata* fueron seleccionados y trasladados a áreas más secas donde otros diploides silvestres de *Musa balbisiana* se desarrollaron naturalmente y de este modo ocurrieron hibridaciones interespecíficas entre *Musa acuminata* (Genoma A) y *Musa balbisiana* (Genoma B) (Leiva-Mora, 2006).

En la actualidad, los bananos y los plátanos son cultivos alimentarios importantes para la población mundial; se cultivan en ~10 millones de hectáreas en las regiones tropicales y subtropicales, en cerca de 120 países. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en 2017 se exportaron 18,068 millones de toneladas de fruto en todo el mundo.

El cultivo de banano tiene gran importancia económica y social para México. Durante 2019 en nuestro país se cultivaron plátanos y bananos en una superficie de ~80,518.69 hectáreas, con una producción total de fruta de 2,458,500.38 toneladas, generando \$8,818.4839 millones de pesos (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2019)). Chiapas es el estado mexicano que ocupa la primera posición como productor de bananos, con 696,867.18 toneladas (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Producción de banano en México

Entidad federativa	Superficie sembrada	Superficie cosechada	Producción
	(ha)	(ha)	(Ton)
Chiapas	23,266.07	23,178.07	696,867.18
Tabasco	11,634.42	11,634.42	590,560.14
Veracruz	16,046.72	15,770.72	333,870.42
Colima	6,084.04	6,084.04	207,764.74
Jalisco	3,833.00	3,831.00	207,764.74
Michoacán	5,670.00	5,589.00	174,714.28
Guerrero	4,058.34	3,812.30	86,643.90
Oaxaca	3,784.95	3,756.95	78,824.16
Puebla	2,458.75	2,389.25	36,442.79
Nayarit	2,496.00	2,389.50	31,453.26
Quintana Roo	774.5	748	8,727.23
Yucatán	255.9	253.9	2,865.37
Campeche	117	117	1,410.77
Morelos	10	10	302
Estado de México	17	17	223.4
Hidalgo	12	12	66
Total	80,518.69	79,593.15	2,458,500.38

Fuente: SIAP (2019)

1.1.1 Plagas y enfermedades en cultivos de banano.

La producción de bananos alrededor del mundo está limitada por diversas plagas y enfermedades que afectan a las plantaciones (Alakonya *et al.*, 2018) en la Tabla 1.2 se enlistan las enfermedades más frecuentes en el cultivo.

Tabla 1.2 Enfermedades y plagas de bananos

Enfermedad	Descripción sintomatológica
Enfermedades ocasionadas por hongos	
Sigatoka amarilla (<i>Pseudocercospora musae</i>)	Estrías amarillo pálido, visibles en el haz, las cuales evolucionan a manchas marrón oscura de forma elíptica, y finalmente a lesión necrótica de forma elíptica a elíptica alargada.
Sigatoka negra (<i>Pseudocercospora fijiensis</i>)	Estrías finas marrón claras, visibles en el envés a partir de la parte apical de las hojas. Las estrías evolucionan a manchas marrón oscuras para finalmente tornarse en manchas oscuras a negras de forma irregular.
Mal de Panamá (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>)	Produce marchitamiento de las hojas y decaimiento del pseudotallo; el micelio del hongo penetra la pared celular epidérmica, coloniza y ocluye los vasos de xilema.
Enfermedades ocasionadas por bacterias	
Moko o marchitez bacteriana (<i>Ralstonia solanacearum</i>)	Se observa pudrición y decoloración en los tejidos internos del pseudotallo, las hojas se tornan amarillas y eventualmente se doblan.

Enfermedades ocasionadas por virus	
Virus del Rayado del banano (<i>Banana Streak Virus - BSV</i>)	Produce estrechas vetas cloróticas y/o necróticas, continuas o discontinuas que van paralelas a las nervaduras de la lámina de la hoja.
Virus del Mosaico del pepino (<i>Cucumber Mosaic Virus - CMV</i>)	Produce una amplia gama de síntomas desde mosaico difuso de hojas a clorosis severa, curvatura de las hojas, distorsión, podredumbre de las hojas cigarro, aspecto de roseta de la disposición de las hojas y atrofia de la planta.
Plagas	
Picudo negro (<i>Cosmopolites sordidus</i>)	Las larvas causantes del daño, se alimentan y se desarrollan dentro del cormo, formando galerías o túneles. Los síntomas se manifiestan con amarillamiento de las hojas, debilidad, poco desarrollo y formación de racimos defectuosos.
Picudo rayado (<i>Metamasius hemipterus</i>)	Las larvas consumen el pseudotallo, lo debilitan y ocasionan el doblamiento de las plantas al momento del llenado del racimo.

Condensado de Bidabadi y Sijun, 2018; Selvarajan, 2015; Torrado-Jaime y Castaño-Zapata, 2008; Torres-González, *et al.*, 2013.

De estas enfermedades la Sigatoka negra (SN), causada por el hongo ascomiceto *Pseudocercospora fijiensis*; anteriormente conocido como *Mycosphaerella fijiensis* (Arango Isaza *et al.*, 2016); es la enfermedad foliar que representa la principal limitante en la producción de musáceas (plátanos y bananos) a nivel mundial y es considerada la enfermedad más costosa y perjudicial del banano a nivel global (Churchill, 2011).

El primer reporte de esta enfermedad fue realizado en el año de 1963 en la costa sureste de Viti Levu en las islas Fiji (revisado en Ploetz, 2000). En América Latina, la enfermedad se identificó por primera vez en Honduras, desde donde se dispersó hacia Guatemala, Belice, México. El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (Mourichon *et al.*, 1997; Churchill 2011; Onyilo *et al.*, 2018).

1.2 *Pseudocercospora fijiensis*

Pseudocercospora fijiensis es el hongo causal de la enfermedad conocida como Sigatoka negra (SN) en el género *Musae* y se le considera como el miembro más destructivo del 'complejo Sigatoka', el cual incluye a los agentes causales de la Sigatoka amarilla (*P. musae*), la mancha foliar del banano (*P. eumusae*) y la Sigatoka negra (*P. fijiensis*). Las Musáceas son los huéspedes principales de *P. fijiensis* y presentan una variedad de síntomas que dependen de los niveles de resistencia de los huéspedes individuales (Alakonya *et al.*, 2018). Sin embargo, la planta ornamental *Heliconia psittacorum* ha sido reportada como un hospedero alternativo de *P. fijiensis* en Manaos, Brasil (Gasparotto *et al.*, 2005) y recientemente, en México, en los estados de Tabasco y Chiapas se reportaron como hospederos alternativos tres nuevas especies: *Xanthosoma robustum*, *Digitaria* sp. y *Wedelia trilobata*, además de confirmar nuevamente a *Heliconia psittacorum* (Vázquez-Euán *et al.*, 2019).

P. fijiensis es un hongo hemibiotrófico, sin embargo, existe un periodo de tiempo antes de la penetración en el hospedero, en la cual el hongo permanece de forma latente sobre la cutícula, lo que sugiere una fase de comensalismo con el hospedero antes de que comience la infección, la nutrición durante este periodo es posible mediante el paso de nutrientes en pequeñas cantidades a la superficie de la hoja (Lepoivre *et al.*, 2002; Kema *et al.*, 1996). Posteriormente, en sus primeras etapas de infección, coloniza los espacios intercelulares

sin causar daño aparente (fase biotrófica); cuando en el espacio intracelular las hifas alcanzan cierta densidad de crecimiento y los nutrientes disponibles en el espacio apoplástico son insuficientes para cubrir las necesidades nutricionales del hongo, *P. fijiensis* cambia a una etapa altamente agresiva que mata a las células, generando manchas necróticas (Rodríguez y Cayón, 2008).

La SN no mata a las plantas de banano inmediatamente, pero reduce la capacidad fotosintética de las hojas y en consecuencia, reduce la calidad y cantidad de los frutos, debido a la precoz maduración que se registra en las plantas infectadas (Churchill, 2011); esto ocasiona pérdidas del 35 al 100 % de la producción, dependiendo del cultivar, las condiciones ambientales y el grado de infección.

Los intentos por controlar a la SN incluyen la aplicación frecuente de fungicidas, prácticas culturales como la eliminación de las hojas afectadas y el espaciado y drenaje adecuado en las plantaciones (Ploetz, 2000). La frecuencia de la aplicación de los fungicidas varía de acuerdo con las condiciones climáticas, siendo lo más común 50 aplicaciones al año en el trópico húmedo (Martínez-Bolaños *et al.*, 2012; Onyilo *et al.*, 2018).

1.2.1 Importancia de las proteínas secretadas en la virulencia

El secretoma se refiere a las proteínas que son secretadas al espacio extracelular de los organismos e incluye a las proteínas secretadas a través de VE's (Deftu *et al.*, 2020). Entre las proteínas secretadas se encuentran aquellas que en los hongos fitopatógenos participan en la modulación de su virulencia y dadas esas características han recibido el nombre de efectores proteicos (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020; Dodds y Rathjen, 2010). Los efectores son moléculas que facilitan el establecimiento de las interacciones biológicas, tanto benéficas como perjudiciales (Kim *et al.*, 2016), y son capaces de modular las respuestas de resistencia en la planta; en dicho sentido, el secretoma fúngico tiene una función importante para la patogénesis, debido a que muchas de las proteínas secretadas han sido identificadas entre los principales efectores en la interacción planta-hongo (Girard *et al.*, 2012). En muchos patógenos sistémicos, los efectores son factores importantes de patogenicidad o virulencia que determinan el éxito de una infección (Arango Isaza *et al.*, 2016).

P. fijiensis, como todo patógeno, produce moléculas efectoras e.g. metabolitos secundarios y proteínas para suprimir las respuestas de defensa del anfitrión y para evitar la muerte de las células hospederas durante su fase biotrófica. En contraste, durante su fase necrotrófica produce proteínas tóxicas y metabolitos secundarios que matan el tejido del hospedero (Noar y Daub, 2016). No obstante, se conoce poco acerca del repertorio de metabolitos tóxicos y de efectores proteicos que produce *P. fijiensis* como parte de su mecanismo de infección.

Análisis bioinformáticos predijeron la presencia de genes ortólogos de los efectores proteicos Ecp2, Ecp6 y Avr4 de *Cladosporium fulvum* en el genoma de *P. fijiensis* (Stergiopoulos *et al.*, 2010). Posteriormente, mediante transcriptómica se demostró la expresión de estos genes en la interacción de *P. fijiensis* con plantas de banano (Noar y Daub, 2016). Análisis proteómicos recientes confirmaron la presencia de Ecp2 y Avr4 en la pared celular de *P. fijiensis* (Burgos-Canul *et al.*, 2019).

Se ha demostrado que el secretoma de *P. fijiensis* es capaz de producir lesiones necróticas *in vivo* en hojas de bananos de las variedades *Musa balbisiana* y *Musa acuminata* cv Gran Enano (Chuc-Uc *et al.*, 2011) e *in vitro* en las variedades Gran Enano y 'Yangambi Km 5' (Escobar-Tovar, *et al.*, 2015), demostrando el importante papel que juega el secretoma en la patogénesis.

El sistema de secreción clásico de proteínas, en eucariontes, consiste en el etiquetado celular de las proteínas hacia la membrana plasmática y su exportación al medio extracelular, mediado en general por el retículo endoplasmático (RE) (Grieve y Rabouille, 2011). Durante la traducción, las proteínas que contienen la péptido señal son reconocidas específicamente en el citoplasma por la partícula de reconocimiento de señal y son transportadas hacia el RE (Nagai *et al.*, 2003).

Después de la transferencia hacia o a través de la membrana del RE, las proteínas nacientes se pliegan y pueden sufrir modificaciones postraduccionales. Posteriormente salen a través de puntos especializados conocidos como sitios de salida del RE (ERES por "ER exit sites") en mamíferos y sitios ER de transición en levaduras (Bonifacino y Glick, 2004). Del RE son transportadas a través del aparato de Golgi hacia su destino final, el cual puede ser la membrana plasmática para muchas proteínas transmembranales o el medio

extracelular para las proteínas secretadas (Mellman y Warren, 2000). Sin embargo, en los estudios del secretoma a menudo se han identificado proteínas que carecen del péptido señal de secreción y de motivos que las asocien a la pared celular (Brown *et al.*, 2015).

En el estudio de Escobar-Tovar y colaboradores (2015) se identificaron nueve proteínas que carecían del péptido señal de secreción; un fenómeno que también se han reportado en el secretoma de otros hongos, e.g. en el secretoma de *Fusarium gramineum* se identificaron 21 proteínas que carecían de péptido señal de secreción (Yang *et al.*, 2012). Aunado a eso, existen varios estudios que describen que en el secretoma están presentes proteínas “atípicas”, que carecen de motivos señal clásicos N-terminales que las etiqueten para la superficie celular externa (Karkowska-Kuleta y Kozik, 2014; Nombela *et al.*, 2006; Rodrigues y Djordjevic, 2012). Entre dichas proteínas “atípicas” se incluye a varias de las que clásicamente han sido caracterizadas como citoplásmicas o constituyentes de la membrana plasmática y que en la actualidad también han sido encontradas en la pared celular fúngica (Nimrichter *et al.*, 2016). Distintos factores podrían ser responsables de este fenómeno, entre ellos la secreción a través de vías desconocidas o no clásicas (Karkowska-Kuleta y Kozik, 2014). Una de estas rutas alternas de secreción consiste en la producción de vesículas extracelulares (VE’s) que son utilizadas como plataformas para el suministro de factores de virulencia del patógeno hacia las células del hospedero (Rodrigues *et al.*, 2008b).

En el estudio del proteoma de la pared celular de *P. fijiensis* también se reportaron proteínas atípicas, entre las que se destacan histonas H3 y H4, proteínas ribosomales, transportadores ABC, thioredoxina, incluyendo también dos efectores proteicos: Avr4 y Ecp6; en ese mismo trabajo se analizaron 2 cepas distintas del hongo y por medio de métodos bioinformáticos se determinó que del total del proteoma compartido por ambas cepas solamente en 32 de las 90 proteínas se predecía la presencia del péptido señal de secreción (Burgos-Canul *et al.*, 2019).

En *Histoplasma capsulatum*, hongo causante de la histoplasmosis se descubrió que muchos de los factores de virulencia de las vesículas extracelulares eran componentes atípicos de pared celular, destacando entre ellas la chaperona HSP60 (Matos Baltazar *et al.*, 2016), algo similar a lo encontrado en el proteoma de pared celular de *P. fijiensis*, lo que sugiere que posiblemente *P. fijiensis* también utiliza este sistema de transporte no canónico.

1.3 Vesículas extracelulares

Las VE's son un grupo heterogéneo de bio-nanopartículas de distintos tamaños con estructuras membranosas esféricas cerradas que poseen una bicapa lipídica (Willms *et al.*, 2016); participan en el transporte y la liberación de moléculas al espacio celular externo (Rizzo *et al.*, 2017).

La Sociedad Internacional para Vesículas Extracelulares (ISEV por sus siglas en inglés) da la siguiente definición para las VE's: partículas naturalmente liberadas de la célula que están delimitadas por una bicapa lipídica y no se pueden replicar (Théry *et al.*, 2018).

Dadas las características y el contenido *i.e.*, lípidos, proteínas membranales y citosólicas, ácidos nucleicos, miARN, ARN, ADN, de las VE's, hacen que estas estructuras biocelulares sean una pieza fundamental en la comunicación intracelular e intercelular y en el intercambio de moléculas bioactivas (Giebel y Helmbrecht, 2017).

1.3.1 Tipos de vesículas extracelulares

Las VE's pueden clasificarse en tres clases principales en función de sus rutas de biogénesis: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos; sin embargo, estos últimos no son considerados como parte de un sistema de secreción regulado, ya que se producen al llevarse a cabo la apoptosis (Figura 1.1).

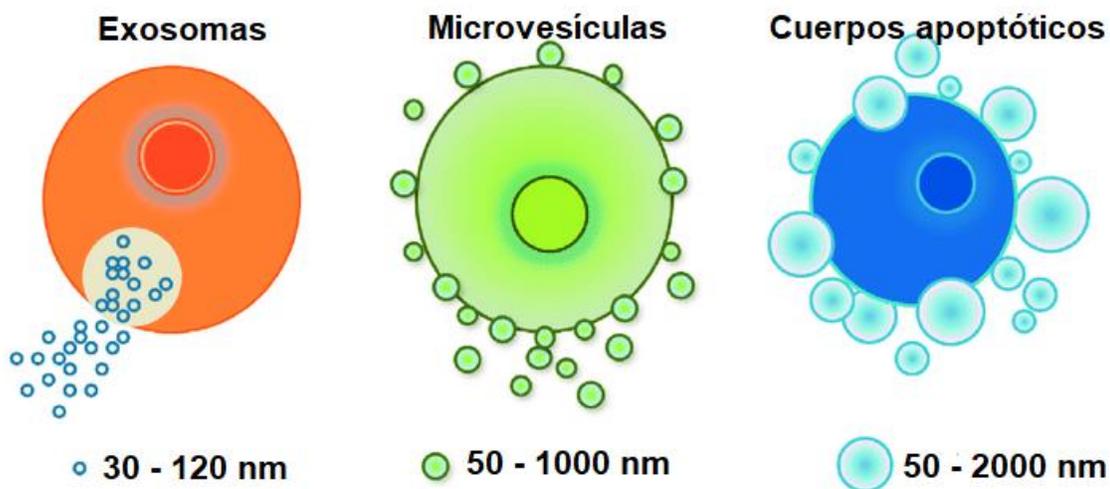


Figura 1.1 Tamaño y biogénesis de las vesículas extracelulares (Modificada de Chen *et al.*, 2018).

Las microvesículas se originan en la superficie de la célula, donde se liberan mediante “brotes” directos de la membrana plasmática; poseen un tamaño heterogéneo que va desde 50 nm hasta 1,000 nm de diámetro.

Los exosomas son vesículas extracelulares que se liberan de las células tras la fusión de un compartimento endocítico intermedio, el cuerpo multivesicular, con la membrana plasmática. Esto libera vesículas intraluminales en el medio extracelular y las vesículas liberadas de esta forma reciben el nombre de exosomas (Edgar, 2016). Tienen un rango de tamaños que va desde los 30 nm hasta los 120 nm (Willms *et al.*, 2016).

Los cuerpos apoptóticos se forman a través de la fragmentación de la membrana celular de las células apoptóticas, tienen un amplio rango de tamaños comprendiendo de 50 a 2,000 nm de diámetro (Willms *et al.*, 2016).

1.3.2 Producción de vesículas extracelulares como un mecanismo universal

La producción de VE´s se ha observado tanto en células eucariontes como en procariontes, y se tiene registro de ellas desde el año de 1946 (Tabla 1.3). Existe una gran cantidad de reportes de producción de VE´s en una gran variedad de tipos celulares de diferentes reinos, lo cual indica que la secreción de VE´s es un proceso biológico conservado y una propiedad común de los sistemas celulares (Oliveira *et al.*, 2013). Actualmente se considera que el fenómeno de la producción de VE´s es un mecanismo universal de transporte de macromoléculas al espacio extracelular (Choi y Lee, 2016; Nimrichter *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2014), aunque la importancia de tal evento aún está sujeto a intensa investigación (Margolis y Sadovsky, 2019).

Cabe mencionar que, en el reporte del año de 1946 (Chargaff y West, 1946) las vesículas extracelulares derivadas de muestras de sangre humana fueron consideradas como restos celulares.

Tabla 1.3 Primeros reportes de vesículas extracelulares.

Reino	Organismo	Referencia
Eucariontas		
Animalia	<i>Homo sapiens</i>	Chargaff y West, 1946
Protista	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Tatischeff <i>et al.</i> , 1998
Fungí	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2007
Plantae	<i>Helianthus annuus</i>	Regente <i>et al.</i> , 2009
Procariontas		
Gram+	<i>Escherichia coli</i>	Knox <i>et al.</i> , 1966
Gram-	<i>Staphylococcus aureus</i>	Lee <i>et al.</i> , 2009
Archea	<i>Thermococcus kodakaraensis</i> <i>Thermococcus gammatolerans</i>	Soler <i>et al.</i> , 2008

1.3.3 Vesículas extracelulares fúngicas

La liberación de VE's por los hongos se hipotetizó desde principios de 1970 cuando mediante imágenes de microscopía electrónica de congelación del hongo *C. neoformans* se observaron estructuras localizadas entre la pared celular y la membrana plasmática; sin embargo, la posibilidad de que dichas estructuras pudieran pasar a través de la pared

celular y llegar al espacio extracelular no fue considerada (Takeo *et al.*, 1973). En 1990 se especuló nuevamente sobre la producción de VE´s en hongos, tras estudios de microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido en *Candida albicans*, en los que se observaron vesículas emergiendo de la membrana plasmática, las cuales poseían una bicapa lipídica (Anderson *et al.*, 1990). Los datos obtenidos fueron pasados por alto debido a que se consideraba que la pared celular era demasiado rígida para ser permeable a estructuras grandes como las VE´s (Brown *et al.*, 2015).

En el año 2007 se registró la primera investigación acerca de VE´s fúngicas, *C. neoformans* fue el primer hongo del que se aislaron estructuras vesiculares a partir de sus sobrenadantes de cultivo, y se identificó que su contenido estaba relacionado con componentes de su pared (Rodrigues *et al.*, 2007). Tal hallazgo reforzó la hipótesis de que el transporte vesicular podría ser la explicación de la localización transitoria o definitiva de proteínas atípicas en la pared celular. En la actualidad el número de especies fúngicas con reportes de VE´s ha aumentado a 17 (Tabla 1.4), apoyando así la idea de que este mecanismo de secreción tiene una distribución universal, aunque aún se desconocen todas sus funciones e importancia en los hongos (Rodrigues y Djordjevic, 2012).

La mayoría de los estudios de vesículas extracelulares en hongos provienen de hongos patógenos de humanos. Los modelos de estimulación en células del hospedero con VE´s provenientes de *C. neoformans* (Rodrigues *et al.*, 2008a), *Paracoccidioides brasiliensis* (Vallejo *et al.*, 2011) y *Malassezia sympodialis* (Gehrmann *et al.*, 2011) realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado claramente que dichas estructuras tienen el potencial de regular pasos críticos durante la patogénesis y son antigénicamente activas, ya que las proteínas obtenidas de los exosomas producidos por *H. capsulatum* y *C. neoformans* fueron reconocidos por los anticuerpos del suero de los pacientes infectados (Oliveira *et al.*, 2013), lo cual resalta aún más la importancia de las proteínas contenidas en las VE´s en la patogénesis.

Tabla 1.4 Especies fúngicas con reportes de VE's.

Espece	Medio de crecimiento	Número de proteínas identificadas	Referencia
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Medio mínimo	92	Rodrigues <i>et al.</i> , 2007
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Ham's F-12	283	Albuquerque <i>et al.</i> , 2008
<i>Candida albicans</i>	Caldo Sabouraud Dextrosa	75	Albuquerque <i>et al.</i> , 2008
<i>Candida parapsilosis</i>	Caldo Sabouraud Dextrosa	No reportadas	Albuquerque <i>et al.</i> , 2008
<i>Sporothrix schenckii</i>	Caldo Sabouraud Dextrosa	40	Albuquerque <i>et al.</i> , 2008
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Caldo YPD	400	Albuquerque <i>et al.</i> , 2008
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Ham's F-12 + 1.5 % glucosa	205	Vallejo <i>et al.</i> , 2011
<i>Alternaria infectoria</i>	RPMI-1640	20	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>Malassezia sympodialis</i>	Caldo de malta y levadura	2439	Johansson <i>et al.</i> , 2018

<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Caldo BHI	63	Ikeda <i>et al.</i> , 2018
<i>Cryptococcus gattii</i>	Caldo YPD	No reportadas	Bielska <i>et al.</i> , 2018
<i>Trichophyton interdigitale</i>	Medio mínimo	No reportadas	Bitencourt <i>et al.</i> , 2018
<i>Pichia fermentans</i>	Medio YCU y medio YCM	No reportadas	Leone <i>et al.</i> , 2018
<i>Rhizopus delemar</i>	PDB	No reportadas	Liu <i>et al.</i> , 2018
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Medio YG	60	Souza <i>et al.</i> , 2019
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	PDB (1/2)	482	Bleackley <i>et al.</i> , 2020
<i>Aspergillus flavus</i>	Medio mínimo	No reportadas	Brauer <i>et al.</i> , 2020

1.3.4 Contenido de las VE´s fúngicas

Como se mencionó anteriormente las VE´s se consideran un mecanismo ubicuo de transferencia intercelular de moléculas, entre ellas, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otras moléculas bioactivas (de Toledo *et al.*, 2018); dicha mezcla molecular compleja incluye muchos componentes citoplasmáticos, hecho que es consistente con el origen propuesto de las VE´s como sustracciones citoplasmáticas (Da Silva *et al.*, 2015). Estas moléculas pueden estar en asociación con los lípidos de la membrana o en el interior de la vesícula, siendo protegidas del medio externo (Cai *et al.*, 2018). Además de la función de protección, las VE´s también podrían llevar a cabo una función de concentración de los componentes patógenos, lo que llevaría a una mayor eficiencia e incluso podría ocurrir una

relación de sinergia con el resto del contenido de las VE's, algo que no ocurre con los métodos clásicos de secreción (Bleackley *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2008b).

En las VE's de *C. neoformans* mediante cromatografía líquida acoplada a proteómica de alta escala LC-MS/MS, se identificaron 76 proteínas. La mayoría carecían del péptido señal requerido para la secreción convencional, además de que se encontró que varias de ellas se asocian a la virulencia: e.g. – glucoroxidomano (GXM), glucosilceramida, enzimas relacionadas a la síntesis capsular, ureasa, lacasa, fosfatasa ácida, y varias proteínas antioxidantes como la superóxido dismutasa, thioredoxina, thioredoxina reductasa, proteína antioxidante específica del tiol y catalasa A, entre otras (Rodrigues *et al.*, 2008a; 2014).

En un trabajo posterior se observó que el tamaño de las vesículas difieren dependiendo de si dichas estructuras abandonaron el citoplasma en eventos de liberación simple o múltiple, sin embargo se concluyó que la carga de vesículas se distribuye de manera homogénea, sin correlación funcional entre subpoblaciones enriquecidas (Wolf *et al.*, 2014).

Los análisis proteómicos de las VE fúngicas han demostrado que estas estructuras poseen particularidades específicas de la especie. Por ejemplo, las proteínas de división celular septinas se describieron en VE's de *P. brasiliensis*, pero no en otras especies (Vallejo *et al.*, 2012a). En *S. cerevisiae*, se detectaron cinco proteínas ancladas a GPI (aspartil proteasa, endoglucanasa y tres proteínas de funciones desconocidas) que están ausentes en las VE's de *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* y *C. neoformans*, lo que sugiere la existencia de mecanismos de exportación de esta clase de glicoproteínas específicos de la especie (Rodrigues *et al.*, 2014). La descarboxilasa del ácido UDP-glucurónico y la deshidrogenasa UDP-glucosa, dos enzimas que son esenciales para el metabolismo del ácido glucurónico, solo se identificaron en VE's de *C. neoformans*.

Un análisis comparativo de los proteomas de las VE's procedentes de *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* y *S. cerevisiae* encontró 26 proteínas sin péptido señal comunes entre las 4 especies, lo que apoya la presencia de esas proteínas en el exterior (Vallejo *et al.*, 2012a).

Aunque se han realizado estudios acerca de la biogénesis de las VE's fúngicas, principalmente intentando identificar y discernir entre las proteínas transportadas por las rutas de secreción clásicas y las rutas de secreción no convencionales, aún se desconocen

los reguladores de la producción de VE´s en hongos (Oliveira *et al.*, 2013). En los estudios con *C. neoformans* y *S. cerevisiae*, mediante mutantes de delección de los reguladores de la secreción convencional: Sec4, Sec1, Sec6 y Sec32, y de las proteínas de etiquetado vacuolar (Vps): Vps23 y Snf7, se demostró que dichas proteínas influyen parcialmente en la composición y la cinética de la liberación de VE´s, pero en ninguna de las mutantes ocurrió un bloqueo en la formación de VE´s (Oliveira *et al.*, 2010; Panepinto *et al.*, 2009). El análisis de las VE´s mediante gradiente diferencial mostró la existencia de subpoblaciones que difieren en el contenido molecular, sugiriendo que existen varias rutas implicadas en la generación de vesículas extracelulares fúngicas.

1.3.5 Aislamiento de VE´s

Se han utilizado distintos métodos de aislamiento de las vesículas extracelulares; sin embargo, no existe un método único dado que, dependiendo del organismo, los factores que influyen la abundancia, el tamaño, el contenido y la facilidad de aislamiento son multifactoriales.

El método clásico para el aislamiento de las VE´s se basa en la separación de acuerdo con su densidad de flotación por centrifugación (Konoshenko *et al.*, 2018). Para evitar la contaminación con otros elementos, productos de lisis celular, este método incluye varias centrifugaciones previas, principalmente iniciando con una centrifugación a 300 o 400 g para sedimentar la mayoría de las células, seguida de una centrifugación a 2,000 g para eliminar los restos celulares y una centrifugación a velocidades mayores a 10,000 g para remover los agregados de biopolímeros, cuerpos apoptóticos y otras estructuras. Las VE´s son obtenidas por ultracentrifugación a velocidades \geq a 100,000 g. El aislamiento a través de ultracentrifugación ha sido usado ampliamente debido a que requiere una cantidad pequeña de reactivos y consumibles, no hay impacto sobre las VE´s exceptuando la fuerza gravitacional y el pipeteo, y no se utilizan otros reactivos que podrían interferir con los análisis posteriores.

Sin embargo, la centrifugación diferencial presenta varias limitaciones; entre ellas: no se logra una recuperación absoluta de las VE´s, debido a que la distancia hacia la pastilla no es la misma para todas las VE´s, además, el radio de sedimentación también depende de la forma y masa relativa al medio. Adicionalmente, puede ocurrir una aglomeración de las

VE's, así como coaislarse con otros componentes como agregados de proteína y virus. Tampoco se descartan daños y pérdida de las VE's. La recuperación reportada de VE's por este método va desde el 2 al 80 %, por lo que no se puede realizar un estudio de comparación entre aislamientos (Coumans *et al.*, 2017).

La mayor complejidad en el estudio de las VE's radica en la amplia heterogeneidad entre ellas (Bielska y May 2019); sin embargo, se han propuesto diversos marcadores moleculares para la identificación de los exosomas procedentes de células humanas, destacando principalmente las tetraspaninas CD9, CD63, CD81; algunas proteínas de respuesta a estrés por calor como la HSP-60 y la HSP-90 (Kastelowitz y Yin, 2014) y las proteínas TSG101 y ALIX (componentes del sistema ESCRT (del inglés Endosomal Sorting Complexes Required for Transport)). Desafortunadamente en los grupos de datos proteómicos de VE's fúngicas no se han encontrado candidatos que funcionen como marcadores (Bleackley *et al.*, 2019).

En el estudio de exosomas de mamíferos se ha utilizado a la Anexina A5 y a la Tim-4 para cuantificar los niveles de fosfatidilserina, lípido que se ha reportado como constituyente de esos exosomas (Kastelowitz y Yin, 2014; Nakai *et al.*, 2016) y se han desarrollado paquetes comerciales para aislamiento y cuantificación de VE's, pero solo han funcionado con algunas especies de mamíferos. Desafortunadamente no se han encontrado homólogos de la proteína Tim-4 en las especies de hongos con reportes de VE's.

1.3.6 Importancia del estudio de las VE's

El conocimiento sobre el papel de las VE's ha evolucionado desde considerarse como simples "bolsas de depósito de basura celular", formas de eliminación de proteínas mal plegadas y toxinas, hasta mensajeros de virulencia asociadas a la progresión patogénica (Bielska y May 2019). Se sabe que las VE's son un medio de comunicación intercelular y de transmisión de macromoléculas entre células, por lo que son importantes para el estudio de comunicación y tráfico celular de moléculas, aunque su función biológica no está definida y por lo tanto las diferentes propuestas son hipótesis que aún deben ser demostradas. En la última década, a los exosomas se les han atribuido funciones en la liberación de proteínas, lípidos, mRNA, miRNA, DNA, polisacáridos, componentes inmunorreactivos y como factores que contribuyen al desarrollo de varias enfermedades (Joffe *et al.*, 2016;

Rizzo *et al.*, 2017). También se ha propuesto que las VE´s podrían ser vectores útiles para la liberación de medicamentos porque están compuestos de membranas celulares, en lugar de polímeros sintéticos, y como tales son mejor tolerados por el huésped (Edgar, 2016).

Distintos factores de virulencia se han asociado con las vesículas extracelulares fúngicas, debido a esto han sido llamadas “bolsas de virulencia” (Joffe *et al.*, 2016). Otros estudios demuestran que el transporte de los factores de virulencia desde el hongo a la célula huésped, mediado por VE´s, es un mecanismo de administración incluso más eficaz que la difusión simple (Rodrigues *et al.*, 2008b). Por otro lado, cada vez son más los reportes de que las VE´s aisladas de hongos patogénicos pueden ser reconocidas por el sistema inmunológico del hospedero y que estas VE´s son capaces de modificar la función inmunológica (Bielska y May, 2019).

Las VE´s fúngicas representan nuevas posibles estrategias para tratar infecciones fúngicas y enfrentar la emergencia de la resistencia adquirida a las drogas antifúngicas (Fisher *et al.*, 2018).

Samuel *et al.* (2015) propusieron que las vesículas extracelulares desempeñan una función importante en la interacción planta-patógeno, transfiriendo efectores y modulando la respuesta de las células hospederas a favor del hongo patógeno; estos autores propusieron también que la carga molecular en las VE´s es específica para el tipo de lesión o infección, por ejemplo, la carga molecular presente en las VE´s de las plantas durante estrés puede ser significativamente diferente a la producida durante la infección por hongos. Otro estudio que asoció las VE´s en la interacción planta-patógeno es el de Micali *et al.* (2011), quienes observaron imágenes ultraestructurales de haustorios de *Golovinomyces orontii* infectando hojas de *Arabidopsis thaliana*, detectando abundancia de cuerpos multivesiculares en los haustorios y vesículas extracelulares.

En el caso de *P. fijiensis*, hasta el momento no se han realizado estudios acerca de la existencia de VE´s y tampoco de su contenido o función. Es posible esperar que sus VE´s transporten factores de virulencia o patogenicidad, así como proteínas atípicas que carezcan de los motivos clásicos (péptido señal de secreción, sitios de N u O-glicosilación) para ser secretada por el GERL.

En este trabajo se estudian dos cepas de *P. fijiensis* con virulencia contrastaste para determinar si el contenido proteico de las VE´s, con base en las funciones asignadas por medio de métodos bioinformáticos, tuviera asociación con la infectividad y virulencia de las cepas.

JUSTIFICACIÓN

El análisis del contenido de las VE's de los hongos patógenos *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *C. albicans*, *Candida parapsilosis*, y *Sporothrix schenckii* sugiere que dichas estructuras y su cargo podrían actuar como "bolsas de virulencia" en la patogénesis (Silva *et al.*, 2019). En el caso de los hongos fitopatógenos solo existen dos reportes de VE's, los cuales corresponden a la especie *A. infectoria* y *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

Siendo *P. fijiensis* el agente causal de la Sigatoka negra y la principal amenaza para las plantaciones de plátanos y bananos en nuestro país y en el mundo, es de vital importancia conocer y caracterizar sus mecanismos de infección. Considerando que en el trabajo de Burgos-Canul *et al.* (2019) se identificaron proteínas atípicas en la pared celular de *P. fijiensis*, y algunas de esas proteínas atípicas han sido relacionadas con patogenicidad o virulencia, entonces, es posible que *P. fijiensis* produzca VE's, y que éstas sean importantes para su patogenicidad. Por ello, es importante demostrar que *P. fijiensis* produce VE's, analizar su contenido proteico y evaluar si dichas VE's inducen lesiones en discos foliares y en planta completa de dos variedades de banano.

La infiltración artificial ha sido utilizada en el estudio de la Sigatoka negra para evaluar el nivel de susceptibilidad o resistencia de los diferentes cultivares o clonas de banano, y para evaluar el grado de virulencia de las cepas de *P. fijiensis*, así como para la generación de síntomas por potenciales efectores (Burgos *et al.*, 2013; Arango Isaza *et al.*, 2016) por lo que el seguimiento de síntomas producidos por las VE's puede ser una herramienta para evaluar si transportan proteínas relacionadas a la patogénesis, además de que comparar dos cepas distintas y que contrastan en virulencia permitirá analizar si el contenido de proteínas de las VE's tienen una influencia en la patogenicidad.

HIPÓTESIS

Dos cepas de *Pseudocercospora fijiensis* con virulencia contrastante producirán y secretarán vesículas extracelulares (VE´s) con diferencias en su contenido de proteínas de patogenicidad, y que en consecuencia influyen en la virulencia de las cepas sobre plantas de banano.

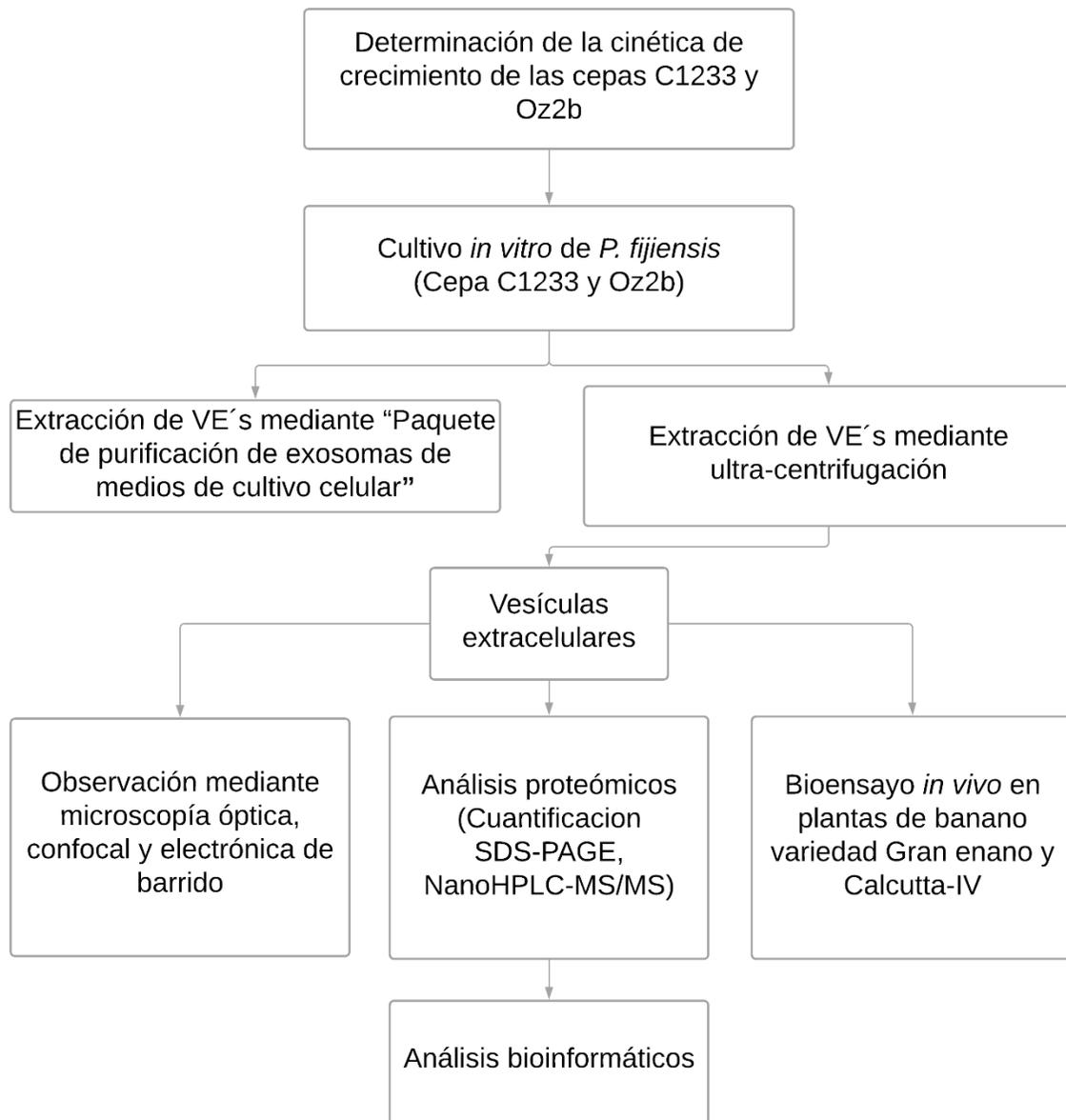
OBJETIVO GENERAL

- Extraer y caracterizar vesículas extracelulares y su contenido proteico a partir de las cepas C1233 y Oz2b de *P. fijiensis* que contrastan en virulencia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar vesículas extracelulares (VE´s) a partir de dos cepas de *Pseudocercospora fijiensis* con virulencia contrastante (cepas C1233 y Oz2b).
- Realizar una caracterización morfológica de las VE´s producidas por las cepas C1233 y Oz2b de *P. fijiensis* mediante microscopía y Dispersión de Luz Dinámica.
- Determinar mediante SDS-PAGE y nanoHPLC-MS/MS el contenido proteico de las VE´s producidas durante el cultivo *in vitro* de las cepas C1233 y Oz2b.
- Comparar mediante métodos bioinformáticos los proteomas de las VE´s aisladas a partir de las cepas C1233 y Oz2b.
- Analizar la respuesta de defensa de hojas de *Musa acuminata* cv Enano Gigante y *Musa acuminata* cv. burmanicoides a la infiltración con diferentes concentraciones de VE´s obtenidas de las cepas C1233 y Oz2b.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



2. CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas C1233 y Oz2b

Se utilizaron las cepas C1233 y Oz2b perteneciente a la colección de cultivos microbianos del CICY. La determinación de la cinética de crecimiento de las cepas de *P. fijiensis* se realizó después de la siembra por triplicado de 1 g de micelio desagregado de cada una de las cepas en 50 ml de medio de cultivo líquido de caldo papa dextrosa (PDB), en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Los matraces se colocaron en un agitador orbital a 100 rpm, y el micelio se colectó a los días 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 de cultivo, de acuerdo a Chuc-Uc *et al.* (2011) y se registró el peso fresco y seco. El peso fresco del micelio se registró después de realizar una deshidratación por aspirado. El peso seco se obtuvo después de la deshidratación del micelio en horno a 60 °C hasta que se alcanzó peso constante (Cruz-Martín *et al.*, 2013).

El crecimiento poblacional para ambas cepas se calculó siguiendo la metodología descrita por Arredondo-Vega y Voltolina (2007).

$$\mu_e = \frac{\ln(x_2 - x_1)}{(t_2 - t_1)}$$

El tiempo de generación fue calculado utilizando la ecuación:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_e}$$

2.2 Aislamiento de vesículas mediante ultracentrifugación para la producción y colecta de las vesículas extracelulares (VE's)

Como inóculo inicial, el micelio de las cepas C1233 u Oz2b cultivadas en medio PDB fue colectado en la fase exponencial de crecimiento justo en el día de duplicación de su biomasa (calculado a partir de la ecuación descrita en el párrafo anterior). Enseguida, por separado, 10 g de micelio fresco fueron inoculados en matraces Erlenmeyer de 1000 ml

conteniendo 500 ml de medio PDB fresco y se incubaron en agitación a 100 rpm por dos días.

En condiciones estériles, el micelio de 6 días de crecimiento en el caso de la cepa C1233 y 8 días para la cepa Oz2b se recuperó mediante filtración a través de un filtro de papel Whatman grado 5 en un embudo Büchner. El micelio fue lavado 2 veces con agua bidestilada desionizada estéril.

El micelio lavado se resembró en matraces Erlenmeyer de 1000 ml con 500 ml de medio mínimo estéril suplementado con dextrosa (10g/l), y se incubó a temperatura ambiente con agitación a 100 rpm durante 48 horas.

La preparación del medio mínimo se realizó a partir de una solución 10X (1.7 g de Medio mínimo [Yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate (Sigma) en 100 ml en agua destilada, y esterilizado por filtración]. La solución madre se almacenó a 4 °C hasta su uso; el medio mínimo 1X se preparó a partir de la solución madre, diluyendo en una relación 1:10 con una solución de dextrosa (10 g/l) estéril. Todo el procedimiento se realizó en condiciones asépticas.

Posteriormente, también bajo condiciones de esterilidad, los medios de cultivo (500 ml) inoculados con las cepas se recuperaron de forma independiente, y se realizó el aislamiento de las VE's.

Al no existir previamente una metodología para el aislamiento de VE's de *P. fijiensis*, se realizó un protocolo híbrido basado en los reportes de Kowal *et al.* (2017) y Silva *et al.* (2014); añadiendo un paso de filtración, y realizando modificaciones de los tiempos y velocidades de centrifugación; durante el procesamiento, las muestras se mantuvieron todo el tiempo en hielo y las centrifugaciones se realizaron a 4 °C.

Brevemente, el medio de cultivo libre de micelio se recuperó mediante filtración a través de un embudo Büchner, utilizando un filtro de papel Whatman Grado 5. Se agregó 35 ml del medio filtrado a cada uno de 12 tubos de centrifuga Nalgene y se centrifugó a 23,000 x *g* durante 45 minutos en una centrifuga Sorvall RC 5B Plus, utilizando un rotor de ángulo fijo Sorvall SA-600. Se recuperó el sobrenadante y se filtró en una unidad de filtración Nalgene equipada con una membrana de nitrocelulosa (Millipore) de 0.45 µm de tamaño de poro. El

filtrado se recuperó y se concentró ~20 veces usando discos de ultrafiltración PLHK Ultracel de celulosa, con tamaño de corte de 100 kDa y una unidad de ultrafiltración Amicon de 50 ml.

El concentrado se transfirió a 2 tubos de ultracentrífuga de policarbonato de 10 ml (estériles) y se centrifugaron a 40,000 x *g* por 30 min en una ultracentrífuga Optima L-100 XP utilizando un rotor de ángulo fijo T40.

Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 100,000 x *g* durante 60 minutos. Se descartó el sobrenadante. Las pastillas se resuspendieron con 5 ml de amortiguador de fosfato salino (PBS) 1X (NaCl 1.37 mmol/L, KCl 2.7 mmol/l, Na₂HPO 10 mmol/l, KH₂PO₄ 1.8 mmol/l; pH 7.4). Las pastillas resuspendidas se centrifugaron nuevamente a 100,000 x *g* durante 60 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 40 µl de amortiguador PBS 1X adicionado con 1 mM de fluoruro de metil sulfonilo (PMSF) como inhibidor de proteasas y 50 mM de azida de sodio (NaN₃). La muestra resuspendida se almacenó en congelación a -80 °C hasta la realización de los análisis posteriores.

Como un primer control se utilizó 500 ml de medio PDB sin adición de micelio, el cual fue sometido al protocolo de aislamiento de VE´s. Como un segundo control se utilizó medio de cultivo inoculado con micelio de *P. fijiensis* previamente sometido a esterilización por autoclave; brevemente, se inocularon 10 g de micelio de la cepa C1233 en 500 ml de medio PDB, se incubó en agitación a 100 rpm durante 6 días, pasado ese tiempo, el cultivo se esterilizó en autoclave a 121 °C con 1 atm de presión durante 45 minutos y a partir de dicho cultivo se procedió a realizar el protocolo de aislamiento de estructuras parecidas a VE´s.

2.3 Aislamiento de vesículas mediante “Paquete de purificación de exosomas de medios de cultivo celular”

Para el aislamiento de VE´s utilizando el paquete comercial “Paquete de purificación de exosomas de medios de cultivo celular” (NORGEN), se siguieron las indicaciones del proveedor. Se realizó el procedimiento descrito anteriormente hasta la concentración mediante ultrafiltración. Posteriormente, del concentrado, treinta y cinco mililitros (35 ml) de cada cepa se transfirieron de manera independiente a tubos Falcón de 50 ml y se

adicionaron con 25 µl del amortiguador ExoC, posteriormente se ajustó el pH a 9.0 utilizando hidróxido de sodio, seguido de la adición de 600 µl del compuesto Slurry E. La mezcla se homogenizó con un vórtex por 10 segundos y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Enseguida, las mezclas se agitaron por vórtex durante 10 segundos y se centrifugaron por 2 minutos a 2000 RPMs. El sobrenadante se desechó y al precipitado se le añadieron 600 µl de amortiguador ExoR, se mezcló por vórtex durante 10 segundos y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos. Después de la incubación se mezcló nuevamente en vórtex durante 10 segundos y se centrifugó por 2 minutos a 500 RPMs.

El sobrenadante se transfirió a una mini columna de centrifugación, provista en el paquete comercial, colocada previamente en un tubo de elución, y se centrifugó por 1 minuto a 7,000 x g. El concentrado se almacenó a -80 °C.

2.4 Observación de las VE´s mediante microscopía de contraste de fases

Se utilizaron 5 µl de la suspensión de VE´s en cada observación. La alícuota de la suspensión se colocó en un portaobjetos limpio, enseguida se le colocó un cubreobjetos limpio. La muestra se observó en un microscopio de contraste de fases Zeiss AxioPlan utilizando el objetivo de 100x y el ocular 10x. Las imágenes fueron adquiridas con el programa AxioVision 4.8.2.

2.5 Microscopía confocal

Las muestras de vesículas extracelulares purificadas de las cepas C1233 u Oz2b de *P. fijiensis* se tiñeron utilizando el colorante Rojo Nilo (Sigma) siguiendo el protocolo de Greenspan y Fowler (1985). Brevemente, se preparó una solución madre pesando 10 mg de Rojo Nilo y disolviéndolo en 1 ml de acetona (10,000 µg/ml). De esta solución madre se tomaron 100 µl y se disolvieron en 900 µl de acetona, para alcanzar una concentración final de 1000 µg/ml; la solución se mantuvo en hielo y protegida de la luz.

En un portaobjetos limpio se colocó una gota de glicerol al 100 % estéril, 2 µl de la solución de trabajo del Rojo Nilo y 5 µl de la suspensión de VE's; la preparación se selló utilizando un cubreobjetos limpio.

Como control positivo y para comprobar el estado del colorante, se preparó una solución de 1 mg/ml de manteca de cerdo comercial (JC Fortes) disolviendo completamente con ayuda de un baño ultrasónico (Branson CPX1800H) a máxima potencia, durante 30 minutos. La preparación de la muestra para su observación se realizó de la forma descrita en el párrafo anterior.

La detección del fluoróforo se realizó en un microscopio confocal (Olympus IX81) utilizando longitudes de excitación de 450 nm y de emisión de 528 nm. Las observaciones se registraron como micrografías.

2.6 Microscopía electrónica de barrido

Para los estudios de microscopía electrónica de barrido, se colocaron 100 µl de la solución de vesículas extracelulares en un microcon YM-10 (Millipore), el cual cuenta con un filtro de corte de 10 kDa. La parte superior del microcon fue sellada utilizando dos capas de una membrana de diálisis con tamaño de corte de 3.5 kDa.

La fijación de las VE's se realizó colocando el microcon dentro de una solución de glutaraldehído al 2.5 % en una solución tampón de fosfatos de sodio (33 % de fosfato monobásico de sodio al 0.2 M y 66 % de fosfato dibásico de sodio al 0.2 M, pH 7.2) durante 48 horas a 4 °C, en ausencia de luz. Enseguida se removió el exceso de fijador, sumergiendo el microcon conteniendo la muestra en la solución tampón de fosfatos de sodio y realizando dos cambios de una hora cada uno. Al finalizar el segundo lavado, las muestras se deshidrataron a través de una serie de soluciones crecientes de etanol (30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 96 % y absoluto). La muestra se dejó reposar en cada solución de etanol por una hora, con excepción de la solución al 70 % en la cual se dejó reposar durante 12 horas. Durante todo el proceso de deshidratación las muestras se mantuvieron a 4 °C en ausencia de luz. El secado de punto crítico se realizó utilizando dióxido de carbono líquido, en un secador de punto crítico (TOUSIMIS, modelo SAMDRI 795). Las muestras se

revistieron con una capa de oro de aproximadamente 150 Armstrong de espesor, con ayuda del equipo Denton Vacuum/Desk II. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de barrido marca Jeol, modelo JSM-6360 LV, utilizando un voltaje de aceleración de 25 kV.

2.7 Determinación del tamaño de las VE´s mediante Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Los tamaños de las VE´s aisladas de las cepas de C1233 y Oz2b se obtuvieron mediante Dispersión de Luz Dinámica (DLS del inglés “Dynamic Light Scattering”), utilizando el equipo NANOTRAC WAVE II y el programa Microtrac Flex II versión 1.0.2. Para ello se realizó el aislamiento de VE´s como se describió anteriormente, teniendo como única diferencia el paso final de resuspensión, la cual se realizó en 2 ml de PBS 1X. Las pastillas se almacenaron a 4 °C hasta su análisis, el cual se realizó antes de que transcurrieran 24 h de su aislamiento. Como blanco se utilizó 2 ml de PBS sin VE´s. Se realizaron 2 réplicas de cada una de las cepas.

2.8 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas en las VE´s se realizó mediante el protocolo de Bradford modificado por Ernst y Zor (2010). La curva de calibración se realizó utilizando cantidades de 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 µg/µl de albúmina sérica bovina (BSA), realizando cada punto por triplicado. Se utilizaron 200 µl de la suspensión de VE´s o 10 µl de proteínas resuspendidas en urea 8 M; la determinación de proteína se realizó por duplicado. La absorbancia de las muestras se determinó en un espectrofotómetro GENESYS 10 UV (Thermo Scientific) a 590 y 450 nm de longitud de onda.

2.9 Análisis de proteínas por electroforesis SDS-PAGE

El análisis de las proteínas contenidas en las VE´s se realizó en geles de 12 % SDS-PAGE. Se agregaron 80 ng de proteínas de vesículas extracelulares de cada cepa

(correspondiente a 40 μ l de suspensión de VE's para la cepa C1233 y 11.7 μ l para la cepa Oz2b) (Ikeda *et al.*, 2018), las cuales fueron suspendidas en agua hasta llegar a 40 μ l totales; se añadieron 10 μ l del amortiguador de Laemmli y se cargaron en el gel de 12 % SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Los geles se sometieron a electroforesis a 80 V a temperatura ambiente; las bandas de proteína se visualizaron tiñendo con nitrato de plata (Vallejo *et al.*, 2011).

2.10 Precipitación de proteínas para su separación de los lípidos de las VE's

A partir de las vesículas purificadas se realizó la precipitación de las proteínas de acuerdo a la metodología propuesta por Wessel y Flugge (1984).

Brevemente, se adicionó agua grado miliQ a las muestras de vesículas extracelulares purificadas hasta llegar a 100 μ L; la suspensión se transfirió a un tubo cónico de 2.5 ml en el cual se adicionaron 300 μ L de agua miliQ, 400 μ L de metanol y 100 μ L de cloroformo. La mezcla se homogenizó en vórtex con agitación vigorosa durante 1 minuto. Posteriormente el homogenado se centrifugó a 17,000 x g durante 15 minutos a 25 °C para lograr una separación de las fases.

Se removió la mezcla de agua-metanol que se forma sobre la interfase y posteriormente se adicionaron 400 μ l de metanol. Nuevamente se realizó la homogenización con agitación vigorosa en vórtex durante 1 minuto, seguido de centrifugación a 17,000 x g durante 15 minutos. Finalizada la centrifugación se removió el sobrenadante y la pastilla se secó a temperatura ambiente durante 1 hora.

2.11 Digestión de proteínas

Las pastillas de proteína de cada una de las muestras fueron resuspendidas en 8 M de urea disuelta en amortiguador HEPES pH 8.0; se tomaron dos alícuotas de 10 μ l de cada muestra para la cuantificación de proteínas. Se añadió dithiothreitol 0.5 M (DTT) en 50 mM de bicarbonato de amonio para alcanzar una concentración final de 10 mM. La resuspensión se homogenizó por vórtex y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Finalizado ese

periodo, se añadió Iodoacetamida (Iodoacetamida 275 mM en bicarbonato de amonio 50 mM), concentración final de 18 mM. Se mezcló brevemente en vórtex y se incubó durante 1 hora en condiciones de oscuridad. Concluida la incubación, se adicionaron 4 volúmenes de agua MiliQ y se mezcló con vórtex. Enseguida, a las muestras se les añadió 0.8 % de tripsina grado secuenciación y se incubó toda la noche a 25 °C protegiendo de la luz. La digestión se detuvo añadiendo 1 % de ácido fórmico.

2.12 Preparación de las proteínas recuperadas de las VE's para su análisis proteómico

Se tomaron alícuotas de los péptidos digeridos, conteniendo 4 µg de proteína de cada una de las cepas y se colocaron en tubos individuales de 0.2 ml. Las muestras se deshidrataron en Savant a temperatura ambiente durante 5 ciclos de 25 minutos cada uno. Las pastillas se resuspendieron en 10 µl de solución de equilibrio (0.1 % TFA en agua grado mili-Q). Se humedeció una punta ZipTip C18 (Merck) con 10 µl de acetonitrilo (ACN) al 100 %. Este paso de humedecimiento se repitió tres veces. Posteriormente se equilibró la punta ZipTip con 10 µl de 0.1 % de TFA en agua grado mili-Q (2 veces). Enseguida, la muestra de proteína se aspiró 10 veces en la punta ZipTip; la punta se lavó 2 veces con 0.1 % TFA en agua grado mili-Q. Los péptidos se recuperaron de la ZipTip aspirando 5 veces 10 µl de solución de elución (0.1 TFA/50 % ACN) previamente depositados en un tubo nuevo de 0.2 ml. La muestra recuperada se deshidrató mediante un concentrador Savant utilizando 2 ciclos de 25 minutos cada uno, a temperatura ambiente.

La separación y secuenciación de los péptidos se realizó mediante proteómica de alta escala, utilizando un sistema nanoHPLC (Dionex Ultimate 3000) acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap (Orbitrap Fusion™ Trihybrid Mass Spectrometer). La inyección de muestras al espectrómetro de masas se realizó mediante ionización por nanoelectrospray. Los espectros de masa/carga fueron comparados mediante el programa MaxQuant y con el programa Proteome Discovered 2.1, ambos contra la base de datos del proteoma deducido de *P. fijiensis*. Inicialmente se seleccionaron como verdaderas aquellas proteínas identificadas que contaban con 2 o más péptidos en una o ambas réplicas, o que contaban con un solo péptido, pero en ambas replicas. Las identidades de las secuencias

obtenidas fueron descargadas para su posterior análisis bioinformático. Al ser bajo el número de proteínas identificadas en la cepa Oz2b, se decidió utilizar aquellas secuencias que tuvieran al menos un péptido en una o ambas replicas, lo que posibilita una mejor comparación entre ambas cepas.

2.13 Análisis bioinformático de los proteomas de las VE aisladas a partir de las cepas C1233 u Oz2B

a) Ontología de genes

La información de ontología de genes (GO) se obtuvo del proteoma deducido de *P. fijiensis* el cual se encuentra disponible en el repositorio Uniprot (<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000016932>), usando para la búsqueda los respectivos IDs de las proteínas identificadas en el proteoma generado en el presente trabajo. Los GOs recuperados se cargaron en el programa “Web Gene Ontology Annotation Plot (WEGO) 2.0” (<http://wego.genomics.cn>) (Ye *et al.*, 2018) para realizar el análisis sistemático de las anotaciones encontradas a nivel 2.

b) Determinación de péptido señal y anclaje GPI

La predicción de la presencia de péptido señal en las secuencias se realizó utilizando los programas TargetP 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/software.php>) (Armenteros *et al.*, 2019), SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/software.php>) (Armenteros *et al.*, 2019) y Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/index.html>) (Käll *et al.*, 2004). La predicción de anclajes GPI se realizó con el programa PredGPI (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/>) (Pierleoni *et al.*, 2008).

c) Predicción de efectores

La búsqueda de posibles efectores se realizó empleando los programas EffectorP 1.0 (<http://effectorp.csiro.au/index.html>) (Sperschneider *et al.*, 2015), EffectorP 2.0 (Sperschneider *et al.*, 2018) (<http://effectorp.csiro.au/index.html>), y EffHunter (https://github.com/GisCarreon/EffHunter_v.1.0) (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020).

Para identificar aquellas proteínas contenidas en las VE's que están relacionadas a virulencia y patogenicidad, las secuencias de proteínas se analizaron mediante Blastp contra la base de datos "Plant-Host interaction 4.9" (<http://phi-blast.phi-base.org/>).

Se consideraron como características de efectores los siguientes parámetros: a) secuencias con un tamaño ≤ 300 aminoácidos, b) porcentaje de cisteínas mayor al 2 %, c) sin dominios transmembranales, d) los resultados de los análisis en los programas EffectorP 1.0 (≥ 0.7), EffectorP 2.0 (≥ 0.7) y, EffHunter. A cada uno de dichos criterios se les asignó un valor de 1, aquellas secuencias con un valor ≥ 4 se seleccionaron como candidatos a efectores.

d) Predicción de dominios transmembranales

La búsqueda de hélices transmembranales se realizó mediante el programa TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) (Sonnhammer *et al.*, 1998).

e) Elaboración de diagramas de Venn

Los diagramas de Venn se construyeron con el programa Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) (Oliveros, 2015).

f) Identificación de familias

La identificación de las familias InterPro a las que pertenecen las proteínas identificadas en las VE's de *P. fijiensis*, así como la asignación de los números de la Comisión de Enzimas se realizaron a partir de la base de datos ENZYME, mediante el programa Blast2Go (Götz *et al.*, 2008).

2.14 Bioensayo del efecto del contenido de las VE's en hojas de plantas de banano

Plantas de *Musa acuminata* cv Enano Gigante y Calcuta-IV, mantenidas en invernadero, de ~ seis meses de edad, se inocularon con 100 y 200 ng de la suspensión vesicular (calculada mediante la cuantificación de proteínas) de las cepas C1233 u Oz2b. Las plantas fueron infiltradas en la primera hoja por debajo de la hoja cigarro (de acuerdo a Muñoz-Pérez, 2018). La inoculación se realizó con incisiones superficiales producidas con un bisturí estéril y colocando sobre ellas las concentraciones de cada muestra, en volumen final de 40 μ l. Como controles positivos para la inducción de la respuesta hipersensible, se utilizaron de manera independiente Glicol-quitina (Sigma) al 0.15 %, y 10 μ g de Proteasa (Sigma); y como controles negativos se utilizaron agua, PBS 1X y un corte sin infiltrar (este último, daño mecánico). El esquema de infiltración se ilustra en la Figura 2.1. Se infiltraron en total 4 plantas, dos de cada cultivar. Las lesiones se registraron cada 24 h durante 96 horas. El tamaño y área de las lesiones se calculó utilizando el programa ImageJ de acceso libre en el NIH (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Las gráficas fueron realizadas con el programa Excel 2016.

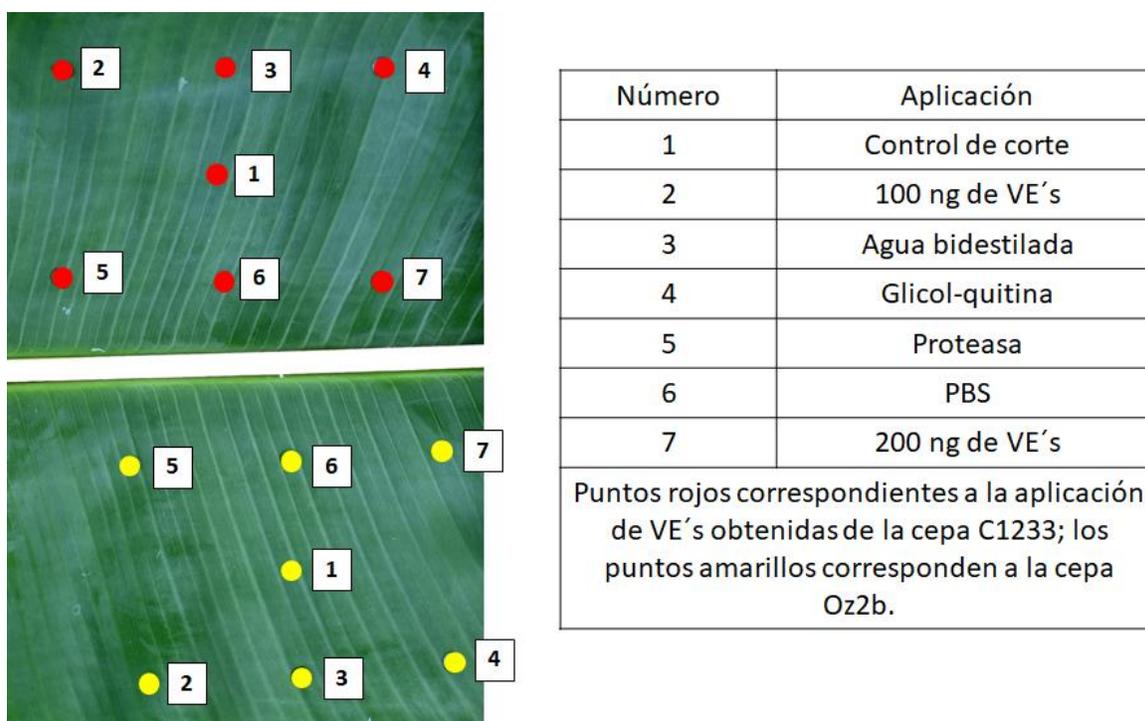


Figura 2.1 Esquemización del diseño del experimento de infiltración en las hojas de banano susceptibles y resistentes a *P. fijiensis*.

3. CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas C1233 y Oz2b

La biomasa (peso fresco) recuperada fue mayor en la cepa C1233 en comparación con la cepa Oz2b (Figura 3.1). Sin embargo; la comparación de los pesos secos mostró que la cepa Oz2b acumuló más materia seca que la cepa C1233. Este comportamiento se mantuvo en todos los tiempos analizados (Figura 3.2).

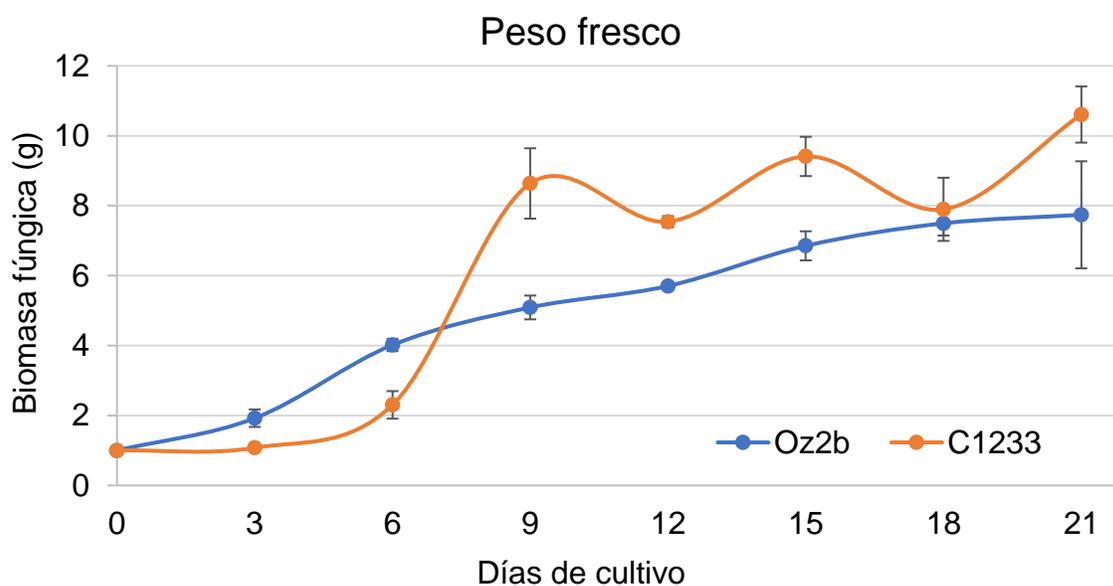


Figura 3.1 Acumulación de peso fresco durante el ciclo de cultivo *in vitro* de las cepas de *P. fijiensis* C1233 y Oz2b. La determinación del peso fresco se realizó en un periodo de 21 días. Las barras representan la desviación estándar.

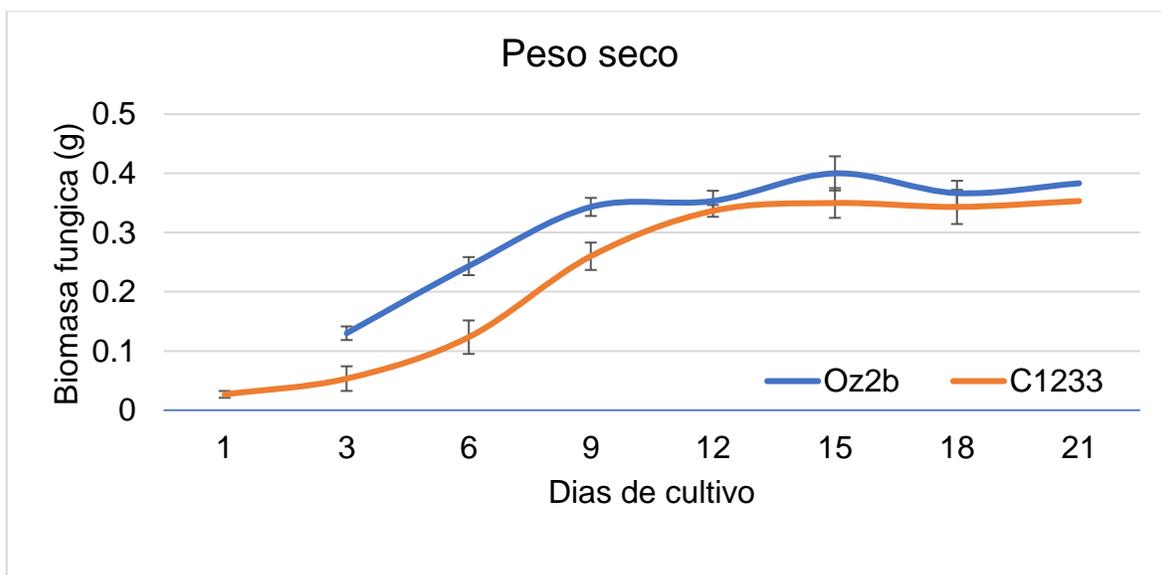


Figura 3.2 Acumulación de peso seco durante el ciclo de cultivo *in vitro* de las cepas de *P. fijiensis* C1233 y Oz2b. La determinación del peso seco se realizó en un periodo de 21 días. Las barras representan la desviación estándar.

El crecimiento poblacional para ambas cepas se calculó siguiendo la metodología descrita en la sección de materiales y métodos a partir de lo cual se obtuvo:

$$t_{Oz2b} = 7.7 \text{ días}$$

$$t_{C1233} = 6.43 \text{ días}$$

Dados los valores del tiempo de duplicación del peso fresco, entonces se seleccionó el día 6 para la cepa C1233 y el día 8 para la cepa Oz2b para la colecta de los medios de cultivo a partir de donde se extrajeron las VE's.

3.2 Aislamiento de VE's mediante el método de ultracentrifugación

El proceso de aislamiento de las VE's mediante ultracentrifugación (desde la recuperación del medio de cultivo, hasta la recuperación de las VE's), requirió de un periodo de tiempo de ~10 horas por muestra. En el paso final se obtuvieron pequeñas pastillas de VE's, en el fondo del tubo de centrifuga (Figura 3.3).

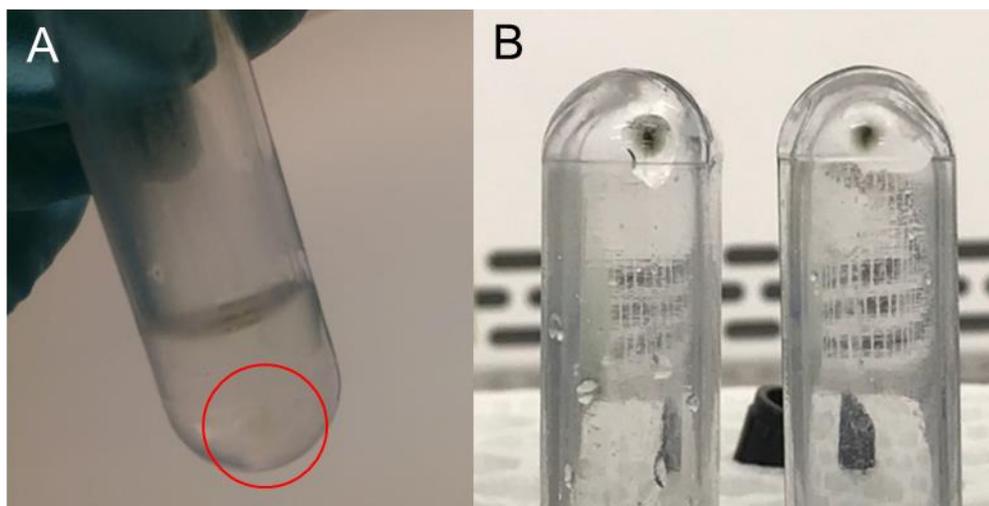


Figura 3.3 Aspecto visual de las pastillas de VE's después de la centrifugación final. A) Pastilla de VE's aisladas de la cepa C1233, B) Pastillas de VE's aisladas de la cepa Oz2b.

3.3 Cuantificación de las proteínas contenidas en las VE's

La Tabla 3.1 muestra las cantidades de proteína contenida en las VE's aisladas por ultracentrifugación y las aisladas con el paquete comercial (Cell Culture Media Exosome Purification), así como en los controles.

Las cantidades de proteína obtenidas en las extracciones realizadas con el paquete comercial fueron similares a las obtenidas con el medio PDB control, mientras que el rendimiento fue mucho mayor con el procedimiento de extracción mediante ultracentrifugación (Tabla 3.1). Con base en ello, se decidió hacer los análisis aislando las VE's con el método de ultracentrifugación.

Tabla 3.1 Cuantificación de proteína de las diferentes VE´s.

Muestra	Concentración de proteína en ng/μl	Proteína total por extracción
PDB Control	1.16 ± 0.29	232 ng
C1233 esterilizado por autoclave (Ultracentrifugación)	1.40	280 ng
C1233 Ultracentrifugación	2.07 ± 0.18	414 ng
Oz2b Ultracentrifugación	6.80 ± 0.23	1360 ng
C1233 paquete comercial	1.22	244 ng
Oz2b paquete comercial	1.53 ± 0.22	306 ng

3.3 Observación de VE´s en microscopía de contraste de fases

En la Figura 3.4 se muestra un comparativo de microfotografías representativas de las estructuras recuperadas a partir de medio PDB sin adición de micelio, y de las VE´s recuperadas de las cepas C1233 (Figura 3.4, panel A) u Oz2b (Figura 3.4 panel B) de *P. fijiensis* y analizadas por microscopía de contraste de fase. En la fotografía del medio PDB control (Figura 3.4, panel C), se observan agregados y estructuras semi esféricas, no obstante, estas son de un tamaño mayor al reportado para los exosomas y microvesículas y son escasas en número en comparación a las VE´s detectadas en los medios inoculados con micelio de las cepas de *P. fijiensis*. En las muestras recuperadas de *P. fijiensis* se observa la presencia de estructuras esféricas tipo VE´s cuyo tamaño comprende desde 500 nm de diámetro hasta más de 1000 nm. Tales estructuras se diferencian fácilmente de las detectadas en el medio de cultivo sin inocular.

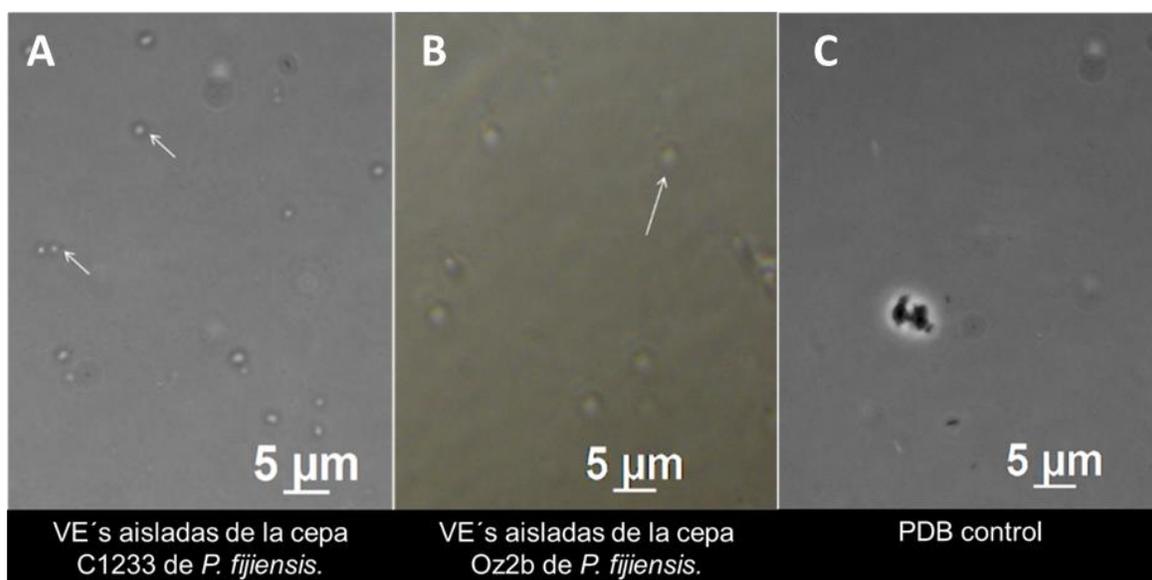


Figura 3.4 Micrografías de VE's aisladas y analizadas por microscopía de contraste de fases A) Cepa C1233, B) Cepa Oz2b, C) medio PDB como control negativo.

Las estructuras observadas en este estudio corresponden en forma y tamaño a las microvesículas, un tipo de vesículas extracelulares; poseen un tamaño que va de los 50 a los 1000 nm (Chen *et al.*, 2018) las cuales ya han sido reportadas en otras especies fúngicas.

Los cuerpos mayores a los 1000 nm pueden corresponder a cuerpos apoptóticos, aunque tampoco puede descartarse su formación como consecuencia de la agregación de cuerpos de menor tamaño.

3.4 Observación de VE's en microscopía confocal

En la Figura 3.5 se observan distintas fotografías obtenidas con el microscopio confocal utilizando el colorante Rojo Nilo, el cual al unirse a compuestos lipídicos fluoresce. En el panel A se muestra la señal que emite el fluoróforo al utilizarlo para teñir una solución de 1 mg/ml de manteca de cerdo comercial como control positivo; el panel B corresponde al PBS, donde no se observa ninguna señal de fluorescencia. En el caso de las suspensiones de VE's (panel C y D) se observa señal en los agregados más grandes en ambas cepas.

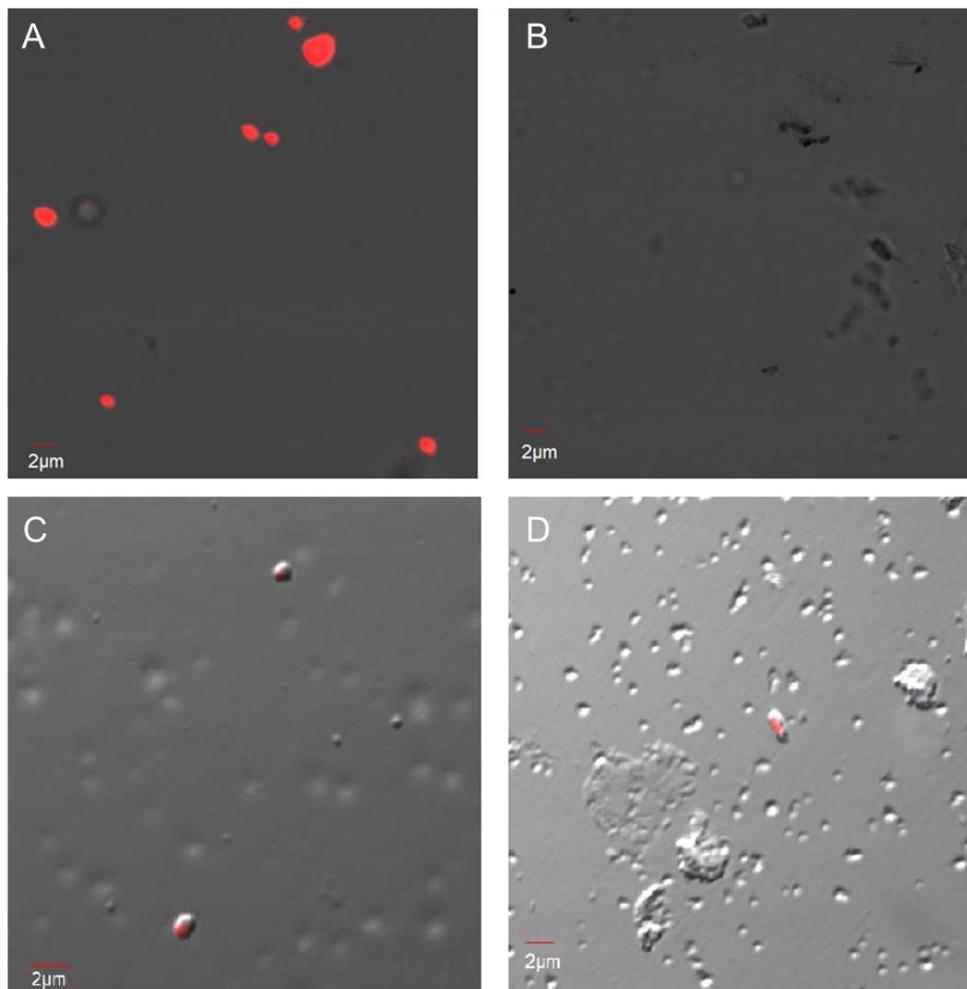


Figura 3.5 Microfotografías de VE´s aisladas de los medios de cultivo de las cepas C1233 y Oz2b y teñidas con Rojo Nilo y detectadas por microscopía confocal. A) Suspensión de manteca de cerdo, B) PBS, C) VE´s de la cepa C1233, D) VE´s de la cepa Oz2b.

3.5 Observación de VE´s en microscopía electrónica de barrido

En la Figura 3.6 se observan estructuras esféricas obtenidas a partir del medio de cultivo de la cepa C1233, de diámetro entre 580 y 650 nm, parecidas a las VE´s que han reportado otros autores en sus análisis de microscopía electrónica de barrido (Silva *et al.*, 2014).

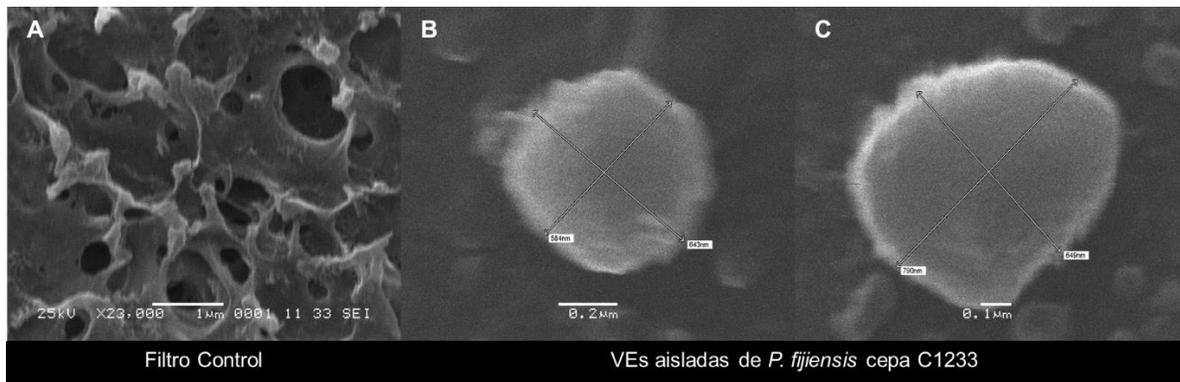


Figura 3.6 Microfotografías de microscopía electrónica de barrido de las VE's aisladas de la cepa C1233. A) Poros del filtro control, B y C) VE's detectadas en los poros del filtro donde se permearon y fijaron las VE's de la cepa C1233.

3.6 Análisis de proteínas por electroforesis SDS-PAGE

La Figura 3.7 muestra un gel de agarosa desnaturalizante de 12 % de poliacrilamida en el cual se cargaron 80 ng de proteína de cada una de las suspensiones de las VE's obtenidas de las cepas C1233 u Oz2b. En la fotografía se observa un mayor número de bandas en el carril correspondiente a las VE's de la cepa C1233. Mientras que en el carril correspondiente a la Oz2b se observan 2 bandas tenues con masas moleculares de 34.2 y 6 KDa.

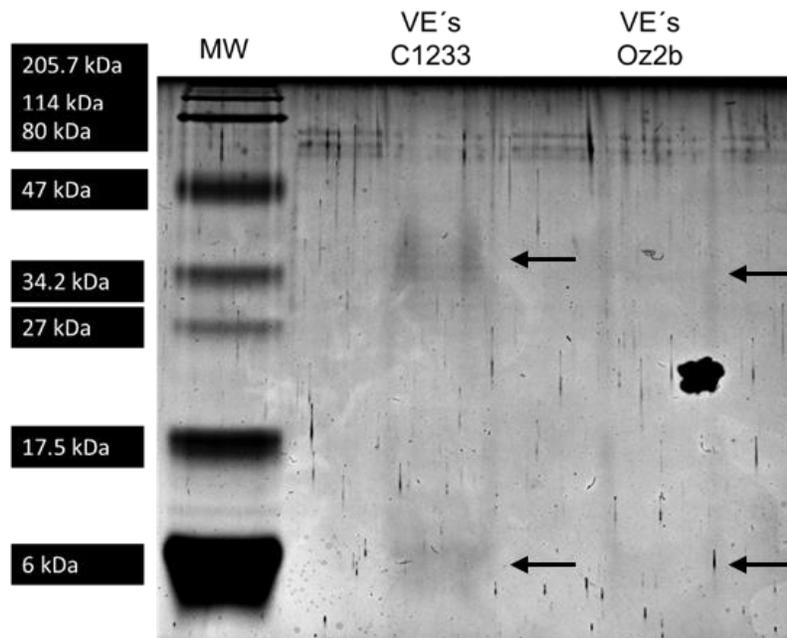


Figura 3.7 Perfil proteico de las VE's obtenidas de las cepas C1233 y Oz2b. Las proteínas fueron analizadas en un gel desnaturalizante de 12 % de poliacrilamida y teñidas con nitrato de plata, el carril MW corresponde al marcador de peso molecular, los carriles marcados como VE's C1233 y VE's Oz2b fueron cargados con 80 ng de proteínas de VE's de la cepa correspondiente.

3.7 Medición de las VE's mediante DLS

Los análisis de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) mediante el NANOTRAC WAVE II produjeron la gráfica de la Figura 3.8, en ella se puede observar que no existieron partículas mayores a 800 nm. Este resultado coincide con las imágenes adquiridas mediante microscopía.

En la cepa C1233 se observó una población de VE's que fueron desde los 25 hasta 200 nm aproximadamente. En el caso de la cepa Oz2b la población es más grande y sus tamaños van desde 25 nm hasta cerca de 500 nm, con un pico máximo que va de 100 a 350 nm. Los resultados fueron reproducibles para cada muestra, ya que los picos máximos de dispersión de la luz y la forma de la curva fueron parecidos entre las réplicas de cada cepa.

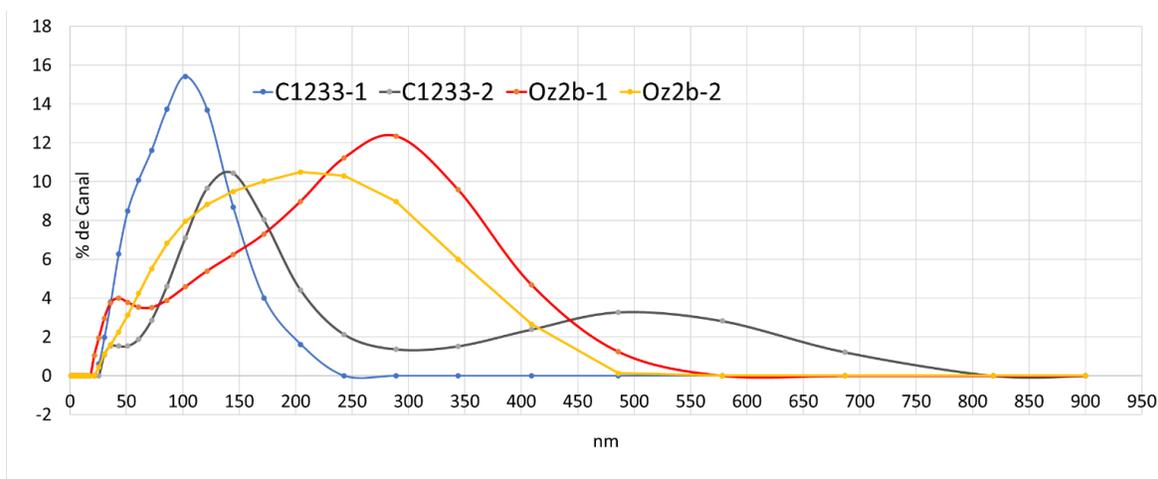


Figura 3.8 Análisis de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) en las cepas C1233 y Oz2b. Los picos máximos muestran el tamaño de las subpoblaciones de VE's en la solución.

3.8 Análisis bioinformáticos

Se enviaron a secuenciar dos muestras de VE's de cada una de las cepas de *P. fijiensis*; al procesar los espectros masa-carga con el programa MaxQuant, se obtuvieron 190 secuencias y 150 secuencias al emplear el programa Proteome Discovered 2.1.

Después de los procesos de filtrado descritos en materiales y métodos, se recuperaron 98 secuencias de proteínas provenientes de las VE's de la cepa C1233 y 71 provenientes de las VE's de la cepa Oz2b (Tabla de anexos 1 y 2).

En el diagrama de Venn se observa que ambas cepas compartieron 39 proteínas mientras que 59 proteínas fueron específicas para la cepa C1233 y 32 para la cepa Oz2b (Figura 3.9).

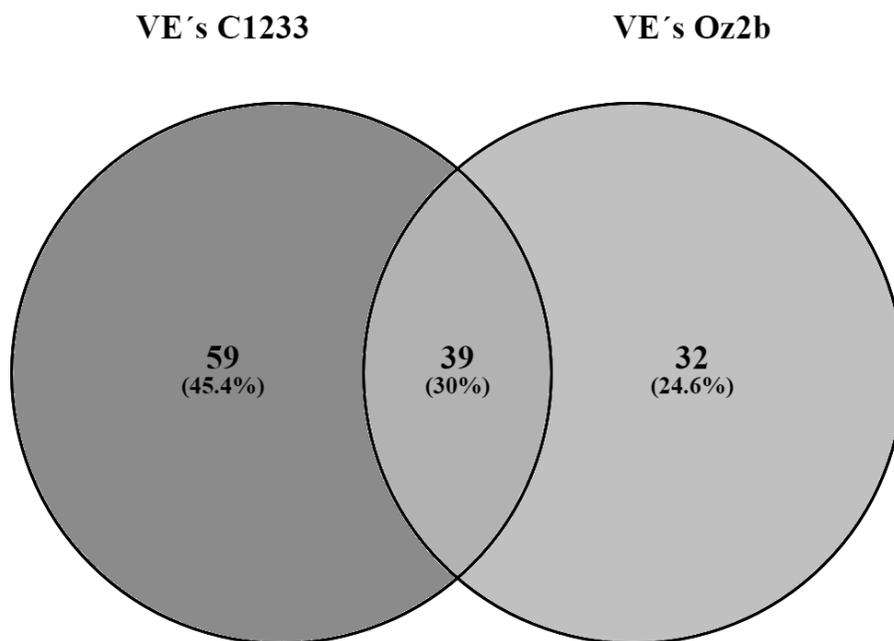


Figura 3.9 Diagrama de Venn que ilustra la distribución de las proteínas obtenidas en las VE's de dos cepas de *P. fijiensis* estudiadas en el presente trabajo.

De las proteínas identificadas en la cepa C1233, 68 tuvieron asignación GO; mientras que en las proteínas de la cepa Oz2b se encontraron 44 con asignación. En contraste, un número similar de proteínas en ambas cepas no obtuvieron asignación GO (30 para la C1233 y 29 para la Oz2b). Las proteínas que contaban con la asignación GO, se analizaron en el WEGO a nivel 2 (Tabla 3.2 y Figura 3.10).

Tabla 3.2 Análisis de ontología de las proteínas secuenciadas a partir de las VE's de dos cepas de *P. fijiensis*.

		VE's C1233	VE's Oz2b	Total
Genes		98	71	169
Genes anotados		68	44	112
Términos GO	Proceso biológico	39	21	60

	Componente celular	30	15	45
	Función molecular	65	42	107
	Total	134	78	212

Nota: Aunque las secuencias analizadas son de proteínas, el “Gene Ontology” analiza sus respectivos genes.

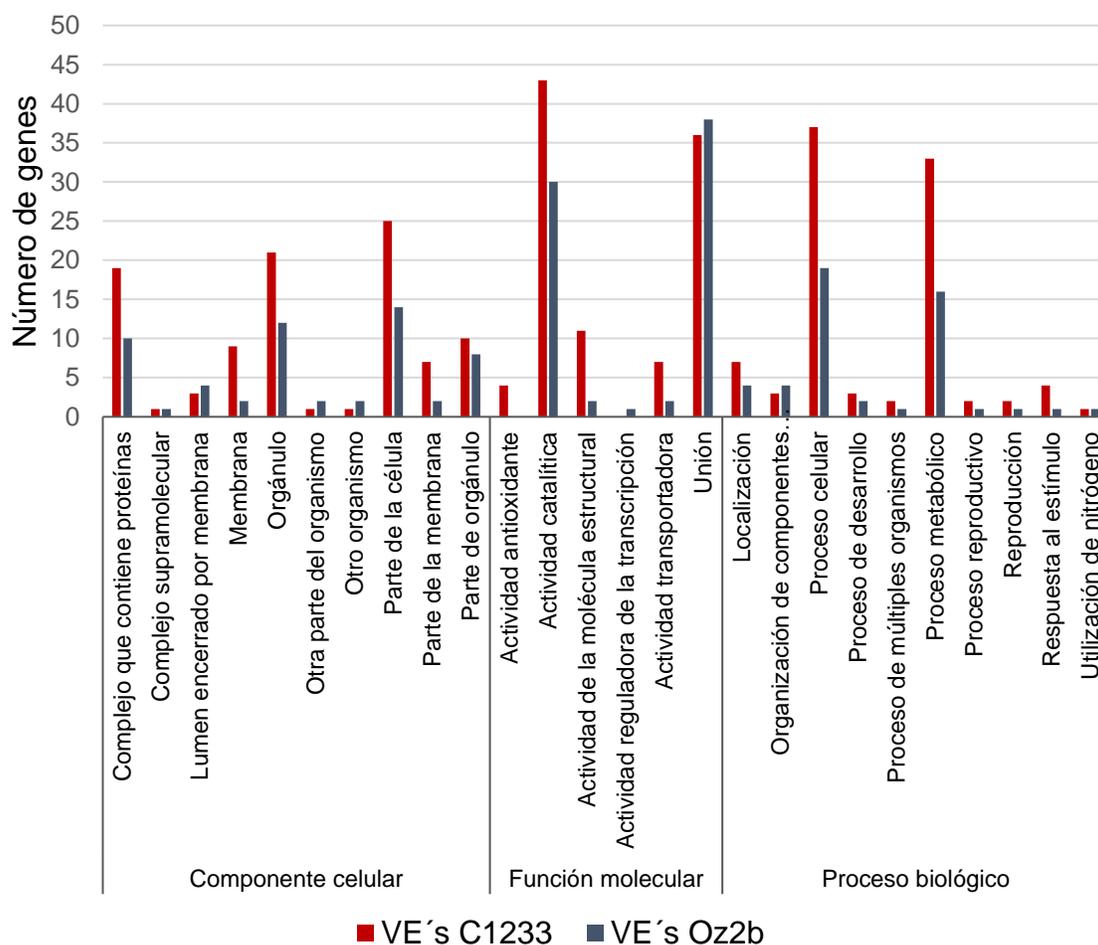


Figura 3.10 Clasificación de acuerdo al “Gene Ontology” de las proteínas secuenciadas a partir de las VE's de dos cepas de *P. fijiensis*.

La Figura 3.10 muestra los términos más representativos, observándose una distribución similar en los proteomas de ambas cepas. La suma aritmética de anotaciones supera el número de proteínas porque una proteína puede tener más de un término asignado.

En ambos proteomas la familia más abundante fue “Dominio de unión FAD/NAD(P)”, seguido de la familia “P-loop que contiene nucleósido trifosfato hidrolasa” y de la familia “ATPasa, dominio de unión a nucleótidos”. En general, la clasificación de familias de proteínas fue similar en ambos proteomas (Figura 3.11 y Figura 3.12).

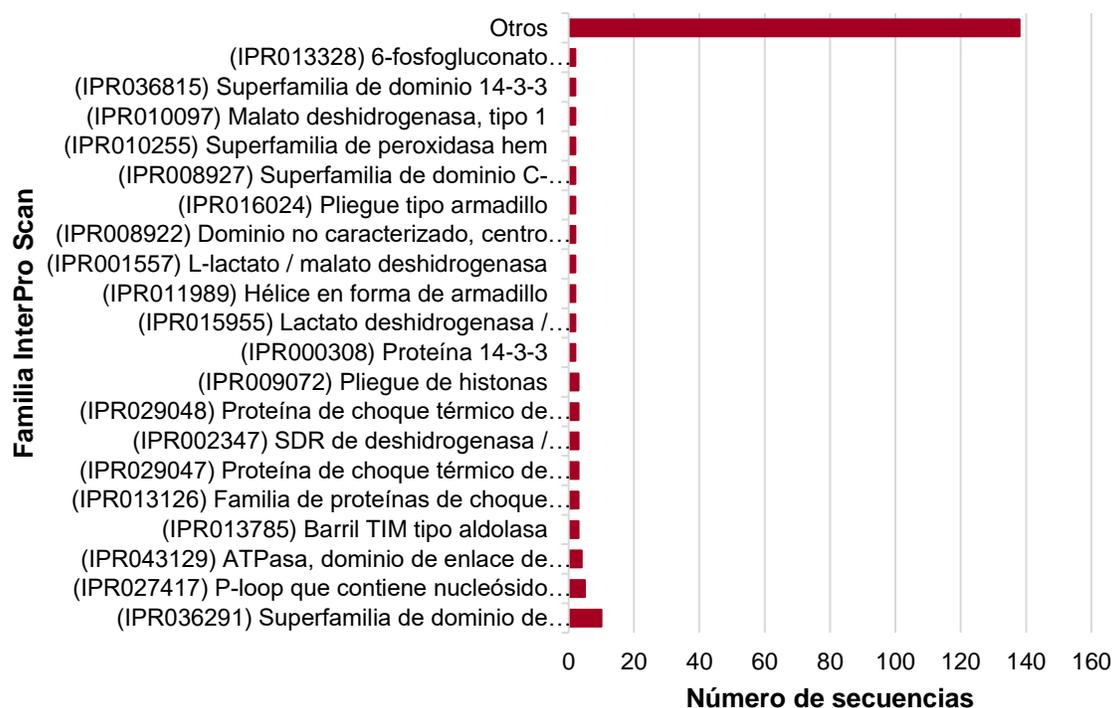


Figura 3.11 Distribución de las secuencias procedentes de las VE´s de la cepa C1233 de *P. fijiensis* en las familias InterPro.

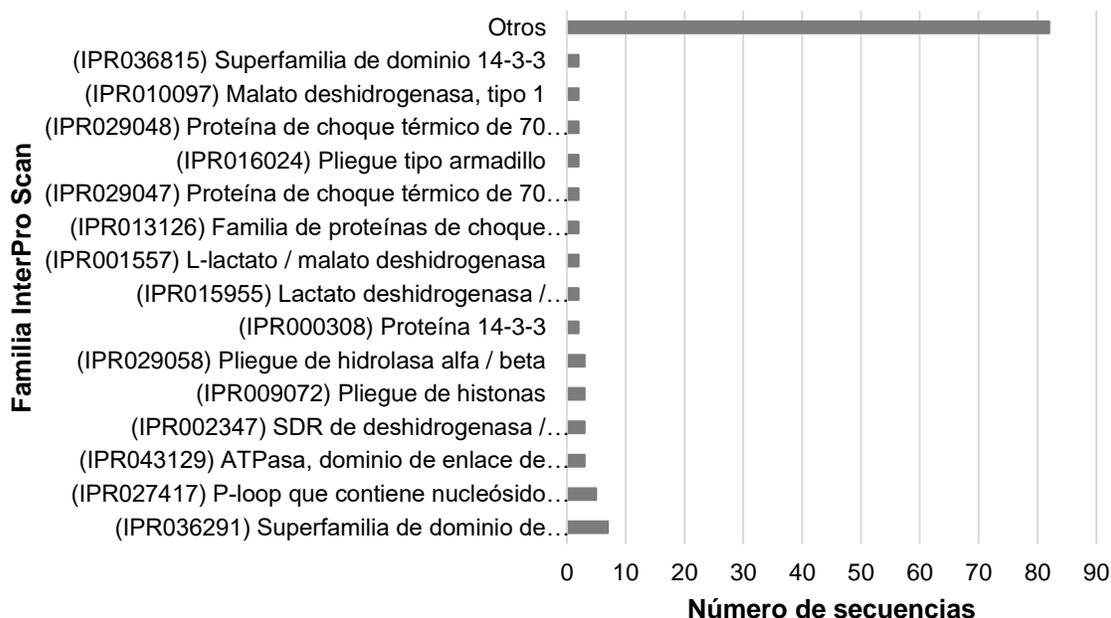


Figura 3.12 Distribución de las secuencias procedentes de las VE's de la cepa Oz2b de *P. fijiensis* en las familias InterPro.

Las proteínas identificadas, se compararon en la base de datos de la comisión de enzimas (CE), esto con el propósito de asignarles los números CE. En las VE's de la cepa C1233 se identificaron 35 secuencias y 21 en las VE's de la cepa Oz2b (Figuras 3.13 y 3.14); en ambas cepas las principales enzimas representadas fueron las oxido-reductasas, seguidas de las hidrolasas y las transferasas. En el caso de la cepa C1233, las transferasas y las hidrolasas estuvieron representadas por igual número de secuencias. También se encontraron liasas, isomerasas y ligasas en ambas cepas y con una distribución similar. Se encontraron 4 translocasas en el proteoma de las VE's de la cepa C1233 que en la cepa Oz2b, siendo 4 las identificadas en la cepa C1233 y solamente una para la cepa Oz2b, aunque lo anterior puede deberse al menor número de proteínas secuenciadas en la cepa Oz2b. Es decir, existe la posibilidad de que sea un resultado sesgado, porque el proteoma de la cepa Oz2b tuvo algunas dificultades.

Distribución de los Números CE de las enzimas de la cepa C1233

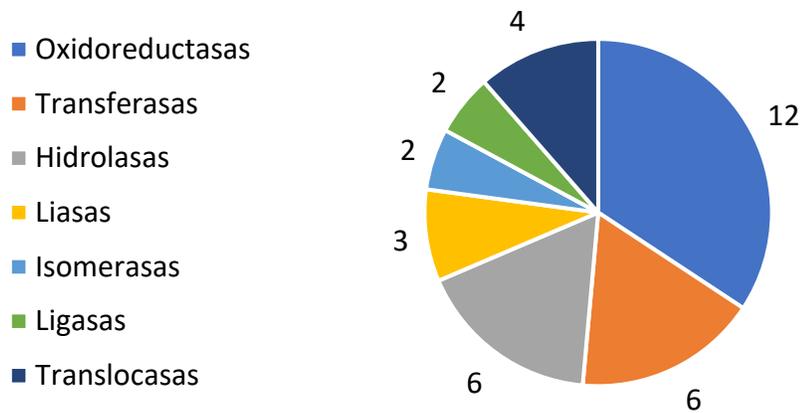


Figura 3.13 Clasificación del proteoma de las VE's de la cepa C1233 de *P. fijiensis* con base en la identificación obtenida a partir de la base de datos ENZYME.

Distribución de los Números CE de las enzimas de la cepa Oz2b

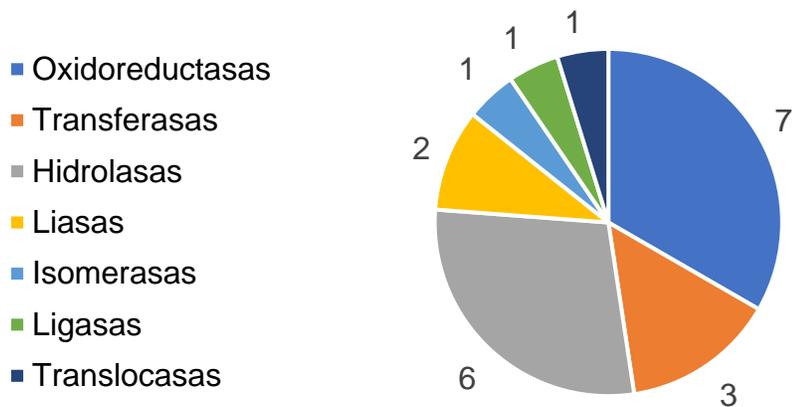


Figura 3.14 Clasificación del proteoma de las VE's de la cepa Oz2b de *P. fijiensis* con base en la identificación obtenida a partir de la base de datos ENZYME.

La determinación *in silico* de la presencia de péptido señal, presencia de anclajes GPI y de dominios transmembranales en las secuencias obtenidas de las VE´s de las cepas C1233 y Oz2b mostró que diecisiete de las 98 secuencias proteicas de la cepa C1233 y diez de las 71 secuencias de la cepa Oz2b predicen tener péptido señal de secreción (Tabla 3.3). Solamente se encontraron dos secuencias con anclaje GPI, ambas en las secuencias de la cepa C1233, y el número de proteínas transmembranales fue igualmente bajo en ambas cepas, encontrándose 5 secuencias con dominios transmembranales en la cepa C1233 y solamente una en el proteoma de las VE´s de la cepa Oz2b.

Tabla 3.3 Características predichas mediante análisis bioinformático en las secuencias de proteínas de las VE´s de las cepas C1233 y Oz2b.

Cepa	Total	Péptido señal	Anclajes GPI (PredGPI)	Proteínas transmembranales (TMHMM)
VE´s C1233	98	16	2	5
VE´s Oz2b	71	10	0	1

3.8.1 Búsqueda de candidatos a efectores

Debido a que ambas cepas son patogénicas y difieren en virulencia, se realizó la búsqueda de posibles efectores en los proteomas de las VE´s, esto para explorar si estas estructuras están involucradas en la secreción de efectores. En la Tabla 3.4 se muestra el número de secuencias que mediante diferentes programas bioinformáticos cumplieron los criterios de identificación de efectores en ambas cepas de *P. fijiensis*. Como efectores putativos, se obtuvieron 25 secuencias en las VE´s de la cepa C1233 y 16 en las VE´s de la cepa Oz2b. Los resultados de los análisis bioinformáticos se pueden consultar en la Tabla de anexos 3 y 4.

Tabla 3.4 Predicción de efectores en las secuencias proteicas identificadas en las VE's de *P. fijiensis*.

Cepa	Sin dominios transmembranales	≤300 aa	≥ 2 % C	EffectorP 1.0	EffectorP 2.0	EffHunter
C1233	93	50	17	31	26	5
Oz2b	71	30	16	19	17	4

A partir de los candidatos a efectores identificados, se realizó una búsqueda de homólogos en la base de datos de PHI. En las Tablas 3.5 y 3.6 se muestran los candidatos a efectores encontrados en la cepa C1233 y Oz2b respectivamente; además se muestra el puntaje obtenido y los dominios InterPro Scan identificados. Diez (10) de los candidatos a efectores fueron comunes en ambas cepas, 15 candidatos fueron específicos de la cepa C1233 y 6 de la cepa Oz2b.

Tabla 3.5 Características de los probables efectores identificados en las VE's de la cepa C1233 de *P. fijiensis*.

#	ID	Nombre de la proteína	Puntaje	PHI-Blast	Dominios InterProScan
1	M2Z6V3_PSEFD	Hce2 domain-containing protein	6	57.67 % de identidad con <i>Pseudomonas fulva</i> ecp2	Ecp2 effector protein
2	M3AQ60_PSEFD	Uncharacterized protein	5	-	-
3	M3B1T0_PSEFD	Uncharacterized protein	5	-	YjgF/YER057c/UK114 family RidA family

4	M2YIX0_PSEFD	Uncharacterized protein	5	77.86 % de identidad con <i>Alternaria alternata</i> BRM2	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR
5	M3AI15_PSEFD	Uncharacterized protein	5	-	Ribosomal protein S9
6	N1Q872_PSEFD	Uncharacterized protein	5	-	-
7	M3ARY7_PSEFD	SCP domain-containing protein	5	-	CAP domain Cysteine-rich secretory protein-related
8	M3B2C2_PSEFD	Uncharacterized protein	4	75.19 % de identidad con <i>Parastagonospora nodorum</i> Mdh1	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR
9	M2Z8L2_PSEFD	Uncharacterized protein	4	56.54 % de identidad con <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> THR1	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR
10	M3AXI2_PSEFD	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	4	42.22 % de identidad con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ndk	Nucleoside diphosphate kinase-like domain
11	M3B5A0_PSEFD	Superoxide dismutase [Cu-	4	80.52 % de identidad con	Superoxide dismutase,

		Zn] (EC 1.15.1.1)		<i>Botrytis cinerea</i> BcSOD1	copper/zinc binding domain
12	M2Z7G1_PSEFD	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	4	-	Triosephosphate isomerase
13	M3AW28_PSEFD	Uncharacterized protein	4	-	-
14	M3B255_PSEFD	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	4	69.52 % de identidad con <i>B. cinerea</i> BCP1	Cyclophilin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase domain
15	N1QCW5_PSEFD	Ribosomal protein	4	-	Ribosomal protein L1/ribosomal biogenesis protein
16	M2ZCN1_PSEFD	Uncharacterized protein	4	-	Ribosomal protein S11
17	M3ASW8_PSEFD	SnoaL-like domain-containing protein	4	-	SnoaL-like domain
18	M3A4N0_PSEFD	Uncharacterized protein	4	-	Ribosomal protein L11, N-terminal Ribosomal protein L11/L12 Ribosomal protein L11, C-terminal

19	N1Q8N6_PSEFD	Thioredoxin domain-containing protein	4	80.09 % de identidad con <i>Magnaporthe oryzae</i> MoPRX1	Peroxiredoxin, C-terminal Alkyl hydroperoxide reductase subunit C/ Thiol specific antioxidant
20	N1Q871_PSEFD	Abhydrolase_2 domain-containing protein	4	-	Phospholipase/carboxylesterase/thioesterase
21	M2ZQ86_PSEFD	Uncharacterized protein (Fragment)	4	-	-
22	M3A269_PSEFD	Uncharacterized protein	4	-	GroES chaperonin family
23	M3ADL0_PSEFD	SBDS domain-containing protein	4	-	Ribosome maturation protein SBDS, N-terminal
24	M3API1_PSEFD	Flavodoxin-like domain-containing protein	4	68.16 % de identidad con <i>M. oryzae</i> MoYcp4	NADPH-dependent FMN reductase-like Flavoprotein WrbA-like
25	N1Q8R7_PSEFD	ATP synthase subunit 5, mitochondrial	4	-	ATPase, OSCP/delta subunit

Tabla 3.6 Características de los probables efectores identificados en las VE's de la cepa Oz2b de *P. fijiensis*.

#	ID	Nombre de la proteína	Puntaje	PHI-Blast	Dominios InterProScan
1	M2Z6V3_PSEFD	Hce2 domain-containing protein	6	57.67 % de identidad con <i>P. fulva</i> ecp2	Ecp2 effector protein
2	M3ARY7_PSEFD	SCP domain-containing protein	5	-	CAP domain Cysteine-rich secretory protein-related
3	N1Q872_PSEFD	Uncharacterized protein	5	-	-
4	M3B081_PSEFD	Uncharacterized protein (Fragment)	5	60.71 % de identidad con <i>P. nodorum</i> SP1	Cerato-platanin
5	M2YZ45_PSEFD	Uncharacterized protein	5	-	-
6	M2YIX0_PSEFD	Uncharacterized protein	5	77.86 % de identidad con <i>A. alternata</i> BRM2	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR
7	M3A269_PSEFD	Uncharacterized protein	4	-	GroES chaperonin family
8	M3ADL0_PSEFD	SBDS domain-containing protein	4	-	Ribosome maturation protein SBDS, N-terminal
9	M2ZQ86_PSEFD	Uncharacterized protein (Fragment)	4	-	-
10	M2YTF6_PSEFD	Uncharacterized protein	4	-	Protein of unknown function DUF1993
11	M3AW28_PSEFD	Uncharacterized protein	4	-	-
12	M3B255_PSEFD	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	4	69.52 % de identidad con <i>B. cinerea</i> BCP1	Cyclophilin-type peptidyl-prolyl cis-

		(PPlase) (EC 5.2.1.8)			trans isomerase domain
13	M3AMG3_PSEFD	Uncharacterized protein	4	-	-
14	M3B2C2_PSEFD	Uncharacterized protein	4	75.19 % de identidad con <i>P. nodorum</i> Mdh1	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR
15	N1QB11_PSEFD	zf-Tim10_DDP domain-containing protein	4	-	Tim10-like
16	M2YR57_PSEFD	Uncharacterized protein	4	-	-

3.8.1.1 Candidatos a efectores exclusivos de las VE's de la cepa C1233

De los candidatos a efectores encontrados exclusivamente en C1233, 5 (M3AQ60, M3B1T0, M3AI15, M2ZCN1 Y M3A4N0) corresponden a proteínas no caracterizadas, no presentaron homología con ninguna proteína de la base de datos PHI. Con base en el análisis de BLASTP, la proteína M3AQ60_PSEFD también se encuentra presente en *P. musae* y *P. eumusae*; sin embargo, su función es desconocida. De manera similar, M3B1T0_PSEFD cuenta con homólogos en *P. fuligena*, *P. musae* y *P. eumusae*. La proteína M3AI15_PSEFD tiene homólogos en *P. fuligena* y *P. musae*. La proteína M2ZCN1 tiene una proteína homóloga únicamente en *P. musae*, mientras que para la proteína M3A4N0 se encontró únicamente un homólogo en *P. eumusae*.

La proteína M2Z8L2 también está clasificada como una proteína no caracterizada en *P. fijiensis* pero presentó un 56.54 % de identidad con la proteína THR1 de *Sclerotinia sclerotiorum*, la cual es una trihidroxinaftaleno reductasa que participa en la ruta de biosíntesis de pentacétidos, a través de la cual la melanina DHN se produce, y su actividad parece estar involucrada en la maduración del esclerocio (Liang *et al.*, 2018).

La proteína M3AXI2_PSEFD fue clasificada como nucleósido difosfato quinasa, y presentó un 42.22 % de identidad con la proteína Ndk de *P. aeruginosa*. La proteína Ndk es secretada

al exterior de *P. aeruginosa* y se ha demostrado que es importante en la patogenicidad y regulación de rutas asociadas a la virulencia bacteriana, como la síntesis de ADN/ARN, división celular y síntesis de alginato (Sundin *et al.*, 1996); en un trabajo más reciente se descubrió que Ndk es capaz de regular la virulencia a través de la percepción de moléculas asociadas a quorum sensing en el hospedero (Yu *et al.*, 2016).

La proteína M3B5A0_PSEFD tiene 80.52 % de identidad con la proteína BcSOD1 de *Botrytis cinerea*, la cual contribuye a la virulencia del patógeno mediante la producción de especies reactivas de oxígeno, cabe mencionar que *B. cinerea* es un hongo necrotrófico, por lo que es capaz de alimentarse del tejido muerto (Rolke *et al.*, 2004).

La proteína N1Q8N6_PSEFD presentó alta identidad (80.09 %) con la proteína MoPRX1 de *M. oryzae*, la cual está involucrada en el desarrollo fúngico y la desintoxicación del estallido oxidativo (Mir *et al.*, 2015).

N1Q871_PSEFD tiene un 35.40 % de identidad con la proteína XC_0646 de la bacteria *X. campestris*, pero no se sabe si ésta afecta la virulencia de la bacteria (O'Connell *et al.*, 2013). Tanto en XC_0646 como en N1Q871_PSEFD se identificó la presencia del dominio de carboxil transferasa.

M3API1_PSEFD presentó un 68.16 % de identidad con el factor de transcripción MoYcp4 de *M. oryzae*, el cual se ha reportado necesario para la patogenicidad en dicho hongo, además de estar involucrado en su crecimiento y conidiogénesis (Chen *et al.*, 2017).

Hubo un grupo de candidatos a efectores en los que no se identificaron homólogos en la base de datos PHI, pero si fue posible relacionarles algún dominio. En la proteína M2Z7G1_PSEFD se identificó un dominio de Triosa fosfato isomerasa, por lo que puede estar involucrada en la degradación de carbohidratos; en N1QCW5_PSEFD se identificó el dominio: Proteína ribosómica L1 y Proteína de biogénesis ribosómica; en M3ASW8_PSEFD se predijo un dominio SnoaL; y en N1Q8R7_PSEFD se identificó el dominio de ATPase_OSCP/dsu.

3.8.1.2 Candidatos a efectores exclusivos de las VE's de la cepa Oz2b

La proteína M3B081_PSEFD obtuvo un 60.71 % de identidad con la proteína SP1 de *Phaeosphaeria nodorum*, la cual es una proteasa extracelular involucrada en la degradación de la pared celular del hospedero (Carlile *et al.*, 2000). En una mutante de *P. nodorum* en la cual se eliminó el gen que codifica a SP1 no se afectó la patogenicidad, pero se observó 50 % de reducción de la actividad total de proteasa alcalina (Bindschedler *et al.*, 2003). Por otra parte, también se identificó el dominio de Ceratoplatanina; estas proteínas pueden actuar como inductores (elicitores) de la defensa en las plantas, participan en la remodelación de la pared celular fúngica y pueden actuar como facilitadores de la penetración mecánica durante la infección en plantas (Bacelli, 2015).

La proteína M2YTF6_PSEFD fue clasificada en la base de datos del Uniprot como “Proteína no caracterizada”, y el único dominio encontrado fue “Proteína de función desconocida DUF1993”, cuenta con homólogos en *P. eumusae*, *P. fulinea* y *P. musae*, aunque su función es desconocida. De manera similar, M3AMG3_PSEFD, M2YR57_PSEFD y M2YZ45_PSEFD fueron identificadas como proteínas no caracterizadas, pero no fue posible asignarles ninguna familia y no se encontraron homólogos en la base de datos PHI.

No se identificaron homólogos en la base de datos PHI de la proteína N1QB11_PSEF; sin embargo, se identificó el dominio Tim10, el cual es un dominio con cuatro residuos de cisteína conservados que participan en la unión a zinc y suelen estar involucrados en la importación de proteínas mitocondriales (Paschen *et al.*, 2000).

3.8.1.3 Candidatos a efectores de las VE's compartidos por ambas cepas

Entre las proteínas comunes de ambas cepas destaca la proteína M2Z6V3_PSEFD, que presenta 57.67 % de identidad con el efector caracterizado Ecp2, el cual ya ha sido identificado en *P. fijiensis* (Noar y Daub, 2016; Burgos-Canul *et al.*, 2019) aunque su función sigue siendo desconocida.

La proteína M2YIX0_PSEFD, no obstante de ser una proteína no caracterizada, tiene 77.86 % de identidad con la proteína BRM2 de *Alternaria alternata*, la cual es una 1,3,8-trihidroxinaftaleno reductasa y está involucrada en la biosíntesis de melanina (Kheder *et al.*, 2012).

En M3ARY7_PSEFD se identificó el dominio CAP, el cual es parte de una superfamilia con muchos miembros. Dicho dominio forma un pliegue de tres capas alfa-beta-alfa que se encuentran en las proteasas (Gibbs *et al.*, 2008). Por otra parte, se identificó la familia de proteínas secretadas ricas en cisteína, familia a la que también pertenecen las proteínas de patogénesis vegetal de la familia PR-1, las cuales son sintetizadas durante la infección por patógenos u otras respuestas relacionadas a estrés (Dixon *et al.*, 1991). Sin embargo, no se encontraron homólogos en la base de datos PHI.

La proteína M3B2C2_PSEFD presentó 75.19 % de identidad con la proteína Mdh1 de *P. nodorum*, la cual es una manitol 2-deshidrogenasa, y participa en el metabolismo del manitol (Solomon *et al.*, 2006).

La base de datos UniProt propone el nombre “Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)” para la secuencia proteica M3B255_PSEFD, en dicha secuencia también se identificó el dominio peptidil-prolil cis-trans isomerasa de tipo ciclofilina. Dicho dominio cataliza la isomerización cis-trans de enlaces peptídicos imídicos de prolina en oligopéptidos, acelerando el plegamiento de proteínas además de tener otras funciones similares a las chaperonas (Fischer y Schmid, 1990). También se encontró 69.52 % de identidad con la proteína BCP1 de *B. cinerea*, una ciclofilina A, se ha encontrado importante en la virulencia, posiblemente en la penetración de las células de planta o durante el crecimiento *in planta* (Viaud *et al.*, 2003).

La proteína M3A269_PSEFD fue clasificada como proteína no caracterizada, y tampoco se encontraron homólogos en la base de datos PHI, aunque si se pudo identificar la familia chaperonina GroES,

En la secuencia M3ADL0_PSEFD solo fue posible identificar el dominio Ribosome maturation protein SBDS, N-terminal; los miembros de dicha familia participan en el metabolismo de ARN (Menne *et al.*, 2007).

Finalmente, en los candidatos M3AW28_PSEFD, M2ZQ86_PSEFD y N1Q872_PSEFD no se encontraron homólogos en la base de datos PHI ni fue posible identificar alguna familia a la que pertenecieran ni dominio proteico. En los tres casos se identificaron homólogos en *P. fuligena*, *P. musa*, y *P. emusae*, los cuales son hongos parientes cercanos de *P. fijiensis*.

3.9 Efecto del contenido de las VE's en hojas de banano

Los efectos de la aplicación de las distintas muestras (VE's y controles) en las hojas de banano se observan en la Figura 3.15. En todos los puntos inoculados se observaron pequeñas lesiones necróticas, aunque las mayores correspondieron a la aplicación de PBS 1X; no obstante, las VE's también ocasionaron lesiones que fueron mayores a las producidas por los controles de corte y agua (Figuras 3.16-3.19).

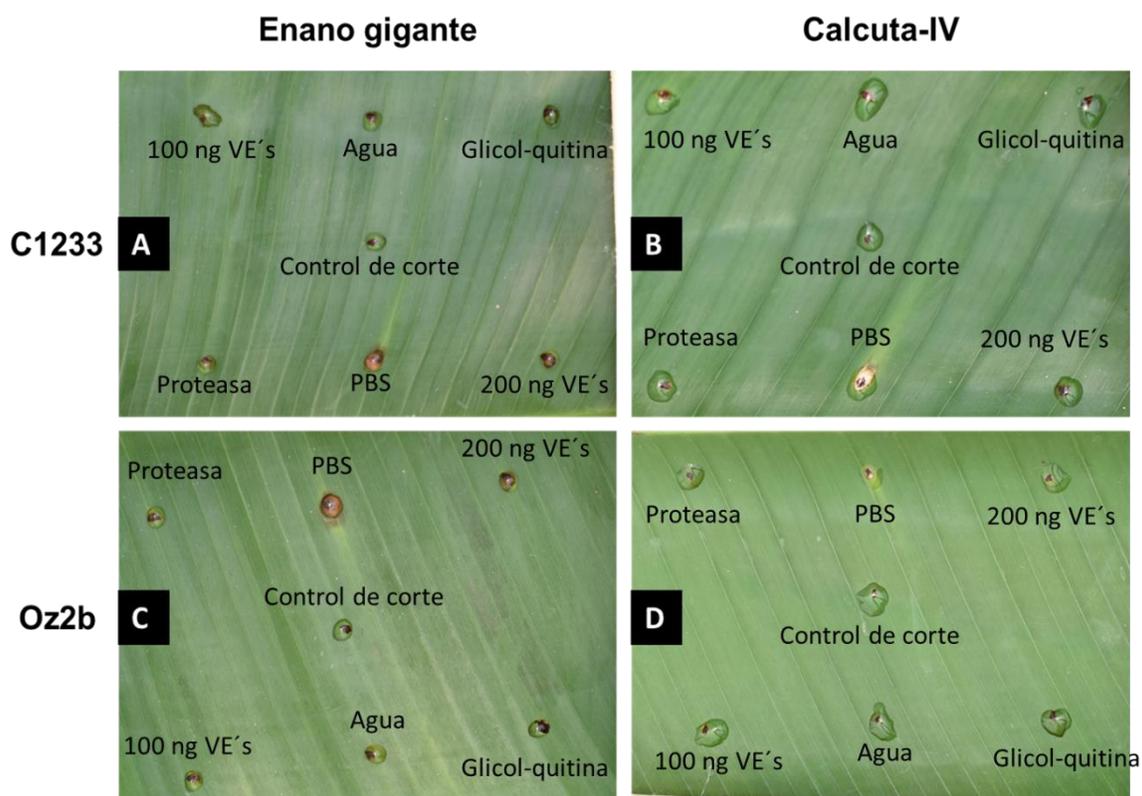


Figura 3.15 Fotografías representativas de las hojas de banano, 96 horas después de la infiltración con las VE's. Panel A) Hoja de banano cultivar Enano Gigante inoculado con VE's de la cepa C1233, Panel B) Hoja de banano cultivar Calcuta-IV inoculada con VE's de la cepa C1233, Panel C) Hoja de banano cultivar Enano Gigante inoculada con VE's de la cepa Oz2b, Panel D) Planta de banano cultivar Calcuta-IV inoculada con VE's de la cepa Oz2b.

Las lesiones producidas por las VE's en las plantas de banano, parecen ser dependientes de la dosis, debido a que las lesiones fueron mayores al aplicar 200 ng de proteína en comparación con las lesiones producidas por la aplicación de 100 ng. Sin embargo, no se

puede descartar que este aumento en el tamaño de lesión se deba al incremento del PBS, amortiguador en el cual se encontraban resuspendidas las VE's.

En la Figura 3.16, se aprecia que las lesiones producidas por la proteasa fueron menores incluso que las producidas por el agua, aunque puede deberse a que la lesión producida con el bisturí antes de la inoculación sea mayor en el caso del sitio de aplicación del agua y la glicol-quitina, como se observa en los tamaños de lesión a las cero horas. Sin embargo, algo similar se puede observar en la Figura 3.17, correspondiente a la inoculación en el mismo cultivar, y en el cual la proteasa genera escasa respuesta hipersensible. Las lesiones ocasionadas por la glicol-quitina incrementaron con el tiempo (Figura 3.16), lo que parece sugerir que la inoculación con glicol-quitina produce una rápida respuesta hipersensible, en Enano Gigante. Esto se basa en el hecho de que durante el periodo de tiempo que transcurrió desde la inoculación a la toma de la foto (aproximadamente 40 minutos), ya se observa una reacción por parte de la planta. Sin embargo, se deben realizar más estudios para corroborar estas observaciones.

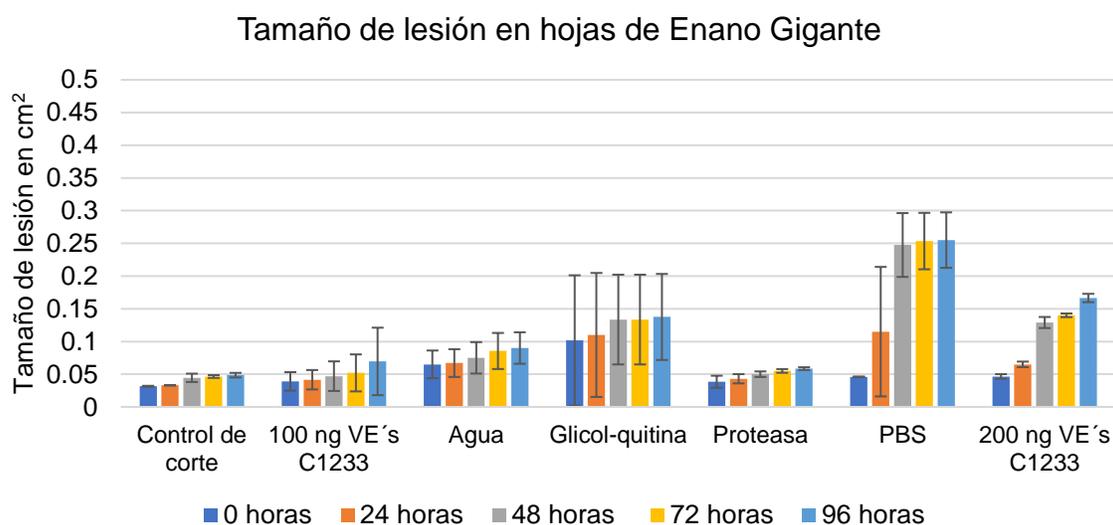


Figura 3.16 Promedios de los tamaños de lesión en plantas de Enano Gigante infiltradas con VE's de la cepa C1233 de *P. fijiensis* y controles. Las barras representan la desviación estándar.

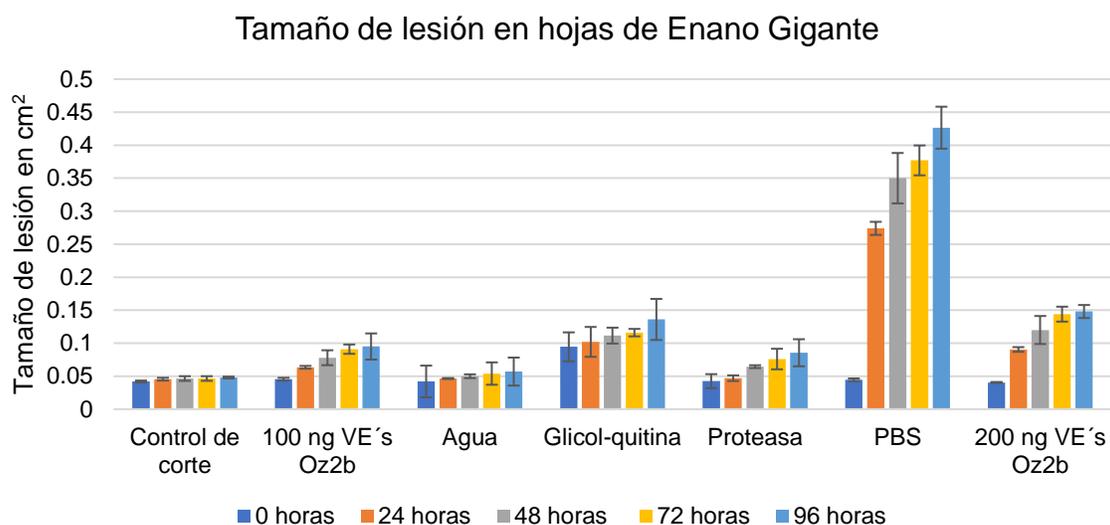


Figura 3.17 Promedios de los tamaños de lesión en plantas de Enano Gigante infiltradas con VE's de la cepa Oz2b de *P. fijiensis* y controles. Las barras representan la desviación estándar.

En las plantas de Calcuta-IV, la reacción de las hojas fue menor que la producida en las plantas de Enano gigante, particularmente en las inoculaciones con Glicol-quitina, en las que después de 48 horas se observa un tamaño de lesión mayor a 0.1 cm² en las plantas de Enano gigante y en las plantas de la variedad Calcuta-IV apenas superan .05 cm². Algo similar ocurrió con la inoculación de 200 ng de VE's (Figuras 3.17 y 3.18).

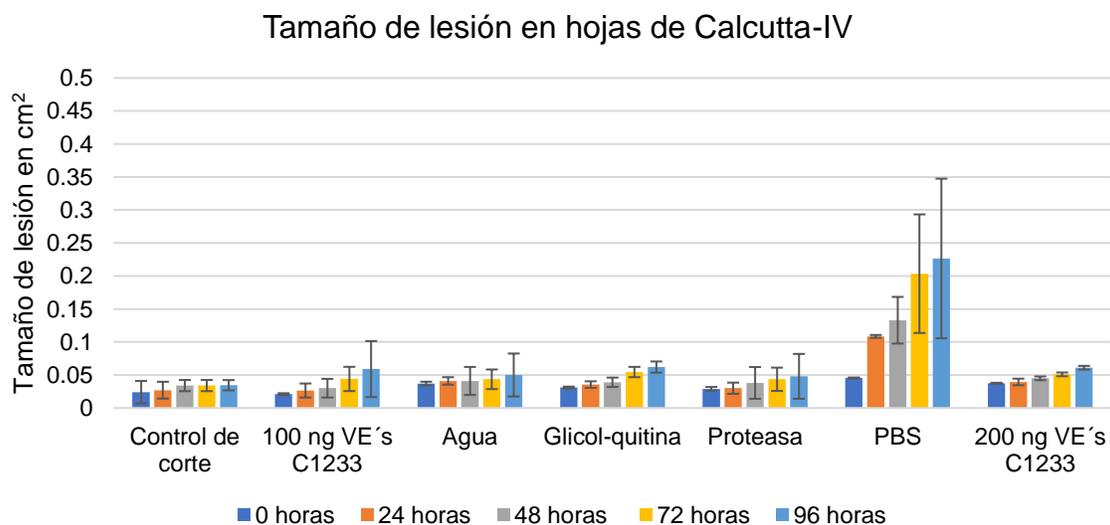


Figura 3.18 Promedios de los tamaños de lesión en plantas de Calcuta-IV infiltradas con VE's de la cepa C1233 de *P. fijiensis* y controles. Las barras representan la desviación estándar.

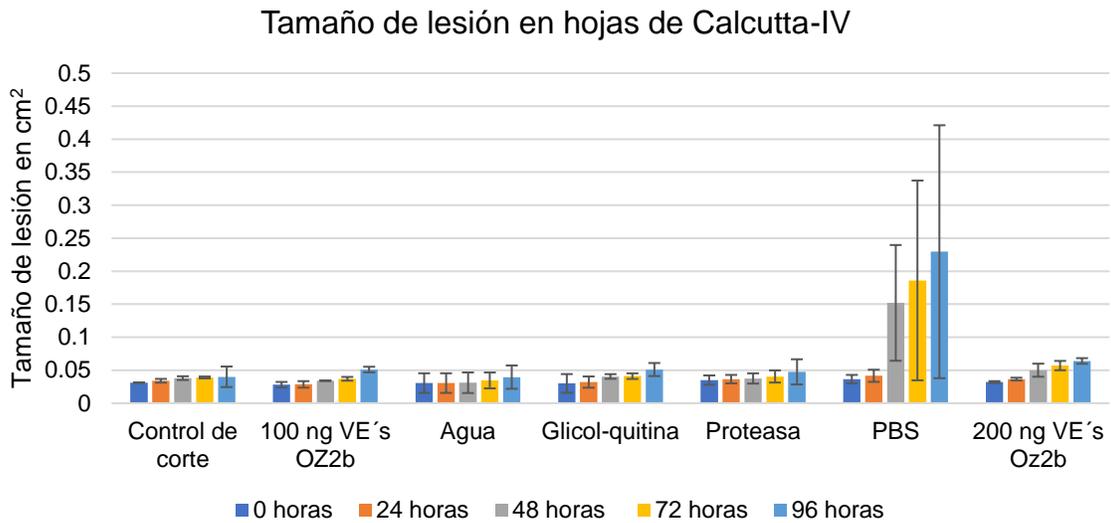


Figura 3.19 Promedios de los tamaños de lesión en plantas de Calcutta-IV infiltradas con VE's de la cepa Oz2b de *P. fijiensis* y controles. Las barras representan la desviación estándar.

La comparación entre el tamaño de la lesión producida por la aplicación de 200 ng de VE's (Figura 3.20) mostró diferencias de respuesta entre los cultivares del banano estudiado. Las lesiones producidas en la variedad Calcutta-IV fueron menores a las producidas en Enano gigante. Además, en las plantas de Calcutta-IV no influyó la cepa de procedencia de las VE's, ya que para ambas cepas el tamaño de lesión fue similar.

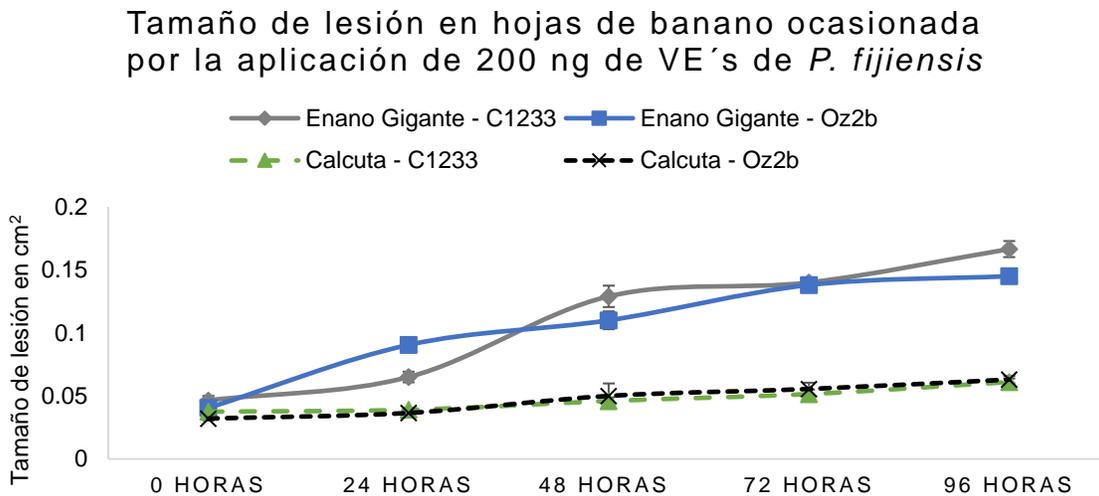


Figura 3.20 Promedios de los tamaños de lesión en hojas de banano ocasionada por la aplicación de 200 ng de VE's de *P. fijiensis*. Las barras representan la desviación estándar.

4. CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas C1233 y Oz2b

Tomando como referencia el peso seco, el crecimiento de la cepa Oz2b fue ligeramente superior con respecto a la cepa C1233; las curvas de crecimiento fueron muy similares comparadas con las obtenidas por Burgos-Canul *et al.* (2019), quienes reportaron el crecimiento de estas mismas cepas durante un periodo de 12 días.

La determinación de la cinética de crecimiento permitió recuperar a las VE's a la mitad de su fase exponencial de crecimiento y así reducir la posible contaminación de las VE's con cuerpos apoptóticos que pudieran generarse si el tejido se colecta cuando haya un índice de muerte celular alto (Willms *et al.*, 2016); además de prevenir que se detecten proteínas liberadas como parte de una fuga citoplasmática (Longo *et al.*, 2014). Adicional a lo anterior, es importante subrayar el hecho de que las VE's son tanto liberadas como incorporadas por las células, por lo que una concentración celular alta puede reducir la cantidad de VE's recuperables a partir del sobrenadante.

4.2 Aislamiento de vesículas extracelulares mediante ultracentrifugación o paquete comercial

La metodología de aislamiento de vesículas extracelulares de *P. fijiensis* mediante ultracentrifugación se realizó utilizando una combinación de las metodologías propuestas por Kowal *et al.* (2017) y Silva *et al.* (2014); se escogieron dichas metodologías debido a que Silva *et al.* (2017) realizó exitosamente la extracción de VE's a partir de *Alternaria infectoria*, el cual es un hongo filamentosos, como lo es también *P. fijiensis*, algo destacable dado que la mayoría de los aislamientos de VE's fúngicas se han realizado con hongos de tipo levaduriforme (Rodrigues *et al.*, 2017; Albuquerque *et al.*, 2008; Vallejo *et al.*, 2011; Johansson *et al.*, 2018; Ikeda *et al.*, 2018; Bielska *et al.*, 2018; Leone *et al.*, 2018). La metodología propuesta por Kowal *et al.* (2017) al igual que la propuesta por Silva *et al.* (2017) emplea pasos de filtración a través de membranas con tamaño de poro de 0.22 y 0.45 μm respectivamente; en ambas metodologías se realizan un total de seis pasos. Da Silva propone un primer paso de centrifugación para la eliminación de células, seguido de una filtración a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.45 μm , la

concentración del filtrado con ayuda de un sistema de ultrafiltración Amicon y una ultracentrifugación a 60,000 rpm durante una hora seguido de dos lavados con PBS. Por el otro lado Kowal propone dos centrifugaciones sucesivas, la primera para eliminar células y la segunda para la eliminación de restos celulares, posteriormente plantea una tercera centrifugación a 16,000 x g para la eliminación de agregados y finalmente la filtración y el paso final de ultracentrifugación a 120,000 x g seguido de un solo lavado con PBS 1X. Es importante notar que la metodología propuesta por Kowal no incluye el proceso de concentración, esto se debe a que dicho protocolo está optimizado para exomas provenientes de células de mamíferos, de las cuales se obtiene una mayor cantidad de VE's presumiblemente debido a que no poseen pared celular (Brown *et al.*, 2015).

Al adaptar las metodologías anteriores al aislamiento de VE's de *P. fijiensis* se realizaron ajustes de acuerdo a los resultados obtenidos, se probaron distintos tiempos y velocidades de centrifugación, se añadió un paso de filtración y una centrifugación después de la concentración. Mediante estas modificaciones se logró la purificación exitosa de VE's de *P. fijiensis*. Esto se comprobó mediante microscopía y el análisis de tamaño de las VE's mediante DLS; con base en los resultados obtenidos, el método implementado para el aislamiento de VE's puede posiblemente ser empleado en otros hongos filamentosos.

El aislamiento de VE's utilizando el paquete comercial "Cell Culture Media Exosome Purification Kit" de la marca Norgen fue infructuoso; esto puede deberse a que el paquete comercial fue diseñado y optimizado para muestras de células de mamíferos, no para cultivos de bacterias y hongos. El fabricante recomendó ajustar la muestra a pH 9 antes de realizar el protocolo, aunque se ajustó el pH, no se lograron obtener VE's del medio de cultivo de *P. fijiensis*.

En lo que respecta al protocolo de aislamiento de VE's por ultracentrifugación: tras el último paso de ultracentrifugación, se obtuvo una pastilla que corresponde a las VE's purificadas. En varios reportes se menciona que la pastilla obtenida suele ser imperceptible para el ojo humano (Nakai *et al.*, 2016; Kenigsberg *et al.*, 2017), en este trabajo las pastillas de las VE's de *P. fijiensis* fueron de color negro, lo que permite que las pastillas sean visibles. El color fue más intenso en las VE's de la cepa Oz2b. Este fenómeno del color de las VE's también fue reportado para las VE's de *F. oxysporum* f. sp. vasinfectum (Bleackley *et al.*, 2020), las cuales mostraron un color púrpura; vale la pena mencionar que el micelio de *F.*

oxysporum es de color púrpura, y los autores, mediante un experimento de coprecipitación, concluyeron que el pigmento era transportado dentro de las VE's (Bleackley *et al.*, 2020).

En algunas VE's fúngicas se ha detectado la presencia de lacasa, una enzima tradicionalmente asociada a la deposición de melanina en la pared celular (Eisenman *et al.*, 2009). En *C. albicans* se han observado vesículas emergiendo de células melanizadas, durante la melanización de la pared celular. Las estructuras eran redondas, con una alta densidad electrónica y con dimensiones similares a las reportadas en este estudio (Walker *et al.*, 2010), lo que apoya la participación de las VE's en el proceso de melanización.

P. fijiensis es conocido por ser un hongo melanizado, y es muy posible que el pigmento sea transportado por VE's de manera similar a como ocurre con *Fusarium oxysporum*. En esta ocasión, después de la secuenciación del proteoma de las VE's de *P. fijiensis* no se identificó ninguna lacasa.

4.3 Observaciones mediante microscopía

Durante las observaciones mediante microscopía electrónica de barrido, utilizando el colorante rojo Nilo se obtuvo una buena tinción de las micelas de manteca de cerdo, aunque la tinción fue mucho menor en las VE's de *P. fijiensis*; esto puede deberse a la baja cantidad de lípidos presentes en las muestras. Otra posible explicación son las diferencias en la composición de lípidos; la manteca de cerdo está compuesta principalmente de ácidos grasos, los cuales se distribuyen de la siguiente manera: Oleico (~55 %), Palmítico (~21 %), Esteárico (~9.5%), Linoleico (~8.5%) y ~6 % de otros ácidos grasos (Porrás *et al.*, 2007); por otro lado, en las VE's fúngicas se han identificado principalmente fosfolípidos, ergosterol y brassicasterol (Cassilly y Reynolds, 2018); además la composición de lípidos en las VE's puede variar entre las especies, como ilustra el caso de *P. brasiliensis*, en el cual el brassicasterol es el esteroide predominante en las VE's. En otras especies el ergosterol suele ser el ácido graso más abundante (Vallejo *et al.*, 2012a). Debido a que los principales componentes lipídicos de las VE's y de la manteca de cerdo son lípidos polares, las diferencias en la composición no parecen ser la razón de la baja señal emitida por las muestras de VE's. El colorante rojo Nilo no fluoresce en la gran mayoría de solventes polares, pero en un ambiente hidrofóbico fluoresce intensamente (Greenspan *et al.*, 1985),

por lo que es posible que la cantidad de lípidos presentes en la muestra no sea suficiente para observar la señal.

Otros colorantes han mostrado ser eficientes para la tinción de VE's; los colorantes Dil y DiD-DS han sido eficientes en la tinción de VE's de *C. neoformans* (Nicola *et al.*, 2009), ambos colorantes poseen afinidad por la bicapa lipídica, por lo que el uso de un colorante con mayor especificidad pueda aumentar el número de VE's observables.

La apariencia de las VE's de *P. fijiensis* en las imágenes de microscopía confocal fue de puntos sólidos y no de un anillo, como se esperaría de una estructura vesicular; sin embargo, esto es debido a que el diámetro de las vesículas es igual o menor a la máxima resolución teórica alcanzada por el microscopio.

La observación de las VE's mediante microscopía electrónica de barrido también planteó sus propias dificultades, principalmente durante la etapa de fijado y deshidratación de las VE's. Durante estos pasos las VE's debían ser sumergidas en soluciones acuosas y los contenedores disponibles en ese momento tenían un tamaño de poro mayor a 1 μm , lo cual hubiera permitido la fuga de las VE's. La falta de un contenedor adecuado se resolvió utilizando un microcón YM-10 (Millipore), el cual cuenta con un filtro de corte de 10 kDa; el microcón se selló con dos capas de membrana de diálisis de tamaño de corte de 3.5 kDa. Debido a que durante la concentración de las VE's se utilizó un filtro de 100 kDa, las VE's recuperadas deberían de ser superiores a dicho tamaño, por lo que no había riesgo de pérdida de VE's al usar el microcón y la membrana.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de las VE's no mostraron esferas perfectas; no obstante, este mismo fenómeno ha sido reportado por varios autores (Giardina *et al.*, 2014, Bleackley *et al.*, 2020) y se debe al proceso de fijación y deshidratación de las VE's, por lo que su morfología suele ser en forma de "rosetas" y semiesféricas con los bordes ondulados.

4.4 Medición del tamaño de las VE's mediante DLS

Los reportes de los tamaños de VE's fúngicas obtenidas mediante DLS en este estudio, son similares a los observados en la Tabla 4.1; además en varias especies fúngicas se observan dos subpoblaciones, las cuales corresponden a los exosomas y microvesículas.

En el caso de las VE's de *P. fijiensis* no se observan claramente estas dos subpoblaciones, esto pudo deberse a la fusión o a la agregación de las VE's durante su almacenamiento; no obstante, su tamaño quedo dentro del rango de tamaño descrito para poblaciones de VE's de diferentes especies fúngicas. En la Tabla 4.1 también se puede observar que los tamaños de las VE's son variables, incluso en una misma especie, existiendo rangos que van desde los 200 a los 1000 nm como en el caso de *C. albicans*; el tamaño de las VE's de *P. fijiensis* se ubica dentro del rango reportado para las VE's fúngicas.

Tabla 4.1 Tamaño de las VE's fúngicas estimado mediante DLS.

Especie	Tamaño de VE's estimado mediante DLS
<i>Cryptococcus neoformans</i>	10 a 150 nm y 400 a 1000 nm 40 a 80 y 120 a 230 nm 20 a 120 y 200 a 400 nm
<i>Histoplasma capsulatum</i>	40 a 60 nm y 170 a 250 nm
<i>Candida albicans</i>	50 a 100 nm y 350 a 850 nm 30 a 200 nm y 200 a 1000 nm
<i>Alternaria infectoria</i>	50 a 100 nm
<i>Pseudocercospora fijiensis</i>	25 a 250 nm y 25 a 500 nm

Modificado de Bielska *et al.* (2019), excepto *P. fijiensis* que corresponde al presente estudio.

4.5 Análisis bioinformático de los proteomas de las VE's aisladas a partir de las cepas C1233 u Oz2b

Combinando los proteomas de las VE's de ambas cepas, se obtuvieron un total de 130 distintas secuencias proteicas; para otras especies de hongos, el número de proteínas encontradas va desde los 20, en el caso de *A. infectoria* (Silva *et al.*, 2014); hasta 2439 para *Malassezia sympodialis* (Johansson *et al.*, 2018). Los dos reportes más recientes de VE's de hongos con identificación de proteínas corresponden a *A. fumigatus* (Souza *et al.*, 2019), en el cual se encontraron 60 secuencias peptídicas; y a *F. oxysporum* f. sp.

vasinfectum (Bleackley *et al.*, 2020), con un reporte de 482 proteínas identificadas. Las 130 proteínas identificadas en este trabajo proporcionan una buena fuente de información para estudiar el fenómeno de las VE's en *P. fijiensis*, así como de su contenido proteico.

El 30 % del total de las proteínas identificadas fue común entre ambas cepas, y las clasificaciones en la Ontología de Genes, la distribución de las familias proteicas, y la asignación de códigos enzimáticos fueron similares para los proteomas de las VE's de C1233 y Oz2b, a pesar que una cepa es más virulenta que la otra (Burgos-Canul *et al.*, 2019). Esto se puede deber al bajo rendimiento de proteínas de las VE's, por lo que es posible que las proteínas identificadas sean las mayoritarias y no el proteoma completo de las VE's de estas cepas; por otro lado, ambas cepas son patogénicas así que pudiera ser que se transporten proteínas similares en ambas cepas. No se puede descartar que, al haber tenido problemas en la secuenciación, se enmascaró o perdió información valiosa de Oz2b y que ello evitó que se detectara su proteoma diferencial y con ello se pudiera entender por qué la cepa es más virulenta. Al igual que en el trabajo de Burgos-Canul *et al.* (2019), la cepa Oz2b presentó un menor número de proteínas, lo que sugiere que, al menos en parte, su virulencia puede estar relacionada con la mayor expresión de proteínas particulares y no con el número de diferentes proteínas presentes en sus VE's.

Por otro lado, la similitud de resultados en los proteomas encontrados en el presente trabajo puede deberse a que ambas cepas se colectaron en momentos fisiológicos similares (en el mismo punto de crecimiento). En el caso de Burgos-Canul *et al.*, (2019) las muestras se colectaron en el mismo día de cultivo, sin embargo, las cepas C1233 y Oz2b tienen diferente velocidad de crecimiento, por lo que posiblemente se encontraban en diferentes estados fisiológicos. Eso permitió en ese otro reporte observar diferencias en la estructura de la pared, en los proteomas y encontrar proteínas diferenciales probablemente relacionadas con la virulencia de *P. fijiensis*.

El haber colectado las cepas en el mismo estadio fisiológico en el presente trabajo también puede explicar la igualdad de proteínas y los resultados similares obtenidos en las pruebas de infiltración de las hojas de banano en plantas completas. A pesar que los resultados no permitieron discernir la razón de la mayor virulencia de Oz2b, el proteoma obtenido en las VE's se confirma por su similitud con el de C1233, a pesar de las dificultades técnicas que

se tuvieron. Se requiere mayor número de muestras y mayor cantidad de proteína para lograr resultados bioinformáticos estadísticamente robustos.

La comparación de las proteínas vesiculares identificadas aquí y las proteínas reportadas en el proteoma de la pared celular (Burgos-Canul *et al.*, 2019) revela algunas proteínas compartidas (Figura 4.2). En particular, 8 proteínas se encuentran presentes en los 3 proteomas. Y solo dos de ellas cuentan con péptido señal de secreción, M3A6K9 (Módulo de unión a carbohidratos) y M2ZZY5 (glucósido hidrolasa). Es importante notar la presencia de una histona H2B (M2ZZM8) en los tres proteomas, una proteína que fue mencionada por Burgos-Canul *et al.* (2019) como atípica; es ese trabajo especularon que su localización en la pared celular puede deberse al transporte a través de VE's, como se demuestra en el presente trabajo. Tres de las proteínas compartidas están clasificadas como parte del metabolismo de carbohidratos y no poseen péptido señal de secreción, entre ellas dos proteínas malato deshidrogenasa (M2YWQ3 y M3A4J1), y una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (M2Z8T3). También se identificó una glutamina sintetasa (M2Z085) como parte del proteoma compartido. Solo uno de los candidatos a efectores fue encontrado también en el proteoma de la pared celular, la proteína M3B255 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase)).

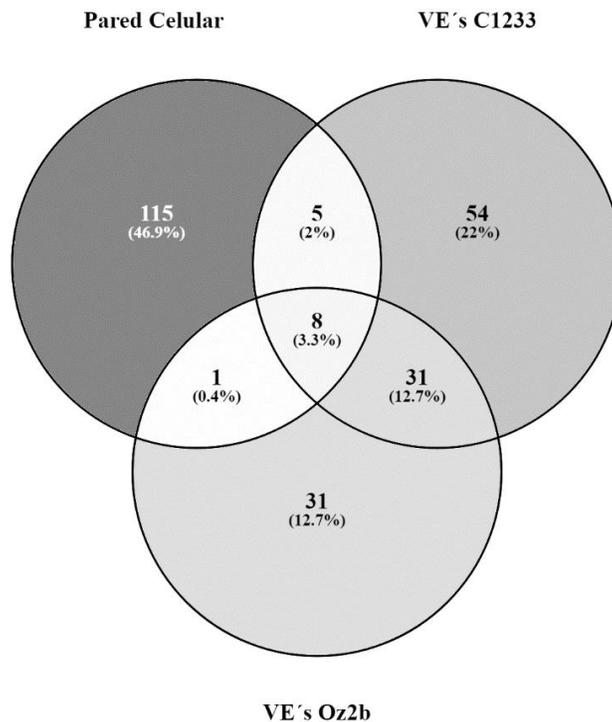


Figura 4.2 Comparación de las secuencias proteicas compartidas entre las VE's de dos cepas de *P. fijiensis* y el proteoma de la pared celular de la misma especie.

El reducido número de proteínas con péptido señal en los proteomas de las VE's de *P. fijiensis* resalta la naturaleza de secreción no canónica de proteínas en las VE's. Además, en los proteomas de las VE's se encontró un número importante de candidatos de efectores, lo que es consistente con el rol de las VE's en la patogénesis y congruente con el nombre de "bolsas de virulencia" que en algunos trabajos se les ha dado (Rodrigues *et al.*, 2008b, Brauer *et al.*, 2020).

Se encontraron diez candidatos a efectores comunes entre ambos proteomas, entre ellos el efector Ecp2, homólogo a la proteína de *Cladosporium fulvum* (De Kock *et al.*, 2004), anteriormente fue descrito como un efector secretado (Escobar-Tovar *et al.*, 2015), sin embargo, es la primera vez que se identifica que es transportado al exterior por medio de las VE's. Es importante resaltar que éste es el primer trabajo que muestra que las VE's son un medio de transporte de proteínas efectoras.

Burgos-Canul *et al.* (2019) identificaron en la pared celular de *P. fijiensis* a los efectores PfAvr4 y PfEcp6, pero no reportaron al efector PfEcp2. Curiosamente en este caso se observó a PfEcp2 pero no a PfAvr4 y PfEcp6, lo que sugiere que estos efectores siguen diferentes rutas en su secreción.

Entre los candidatos a efectores encontrados en la cepa Oz2b destaca la proteína M3B081_PSEFD, que obtuvo 5 de 6 puntos posibles para calificar como efector, debido a que se pudo identificar un homólogo en la base de datos PHI y que posee un dominio de Ceratoplatanina, el cual está involucrado en la interacción planta-patógeno. Además, fue el único candidato de Oz2b en el que fue posible obtener información de la literatura científica, ya que el resto de candidatos únicos se encuentran como proteínas no caracterizadas y no fue posible identificar homólogos en la base de datos PHI. Por lo que hacen falta más estudios para entender las bases de la mayor virulencia que presenta la cepa Oz2b.

4.6 Efecto de la inoculación de las VE's en hojas de plantas de banano

El amortiguador PBS fue la solución que ocasionó la mayor respuesta en los dos cultivares de banano utilizados en el presente trabajo; este resultado puede deberse a la presencia de sodio y potasio en el amortiguador, el cual se encuentra en forma de NaCl (137 mM) y KCl (2.7 mM); se conoce que tanto sodio, cloro y potasio son iones esenciales en el potencial de membrana celular pero particularmente en las células vegetales. Es posible que al aplicar el PBS en solución 1X sin diluir, la concentración de Na²⁺, K⁺ y Cl⁻ fuera mayor a la concentración intracelular y facilitara la muerte celular (Schroeder *et al.*, 2015).

La mayor respuesta a la infiltración de VE's ocurrió en las plantas de Enano gigante, sin embargo, Muñoz-Pérez (2018) y Chuc-Uc *et al.* (2011) han reportado que la infiltración de proteínas de *P. fijiensis* en hojas de banano, Enano gigante, muestra menor respuesta en comparación a una variedad silvestre o al cultivar Calcuta-IV; lo contrario ocurrió en el experimento realizado en este trabajo; para explicar lo anterior hay que tomar en cuenta que la infiltración se realizó con VE's, las cuales están envueltas en una bicapa lipídica, por lo que la proteína no interacciona directamente con la planta. Además, en el reporte de Chuc-Uc *et al.*, (2011), se utilizaron 20 µg de proteína, una cantidad mucho mayor a los 100 y 200 ng empleados en el presente trabajo; y en el reporte de Muñoz-Pérez (2018) se emplearon 150 y 300 ng de la proteína PfAvr4-M electroeluida (proteína purificada y

renaturalizada para recuperar su actividad biológica), por lo que al ser una proteína enriquecida en la muestra, estaba más concentrada y pudo disparar la respuesta hipersensible, mientras que los efectores en las VE's se encuentran diluidos en mezclas complejas con otras proteínas, como mostró la secuenciación.

Por otro lado, la respuesta hipersensible del cultivar Calcuta-IV ha sido atribuida a la presencia en el hospedero de proteínas R aún desconocidas (Muñoz-Pérez, 2018), y como se mencionó anteriormente, las proteínas de las VE's forman una mezcla compleja y se encuentran en pequeñas cantidades, por lo que es posible que las cantidades empleadas no hayan sido suficientes para disparar la inmunidad activada por efectores.

Aunque la aplicación de VE's en las hojas de banano ocasionó lesiones necróticas, no se puede descartar que las lesiones hayan sido producidas por la presencia del amortiguador PBS, esto debido a que, por un error metodológico, la cantidad de PBS aplicada durante la infiltración fue ~4 veces mayor a la cantidad en la cual se encontraban resuspendidas las VE's, por lo que se necesita más investigación en cuanto al efecto de la aplicación de VE's en plantas.

En resumen, este trabajo contribuye a ampliar el conocimiento que tenemos de *P. fijiensis* y su patogénesis, pero también en sentido más amplio a entender la biología de los hongos en general, y de los patógenos en particular. Nuestros datos apoyan que las proteínas atípicas encontradas en la pared celular reportadas por Burgos-Canul *et al.*, (2019) no son producto de la contaminación, sino que son secretadas mediante VE's. Las próximas investigaciones deberán enfocarse a elucidar el papel de tales proteínas en el exterior.

Las VE's han recibido el nombre de "bolsas de virulencia", y su contenido se ha asociado con factores de patogenicidad y factores de virulencia, pero este trabajo es el primero en evidenciar que las VE's son un medio de transporte al exterior de algunos efectores fúngicos. Esto es un hallazgo importante en el área de la efectorómica y abre una nueva ruta de investigación.

5. CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

Se estandarizó un protocolo para el aislamiento de las VE´s provenientes de *P. fijiensis*.

Las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía de contraste de fases muestran estructuras esféricas con tamaños congruentes con los reportados para las VE´s, lo que apoya que si se obtuvieron VE´s de *P. fijiensis*. La tinción realizada con rojo Nilo (el cual es un colorante fluorescente en ambientes hidrofóbicos) tiñó las estructuras, y se comprobó la presencia de proteínas mediante su cuantificación y tinción con nitrato de plata. Adicionalmente, el tamaño de las estructuras determinado mediante DLS concuerda con el tamaño reportado por otros autores que han aislado exitosamente VE´s fúngicas; los resultados obtenidos apoyan a que efectivamente *P. fijiensis* produce y secreta VE´s.

Se encontró que las VE´s participan en el transporte de algunos efectores fúngicos.

Los hallazgos de este trabajo con respecto a la secreción de proteínas por vías no canónicas muestran que este es un mecanismo frecuente y paralelo al de la secreción clásica para ubicar proteínas en el exterior de las células de *P. fijiensis*.

5.2 Perspectivas

Caracterizar más profundamente las VE´s de *P. fijiensis* en su composición y sus cargos, por ejemplo, si contienen RNAs, como ocurre en otras especies fúngicas; éstos también pueden actuar como factores de virulencia, por lo que se debe explorar su presencia en las VE´s.

Profundizar el papel de las VE´s en el transporte de efectores, así como en su composición lipídica y en su función como ruta alterna de secreción proteica y en particular de efectores involucrados en la virulencia de *P. fijiensis*.

Analizar la función de las proteínas atípicas, en la biogénesis y la reestructuración de la pared celular, y en otras funciones de la célula fúngica.

Anexos

Anexo 1 Proteínas identificadas en las VE's de la cepa C1233 de *P. fijiensis*.

#	ID	Nombre de la proteína	#AA
1	M2YIX0_PSEFD	Uncharacterized protein	267
2	M2YR86_PSEFD	2-phosphoglycerate dehydratase (EC 4.2.1.11) (Enolase)	437
3	M2YRA4_PSEFD	Uncharacterized protein	633
4	M2YUX2_PSEFD	Uncharacterized protein	270
5	M2YW74_PSEFD	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC 1.1.1.49)	512
6	M2YWQ3_PSEFD	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	331
7	M2YY93_PSEFD	14_3_3 domain-containing protein	265
8	M2Z085_PSEFD	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	382
9	M2Z2S2_PSEFD	Uncharacterized protein	884
10	M2Z5N8_PSEFD	Glycoside hydrolase family 55 protein	772
11	M2Z6V3_PSEFD	Hce2 domain-containing protein	161
12	M2Z7E9_PSEFD	Uncharacterized protein	188
13	M2Z7G1_PSEFD	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	247
14	M2Z7T5_PSEFD	GYF domain-containing protein	1514
15	M2Z7X3_PSEFD	MFS domain-containing protein	525
16	M2Z8L2_PSEFD	Uncharacterized protein	272
17	M2Z8T3_PSEFD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	338
18	M2Z9P2_PSEFD	Uncharacterized protein (Fragment)	480

19	M2ZCN1_PSEFD	Uncharacterized protein	150
20	M2ZFI7_PSEFD	Glycoside hydrolase family 32 protein	660
21	M2ZL88_PSEFD	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase (EC 1.1.1.17)	383
22	M2ZLF3_PSEFD	14_3_3 domain-containing protein	270
23	M2ZPD9_PSEFD	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein (Fragment)	178
24	M2ZPI5_PSEFD	Histone H3	136
25	M2ZPV3_PSEFD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.44)	494
26	M2ZQ86_PSEFD	Uncharacterized protein (Fragment)	168
27	M2ZRP1_PSEFD	Uncharacterized protein	306
28	M2ZSY8_PSEFD	Uncharacterized protein	666
29	M2ZUW5_PSEFD	FAA_hydrolase domain-containing protein	294
30	M2ZXA8_PSEFD	Uncharacterized protein	150
31	M2ZZM8_PSEFD	Histone H2B	139
32	M2ZZY5_PSEFD	Glycoside hydrolase family 17 protein	373
33	M3A047_PSEFD	Transaldolase (EC 2.2.1.2)	324
34	M3A117_PSEFD	CRAL-TRIO domain-containing protein	347
35	M3A269_PSEFD	Uncharacterized protein	104
36	M3A2T6_PSEFD	Uncharacterized protein	558
37	M3A2X2_PSEFD	Uncharacterized protein	218
38	M3A440_PSEFD	Uncharacterized protein	454
39	M3A4J1_PSEFD	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	344
40	M3A4N0_PSEFD	Uncharacterized protein	165

41	M3A4Z1_PSEFD	ACB domain-containing protein	91
42	M3A6K9_PSEFD	Carbohydrate-binding module family 50 protein	413
43	M3A9A8_PSEFD	Tyrosinase (EC 1.14.18.1)	810
44	M3ADL0_PSEFD	SBDS domain-containing protein	113
45	M3AE59_PSEFD	G protein beta subunit	316
46	M3AFF1_PSEFD	Uncharacterized protein	587
47	M3AH24_PSEFD	Tyrosinase (EC 1.14.18.1)	637
48	M3AI15_PSEFD	Uncharacterized protein	143
49	M3AJM2_PSEFD	Uncharacterized protein	255
50	M3AKW2_PSEFD	Carrier domain-containing protein	2309
51	M3ALM9_PSEFD	Uncharacterized protein	519
52	M3ALX0_PSEFD	Uncharacterized protein	431
53	M3AMX2_PSEFD	ABC transporter, ABC-F family, GCN-EF3 type	1059
54	M3AN16_PSEFD	Kinesin motor domain-containing protein	1663
55	M3AP42_PSEFD	Fructose-bisphosphate aldolase (FBP aldolase) (EC 4.1.2.13)	359
56	M3API1_PSEFD	Flavodoxin-like domain-containing protein	205
57	M3APK2_PSEFD	Uncharacterized protein	76
58	M3AQ45_PSEFD	Uncharacterized protein	265
59	M3AQ60_PSEFD	Uncharacterized protein	150
60	M3AR39_PSEFD	40S ribosomal protein S4	262
61	M3ARW7_PSEFD	Uncharacterized protein	679
62	M3ARY7_PSEFD	SCP domain-containing protein	254

63	M3ASW8_PSEFD	SnoaL-like domain-containing protein	150
64	M3AT95_PSEFD	Uncharacterized protein	326
65	M3ATS3_PSEFD	Catalase-peroxidase (CP) (EC 1.11.1.21) (Peroxidase/catalase)	743
66	M3AV10_PSEFD	Histone H4 (Fragment)	89
67	M3AW28_PSEFD	Uncharacterized protein	185
68	M3AXI2_PSEFD	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	153
69	M3B1T0_PSEFD	Uncharacterized protein	126
70	M3B255_PSEFD	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	189
71	M3B2C2_PSEFD	Uncharacterized protein	266
72	M3B3Z9_PSEFD	Uncharacterized protein	249
73	M3B4X9_PSEFD	Uncharacterized protein	380
74	M3B5A0_PSEFD	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	154
75	M3B5I9_PSEFD	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine S-methyltransferase (EC 2.1.1.14)	769
76	M3B838_PSEFD	Uncharacterized protein (Fragment)	1480
77	M3B8I1_PSEFD	Peroxidase (EC 1.11.1.-) (Fragment)	274
78	M3B8I7_PSEFD	Uncharacterized protein	650
79	M3B972_PSEFD	Uncharacterized protein	155
80	M3BAZ7_PSEFD	Uncharacterized protein	734
81	M3BC80_PSEFD	NmrA domain-containing protein	295
82	M3BCH9_PSEFD	Uncharacterized protein	375
83	N1Q654_PSEFD	ATP synthase subunit delta, mitochondrial (F-ATPase delta subunit)	166

84	N1Q6D5_PSEFD	Uncharacterized protein	127
85	N1Q6W0_PSEFD	Uncharacterized protein	419
86	N1Q7J1_PSEFD	HMG box domain-containing protein	108
87	N1Q871_PSEFD	Abhydrolase_2 domain-containing protein	234
88	N1Q872_PSEFD	Uncharacterized protein	193
89	N1Q8L5_PSEFD	Alpha-acetolactate decarboxylase (EC 4.1.1.5)	234
90	N1Q8N6_PSEFD	Thioredoxin domain-containing protein	226
91	N1Q8R7_PSEFD	ATP synthase subunit 5, mitochondrial	229
92	N1Q8Z0_PSEFD	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	527
93	N1Q952_PSEFD	CFEM domain-containing protein	244
94	N1Q9P0_PSEFD	Uncharacterized protein	1243
95	N1Q9Y1_PSEFD	Elongation factor 1-alpha	459
96	N1QAA0_PSEFD	ATP synthase subunit alpha	550
97	N1QAK8_PSEFD	DYNc domain-containing protein	511
98	N1QCW5_PSEFD	Ribosomal protein	217

Anexo 2 Proteínas identificadas en las VE's de la cepa Oz2b de *P. fijiensis*.

#	ID	Nombre de la proteína	#AA
1	M2YIX0_PSEFD	Uncharacterized protein	267
2	M2YR57_PSEFD	Uncharacterized protein	238
3	M2YR86_PSEFD	2-phosphoglycerate dehydratase (EC 4.2.1.11) (Enolase)	437
4	M2YTF6_PSEFD	Uncharacterized protein	174
5	M2YWK9_PSEFD	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit CBF5	509
6	M2YWQ3_PSEFD	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	331
7	M2YY93_PSEFD	14_3_3 domain-containing protein	265
8	M2YZ45_PSEFD	Uncharacterized protein	211
9	M2Z085_PSEFD	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	382
10	M2Z1E7_PSEFD	Uncharacterized protein	236
11	M2Z5N8_PSEFD	Glycoside hydrolase family 55 protein	772
12	M2Z6V3_PSEFD	Hce2 domain-containing protein	161
13	M2Z7X3_PSEFD	MFS domain-containing protein	525
14	M2Z8T3_PSEFD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	338
15	M2ZKY8_PSEFD	Uncharacterized protein	293
16	M2ZLF3_PSEFD	14_3_3 domain-containing protein	270
17	M2ZPI5_PSEFD	Histone H3	136
18	M2ZPV3_PSEFD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.44)	494
19	M2ZQ86_PSEFD	Uncharacterized protein (Fragment)	168
20	M2ZYU4_PSEFD	Uncharacterized protein	176
21	M2ZZM8_PSEFD	Histone H2B	139

22	M2ZZY5_PSEFD	Glycoside hydrolase family 17 protein	373
23	M3A269_PSEFD	Uncharacterized protein	104
24	M3A2J8_PSEFD	Uncharacterized protein	892
25	M3A2T6_PSEFD	Uncharacterized protein	558
26	M3A2Z9_PSEFD	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (CoA acylating) (EC 1.2.1.27)	543
27	M3A440_PSEFD	Uncharacterized protein	454
28	M3A4J1_PSEFD	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	344
29	M3A6K4_PSEFD	Proteasome subunit beta (EC 3.4.25.1)	273
30	M3A6K9_PSEFD	Carbohydrate-binding module family 50 protein	413
31	M3A893_PSEFD	Uncharacterized protein	113
32	M3A9A8_PSEFD	Tyrosinase (EC 1.14.18.1)	810
33	M3ADL0_PSEFD	SBDS domain-containing protein	113
34	M3AH77_PSEFD	VPS9 domain-containing protein (Fragment)	628
35	M3AMG3_PSEFD	Uncharacterized protein	214
36	M3AMX2_PSEFD	ABC transporter, ABC-F family, GCN-EF3 type	1059
37	M3AN16_PSEFD	Kinesin motor domain-containing protein	1663
38	M3AN89_PSEFD	GMC_OxRdtase_N domain-containing protein	722
39	M3ANI4_PSEFD	Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein	691
40	M3ARY7_PSEFD	SCP domain-containing protein	254
41	M3AS11_PSEFD	G-patch domain-containing protein	437
42	M3AV10_PSEFD	Histone H4 (Fragment)	89
43	M3AW28_PSEFD	Uncharacterized protein	185
44	M3AWY3_PSEFD	Sulfatase domain-containing protein	625

45	M3B081_PSEFD	Uncharacterized protein (Fragment)	123
46	M3B187_PSEFD	Uncharacterized protein	831
47	M3B255_PSEFD	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	189
48	M3B2C2_PSEFD	Uncharacterized protein	266
49	M3B2I1_PSEFD	Uncharacterized protein	252
50	M3B3K8_PSEFD	Uncharacterized protein	900
51	M3B4X7_PSEFD	Abhydrolase_3 domain-containing protein	383
52	M3B7P1_PSEFD	RING-type domain-containing protein	722
53	M3B838_PSEFD	Uncharacterized protein (Fragment)	1480
54	M3B8I7_PSEFD	Uncharacterized protein	650
55	M3B972_PSEFD	Uncharacterized protein	155
56	M3BAZ7_PSEFD	Uncharacterized protein	734
57	M3BCH9_PSEF D	Uncharacterized protein	375
58	N1Q6M3_PSEFD	Non-specific serine/threonine protein kinase (EC 2.7.11.1)	620
59	N1Q6S3_PSEFD	Uncharacterized protein	699
60	N1Q6U9_PSEFD	Carboxylic ester hydrolase (EC 3.1.1.-)	510
61	N1Q7G9_PSEFD	Uncharacterized protein	766
62	N1Q7W6_PSEF D	PUM-HD domain-containing protein (Fragment)	607
63	N1Q859_PSEFD	Uncharacterized protein	178
64	N1Q872_PSEFD	Uncharacterized protein	193
65	N1Q8L5_PSEFD	Alpha-acetolactate decarboxylase (EC 4.1.1.5)	234
66	N1Q9Y1_PSEFD	Elongation factor 1-alpha	459
67	N1QAA0_PSEFD	ATP synthase subunit alpha	550

68	N1QAK8_PSEFD	DYNc domain-containing protein	511
69	N1QB11_PSEFD	zf-Tim10_DDP domain-containing protein	93
70	N1QC26_PSEFD	Uncharacterized protein	554
71	N1QD20_PSEFD	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase (EC 2.3.1.97) (Fragment)	441

Anexo 3 Resultados de los análisis bioinformáticos realizados para la búsqueda de candidatos a efectores en las VE's de la cepa C1233 de *P. fijiensis*.

#	ID	#AA	%C	Péptido señal	Effector P 1.0	Effector P 2.0	EffHunter	Pred GPI	TMH MM
1	M2YIX0_PSEFD	267	2.62	No	Effector	Effector	-	-	0
2	M2YR86_PSEFD	437	0.46	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
3	M2YRA4_PSEFD	633	0.47	No	Non-effector	Non-effector	-	-	1
4	M2YUX2_PSEFD	270	0.00	Si	Non-effector	Non-effector	-	Highly probable	1
5	M2YW74_PSEFD	512	0.39	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
6	M2YWQ3_PSEFD	331	0.91	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
7	M2YY93_PSEFD	265	0.75	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
8	M2Z085_PSEFD	382	2.09	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
9	M2Z2S2_PSEFD	884	0.68	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
10	M2Z5N8_PSEFD	772	1.42	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
11	M2Z6V3_PSEFD	161	3.11	Si	Effector	Effector	Effector	-	0
12	M2Z7E9_PSEFD	188	0.53	No	Effector	Non-effector	-	-	0
13	M2Z7G1_PSEFD	247	1.21	No	Effector	Effector	-	-	0
14	M2Z7T5_PSEFD	1514	0.07	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0

15	M2Z7X3_PSEFD	525	1.52	No	Non-effector	Non-effector	-	-	12
16	M2Z8L2_PSEFD	272	1.47	No	Effector	Effector	-	-	0
17	M2Z8T3_PSEFD	338	0.89	No	Non-effector	Effector	-	-	0
18	M2Z9P2_PSEFD	480	3.33	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
19	M2ZCN1_PSEFD	150	0.67	No	Effector	Effector	-	-	0
20	M2ZF17_PSEFD	660	0.76	Si	Non-effector	Non-effector	-	-	0
21	M2ZL88_PSEFD	383	1.04	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
22	M2ZLF3_PSEFD	270	1.11	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
23	M2ZPD9_PSEFD	178	1.12	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
24	M2ZPI5_PSEFD	136	0.74	No	Effector	Non-effector	-	-	0
25	M2ZPV3_PSEFD	494	1.01	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
26	M2ZQ86_PSEFD	168	0.00	No	Effector	Effector	-	-	0
27	M2ZRP1_PSEFD	306	1.96	No	Non-effector	Non-effector	-	-	6
28	M2ZSY8_PSEFD	666	1.05	Si	Non-effector	Non-effector	-	-	0
29	M2ZUW5_PSEFD	294	1.02	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
30	M2ZXA8_PSEFD	150	0.00	No	Effector	Non-effector	-	-	0

31	M2ZZM8_PSEFD	139	0.00	No	Effector	Non-effector	-	-	0
32	M2ZZY5_PSEFD	373	1.61	Si	Non-effector	Non-effector	Effector	-	0
33	M3A047_PSEFD	324	0.93	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
34	M3A117_PSEFD	347	1.44	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
35	M3A269_PSEFD	104	0.00	No	Effector	Effector	-	-	0
36	M3A2T6_PSEFD	558	3.23	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
37	M3A2X2_PSEFD	218	1.83	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
38	M3A440_PSEFD	454	2.42	Si	Non-effector	Non-effector	-	-	0
39	M3A4J1_PSEFD	344	0.29	No	Non-effector	Effector	-	-	0
40	M3A4N0_PSEFD	165	0.61	No	Effector	Effector	-	-	0
41	M3A4Z1_PSEFD	91	0.00	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
42	M3A6K9_PSEFD	413	1.94	Si	Non-effector	Non-effector	-	-	0
43	M3A9A8_PSEFD	810	1.36	Si	Non-effector	Non-effector	-	-	0
44	M3ADL0_PSEFD	113	0.00	No	Effector	Effector	-	-	0
45	M3AE59_PSEFD	316	2.22	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
46	M3AFF1_PSEFD	587	1.02	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0

47	M3AH24_PSEFD	637	1.26	Si	Non-effector	Non-effector	-	-	0
48	M3AI15_PSEFD	143	2.10	No	Effector	Effector	-	-	0
49	M3AJM2_PSEFD	255	3.53	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
50	M3AKW2_PSEFD	2309	0.56	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
51	M3ALM9_PSEFD	519	0.77	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
52	M3ALX0_PSEFD	431	3.02	Si	Non-effector	Non-effector	-	-	1
53	M3AMX2_PSEFD	1059	1.23	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
54	M3AN16_PSEFD	1663	0.24	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
55	M3AP42_PSEFD	359	0.56	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
56	M3API1_PSEFD	205	0.00	No	Effector	Effector	-	-	0
57	M3APK2_PSEFD	76	0.00	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
58	M3AQ45_PSEFD	265	2.26	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
59	M3AQ60_PSEFD	150	6.67	Si	Effector	Non-effector	Effector	-	0
60	M3AR39_PSEFD	262	0.38	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
61	M3ARW7_PSEFD	679	0.00	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
62	M3ARY7_PSEFD	254	1.97	Si	Effector	Effector	Effector	-	0

63	M3ASW 8_PSEF D	150	0.67	No	Effector	Effector	-	-	0
64	M3AT95 _PSEFD	326	1.23	No	Non- effector	Non- effector	-	-	0
65	M3ATS3 _PSEFD	743	0.27	No	Non- effector	Non- effector	-	-	0
66	M3AV10 _PSEFD	89	0.00	No	Effector	Non- effector	-	-	0
67	M3AW28 _PSEFD	185	1.08	Si	Effector	Effector	-	-	0
68	M3AXI2_ PSEFD	153	1.31	No	Effector	Effector	-	-	0
69	M3B1T0 _PSEFD	126	3.17	No	Effector	Effector	-	-	0
70	M3B255 _PSEFD	189	1.06	No	Effector	Effector	-	-	0
71	M3B2C2 _PSEFD	266	1.88	No	Effector	Effector	-	-	0
72	M3B3Z9 _PSEFD	249	3.21	No	Non- effector	Non- effector	-	-	0
73	M3B4X9 _PSEFD	380	0.26	No	Non- effector	Non- effector	-	-	0
74	M3B5A0 _PSEFD	154	1.30	No	Effector	Effector	-	-	0
75	M3B5I9_ PSEFD	769	0.52	No	Non- effector	Non- effector	-	-	0
76	M3B838 _PSEFD	1480	1.42	No	Non- effector	Non- effector	-	-	0
77	M3B8I1_ PSEFD	274	1.46	No	Non- effector	Non- effector	-	-	0
78	M3B8I7_ PSEFD	650	0.62	No	Non- effector	Non- effector	-	-	0

79	M3B972_PSEFD	155	0.65	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
80	M3BAZ7_PSEFD	734	0.95	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
81	M3BC80_PSEFD	295	0.68	No	Non-effector	Unlikely effector	-	-	0
82	M3BCH9_PSEFD	375	1.07	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
83	N1Q654_PSEFD	166	0.00	No	Effector	Non-effector	-	-	0
84	N1Q6D5_PSEFD	127	0.00	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
85	N1Q6W0_PSEFD	419	3.82	Si	Non-effector	Non-effector	-	Weakly probable	0
86	N1Q7J1_PSEFD	108	0.00	No	Effector	Non-effector	-	-	0
87	N1Q871_PSEFD	234	0.43	No	Effector	Effector	-	-	0
88	N1Q872_PSEFD	193	2.07	Si	Non-effector	Effector	Effector	-	0
89	N1Q8L5_PSEFD	234	1.28	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
90	N1Q8N6_PSEFD	226	0.44	No	Effector	Effector	-	-	0
91	N1Q8R7_PSEFD	229	0.00	No	Effector	Effector	-	-	0
92	N1Q8Z0_PSEFD	527	1.90	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
93	N1Q952_PSEFD	244	3.28	Si	Non-effector	Non-effector	-	Highly probable	0

94	N1Q9P0_PSEFD	1243	1.77	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
95	N1Q9Y1_PSEFD	459	1.53	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
96	N1QAA0_PSEFD	550	0.91	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
97	N1QAK8_PSEFD	511	1.96	No	Non-effector	Non-effector	-	-	0
98	N1QCW5_PSEFD	217	0.92	No	Effector	Effector	-	-	0

Anexo 4 Resultados de los análisis bioinformáticos realizados para la búsqueda de candidatos a efectores en las VE's de la cepa Oz2b de *P. fijiensis*.

#	ID	#AA	%C	Péptido señal	Effector P-1.0	Effector P-2.0	EffHunter	Pred GPI	TMH MM
1	M2YIX0_PSEFD	267	2.62	-	Effector	Effector	-	-	0
2	M2YR57_PSEFD	238	2.52	-	Effector	Unlikely effector	-	-	0
3	M2YR86_PSEFD	437	0.46	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
4	M2YTF6_PSEFD	174	1.15	-	Effector	Effector	-	-	0
5	M2YWK9_PSEFD	509	1.96	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
6	M2YWQ3_PSEFD	331	0.91	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
7	M2YY93_PSEFD	265	0.75	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
8	M2YZ45_PSEFD	211	3.32	-	Effector	Effector	-	-	0
9	M2Z085_PSEFD	382	2.09	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
10	M2Z1E7_PSEFD	236	2.97	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
11	M2Z5N8_PSEFD	772	1.42	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
12	M2Z6V3_PSEFD	161	3.11	Si	Effector	Effector	Effector	-	0
13	M2Z7X3_PSEFD	525	1.52	-	Non-effector	Non-effector	-	-	12
14	M2Z8T3_PSEFD	338	0.89	-	Non-effector	Effector	-	-	0

15	M2ZKY8_PSEFD	293	2.05	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
16	M2ZLF3_PSEFD	270	1.11	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
17	M2ZPI5_PSEFD	136	0.74	-	Effector	Non-effector	-	-	0
18	M2ZPV3_PSEFD	494	1.01	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
19	M2ZQ86_PSEFD	168	0.00	-	Effector	Effector	-	-	0
20	M2ZYU4_PSEFD	176	0.57	Si	Effector	Non-effector	-	-	0
21	M2ZZM8_PSEFD	139	0.00	-	Effector	Non-effector	-	-	0
22	M2ZZY5_PSEFD	373	1.61	Si	Non-effector	Non-effector	Effector	-	0
23	M3A269_PSEFD	104	0.00	-	Effector	Effector	-	-	0
24	M3A2J8_PSEFD	892	0.00	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
25	M3A2T6_PSEFD	558	3.23	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
26	M3A2Z9_PSEFD	543	1.10	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
27	M3A440_PSEFD	454	2.42	Si	Non-effector	Non-effector	-	-	0
28	M3A4J1_PSEFD	344	0.29	-	Non-effector	Effector	-	-	0
29	M3A6K4_PSEFD	273	0.37	-	Non-effector	Unlikely effector	-	-	0
30	M3A6K9_PSEFD	413	1.94	Si	Non-effector	Non-effector	-	-	0

31	M3A893_PSEFD	113	1.77	-	Effector	Non-effector	-	-	0
32	M3A9A8_PSEFD	810	1.36	Si	Non-effector	Non-effector	-	-	0
33	M3ADL0_PSEFD	113	0.00	-	Effector	Effector	-	-	0
34	M3AH77_PSEFD	628	0.48	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
35	M3AMG3_PSEFD	214	1.87	-	Effector	Effector	-	-	0
36	M3AMX2_PSEFD	1059	1.23	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
37	M3AN16_PSEFD	1663	0.24	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
38	M3AN89_PSEFD	722	1.39	Si	Non-effector	Non-effector	-	-	0
39	M3ANI4_PSEFD	691	2.03	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
40	M3ARY7_PSEFD	254	1.97	Si	Effector	Effector	Effector	-	0
41	M3AS11_PSEFD	437	0.23	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
42	M3AV10_PSEFD	89	0.00	-	Effector	Non-effector	-	-	0
43	M3AW28_PSEFD	185	1.08	Si	Effector	Effector	-	-	0
44	M3AWY3_PSEFD	625	1.44	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
45	M3B081_PSEFD	123	3.25	-	Effector	Effector	-	-	0
46	M3B187_PSEFD	831	0.60	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0

47	M3B255_PSEFD	189	1.06	-	Effector	Effector	-	-	0
48	M3B2C2_PSEFD	266	1.88	-	Effector	Effector	-	-	0
49	M3B211_PSEFD	252	0.40	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
50	M3B3K8_PSEFD	900	1.22	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
51	M3B4X7_PSEFD	383	2.35	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
52	M3B7P1_PSEFD	722	1.25	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
53	M3B838_PSEFD	1480	1.42	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
54	M3B817_PSEFD	650	0.62	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
55	M3B972_PSEFD	155	0.65	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
56	M3BAZ7_PSEFD	734	0.95	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
57	M3BCH9_PSEFD	375	1.07	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
58	N1Q6M3_PSEFD	620	0.65	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
59	N1Q6S3_PSEFD	699	1.14	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
60	N1Q6U9_PSEFD	510	2.75	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
61	N1Q7G9_PSEFD	766	0.91	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
62	N1Q7W6_PSEFD	607	0.99	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0

63	N1Q859_PSEFD	178	0.00	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
64	N1Q872_PSEFD	193	2.07	Si	Non-effector	Effector	Effector	-	0
65	N1Q8L5_PSEFD	234	1.28	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
66	N1Q9Y1_PSEFD	459	1.53	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
67	N1QAA0_PSEFD	550	0.91	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
68	N1QAK8_PSEFD	511	1.96	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
69	N1QB11_PSEFD	93	4.30	-	Non-effector	Effector	-	-	0
70	N1QC26_PSEFD	554	0.72	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0
71	N1QD20_PSEFD	441	1.13	-	Non-effector	Non-effector	-	-	0

Referencias

- Alakonya, A. E., Kimunye, J., Mahuku, G., Amah, D., Uwimana, B., Brown, A., y Swennen, R. (2018). Progress in understanding *Pseudocercospora* banana pathogens and the development of resistant *Musa* germplasm. *Plant Pathology*, 67(4), 759–770. <https://doi.org/10.1111/ppa.12824>
- Albuquerque, P. C., Nakayasu, E. S., Rodrigues, M. L., Frases, S., Casadevall, A., Zancoppe-Oliveira, R. M., Almeida, I.C. y Nosanchuk, J. D. (2008). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cellular Microbiology*, 10(8), 1695–1710. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01160.x>
- Armenteros, J. J. A., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., Von Heijne, G., Elofsson, A., y Nielsen, H. (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Science Alliance*, 2(5). <https://doi.org/10.26508/lsa.201900429>
- Armenteros, J. J. A., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., Heijne, G. y Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4), 420-423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Anderson, J., Mihalik, R., y Soll, D. (1990). Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. *Journal of Bacteriology*, 172(1), 224-235.
- Arango Isaza, R. E., Diaz-Trujillo, C., Dhillon, B., Aerts, A., Carlier, J., Crane, C. F., de Jong T. V., Vries I., Dietrich R., Farmer A. D., Fortes-Fereira C., Garcia S., Guzman M. y Kema, G. H. J. (2016). Combating a Global Threat to a Clonal Crop: Banana black Sigatoka Pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (Synonym *Mycosphaerella fijiensis*) Genomes Reveal Clues for Disease Control. *PLoS Genetics*, 12(8), 1–37. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005876>
- Arredondo-Vega, B. O., y Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasas de crecimiento. *Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa*

Microalgal, (January), 21–29. Recuperado de:
<https://www.researchgate.net/publication/253237563>

Baccelli, I. (2015). Cerato-platanin family proteins: one function for multiple biological roles?. *Frontiers in plant science*, 5, 769. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00769>

Bidabadi S., y Sijun, Z. (2018). Banana Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) control and resistance, in the context of developing wilt-resistant bananas within sustainable production systems. *Horticultural Plant Journal*, 4, 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.001>

Bielska, E., Sisquella, M. A., Aldeieg, M., Birch, C., O'Donoghue, E. J., y May, R. C. (2018). Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03991-6>

Bielska, E., y May, R. C. (2019). Extracellular vesicles of human pathogenic fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 52, 90-99.

Bindschedler, L. V., Sanchez, P., Dunn, S., Mikan, J., Thangavelu, M., Clarkson, J. M., y Cooper, R. M. (2003). Deletion of the SNP1 trypsin protease from *Stagonospora nodorum* reveals another major protease expressed during infection. *Fungal Genetics and Biology*, 38(1), 43-53. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00517-0](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00517-0)

Bitencourt, T. A., Rezende, C. P., Quaresemin, N. R., Moreno, P., Hatanaka, O., Rossi, A., Martinez-Rossi N. M. y Almeida, F. (2018). Extracellular vesicles from the dermatophyte *Trichophyton interdigitale* modulate macrophage and keratinocyte functions. *Frontiers in Immunology*, 9, 5–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02343>

Bleackley, M. R., Dawson, C. S., & Anderson, M. A. (2019). Fungal extracellular vesicles with a focus on proteomic analysis. *Proteomics*, 19(8), e1800232. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800232>

- Bonifacino, J. S., y Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116(2), 153–166. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01079-1)
- Bouché, N., Yellin, A., Snedden, W. A., y Fromm, H. (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 435-466. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144224>
- Brauer, V. S., Pessoni, A. M., Bitencourt, T. A., de Paula, R. G., de Oliveira Rocha, L., Goldman, G. H., y Almeida, F. (2020). Extracellular Vesicles from *Aspergillus flavus* Induce M1 Polarization In Vitro. *mSphere*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00190-20>
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 620-630.
- Burgos-Canul, Y. Y., Canto-Canché, B., Berezovski, M. V., Mironov, G., Loyola-Vargas, V. M., Barba de Rosa, A. P., Tzec-Simá M., Brito-Argáez L., Carrillo-Peach M. Grijalva-Arango R., Muñoz-Pérez G., e Islas-Flores I. (2019). The cell wall proteome from two strains of *Pseudocercospora fijiensis* with differences in virulence. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(7), 105. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2681-2>
- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F., Palmquist, J., & Jin, H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, 360, 1126–1129. <https://doi.org/10.1126/science.aar4142>
- Carreón-Anguiano, K. G., Islas-Flores, I., Vega-Arreguín, J., Sáenz-Carbonell, L., y Canto-Canché, B. (2020). EffHunter: A Tool for Prediction of Effector Protein Candidates in Fungal Proteomic Databases. *Biomolecules*, 10(5), 712. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom10050712>
- Carlile, A. J., Bindschedler, L. V., Bailey, A. M., Bowyer, P., Clarkson, J. M., y Cooper, R. M. (2000). Characterization of SNP1, a cell wall-degrading trypsin, produced during

-
- infection by *Stagonospora nodorum*. *Molecular plant-microbe interactions*, 13(5), 538-550. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.5.538>
- Cassilly, C. D., y Reynolds, T. B. (2018). PS, it's complicated: the roles of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the pathogenesis of *Candida albicans* and other microbial pathogens. *Journal of Fungi*, 4(1), 28.
- Chargaff, E. y West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 166, 189–97.
- Chen, Y., Le, X., Sun, Y., Li, M., Zhang, H., Tan, X., Zhang D., Liu Y. y Zhang, Z. (2017). MoYcp4 is required for growth, conidiogenesis and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Molecular plant pathology*, 18(7), 1001-1011. <https://doi.org/10.1111/mpp.12455>
- Chen, Y., Li, G., y Liu, M. L. (2018). Microvesicles as emerging biomarkers and therapeutic targets in cardiometabolic diseases. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 16(1), 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2017.03.006>
- Choi, H., y Lee, D. S. (2016). Illuminating the physiology of extracellular vesicles. *Stem Cell Research y Therapy*, 7(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0316-1>
- Chuc-Uc, J., Brito-Argáez, L., Canto-Canché, B., Tzec-Simá, M., Rodríguez-García, C., Peraza-Echeverría, L., Peraza-Echeverría S., James-Kay A., Cruz-Cruz C. A., Peña-Rodríguez L. M. e Islas-Flores Ignacio, I. (2011). The *in vitro* secretome of *Mycosphaerella fijiensis* induces cell death in banana leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(6), 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.02.006>
- Churchill, A. C. L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: Progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 307–328. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x>
- Coumans, F. A., Brisson, A. R., Buzas, E. I., Dignat-George, F., Drees, E. E., El-Andaloussi, S., Emanuelli C., Gasecka A., Hendrix A., Hill A., Lecroix R., Lee T., van Leeuwen

- T., Mackman N., Mäger I., Nolan J., van der Pol E., Pegtel D., Sahoo S., Siljander P., Sturk G., de Wever O. y Niwuwland R. (2017). Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circulation Research*, 120(10), 1632-1648.
- Cruz-Martín, M., Acosta-suárez, M., Mena, E., Roque, B., y Leiva-mora, M. (2013). Cuantificación del crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia. *Biotecnología Vegetal*, 13(4), 219–224.
- Da Silva, R. P., Puccia, R., Rodrigues, M. L., Oliveira, D. L., Joffe, L. S., César, G. V., Nimrichter L., Goldenberg S. y Alves, L. R. (2015). Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. *Scientific Reports*, 5, 7763.
- Deftu, A. T., Radu, B. M., Cretoiu, D., Deftu, A. F., Cretoiu, S. M., y Xiao, J. (2020). Exosomes as intercellular communication messengers for cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Exosomes* (pp. 199-238). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816053-4.00009-2>
- Denham, T., y Donohue, M. (2009). Pre-Austronesian dispersal of banana cultivars West from New Guinea: linguistic relics from Eastern Indonesia. *Archaeology in Oceania*, 44(1), 18-28. <https://doi.org/10.1002/j.1834-4453.2009.tb00041.x>
- De Kock, M. J., Iskandar, H. M., Brandwagt, B. F., Laugé, R., De Wit, P. J., Y Lindhout, P. (2004). *Recognition of Cladosporium fulvum* Ecp2 elicitor by non-host *Nicotiana* spp. is mediated by a single dominant gene that is not homologous to known Cf-genes. *Molecular plant pathology*, 5(5), 397-408. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00239.x>
- de Toledo Martins, S., Szwarc, P., Goldenberg, S., & Alves, L. R. (2019). Extracellular Vesicles in Fungi: Composition and Functions. *Current topics in microbiology and immunology*, 422, 45–59. https://doi.org/10.1007/82_2018_141
- Dixon, D. C., Cutt, J. R., y Klessig, D. F. (1991). Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts. *The EMBO Journal*, 10(6), 1317-1324. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07650.x>

-
- Dodds, P. N., y Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539-548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Edgar, J. R. (2016). Q y A: What are exosomes, exactly? *BMC Biology*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0268-z>
- Eisenman, H. C., Frases, S., Nicola, A. M., Rodrigues, M. L., & Casadevall, A. (2009). Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 12), 3860–3867. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032854-0>
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., y Von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300(4), 1005-1016.
- Ernst, O., y Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (38), 1–6. <https://doi.org/10.3791/1918>
- Escobar-Tovar, L., Guzmán-Quesada, M., Sandoval-Fernández, J. A., y Gómez-Lim, M. A. (2015). Comparative analysis of the *in vitro* and *in planta* secretomes from *Mycosphaerella fijiensis* isolates. *Fungal Biology*, 119(6), 447–470. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.01.0020>
- Fankhauser, N., y Mäser, P. (2005). Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics*, 21(9), 1846-1852.
- Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D., y Gurr, S. J. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360(6390), 739-742.
- Fischer, G., y Schmid, F. X. (1990). The mechanism of protein folding. Implications of *in vitro* refolding models for *de novo* protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry*, 29(9), 2205–2212. <https://doi.org/10.1021/bi00461a001>

-
- Gasparotto, L., Pereira, J. C. R., Urben, A. F., Hanada, R. E., y Pereira, M. C. N. (2005). *Heliconia psittacorum*: hospedeira de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka-negra da bananeira. *Fitopatologia Brasileira*, 30(4), 423–425. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000400016>
- Gehrmann, U., Qazi, K.R., Johansson, C., Hultenby, K., Karlsson, M., Lundeberg, L., Gabrielsson, S., Scheynius, A. (2011). Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and host exosomes induce cytokine responses—Novel mechanisms for host-microbe interactions in atopic eczema. *PLoS One*, 6(7).
- Giardina, B. J., Stein, K., & Chiang, H. L. (2014). The endocytosis gene END3 is essential for the glucose-induced rapid decline of small vesicles in the extracellular fraction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of extracellular vesicles*, 3(1), 23497. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23497>
- Gibbs, G. M., Roelants, K., & O'bryan, M. K. (2008). The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins—roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocrine Reviews*, 29(7), 865-897. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0032>
- Giebel, B., y Helmbrecht, C. (2017). *Extracellular Vesicles*. (Kuo, W. P. y Jia, S. Eds.), Exosomes and Microvesicles: Methods and Protocols (Vol. 1660). New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1>
- Girard, V., Dieryckx, C., Job, C., y Job, D. (2013). Secretomes: the fungal strike force. *Proteomics*, 13(3-4), 597-608.
- Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Robles M., Talón M., Dopazo J. y Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, 36(10), 3420-3435. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn176>
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*, 100(3), 965-973. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>
-

-
- Grieve, A. G., y Rabouille, C. (2011). Golgi bypass: skirting around the heart of classical secretion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), a005298.
- Ikeda, M. A. K., de Almeida, J. R. F., Jannuzzi, G. P., Cronemberger-Andrade, A., Torrecilhas, A. C. T., Moretti, N. S., da Cunha J. P. C., de Almeida S. R. y Ferreira, K. S. (2018). Extracellular vesicles from *Sporothrix brasiliensis* are an important virulence factor that induce an increase in fungal burden in experimental sporotrichosis. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02286>
- Joffe, L. S., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., y Del Poeta, M. (2016). Potential roles of fungal extracellular vesicles during infection. *MSphere*, 1(4). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00099-16>
- Johansson, H. J., Vallhov, H., Holm, T., Gehrman, U., Andersson, A., Johansson, C., Blom H., Carroni M., Lehtiö y Scheynius, A. (2018). Extracellular nanovesicles released from the commensal yeast *Malassezia sympodialis* are enriched in allergens and interact with cells in human skin. *Scientific Reports*, 8(1), 9182. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27451-9>
- Käll, L., Krogh, A., y Sonnhammer, E. L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of Molecular Biology*, 338(5), 1027-1036.
- Karkowska-Kuleta, J., y Kozik, A. (2014). Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. *Molecular Oral Microbiology*, 29(6), 270–283. <https://doi.org/10.1111/omi.12078>
- Kastelowitz, N., y Yin, H. (2014). Exosomes and microvesicles: identification and targeting by particle size and lipid chemical probes. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 15(7), 923–928. <https://doi.org/10.1002/cbic.201400043>
- Kenigsberg, S., Wyse, B. A., Librach, C. L., y Da Silveira, J. C. (2017). Protocol for exosome isolation from small volume of ovarian follicular fluid: evaluation of ultracentrifugation and commercial kits. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1660, 321–341. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_26

- Kema, G., Yu, D., Rijkenberg, F., Shaw M. y Baayen R. (1996). Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathol.* 86, 777-786.
- Kheder, A. A., Akagi, Y., Akamatsu, H., Yanaga, K., Maekawa, N., Otani, H., Tsuge T., y Kodama, M. (2012). Functional analysis of the melanin biosynthesis genes ALM1 and BRM2-1 in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. *Journal of General Plant Pathology*, 78(1), 30-38. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0356-4>
- Kim, K.-T., Jeon, J., Choi, J., Cheong, K., Song, H., Choi, G., Cheong, K., Song, H., Choi, G., Kang, S., y Lee, Y.-H. (2016). Kingdom-wide analysis of fungal small secreted proteins (SSPs) reveals their potential role in host association. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.0018>
- Knox, K. W., Work, E., y Wessel, A. (1966). Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 92(4), 1206-1217.
- Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., y Laktionov, P. (2018). Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. *BioMed Research International*, 2018, 8545347. <https://doi.org/10.1155/2018/8545347>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>
- Langhe, E. De, Inibap, F. (1996). Banana and Plantain: the earliest fruit crops? pp. 6-8 en *Networking Banana and Plantain: INIBAP Annual Report 1995*.
- Lee, E. Y., Choi, D. Y., Kim, D. K., Kim, J. W., Park, J. O., Kim, S., Desiderio, D., Kim, Y., y Gho, Y. S. (2009). Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*, 9(24), 5425–5436. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900338>
- Leiva Mora, M. (2006). Mejoramiento genético tradicional y empleo de técnicas biotecnológicas en la búsqueda de resistencia frente a los principales patógenos

fúngicos de *Musa spp.* *Biotecnología Vegetal*, 6(3), 131–137. Recuperado de <http://biblat.unam.mx/es/revista/biotecnologia-vegetal/articulo/mejoramiento-genetico-tradicional-y-empleo-de-tecnicas-biotecnologicas-en-la-busqueda-de-resistencia-frente-a-los-principales-patogenos-fungicos-de-musa-spp>

Leone, F., Bellani, L., Muccifora, S., Giorgetti, L., Bongioanni, P., Simili, M., Maserti B. y Del Carratore, R. (2018). Analysis of extracellular vesicles produced in the biofilm by the dimorphic yeast *Pichia fermentans*. *Journal of Cellular Physiology*, 233(4), 2759-2767.

Lepoivre, P., J. Busogoro, y J. Etame (2002). Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interactions. pp.151-159. En: *Proceedings of the 2nd International workshop on M. fijiensis leaf spot diseases*. San José (Costa Rica).

Liang, Y., Xiong, W., Steinkellner, S., y Feng, J. (2018). Deficiency of the melanin biosynthesis genes SCD1 and THR1 affects sclerotial development and vegetative growth, but not pathogenicity, in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Plant Pathology*, 19(6), 1444–1453. <https://doi.org/10.1111/mpp.12627>

Longo, L. V., da Cunha, J. P., Sobreira, T. J., y Puccia, R. (2014). Proteome of cell wall-extracts from pathogenic *Paracoccidioides brasiliensis*: comparison among morphological phases, isolates, and reported fungal extracellular vesicle proteins. *EuPA Open Proteomics*, 3, 216-228.

Margolis, L., y Sadovsky, Y. (2019). The biology of extracellular vesicles: The known unknowns. *PLoS Biology*, 17(7), e3000363.

Martínez-Bolaños, L., Téliz-Ortiz, D., Rodríguez-Macie, J. C., Mora-Aguilera, J. A., Nieto-Ángel, D., Cortés-Flores, J. I., Mejía-Sanchez D., Nava-Díaz C. y Silva-Aguayo, G. (2012). Resistencia a fungicidas en poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* del Sureste Mexicano. *Agrociencia*, 46(7), 707–717.

Matos Baltazar, L., Nakayasu, E. S., Sobreira, T. J. P., Choi, H., Casadevall, A., Nimrichter, L., y Nosanchuk, J. D. (2016). Antibody binding alters the characteristics and

- contents of extracellular vesicles released by *Histoplasma capsulatum*. *MSphere*, 1(2), 1–17. <https://doi.org/10.1128/msphere.00085-15>
- Mellman, I., y Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell*, 100(1), 99–112. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81687-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81687-6)
- Menne, T. F., Goyenechea, B., Sánchez-Puig, N., Wong, C. C., Tonkin, L. M., Ancliff, P. J., Brost R. L., Costanzo M., Boone C. y Warren, A. J. (2007). The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nature Genetics*, 39(4), 486-495. <https://doi.org/10.1038/ng1994>
- Micali, C. O., Neumann, U., Grunewald, D., Panstruga, R., y O'Connell, R. (2011). Biogenesis of a specialized plant–fungal interface during host cell internalization of *Golovinomyces orontii* haustoria. *Cellular Microbiology*, 13(2), 210-226.
- Mir, A. A., Park, S. Y., Sadat, M. A., Kim, S., Choi, J., Jeon, J., y Lee, Y. H. (2015). Systematic characterization of the peroxidase gene family provides new insights into fungal pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Scientific Reports*, 5, 11831. <https://doi.org/10.1038/srep11831>
- Mourichon, X., Carlier, J., Fouré, E., Network, I., Inibap, P., y France, M. (1997). Sigatoka leaf spot diseases of bananas: black leaf streak (black Sigatoka). *Musa Disease Fact Sheet*, (8).
- Nagai, K., Oubridge, C., Kuglstatler, A., Menichelli, E., Isel, C., y Jovine, L. (2003). Structure, function and evolution of the signal recognition particle. *The EMBO Journal*, 22(14), 3479-3485.
- Nakai, W., Yoshida, T., Diez, D., Miyatake, Y., Nishibu, T., Imawaka, N., Naruse, K., Sadamura, Y., y Hanayama, R. (2016). A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Scientific Reports*, 6, 33935. <https://doi.org/10.1038/srep33935>
- Nicola, A. M., Frases, S., & Casadevall, A. (2009). Lipophilic dye staining of *Cryptococcus neoformans* extracellular vesicles and capsule. *Eukaryotic Cell*, 8(9), 1373-1380.

-
- Nimrichter, L., De Souza, M. M., Del Poeta, M., Nosanchuk, J. D., Joffe, L., Tavares, P. D. M., y Rodrigues, M. L. (2016). Extracellular vesicle-associated transitory cell wall components and their impact on the interaction of fungi with host cells. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01034>
- Noar, R. D., y Daub, M. E. (2016). Transcriptome sequencing of *Mycosphaerella fijiensis* during association with *Musa acuminata* reveals candidate pathogenicity genes. *BMC Genomics*, 17(1), 690. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3031-5>
- Nombela, C., Gil, C., & Chaffin, W. L. (2006). Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends in Microbiology*, 14(1), 15-21.
- O'Connell, A., An, S. Q., McCarthy, Y., Schulte, F., Niehaus, K., He, Y. Q., Tang J., Rayan R. P. y Dow, J. M. (2013). Proteomics analysis of the regulatory role of Rpf/DSF cell-to-cell signaling system in the virulence of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(10), 1131-1137. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-13-0155-R>
- Oliveira, D. L., Nakayasu, E. S., Joffe, L. S., Guimarães, A. J., Sobreira, T. J., Nosanchuk, J. D., ... & Nimrichter, L. (2010). Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS One*, 5(6), e111113.
- Oliveira, D., Rizzo, J., Joffe, L., Godinho, R., y Rodrigues, M. (2013). Where do they come from and where do they go: candidates for regulating extracellular vesicle formation in fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9581-9603.
- Oliveros, J.C. (2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.htm>
- Onyilo, F., Tusiime, G., Tripathi, J. N., Chen, L. H., Falk, B., Stergiopoulos, I., Tushemereiw W., Kubiriba J. y Tripathi, L. (2018). Silencing of the mitogen-activated protein kinases (MAPK) Fus3 and Slr2 in *Pseudocercospora fijiensis* reduces growth and virulence on host plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00291>

-
- Panepinto, J., Komperda, K., Frases, S., Park, Y. D., Djordjevic, J. T., Casadevall, A., y Williamson, P. R. (2009). Sec6-dependent sorting of fungal extracellular exosomes and laccase of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 71(5), 1165-1176.
- Paschen, S. A., Rothbauer, U., Káldi, K., Bauer, M. F., Neupert, W., y Brunner, M. (2000). The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(23), 6392–6400. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6392>
- Petersen, T., Brunak, S., Von Heijne, G. y Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, 8:785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Pierleoni, A., Martelli, P. L., y Casadio, R. (2008). PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 392. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-392>
- Ploetz, R. (2000). Black Sigatoka. *Pesticide Outlook*, 11(1), 19–23. <https://doi.org/10.1039/b006308h>
- Porras-Tejeiro, C. J., Pérez Almero, J. L., Brun Esquiliche, P., & Casas Millán, C. (2009). Validez analítica de los ácidos grasos en cerdo Ibérico. *Sólo Cerdo Ibérico*, 21, 85-89.
- Regente, M., Corti-Monzón, G., Maldonado, A. M., Pinedo, M., Jorrín, J., y de la Canal, L. (2009). Vesicular fractions of sunflower apoplastic fluids are associated with potential exosome marker proteins. *FEBS Letters*, 583(20), 3363–3366. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.09.041>
- Rizzo, J., Nimrichter, L., y Rodrigues, M. L. (2017). What Is New? Recent knowledge on fungal extracellular vesicles. *Current Fungal Infection Reports*, 11(4), 141–147. <https://doi.org/10.1007/s12281-017-0293-6>
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Almeida, I. C., y Nimrichter, L. (2014). The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular

-
- vesicles. *Journal of Proteomics*, 97, 177–186.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.001>
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C., y Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 58–67. <https://doi.org/10.1128/EC.00370-07>
- Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Oliveira, D. L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., Alvarez M., Nakouzi A., Feldmesser M. y Casadevall, A. (2007). Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell*, 6(1), 48-59.
- Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Oliveira, D. L., Nosanchuk, J. D., y Casadevall, A. (2008b). Vesicular trans-cell wall transport in fungi: A Mechanism for the delivery of virulence-associated macromolecules?. *Lipid Insights*, 2, 27–40.
<https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Rodrigues, M. L., y Djordjevic, J. T. (2012). Unravelling secretion in *Cryptococcus neoformans*: More than one way to skin a cat. *Mycopathologia*, 173(5–6), 407–418.
<https://doi.org/10.1007/s11046-011-9468-9>
- Rodríguez, P., y Cayón, G. (2008). Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Agronomía Colombiana*, 26(2), 256–265.
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K. M., Siewers, V., Tenberge, K. B., Tudzynski, B., y Tudzynski, P. (2004). Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology*, 5(1), 17–27.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00201.x>
- Samuel, M., Bleackley, M., Anderson, M., y Mathivanan, S. (2015). Extracellular vesicles including exosomes in cross kingdom regulation: a viewpoint from plant-fungal

- interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–5.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00766>
- Selvarajan, R. (2015). Viral diseases of banana. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 10(050).
<https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201510050>
- Schroeder, J., Bethke, P., Gassmann, W. y Ward J. (2015). Membrane Transport, en: *Biochemistry and molecular biology of plants*, Buchanan, B. B., Gruissem, W., y Jones, R. L. (Eds.). John Wiley & Sons. West Sussex. pp 111-150.
- SIAP. (2019). Anuario estadístico de la producción agrícola. Recuperado de
<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Silva, B. M. A., Prados-Rosales, R., Espadas-Moreno, J., Wolf, J. M., Luque-Garcia, J. L., Goncalves, T., y Casadevall, A. (2014). Characterization of *Alternaria infectoria* extracellular vesicles. *Medical Mycology*, 52(2), 202–210.
<https://doi.org/10.1093/mmy/myt003>
- Silva, V. K., Rodrigues, M. L., y May, R. C. (2019). Deciphering fungal extracellular vesicles: from cell biology to pathogenesis. *Current Clinical Microbiology Reports*, 6(3), 89–97.
- Soler, N., Marguet, E., Verbavatz, J. M., y Forterre, P. (2008). Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic Archaea of the order Thermococcales. *Research in Microbiology*, 159(5), 390–399.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.04.015>
- Solomon, P. S., Waters, O. D., Jörgens, C. I., Lowe, R. G., Rechberger, J., Trengove, R. D., y Oliver, R. P. (2006). Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch). *The Biochemical Journal*, 399(2), 231–239. <https://doi.org/10.1042/BJ20060891>

-
- Sonnhammer, E. L., Von Heijne, G., y Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Intelligent Systems for Molecular Biology* (Vol. 6, pp. 175-182).
- Souza, J. A. M., Baltazar, L. de M., Carregal, V. M., Gouveia-Eufrasio, L., de Oliveira, A. G., Dias, W. G., Campos, R., de Miranda, K., Malavazi, I., de Assis D., Georges, F., de Souza, D., Martins, M. y Soriani, F. M. (2019). Characterization of *Aspergillus fumigatus* extracellular vesicles and their effects on macrophages and neutrophils functions. *Frontiers in Microbiology*, 10(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02008>
- Sperschneider, J., Gardiner, D.M., Dodds, P.N., Tini, F., Covarelli, L., Singh, K.B., Manners, J.M. and Taylor, J.M. (2016), EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytol*, 210: 743-761.
- Sperschneider, J., Dodds, P.N., Gardiner, D.M., Singh, K.B. and Taylor, J.M. (2018), Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Molecular Plant Pathology*, 19: 2094-2110.
- Stergiopoulos, I., Burg, H. A. van den, Ökmen, B., Beenen, H. G., Liere, S. van, Kema, G. H. J., y Wit, P. J. G. M. de. (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), 7610–7615. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1002910107>
- Sundin, G. W., Shankar, S., y Chakrabarty, A. M. (1996). Mutational analysis of nucleoside diphosphate kinase from *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of critical amino acid residues involved in exopolysaccharide alginate synthesis. *Journal of Bacteriology*, 178(24), 7120-7128.
- Takeo, K., Uesaka, I., Uehira, K., & Nishiura, M. (1973). Fine structure of *Cryptococcus neoformans* grown in vitro as observed by freeze-etching. *Journal of Bacteriology*, 113(3), 1442-1448.

-
- Tatischeff, I., Bomsel, M., De Paillerets, C., Durand, H., Geny, B., Segretain, D., Turpin E. y Alfsen, A. (1998). *Dictyostelium discoideum* cells shed vesicles with associated DNA and vital stain Hoechst 33342. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(5), 476–487. <https://doi.org/10.1007/s000180050176>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ... y Ayre, D. C. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750.
- Torrado-Jaime, M., y Castaño-Zapata, J. (2008). Incidencia y severidad de las Sigatocas negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach et Mulder) del plátano según los estados fenológicos. *Agronomía Colombiana*, 26(3), 435–442.
- Torres-González, C., Casas, M., y Ortiz, J. E. D. (2013). Manejo de *Ralstonia solanacearum* raza 2 a través de productos químicos y biológicos. *Iteckne*, 10(2), 217-223.
- Tyanova, S., Temu, T., y Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols*, 11(12), 2301–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>
- Vallejo, M. C., Matsuo, A. L., Ganiko, L., Medeiros, L. C. S., Miranda, K., Silva, L. S., Freymüller-Haapalainen E., Sinigaglia-Coimbra R., Almeida I. C. y Puccia, R. (2011). The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic α -galactosyl epitopes. *Eukaryotic Cell*, 10(3), 343–351. <https://doi.org/10.1128/EC.00227-10>
- Vallejo, M. C., Nakayasu, E. S., Longo, L. V., Ganiko, L., Lopes, F. G., Matsuo, A. L., Almeida I., y Puccia, R. (2012b). Lipidomic analysis of extracellular vesicles from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *PloS One*, 7(6).
- Vallejo, M. C., Nakayasu, E. S., Matsuo, A. L., Sobreira, T. J. P., Longo, L. V. G., Ganiko, L., Almeida I. C. y Puccia, R. (2012a). Vesicle and vesicle-free extracellular
-

proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparative analysis with other pathogenic fungi. *Journal of Proteome Research*, 11(3), 1676–1685. <https://doi.org/10.1021/pr200872s>

Vázquez-Euán, R., Chi-Manzanero, B., Hernández-Velázquez, I., Tzec-Simá, M., Islas-Flores, I., Martínez-Bolaños, L., Garrido-Ramírez, E., y Canto-Canché, B. (2019). Identification of new hosts of *Pseudocercospora fijiensis* suggests innovative pest management programs for black Sigatoka disease in banana plantations. *Agronomy*, 9(10), 666. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100666>

Viaud, M., Brunet-Simon, A., Brygoo, Y., Pradier, J. M., y Levis, C. (2003). Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Microbiology*, 50(5), 1451-1465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03798.x>

Wessel, D. y Flugge U. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138(1): 141-3.

Willms, E., Johansson, H. J., Mäger, I., Lee, Y., Blomberg, K. E. M., Sadik, M., Alaarg A., Edvard Smith C. I., Lehtiö J., Andaloussi S. E., Wood M. J. A. y Vader, P. (2016). Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific Reports*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep22519>

Wolf, J. M., Espadas-Moreno, J., Luque-Garcia, J. L., y Casadevall, A. (2014). Interaction of *Cryptococcus neoformans* extracellular vesicles with the cell wall. *Eukaryotic Cell*, 13(12), 1484–1493. <https://doi.org/10.1128/EC.00111-14>

Yang, F., Jensen, J. D., Svensson, B., Jørgensen, H. J. L., Collinge, D. B., y Finnie, C. (2012). Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat. *Molecular Plant Pathology*, 13(5), 445–453. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00759.x>

Ye, J., Zhang, Y., Cui, H., Liu, J., Wu, Y., Cheng, Y., Xu H., Huang X., Li S., Zhou A., Zhang X., Bolund L., Chen Q., Wang J., Yang H., Fang L. y Shi C. (2018). WEGO 2.0: a

web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W71-W75.

Yu, H., Xiong, J., Zhang, R., Hu, X., Qiu, J., Zhang, D., Xu X., Xin R., He X., Xie W., Sheng H., Chen Q., Zhang L., Rao X. y Zhang K. (2016). Ndk, a novel host-responsive regulator, negatively regulates bacterial virulence through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 6, 28684. <https://doi.org/10.1038/srep28684>