



Estudio a escala genómica de la familia *LRR-RLP* de plátano para la identificación de candidatos a genes de resistencia.

Tesis que presenta

Dulce Ivonn Guadalupe Álvarez López

En opción al título de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: **Opción Biotecnología**)

Mérida, Yucatán, México

2022

*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 **Dulce Ivonn Guadalupe Álvarez López** titulado “**Estudio a escala genómica de la familia LRR-RLP de plátano para la identificación de candidatos a genes de resistencia**” fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en el laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección del **Dr. Santy Peraza Echeverría** y la codirección de la **Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia**, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.



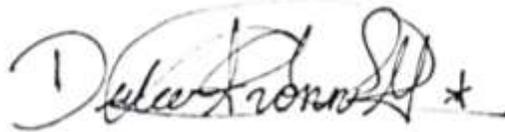
---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 03 de junio de 2022.

## 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 regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

M. en C. Dulce Ivonn Guadalupe Álvarez López

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Generación de una variedad intragénica de plátano resistente a la enfermedad de la Sigatoka negra para mejorar la economía de los productores y proteger al ambiente” PN-2015-01-177) en el que participé bajo la dirección del Dr. Santy Peraza Echeverría y la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores: Agradezco de manera especial al Dr. Santy Peraza Echeverría y la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia por la oportunidad y confianza para realizar el trabajo de investigación, por la paciencia y todas sus enseñanzas, muchas gracias.

A mi comité Tutorial conformado por el Dr. Santy Peraza Echeverría, Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dra. Luisa Alhucema López Ochoa y al Dr. Gabriel Lizama Uc por sus observaciones además de aportes a mi formación y a este proyecto cada semestre durante las evaluaciones.

Al comité de revisión del presente documento de tesis conformado por: Dra. Elsa Beatriz Góngora Castillo, Dra. Luisa Alhucema López Ochoa, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, Dr. Gabriel Lizama Uc, Dr. Carlos Alberto Puch Hau, Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverría.

Al comité predoctoral conformado por el Dr. Jorge M. Santamaría Fernández, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado, Dra. Luisa Alhucema López Ochoa, Dr. Gabriel Lizama Uc, y Dr. Miguel Ángel Vallejo Reyna por sus observaciones, recomendaciones y apoyo.

Al Dr. Fray Martín Baas Espínola por el apoyo en el establecimiento de algunas técnicas y el proceso de bombardeo, la discusión y revisiones al trabajo.

A la QBA Ileana Cecilia Borges Argáez por todo su apoyo técnico para los cultivos embriogénicos y todos sus consejos de laboratorio.

A la Bióloga Verónica Limones Briones por su apoyo técnico en biología molecular.

Al Ing. Ricardo Echeverría-Peraza por su apoyo técnico en la informática.

Al M. en C. Sergio García-Laynes por su gran apoyo en laboratorio y los experimentos finales, así como la discusión en grupo.

Al M. en C. Raúl A. Manzanilla Rivas por su apoyo en laboratorio con la donación y conservación del material biológico.

A mis amigos y compañeros de la Unidad de Biotecnología.

A mis amigos, compañeros y colegas del Laboratorio de Microalgas y Cultivos tropicales.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por la beca

otorgada: número 418417.

Este trabajo se realizó dentro del marco del proyecto titulado: "Generación de una variedad intragénica de plátano resistente a la enfermedad de la Sigatoka negra para mejorar la economía de los productores y proteger al ambiente" PN-2015-01-177.

Gracias al personal del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado a lo largo de estos años.

Agradezco de manera especial al personal del programa de Ciencias Biológicas y al de la Unidad de Biotecnología por el apoyo y las instalaciones prestadas para el desarrollo de este trabajo.

## DEDICATORIAS

A mis maestros y ejemplos de vida, a mis grandes amores.

A mis tres madres y a mis tres padres:

A mi padre Dios, que nunca me ha dejado sola, y que siempre ha cumplido sus promesas, gracias.

A mi madre biológica Luz Victoria López Ramos †, quién me ha dado los dos regalos más grandes que un ser humano puede recibir: la vida, al traerme a este mundo; y la libertad, de crear y de decidir mi camino, gracias.

A mi padre-abuelo, el señor Blas López Araujo † que siempre cuidó de mí como un gran tesoro y me enseñó a disfrutar los pequeños momentos de la vida, gracias.

A mi madre-abuela, la señora Belén Ramos Vargas † quién además me acogió como su pupila de vida, compañera, y que fue mi salvavidas en los momentos más oscuros de mi infancia y juventud, gracias. Gracias por ser tan fuerte y valiente.

A mi madre-tía la señora Verónica López Ramos que siempre ha sido una gran amiga, cómplice, consejera y una muy buena tutora tras la partida de nuestra querida Luvy. Gracias por tu amor y confianza, seguiremos adelante, disfrutando nuevos triunfos.

A mi padre-tío al señor Carlos Alejandro Flores Sifuentes † que ha cuidado de mí como otra hija, me ha aconsejado y protegido desde siempre, y con quién siempre disfruté los triunfos de la vida, gracias, gracias por tu voto de confianza.

A mi compañero de vida:

A ti mi querido y amado Jacobo gracias por enseñarme a confiar en mí misma, y extender más la creatividad, por compartir los grandes retos y logros de este camino en la ciencia, gracias.

A mi pequeño maestro:

A ti mi pequeño y amado Mateo, gracias por tenerme paciencia y ayudarme a ver la vida con más alegría, gracias.

A mis tíos Alfredo y Vicky que han sido gran pilar y ejemplo en nuestra familia, gracias por su cariño y apoyo.

A mis hermanos y primos hermanos (Emmanuel, Arturo, Alfredo, Luis, Cynthia, Carlos, Pablo) porque siempre están para darme ánimo, compartir anécdotas y recordarme que hay siempre quienes nos siguen las huellas. Gracias por todas las buenas anécdotas de la infancia y las nuevas anécdotas de la vida adulta.

A los más pequeños de la familia que son la alegría de nuestras vidas.

A mis suegros que siempre me han apoyado y aconsejado, muchas gracias por siempre estar y ser un gran apoyo para nosotros, seguiremos cosechando triunfos.

A los amigos; los de siempre y los nuevos, muchas gracias por compartir buenos momentos y ayudar a pasar los malos. Gracias.

A todos los pequeños científicos y todos los científicos que aún son pequeños, no dejen de imaginar y hacer preguntas.

---

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I .....	3
ANTECEDENTES .....	3
1.1 EL ORIGEN E IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE PLÁTANO .....	3
1.2. PRODUCCIÓN MUNDIAL Y NACIONAL.....	4
1.3. ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DE PLÁTANO.....	7
1.5. MECANISMOS DE DEFENSA EN LAS PLANTAS .....	12
1.6. PROTEÍNAS PRR: PROTEÍNAS RECEPTORAS DE PATRONES DE RECONOCIMIENTO.....	14
1.7. EL RECEPTOR Cf-4 Y SU FUNCIÓN .....	16
1.8. ESTUDIOS A ESCALA GENÓMICA DE LA FAMILIA LRR-RLP EN PLANTAS.....	18
1.9. REPORTES DE GENES DE RESISTENCIA EN PLÁTANO. ....	18
JUSTIFICACIÓN .....	19
HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVO GENERAL .....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
CAPÍTULO II .....	23
CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA <i>LRR-RLP</i> DE PLÁTANO.....	23
2.1 INTRODUCCIÓN .....	23

---

<b>2.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.1 RASTREO DE SECUENCIAS <i>LRR-RLP</i> EN EL GENOMA DE PLÁTANO.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.2 IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS <i>LRR-RLP</i> EN EL GENOMA DE PLÁTANO.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.3 IDENTIFICACIÓN DE EXONES, INTRONES Y REGIONES NO TRADUCIBLES EN LOS GENES <i>LRR-RLP</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.4 IDENTIFICACIÓN DE MOTIVOS CONSERVADOS EN LAS PROTEÍNAS <i>LRR-RLP</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.5 LOCALIZACIÓN DE LOS GENES <i>LRR-RLP</i> EN LOS CROMOSOMAS.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.6 MODELAJE TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA <i>LRR-RLP</i> DE PLÁTANO .....</b>	<b>27</b>
<b>2.4 RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>2.4.1 IDENTIFICACIÓN, ANOTACIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE SECUENCIAS <i>LRR-RLPs</i> EN EL GENOMA DE PLÁTANO. ....</b>	<b>28</b>
<b>2.4.2 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GÉNICA DE LOS <i>MALRR-RLP</i> E IDENTIFICACIÓN DE MOTIVOS CONSERVADOS EN SUS SECUENCIAS PROTEICAS.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4.3 LOCALIZACIÓN DE LOS GENES <i>MALRR-RLP</i> EN LOS CROMOSOMAS.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4.4 GENES <i>LRR-RLP</i> DE PLÁTANO CON POTENCIAL DE RESISTENCIA A FOC RAZA1 FORMAN UN CLÚSTER EN EL CROMOSOMA 10. ....</b>	<b>36</b>
<b>2.5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>2.6 CONCLUSIONES .....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>44</b>
<b>ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE EXPRESIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA <i>LRR-RLP</i> DE PLÁTANO .....</b>	<b>44</b>

---

3.1 INTRODUCCIÓN .....	44
3.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	46
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.3.1 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS Y FILOGENIA DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA LRR-RLP DE PLÁTANO .....	47
3.3.2 FILOGENIA DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA LRR-RLP DE PLÁTANO CON PROTEÍNAS DE RESISTENCIA LRR-RLP.....	47
3.3.3 FILOGENIA DE LAS FAMILIAS LRR-RLP DE PLÁTANO, ARROZ Y <i>ARABIDOPSIS</i> .....	47
3.3.4 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LOS GENES <i>LRR-RLP</i> DE PLÁTANO EN RESPUESTA A FOC RAZA 1 Y FOC TR4.....	48
2.3.6 MODELAJE TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA LRR-RLP DE PLÁTANO .....	48
3.4 RESULTADOS .....	49
3.4.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA FAMILIA DE LRR-RLPs EN PLÁTANO .....	49
3.4.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS LRR-RLPs DE PLÁTANO CON PROTEÍNAS DE RESISTENCIA LRR-RLP CARACTERIZADAS FUNCIONALMENTE. ....	51
3.4.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LRR-RLPs DE PLÁTANO, ARROZ Y <i>ARABIDOPSIS</i> .....	54
3.4.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>LRR-RLP</i> DE PLÁTANO .....	56
3.5 DISCUSIÓN .....	60
3.6 CONCLUSIONES .....	62
CAPÍTULO IV .....	63
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	63
4.1 DISCUSIÓN GENERAL .....	63

---

<b>4.2 CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>67</b>
<b>4.3 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>69</b>

---

## LISTADO DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1.1. Origen y distribución de las secciones del genero Musa. ....	4
Figura 1.2. Superficie mundial de plátano cosechada. ....	5
Figura 1.3. Producción mundial de plátano. ....	6
Figura 1.4. Gráfica de Historial de área sembrada y producción de plátano en México. ....	6
Figura 1.5. Ciclo de vida de <i>P. fijiensis</i> . ....	8
Figura 1.6. Desarrollo de los síntomas causados por <i>P. fijiensis</i> . ....	9
Figura 1.7. Ciclo de vida de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cabense</i> (Foc) en plátano. ....	10
Figura 1.8. Vista esquemática del modelo de inmunidad espacial. ....	13
Figura 1.9. Familia de Receptores de Reconocimiento de Patrones. ....	15
Figura 1.10 Dominios estructurales de Cf-4. ....	17
Figura 1.11. Estrategia Experimental General. ....	21
Figura 2.1. Estrategia Experimental. ....	25
Figura 2.2. Alineamiento de 20 proteínas caracterizadas funcionalmente. ....	29
Cuadro 2.1. Anotación de genes LRR-RLP en plátano. ....	30
Figura 2.3 Estructura de los genes <i>MaLRR-RLP</i> de plátano. ....	33
Figura 2.4 Motivos conservados de las proteínas <i>MaLRR-RLP</i> de plátano. ....	34
Figura 2.5 Distribución de los genes <i>MaLRR-RLP</i> en <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> . ....	35
Cuadro 2.2 Análisis de genes encontrados en la parte distal de cromosoma 10. ....	37
Figura 2.6. Modelaje tridimensional de CGRs. ....	38

---

Figura 3.1. Estrategia Experimental. ....	46
Figura 3.2 Árbol filogenético Maximum-Likelihood de la familia LRR-RLP de plátano.....	50
Figura 3.3 Árbol filogenético Maximum-Likelihood de la familia LRR-RLP de plátano y LRR-RLPs de resistencia a patógenos .....	52
Cuadro 3.1 Número total de LRR-RLPs de plátano propuestos en este estudio como candidatos a genes de resistencia (CGR).....	53
Figura 3.4 Árbol filogenético Maximum-Likelihood de las familias LRR-RLP de plátano, arroz y Arabidopsis. ....	55
Figura 3.5 Perfiles de expresión a 3 horas post infección. ....	57
Figura. 3.6 Perfiles de expresión a 27 horas post infección. ....	58
Figura 3.7 Perfiles de expresión a 3 horas post infección. ....	59

---

## ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Inglés</b>	<b>Español</b>
LRR	Leucine Rich Repeat	Repeticiones Ricas en Leucina
LRR-RLP	Leucine Rich Repeat Receptor Like-Protein	Proteína tipo Receptor con Repeticiones Ricas en Leucina
LRR-RLK	Leucine Rich Repeat Receptor Like Kinase	Proteína tipo Cinasa con Repeticiones Ricas en Leucina
PRR	Pattern Recognition Receptor	receptores de reconocimiento de patrones
Foc race 1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense race 1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense raza 1
Foc TR4	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense Tropical Race 4	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense Raza Tropical 4
PTI	PAMP Triggered Immunity	Inmunidad desencadenada por PAMPs
ETI	Efector Triggered Immunity	Inmunidad desencadenada por Efectores
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
MAMP	Microbe-Associated Molecular Patterns	Patrones Moleculares Asociados a Microbios
Avr	Avirulence	Avirulencia
Cf	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>
BBTV	Banana Bunchy Top Virus	Virus de la Copa del Plátano
BBrMV	Banana Brat Mosaic Virus	Virus del Mosaico Mucoso del Plátano
BSV	Banana Streak Virus	Virus del Rayado del Plátano
TR4	Tropical Race 4	Raza Tropical 4
PDS	Phytoenodesaturase	Fitonenodesaturasa
DMR6	Downy Mildew Resistance 6	Gen de Resistencia 6 contra Mildew veloso
MaCO1	Musa acuminata ACC Oxidase	ACC Oxidasa de Musa acuminata

---

## RESUMEN

Las plantas son capaces de percibir a los patógenos a través de receptores, los cuales se clasifican, dependiendo de su localización celular, en intracelulares o anclados en la membrana celular; estos últimos son denominados PRRs (receptores de reconocimiento de patrones). Dentro de los PRRs se encuentran las cinasas tipo receptor con un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR-RLKs) y las proteínas tipo receptor con un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR-RLPs). Las proteínas LRR-RLP desempeñan un papel fundamental en el sistema inmune de las plantas al reconocer, por medio de su ectodominio LRR, moléculas derivadas de patógenos y activar una respuesta de resistencia robusta que impide la colonización del microorganismo a la planta y el desarrollo de una enfermedad. Con respecto al caso específico del monocultivo de plátano, este es susceptible a diversas enfermedades debido a su baja variabilidad genética, por lo que la búsqueda de genes que confieran resistencia a patógenos en el germoplasma de este cultivo es de suma importancia tanto para su mejoramiento genético como para contribuir a la seguridad alimentaria global. En este sentido, el estudio de genes de resistencia, como es el caso de los genes *LRR-RLP*, es relevante para el mejoramiento genético de este cultivo. Por tal motivo, el objetivo general del presente trabajo fue caracterizar la estructura, localización cromosómica, filogenia y expresión de los miembros de la familia *LRR-RLP* del genotipo silvestre *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. Mediante la aplicación de múltiples herramientas bioinformáticas se logró la identificación de un total de 78 genes *LRR-RLP* en el genoma del plátano. Interesantemente, siete *MaLRR-RLPs* se agruparon en un clúster en la parte distal del cromosoma 10, donde la resistencia a la enfermedad del marchitamiento por *Fusarium* causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 ha sido previamente mapeada. Por lo tanto, estos siete *MaLRR-RLPs* fueron propuestos como candidatos a genes de resistencia (CGR) para la enfermedad del marchitamiento de *Fusarium*. También identificamos otros siete CGR de plátano en función de sus estrechas relaciones filogenéticas con proteínas de resistencia LRR-RLP conocidas. Además, el análisis filogenético de las familias LRR-RLP de plátano, arroz y *Arabidopsis* reveló cinco clados filogenéticos compartidos por estas especies de plantas, lo cual sugiere un origen antiguo para los miembros de estos cinco clados que podría preceder la divergencia de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Finalmente, un análisis transcriptómico de la familia de genes *MaLRR-RLP* en plantas tratadas con Foc raza 1 o Foc TR4 mostró la expresión de varios miembros de esta familia, algunos de los cuales fueron regulados de forma positiva en respuesta a estas razas de Foc. Este estudio ha proporcionado nuevo conocimiento sobre la estructura, distribución en los cromosomas, evolución y expresión de la familia de genes *LRR-RLP* de plátano, así como valiosos CGR que podrían facilitar la identificación de genes de resistencia a enfermedades para el mejoramiento genético de este cultivo.



---

## ABSTRACT

Plants are able to perceive pathogens through receptors, which are classified, depending on their cellular location, into intracellular or anchored in the cell membrane; the latter are called PRRs (pattern recognition receptors). PRRs include leucine-rich repeat receptor-like protein kinases (LRR-RLKs) and leucine-rich repeat receptor-like proteins (LRR-RLPs). LRR-RLPs play a fundamental role in the immune system of plants by recognizing, through their LRR ectodomain, molecules derived from pathogens and activating a robust resistance response that prevents the colonization of the microorganism to the plant and the development of a disease. Particularly, banana monoculture is susceptible to various diseases due to its low genetic variability, therefore the search for genes that confer resistance to pathogens is of utmost importance both for its genetic improvement and for the contribution to global food security. In this sense, the study of resistance genes, such as the *LRR-RLP* genes, is relevant for the genetic improvement of this crop. For this reason, the general objective of this work was to characterize the structure, chromosomal location, phylogeny and expression of the members of the LRR-RLP family of the wild genotype *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. Through the application of multiple bioinformatics tools, the identification of a total of 78 *LRR-RLP* genes in the banana genome was achieved. Interestingly, seven *MaLRR-RLPs* were clustered in the distal part of chromosome 10, where resistance to Fusarium wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 has been previously mapped. Therefore, these seven *MaLRR-RLPs* were proposed as resistance gene candidates (RGCs) for Fusarium wilt resistance. We also identified seven other banana RGCs based on their close phylogenetic relationships with known LRR-RLP resistance proteins. In addition, phylogenetic analysis of the LRR-RLP families of banana, rice and *Arabidopsis* revealed five phylogenetic clades shared by these plant species, suggesting an ancient origin for the members of these five clades that could precede the divergence of monocotyledonous and dicotyledonous plants. Finally, a transcriptomic analysis of the *MaLRR-RLP* gene family in plants treated with Foc race 1 or Foc TR4 showed the expression of several members of this family, some of whom were positively regulated in response to these Foc races. This study has provided new knowledge about the structure, distribution in chromosomes, evolution and expression of the LRR-RLP family of banana genes, as well as valuable RGCs that could facilitate the identification of disease resistance genes for the genetic improvement of this crop.

## INTRODUCCIÓN

Los cultivos agrícolas son drásticamente afectados por patógenos y plagas, tales como los virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos (Dangl et al., 2013). Las infecciones que provocan los patógenos derivan en enfermedades, las cuales han causado grandes pérdidas y catástrofes a lo largo de la historia; aun cuando los pesticidas han ayudado en el combate de estas enfermedades, el costo por el uso continuo de los agroquímicos a la salud y al ambiente, ha sido alto (Baker et al. 1997; Wu et al., 2018) . En las últimas décadas se han realizado avances significativos en el entendimiento de los genes involucrados en la resistencia a patógenos, particularmente en los genes encargados de detectar a los patógenos y activas la respuesta inmune de la planta. Este conocimiento está permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias para el combate del estrés biótico, como el mejoramiento genético de plantas con un sistema inmune fortalecido para repeler el ataque de patógenos que puedan prescindir del uso de pesticidas.

La evolución de las plantas y sus patógenos, ha llevado a desarrollar una gran gama de respuestas del sistema inmune de la planta (Cesari 2018), las cuales inician con las barreras físicas; como lo son la pared celular con su cutícula cerosa (Dangl et al., 2013). No obstante, existen patógenos que libran este obstáculo, y aun así se encuentran con un mecanismo de defensa tan sofisticado como el de los mamíferos. La primera línea de defensa a nivel de membrana plasmática, se encarga del reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs o MAMPS, por sus siglas en inglés) los cuales son moléculas evolutivamente conservadas de los microorganismos patógenos. Este reconocimiento es realizado por las proteínas conocidas como receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) que conduce a una respuesta inmune conocida como inmunidad activada por PAMPs (PTI, por sus siglas en inglés) (Keller et al., 2016). Las proteínas PRR se encuentran divididas en dos grupos, el primero y más grande es el de las proteínas de la clase de receptores tipo cinasa con un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR-RLK, por sus siglas en inglés), las cuales presentan un ectodominio de unión a ligando LRR, un dominio sencillo transmembranal, y un dominio intracelular de cinasa, mientras que la clase de proteínas tipo receptoras con un dominio LRR (LRR-RLP, por sus siglas en inglés) carecen de dominio de señalización intracelular, sin embargo son también proteínas ancladas a membrana, al igual que el primer grupo y poseen sitios de repeticiones ricas en leucina que conforman el dominio de reconocimiento extracelular y cuentan con un dominio transmembranal (Boutrot y Zipfel 2017a) . Las proteínas LRR-RLP has sido menos estudiadas que sus contrapartes LRR-RLKs, sin embargo, sus funciones en la inmunidad de plantas son cada vez más apreciadas (Jamieson et al., 2018). Esto debido a que las LRR-RLPs desencadenan una plétora de respuestas de defensa, con intensidades en un rango de inmunidad moderada a una fuerte respuesta hipersensible (van der Burgh and Joosten 2019). La plantas también cuentan con un mecanismo intracelular de reconocimiento conocido como inmunidad activada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés) mediante el cual las proteínas receptoras de la familia NBS-LRR juegan un papel esencial en esta respuesta (Noman et al., 2019; Shao et al. 2019) .

Dentro de la familia de receptores LRR-RLP se han reportado diversos genes que han mejorado la resistencia a patógenos (Boutrot y Zipfel 2017a; Saijo et al., 2018), entre ellos el grupo de receptores *Cf* identificado en tomate como son *Cf-9*, *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* y

*Hcr-9 4E*, los cuales perciben diversos productos Avr de las cepas del hongo patógeno *Cladosporium fulvum* (Jones et al., 1994b; Dixon et al., 1996; Thomas et al., 1997; Dixon et al., 1998; Westerink et al., 2004). Por otro lado, esta familia ha sido estudiada a escala genómica tanto en plantas modelo como en cultivos agrícolas (Kang y Yeom, 2018; Fritz-Laylin et al., 2005; Wang et al., 2008; Petre et al., 2014; Chen et al., 2015; Restrepo-Montoya et al., 2021), lo cual debe de facilitar la identificación de nuevos genes de resistencia para el mejoramiento genético de estos cultivos.

El cultivo de plátano, al ser un monocultivo, se ve seriamente afectado por factores de estrés biótico (Tripathi et al., 2019) , requiriendo de un gran costo para el manejo de enfermedades fúngicas como por ejemplo la Sigatoka negra, que requiere de un gran número de aplicaciones de fungicidas al año para su control con un costo estimado a nivel global de \$550 millones de dólares al año (Churchill 2011). En el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* TR4, agente causal del mal de Panamá, simplemente no existe control químico efectivo por lo que las pérdidas son totales, quedando las tierras con la presencia del hongo (Dale, James, et al. 2017). Este escenario hace que sea urgente la atención, investigación y aplicación de herramientas de mejoramiento del cultivo de plátano, el cual es un alimento básico para más de 400 millones de personas en el mundo (FAO, 2017) y representa una importante fuente de ingresos para mercados locales y de exportación de muchos países del trópico.

Recientemente, se descubrió que un gen de la familia NBS-LRR de plátano nombrado como RG2 (también conocido como RGC2) pudo conferir resistencia contra Foc TR4 en pruebas de campo (Peraza-Echeverria et al., 2008; 2009; Dale et al., 2017). Lo anterior representa un avance muy valioso hacia el desarrollo de nuevas variedades de plátano resistentes a este patógeno letal. Sin embargo, aún se desconocen los genes que están involucrados en la resistencia de las otras razas de Foc y *P. fijiensis*. Recientemente, se clonaron dos genes de resistencia para *F. oxysporum* en tomate, nombrados como *I* e *I-7* (Gonzalez-Cendales et al., 2016; Catanzariti et al., 2017), los cuales pertenecen a la familia de los genes *LRR-RLP*. Interesantemente, la proteína Cf-4 de tomate, también de la familia *LRR-RLP*, tiene la capacidad de reconocer a un homólogo de esta proteína (MfAVR4) del patógeno *P. fijiensis*, agente causal de la enfermedad de Sigatoka Negra en ensayos de co-expresión transitoria en hojas de la planta modelo *Nicotiana benthamiana* (Stergiopoulos et al., 2010). Estas evidencias sugieren que genes del tipo *LRR-RLP* podrían estar involucrados en la resistencia a los hongos Foc y *P. fijiensis* en plátano. Dados estos antecedentes, en la presente tesis abordamos el estudio a escala genómica de la familia *LRR-RLP* de plátano con la finalidad de determinar el número de miembros que componen esta familia en este cultivo, su localización en los cromosomas, relaciones filogenéticas y expresión. Esta investigación permitió la identificación de candidatos a genes de resistencia que podrían ser utilizados para el mejoramiento de este cultivo.

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1 El Origen e Importancia del Cultivo de Plátano

Los platanares, es decir, las variedades de plátano que se consumen como postre y en platillos u otros usos, son plantas que pertenecen a la familia Musaceae, son herbales, monocotiledóneas perenes gigantes de la orden de los Zingiberales, y un grupo hermano del grupo de Poales, el cual incluye a los cereales (Mohandas y Ravishankar, 2016).

La familia Musaceae se divide en tres géneros: *Musella*, *Ensete* y *Musa*, de los que se desprenden un gran número de plantas de tipo herbal perenne con tallo semi leñoso que llega alcanzar los 15 metros de altura, con hojas largas de color verde brillante, formando una inflorescencia de la cual se desarrollan los frutos (De Langhe et al., 2009).

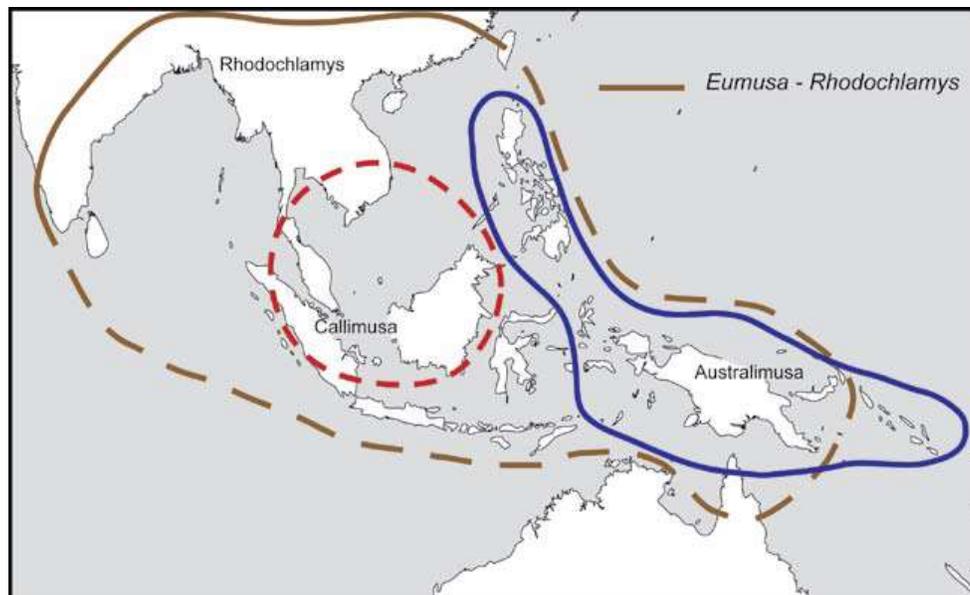
El género *Musa* se ha dividido en cuatro secciones: *Callimusa*, *Rhodoclamys*, *Australimusa*, y *Eumusa*, dependiendo de su distribución. La sección *Eumusa* (a veces llamada solo *Musa* 2X =22) cubre por completo el área primaria de diversidad (el área actual del Sur de China, Indonesia, Papua Nueva Guinea y Norte de Australia), excepto la parte de Melanesia oriental; la sección *Rhodoclamys* (2X=22) se extiende en la tierra principal monzónica del sureste de Asia; la sección *Australimusa* (2X=20) comprende las regiones del sureste de Indonesia y el Sur de las Filipinas a Malasia, y la sección *Callimusa* (2x=20) se encuentra principalmente en las tierras bajas de la parte central (sur de Vietnam, la parte peninsular de Malaysia, Borneo y Sumatra). Es de la primera sección *Eumusa* donde se originaron las especies fundadoras de los plátanos comestibles *Musa acuminata* Colla (AA) y *Musa balbisiana* Colla (BB) a través de cruce híbrido o duplicación, los triploides pertenecientes a las más de 1000 variedades existentes en el mundo (Heslop-Harrison y Schwarzacher, 2007; De Langhe et al., 2009).

El cultivo de plátano es originario del sudeste asiático y norte de Australia, su distribución natural se extiende en el norte de Nepal y el sureste montañoso de China, hasta el sureste de las islas de Indonesia y Nueva Guinea, con una parte aislada del bosque tropical húmedo de Queensland (De Langhe et al., 2009). A partir de esas latitudes se extendió hacia todas las regiones tropicales y subtropicales del planeta debido en gran parte a su comercialización, pasando por un largo proceso de domesticación de alrededor de 7000 años (D'hont et al., 2012).

Los frutos de plátano se distinguen por tener un alto nivel nutricional y diversas propiedades que benefician al organismo (Gowen, 1995). Es por ello que son considerados un alimento básico en muchos países del mundo; se cultiva en 135 países de los cuales se estima que 400 millones de personas dependen de este sistema de cultivo para su subsistencia y comercialización; se estima que la producción mundial llega a tener un valor de 52 mil millones de dólares (FAO, 2017).

Los frutos generados, dependiendo de la variedad, poseen distinto color y tamaño. Sin embargo, el cultivar con mayor superficie sembrada, mayor comercialización y de mejores

características para su consumo es Cavendish, que representa la mitad de la producción actual anual (D'hont et al., 2012).



**Figura 1.1. Origen y distribución de las secciones del género Musa.** Distribución geográfica de las principales secciones del género Musa. Algunos límites de Callimusa y Australimusa (límite del oeste) son inciertos. La sección Eumusa (a veces llamada solo Musa) ( $2X=22$ ) cubre por completo el área primaria de diversidad, excepto la parte de Melanesia oriental; la sección Rhodochlamys ( $2X=22$ ) se distribuye en la tierra principal monzónica del sureste de Asia; la sección Australimusa ( $2X=20$ ) abarca el sureste de Indonesia y el Sur de las Filipinas a Malasia y la sección Callimusa ( $2x=20$ ), se encuentra principalmente en las tierras bajas de la parte central (sur de Vietnam, la parte peninsular de Malasia, Borneo y Sumatra) (De Langhe et al., 2009).

## 1.2. Producción Mundial y Nacional

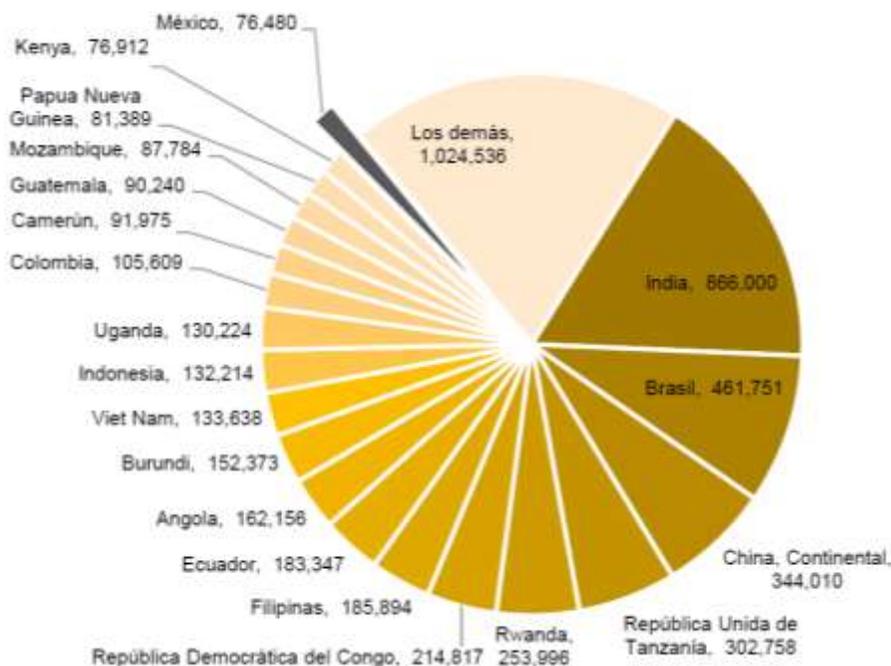
El cultivo de plátano es uno de los principales cultivos en la producción y comercio agrícola mundial, se estima que su producción global pasó de 69 millones de toneladas en el periodo de 2000 a 2002 a una total de 116 millones de toneladas en el periodo de 2017 a 2019, arrojando un valor aproximado de 31 millones de dólares (FAO, 2020).

Nuestro país, México, es uno de los principales productores de plátano, ocupando el 12o lugar, aportando poco más de 2 mil toneladas anuales. Entre los principales destinos para las exportaciones de la producción E.E.U.U. es el principal destino, le siguen los países de Japón, Países Bajos, Nueva Zelanda, Reino Unido, Corea del Sur, Italia, España, Ucrania, Guatemala, y Rumania (SIAP, 2020). En México se producen ocho variedades de plátano, entre las cuales se encuentran 'Enano gigante', plátano macho, plátano manzano, plátano morado, plátano pera, plátano tabasco y Valery, con una superficie

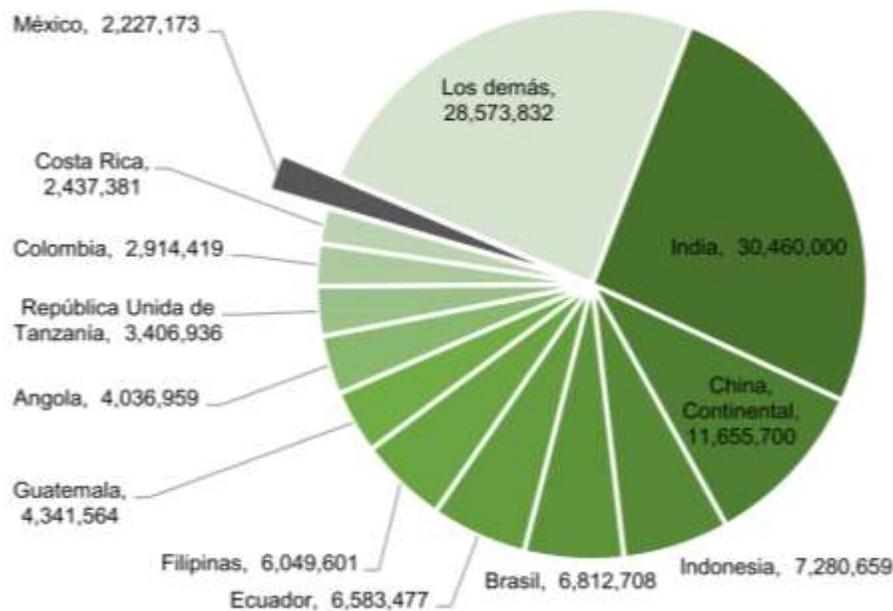
cultivada de 81 mil hectáreas en total, y un rendimiento de 30.1 toneladas / ha (SIAP, 2020).

En el país la producción de plátano se concentra en las zonas costeras del Golfo de México y del Pacífico. En la zona Sur-Sureste participan principalmente los estados de Chiapas, Tabasco, Veracruz y Oaxaca. Los estados de la región Centro-Occidente con importantes niveles de cultivo son: Colima, Michoacán, Jalisco, Puebla, Guerrero; además está también Nayarit considerado de la región Noroeste. A pesar que Chiapas es el principal productor de este fruto, Tabasco recibe mayores cotizaciones por su producto, recibiendo 3 mil 586 pesos por tonelada (SIAP, 2020).

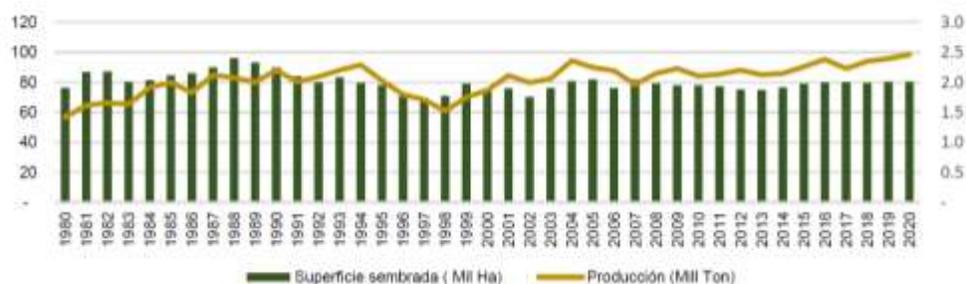
Debido a que es el quinto cultivo de mayor producción y consumo a nivel mundial, y gracias a que cerca de 400 millones de personas en países tropicales y subtropicales dependen de su comercialización y producción para alimentarse, la inocuidad del cultivo de plátano y banano es un tema de seguridad alimentaria (FAO, 2017).



**Figura 1.2. Superficie mundial de plátano cosechada.** Gráfica de la Superficie cosechada de plátano a nivel mundial (ha) 2019. México se encuentra entre los veinte principales países con mayor superficie cosechada a nivel mundial (FAO, 2021; SIAP, 2021)



**Figura 1.3. Producción mundial de plátano.** Gráfica del volumen producido de plátano a nivel mundial (ha) 2019. México ocupa la doceava posición entre los principales productores de plátano a nivel mundial con una producción de 2.5 millones de ton ubicándose en el país como el tercer cultivo de mayor importancia precedido por los cítricos (limón y naranja) (FAO 2021; SIAP 2021).



**Figura 1.4. Gráfica de Historial de área sembrada y producción de plátano en México.** Entre los años 2000 y 2020 la superficie de plátano en México incrementó 9.6%, lo que significó pasar de 74,363 hectáreas sembradas a 80,547 hectáreas, con una producción de 1.9 millones de toneladas a inicios del periodo, que para 2020 ya sumaba 2.5 millones (SIAP 2021).

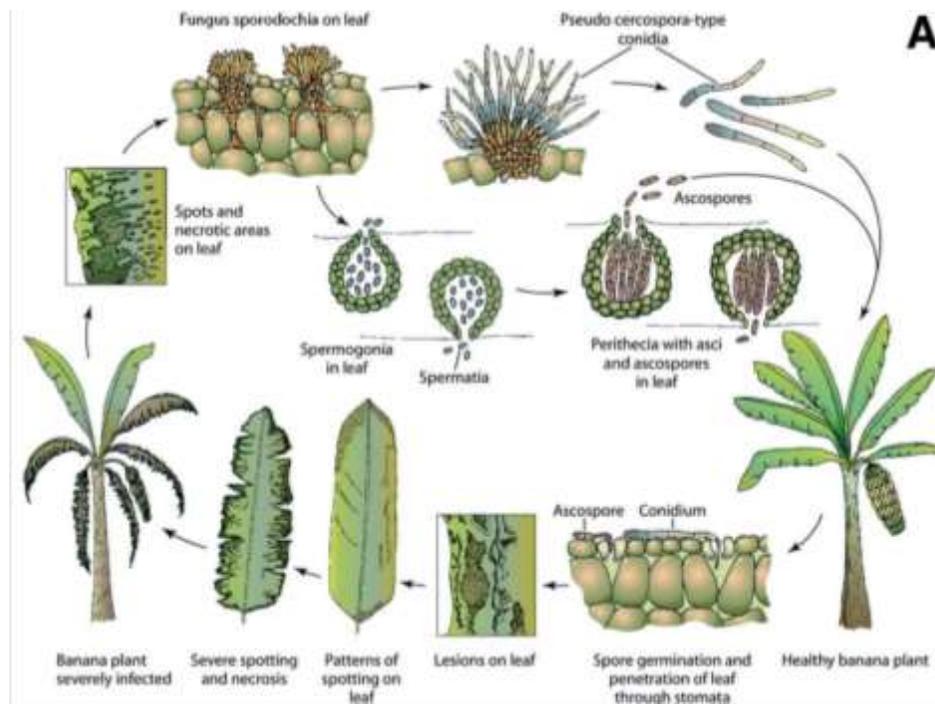
### 1.3. Enfermedades en el cultivo de plátano

Dentro de las diversas enfermedades que atacan este cultivo se encuentran los virus como el Banana bunchy top virus (BBTV), el Banana bract mosaic virus (BBBrMV), Banana streak virus (BSV); enfermedades causadas por bacteria como las llamadas Moko y Bugtok causados por *Pseudomonas solanacearum*; nematodos como (*Radopholus similis*) (Becker y Dale 2004); y las enfermedades fúngicas. Entre estas últimas encontramos las dos enfermedades más devastadoras del cultivo de plátano, de las cuales la más silenciosa es la marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 ('Tropical Race 4') representando una amenaza a la producción de este cultivo, con serias repercusiones para los medios de subsistencia de los pequeños productores, trabajadores y la cadena de valor del plátano. Esta nueva raza del hongo *F. oxysporum* f. sp. *cubense* supera el alcance de su predecesor Foc raza 1, responsable de la devastación del cultivar Gros Michel, la cual fue superada desde hace poco más de 60 años con la introducción de los cultivares resistentes Cavendish. Sin embargo, la tregua al cultivo de banano ha sido pasajera. Desde su primer reporte en 1990, la Marchitez causada por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 ha llegado a mermar miles de hectáreas y reducir superficies enteras del cultivo, poniendo de manifiesto la fragilidad de la estrecha variabilidad de los plátanos Cavendish, los cuales representan alrededor de la mitad de la producción mundial de plátano, debido a que estos son particularmente susceptibles a esta nueva raza del hongo (FAO, 2017). Es por ello que la pérdida de las áreas de cultivo se han traducido en millones de dólares en países como Taiwán (US \$253 millones), Indonesia (US \$121 millones), Malasia (US\$14 millones) y Australia (AUS \$138 millones anuales), mientras que en China continental 40 mil ha de Cavendish han sido afectadas, en Filipinas se han abandonado hasta 3000 ha de cultivo, y en Oriente Medio, Mozambique, India, Laos y Vietnam se ha cambiado el cultivo de banano por otros cultivos, ya que incluso los cultivares locales se ven amenazados. Recientemente, la amenaza más temida se ha hecho una realidad en abril de 2019 al confirmarse la presencia de Foc TR4 en Colombia (La Guajira), elevando el riesgo en la principal zona de exportación mundial que es la región LAC (Latino América y el Caribe) (Altendorf, 2019; Stokstad, 2019a; 2019b; Viljoen et al., 2020). Por lo tanto, es urgente tomar medidas sanitarias y aplicar medidas de mejoramiento al cultivo.

La segunda enfermedad fúngica y de origen foliar, que representa un gran riesgo en la producción de plátanos es la Sigatoka Negra o Rayado Negro de las hojas, cuyo agente causal es *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet un hongo heterotálico sexual que en su etapa anamorfa es denominado *Pseudocercospora fijiensis* (M. Morelet) Deighton. *M. fijiensis* es un miembro de los ascomicetos, de hábitos hemi-biotróficos, haploide, de la clase Dothideomycetes, orden Capnodiales y familia Mycosphaerellaceae. Esta clasificación taxonómica está basada en la filogenia de su DNA, el análisis morfológico y sus características culturales (Churchill, 2011). La enfermedad del Rayado Negro de las hojas o Sigatoka Negra se reportó en primer lugar en el Valle de Sigatoka en las Islas Fiji durante la década de 1960. A partir de esta década se dispersó alrededor del mundo en todas las zonas tropicales productoras de plátano. Actualmente, es la enfermedad foliar más devastadora y con mayor costo de manejo durante la producción, llegando a costar hasta \$US 1000/ Ha. Su ciclo de vida se divide en dos fases: asexual y sexual. En la asexual, o estadio anamorfo, el hongo es llamado *Pseudocercospora fijiensis* nombrado por Deighton, mientras que en la fase sexual *Mycosphaerella fijiensis* descrito por M. Morelet. Este es un hongo heterotálico haploide, hemibiótrofo ascomiceto con un sistema

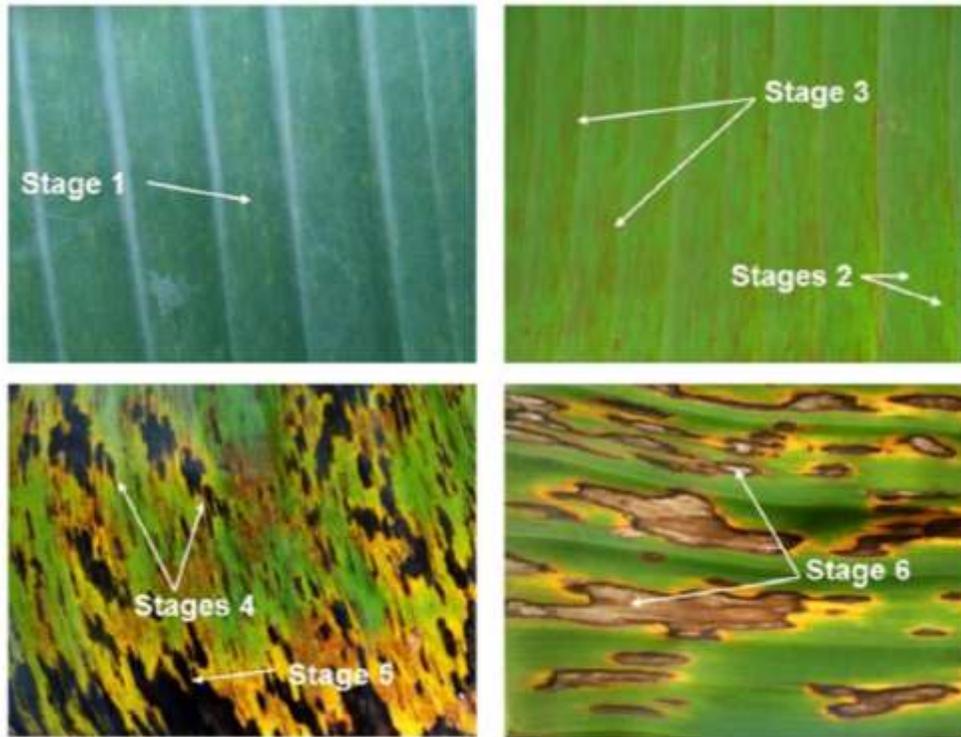
bipolar, de la clase Dothideomycetes, perteneciente a la orden Capnodiales y de la Familia Mycosphaerellaceae (Churchill, 2011).

La enfermedad comienza a manifestarse en las hojas, donde el hongo provoca unas rayas en tono marrón-rojizo penetrando sus hifas por los estomas, extendiéndose poco a poco de manera paralela a las nervaduras. Con el tiempo y la extensión del hongo, estas rayas se van agregando y uniendo, hasta formar rayas de mayor grosor de coloración marrón -negro. Eventualmente, se forman lesiones elípticas de mayor tamaño que coalescen, provocando necrosis. No es una enfermedad en la que el patógeno mate de inmediato a su hospedero, ya que su hábito hemi-biotrófico y el ciclo de vida del hongo dan una pauta para que durante algún tiempo la planta sobreviva. Sin embargo, a lo largo del ciclo de la enfermedad se observa una caída en la capacidad fotosintética llevando a la planta a una reducción de calidad y cantidad de fruto producido e induciendo en ocasiones a la rápida maduración de los frutos en las plantas infectadas (Churchill, 2011). El control de este patógeno solo puede ser manejado por aplicaciones intensivas de fungicida, requiriendo intervenciones continuas a través del año en la mayoría de las áreas de producción. La Sigatoka Negra causa grandes costos en la producción mundial de plátano, superando los \$500 millones por año. Debido a l costo del manejo, además del daño ambiental para el control de la Sigatoka Negra del plátano, y se propone la utilización de herramientas biotecnológicas para buscar nuevas estrategias para su combate (Arango Isaza et al., 2016).



**Figura 1.5. Ciclo de vida de *P. fijiensis*.** Desarrollo de los estadios de *P. fijiensis* (*M. fijiensis*), con los estados de afectación progresivo de la enfermedad de la

Sigatoka negra en plátano. A) Ciclo de vida y desarrollo de *P. fijiensis* causando la Sigatoka negra (Churchill 2011).



**Figura 1.6. Desarrollo de los síntomas causados por *P. fijiensis*.** La enfermedad de Sigatoka negra cuyo agente causal también es llamado *M. fijiensis*, tiene diversos estados de afectación progresivo observados en las hojas de plátano debido al avance de la enfermedad (Kimunye et al., 2021).



**Figura 1.7. Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) en plátano.** A) Esporas (micro y macro conidios y chlamydoesporas) latentes en el suelo o en hospederos alternativos como malezas. B) Chlamydoesporas germinando estimuladas por los exudados de raíces y los tubos germinales penetrando las raíces de plátano. C) Foc creciendo a través del córtex de la epidermis y micelio invadiendo el sistema vascular. D) Conidios y chlamydoesporas son constantemente producidas en el tejido vascular. Los conidios son rápidamente distribuidos a toda la planta a través del sistema de transpiración. El micelio y los bloques de goma del tejido vascular y los primeros síntomas del amarillamiento son observados en las hojas viejas. E) Foc coloniza y destruye más tejido vascular provocando una marchitez intensa. F) La planta infectada muere y la planta aledaña (la hija), la cual también está contaminada por la madre por la conexión vascular con la planta madre, muestra los síntomas iniciales. La planta madre eventualmente cae al suelo y el ciclo de enfermedad vuelve a iniciar (Dita et al., 2018).

#### 1.4. Estrategias de mejoramiento en el cultivo de plátano

Algunos de los principales factores que aumentan los costos de producción, y en muchos casos son responsables de las pérdidas totales de producción, son las plagas y enfermedades destructivas y en constante evolución (Trębicki and Finlay 2018). Los fitopatólogos han contribuido con el desarrollo de conocimiento y soluciones a estos problemas de enfermedades mejorando la nutrición, y la sostenibilidad del sistema de cultivo; fortaleciendo la capacidad de investigación en los países tropicales hacia cultivos básicos para el desarrollo de las poblaciones en desarrollo (Nelson 2020) .

Adicionalmente las nuevas tecnologías y metodologías para mejoramiento de cultivos pueden acelerar el proceso de obtención de cultivos mejorados y resistentes a

enfermedades (Voss-Fels et al., 2019), sobre todo para aquellos cultivos cuyo sistema de propagación y o variabilidad son bajos como el caso de plátano.

El cultivo de plátano posee una naturaleza renuente a la propagación convencional o cruzada, por lo cual se propaga vegetativamente en campo a través de los hijuelos que se forman del pseudotallo o cormo principal. Es así que los platanares comerciales son propagados como clonas que carecen de variabilidad genética que ayude en su inmunidad. Por tal motivo, la mejor opción para el mejoramiento genético de los plátanos es la ingeniería genética y los métodos de transformación. Así mismo se requiere de un proceso completo de propagación de las nuevas plantas resistentes generadas (Tripathi et al., 2015).

Actualmente ya se cuenta con diversos sistemas de transformación de plátano, como la transformación por *Agrobacterium* (Ganapathi et al., 2001), la electroporación y el bombardeo por micropartículas (Becker y Dale 2004). Además, diversos grupos de trabajo han implementado y mejorado el sistema de regeneración *in vitro* de plantas de plátano, y actualmente se cuenta con un sistema eficiente de embriogénesis somática a partir de flores masculinas para formar células embriogénicas en suspensión y lograr regenerar plantas mejoradas genéticamente (Cote et al., 1996).

La multiplicación de plantas *in vitro* ha potenciado las técnicas de ingeniería genética, que a su vez han permitido introducir características de resistencia o tolerancia a diversos tipos de estrés. Ejemplos de avances significativos se tienen desde los primeros reportes de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (May et al., 1995) y bombardeo (Sági et al., 1995) hasta llegar a la transformación genética mediante silenciamiento génico inducido por el hospedero (HIGS) y la edición génica (Tripathi et al., 2019; Wang et al., 2021). Más recientemente se han dado los primeros pasos en la edición génica de plátano, modificando el gen *PDS* (Phytoenodesaturasa) (Naim et al., 2018) y algunos genes para defensa contra patógenos como por ejemplo el gen *DRM6* (Tripathi et al., 2021) así como la edición de genes para el combate del virus BSV intrínseco en el genoma B de algunos cultivares (Tripathi et al. 2019) y la edición con el gen MaACO1 para conceder un mayor tiempo de vida de anaquel al fruto (Hu et al., 2021).

Además de estos avances significativos, se cuenta con un gran acervo genético en los genomas de bananos silvestres diploides que han sido publicados (<https://banana-genome-hub.southgreen.fr/>) en especial el (genoma A) de los cultivares *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* (D'hont et al., 2012) y el genoma B de *Musa balbisiana* (Davey et al., 2013). La disponibilidad de estos datos genómicos también despeja el camino para la identificación de secuencias blanco, y optimiza la tecnología de edición génica minimizando la probabilidad de efectos adversos en los plátanos modificados (Pua et al. 2019).

La nueva era de los análisis masivos genómicos, junto con la reciente explosión de datos a gran escala de genomas de planta y las herramientas bioinformáticas brinda la posibilidad de realizar análisis que provean evidencias en las dinámicas co-evolutivas de las plantas y patógenos mostrando una amplia gama de oportunidades para la identificación y estudio de genes clave en la inmunidad. Lo anterior con el objetivo de encontrar soluciones a las enfermedades más devastadoras de plátano, para lo cual es

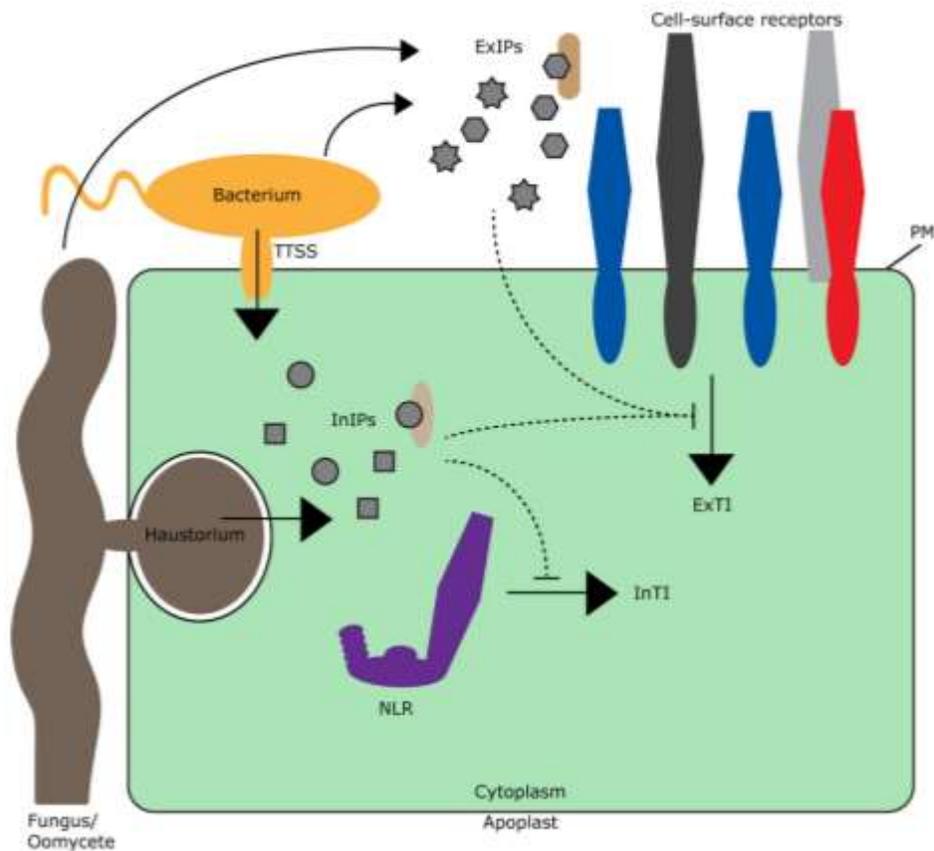
vital entender las redes de regulación del sistema de inmunidad innata de las plantas (Han 2019).

### **1.5. Mecanismos de defensa en las plantas**

Las plantas no poseen un sistema inmune adaptativo somático como el de los mamíferos, en donde existen células de defensa móviles que produzcan anticuerpos específicos de reconocimiento para cada patógeno. Sin embargo, sí poseen un sistema inmune innato que con el paso de las generaciones ha ido adaptándose para reconocer de forma específica las señales de cada patógeno con el que interactúa (Dangl, 2006). Además de las barreras físicas y químicas preexistentes, como son la cutícula o la pared celular, las plantas expresan sistemas de reconocimiento y montan respuestas inmunes inducibles que son desencadenadas inmediatamente después del primer contacto prolongado con los patógenos (Göhre y Robatzek 2008).

La activación de la defensa de la planta para restringir la invasión de los patógenos es a menudo conferida por las proteínas de resistencia. Las proteínas de resistencia o también llamadas solo proteínas R, funcionan en la percepción de patógenos y en la activación de redes de señalización de defensa conservadas. Estas proteínas perciben en dos niveles diferentes; de forma extracelular e intracelular. La clase más prevalentemente encontrada y reportada de proteínas R, contienen motivos de repeticiones ricas en leucina (LRR), un sitio de unión a nucleótidos (NBS) central, y un dominio amino terminal variable, siendo estos responsables de la percepción intracelular. Otras clases de proteínas R, poseen un dominio extracelular LRR, un dominio transmembranal y algunas veces un dominio intracelular serina/treonina cinasa o una cola de residuos, estas son las encargadas del sensado extracelular (Hammond-Kosack y Kanyuka 2007).

El sistema de defensa inducible puede activarse mediante el reconocimiento de algunas proteínas o metabolitos excretados a la célula por el patógeno (figura 1.8), llamados Patrones Inmunogénicos Extracelulares o ExIP, o puede ser intracelulares, por lo tanto, llamados Patrones Inmunogénicos Intracelulares (InIP). Este es el modelo de inmunidad espacial más recientemente propuesto (van der Burgh y Joosten, 2019). En este modelo de inmunidad espacial, el reconocimiento de ExIPs por los receptores de superficie celular permiten desencadenar las respuestas extracelulares (ExTRs), lo cual puede resultar en una simbiosis extendida con el microbio invasor o en una defensa exitosa de la planta, dando fin a la simbiosis, llevando a la inmunidad desencadenada extracelularmente (ExTI). Así mismo, existe el reconocimiento de los InIPs realizado por los receptores citoplásmicos, principalmente los NLRs, lo cual lleva a desencadenar las respuestas intracelulares o (InTRs) y subsecuentemente desencadenar la inmunidad intracelular (InTI) (van der Burgh y Joosten, 2019) .



**Figura 1.8. Vista esquemática del modelo de inmunidad espacial.** Los patrones inmunogénicos extracelulares (ExIPs), los cuales son acumulados bajo el ataque de los microbios a la planta o como resultado de daño celular, son percibidos por receptores de superficie celular en la membrana plasmática (MP). Los ExIPs, son también llamados señales de daño, los cuales pueden ser tanto de patrones derivados de patógeno y efectores o patrones moleculares asociados a daño (mostrados como estructuras en gris fuera de la célula) y blancos de virulencia derivados del hospedero como efectores modificados (VTs) (estructuras en café). Los patrones inmunogénicos intracelulares (InIPs) son señales de daño que son percibidos por receptores citoplasmáticos, principalmente los receptores con repeticiones ricas en leucina de unión a nucleótidos (NLRs). Los InIPs pueden ser moléculas derivadas de patógenos (mostradas como estructuras grises dentro de la célula) o VTs modificados (estructuras marrón claro). El reconocimiento de ambos ExIPs e InIPs lleva a la activación de las respuestas de defensa del hospedero, referidas como inmunidad desencadenada intra y extracelular (InTI o ExTI), respectivamente. Los ExIPs pueden actuar como efectores, y por su acción en el espacio extracelular estos pueden suprimir o eludir la activación de los ExTI (línea punteada del apoplasto hasta el citoplasma). Los InIPs pueden actuar también como efectores, con el potencial de suprimir la inmunidad desencadenada en la superficie celular, así como por los receptores citoplasmáticos (líneas punteadas en el citoplasma). Las abreviaciones TTSS se refieren a el sistema de secreción tipo tres (van der Burgh y Joosten, 2019).

Esta identificación es llevada a cabo por las proteínas transmembranales extracelulares en la primera línea de defensa, las también llamadas PRR (receptores de reconocimiento de patrones) o proteínas receptoras de patrones de reconocimiento, las cuales se dividen en dos grandes grupos: las LRR-RLKs (quinasas tipo receptor con dominio de repeticiones ricas en leucina) y LRR-RLPs (proteínas tipo receptor con dominio de repeticiones ricas en leucina). Las proteínas del primer grupo contienen ectodominios de unión a ligando, un dominio sencillo de pase transmembranal, y un dominio intercelular de quinasa; mientras que el segundo grupo las RLPs son proteínas que poseen un dominio LRR y transmembranal, pero carecen de algún dominio de señalización intracelular obvio (Boutrot y Zipfel, 2017b). Entre estos tres dominios principales, el dominio intracelular puede tener un motivo quinasa o de anclaje para interactuar internamente con otras proteínas, el dominio intracelular hidrofóbico ancla la proteína a la membrana, y el ectodominio extracelular de unión a ligando con motivos de repeticiones ricas en leucina (LRR) funge como sitio de reconocimiento de los patógenos (Zipfel, 2014).

Estas proteínas PRR desencadenan un gran número de respuestas río abajo dentro del citoplasma, lo cual permite poner en marcha el mecanismo de inmunidad. En este tipo de respuesta se estimulan las cascadas de señalización involucradas en el flujo de Calcio ( $Ca^{+2}$ ) y las MAPKs (mitogen activated protein kinases), las cuales permitirán la reacción de defensa de la planta, además se incrementa la producción de ROS (por sus siglas en inglés de Reactive Oxygen Species, especies reactivas de oxígeno) llevando esto a la alcalinización del medio, respuestas que perjudican al patógeno. Se observa la deposición de callosa en la pared celular lo cual perturba la penetración, mientras que permite la expresión de productos antimicrobianos, como las proteínas PR (Pathogenesis Related) y defensinas que obstaculizan aún más la infección (Göhre and Robatzek 2008).

### **1.6. Proteínas PRR: Proteínas Receptoras de Patrones de Reconocimiento**

Los genes de resistencia análogos (RGAs), como los que codifican para las proteínas NBS, las proteínas tipo receptor quinasa (LRR-RLKs) y las proteínas tipo receptor (LRR-RLPs), son potenciales genes de resistencia (genes R) que contienen dominios y motivos conservados específicos (Li et al., 2016).

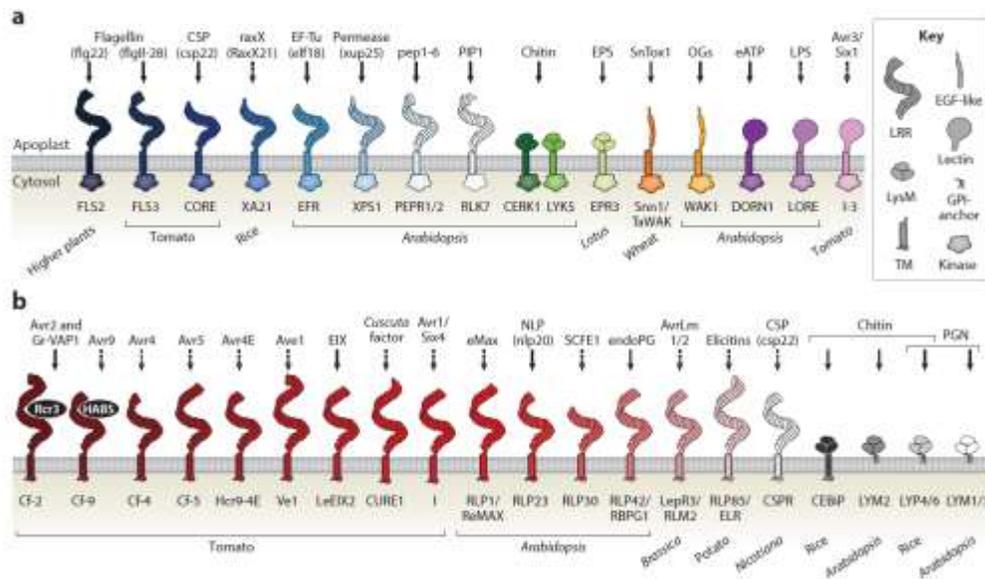
Las proteínas receptoras transmembranales se dividen en dos principales familias. Las proteínas de la familia LRR-RLK (figura 1.9 a) poseen una estructura muy definida compuesta de un dominio extracelular que en su mayoría es de repeticiones ricas en leucina (LRR), aunque existen algunas variaciones con dominios de lisina LysM, de Lectina y EGF-like; un dominio transmembranal, y un dominio quinasa intracelular. Las proteínas de la familia LRR-RLP (figura 1.9 b) por su parte también poseen una estructura principal bien definida: un dominio extracelular LRR (que en ocasiones también puede variar), un dominio transmembranal, y a diferencia de las RLK estas carecen de un dominio como tal de forma intracelular, sin embargo, la cola de residuos que muestran ayuda en su interacción intracelular con otras proteínas río abajo (Kruijt et al., 2005; Boutrot y Zipfel 2017b).

Las proteínas LRR-RLP tienen un papel preponderante tanto en procesos de desarrollo y crecimiento, como en procesos de reconocimiento y defensa. Algunos ejemplos de proteínas involucradas en procesos de desarrollo son la proteína CLAVATA 2 reportada

en *Arabidopsis*, involucrada en el desarrollo de meristemos (Jeong et al.,1999) así como su homólogo en maíz la proteína Fea2 (*FASCIATED EAR 2*) (Taguchi-Shiobara et al., 2001).

Los trabajos de sobre expresión mediante ingeniería genética de PRRs, han dado un enfoque novedoso y una solución original para ampliar el espectro de resistencia a diferentes enfermedades. De hecho, en el caso de las proteínas pertenecientes a la familia LRR-RLP existe todo un subgrupo de proteínas localizadas en *Solanum spp.* (tomate) denominadas Cf las cuales son responsivas al hongo *Cladosporium fulvum* (Jones et al., 1994; Dixon et al., 1996; Thomas et al., 1997; Dixon et al., 1998; Westerink et al., 2004).

En el presente trabajo de tesis, el enfoque es en los genes de resistencia que codifican LRR-RLPs, y nos enfocamos en los genes con estructura canónica, descrita inicialmente con el primer miembro descrito para esta familia génica que fue la proteína Cf-9 (Jones et al., 1994). Se han encontrado reportes en la subfamilia de proteínas Cf de tomate, que median la resistencia contra el hongo biotrófico *Cladosporium fulvum*, perteneciente al mismo orden (Capnodiales) de *P. fijiensis* (Arango-Isaza et al., 2016; Chang et al., 2016; Noar y Daub, 2016), que muestran evidencia sobre el reconocimiento mediante expresión heteróloga en *N. benthamiana* del gen *Avr4* de *P. fijiensis* (Thomas et al., 1997; Stergiopoulos et al., 2010). Debido a lo anterior, se ha formulado la hipótesis de que este reconocimiento podría darse también en el cultivo de plátano hacia el agente causal de Sigatoka negra, por lo cual se buscan proteínas homólogas en *Musa acuminata* que respondan con el mismo mecanismo de respuesta hipersensible a esta enfermedad (Kruijt et al., 2005; Stergiopoulos et al., 2010).



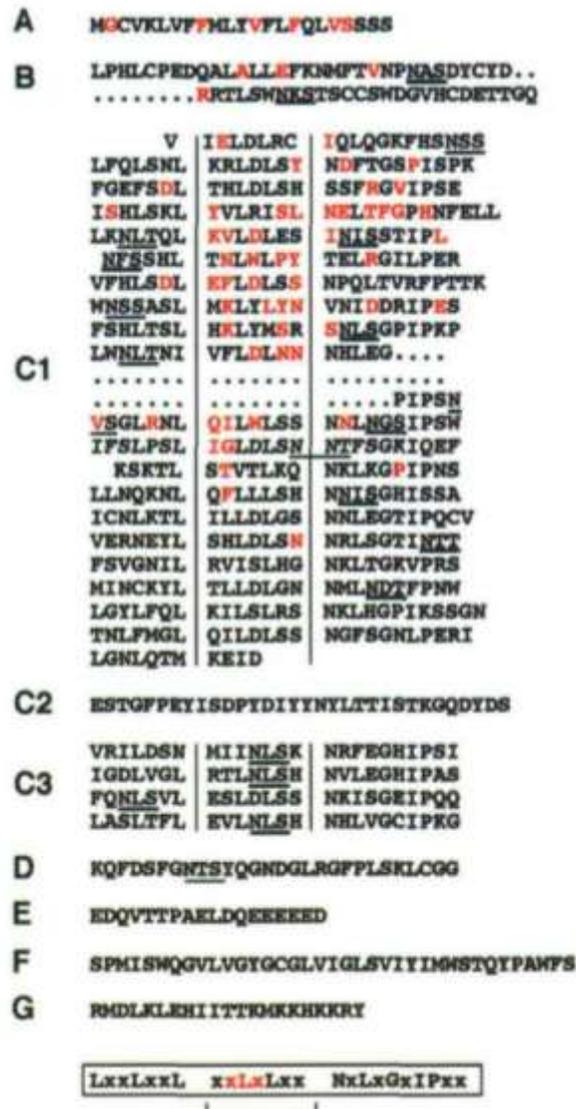
**Figura 1.9. Familia de Receptores de Reconocimiento de Patrones.** Las PRRs se encuentran en la membrana celular, existe una gran gama de variantes de estas proteínas y su especificidad de reconocimiento hacia un grupo patógeno depende de esta diferencia en sus motivos. a) Las proteínas de la familia LRR-RLK; b) Las proteínas de la familia LRR-RLP (Boutrot y Zipfel, 2017b).

### 1.7. El receptor Cf-4 y su función

El primer trabajo en el que se identificó un gen que codifica a una proteína de tipo RLP (Receptor Like Protein) fue realizado por David Jones y colaboradores en 1994 (Jones et al., 1994), en el que se reporta la estructura y secuencia del gen Cf-9 responsivo a *Cladosporium fulvum* y cuya proteína se define como una glicoproteína extra-citoplásmica anclada a membrana, debido a los dominios presentes en su secuencia proteica que reconoce a una proteína de virulencia denominada Avr9 perteneciente a *Cladosporium fulvum*. Por lo tanto, es considerado el miembro fundador de la familia de proteínas Cf en tomate, las cuales actualmente han sido introducidas en la variedad comercial money maker (MM) (Jones et al., 1994). Así mismo, un par de años más tarde se elucidó el origen de un nuevo gen Cf mediante las técnicas de mapeo AFLP y RFLPs, encontrándose en el cromosoma 1 de *Lycopersicon hirsutum* (una variedad silvestre de tomate actualmente denominada *Solanum habrochaites*). Este gen, denominado Cf-4, codifica para una proteína con la misma naturaleza de Cf-9, es decir, una glicoproteína anclada a membrana contando con 25 motivos de repeticiones ricas en leucina, dos más que la proteína Cf-9. La proteína Cf-4 reconoce a otra proteína de avirulencia, la llamada Avr4 secretada por el hongo *Cladosporium fulvum* (Thomas et al., 1997). Este par de genes de virulencia, Avr-4 y Avr-9 junto con los respectivos genes con los que interactúan y que codifican para PRRs se han seguido estudiando, debido a que presentan una respuesta de inmunidad muy precisa y eficiente, y que desencadenan una respuesta hipersensible tras su respectivo reconocimiento haciéndolos un modelo para la ingeniería genética y para los ensayos de resistencia a patógenos (Van Der Hoorn et al., 2000).

El modelo de interacción entre proteína receptora (Cf-4) y su ligando (Avr-4) ha sido estudiado en otras plantas modelo, como por ejemplo *Nicotiana benthamiana* (I. Stergiopoulos et al., 2010). En el mencionado trabajo se identificó un gen Cf-4 que codifica para una RLP capaz de reconocer un gen de avirulencia de *Pseudocercospora fijiensis*, el agente causal de la Sigatoka Negra, y que es homólogo a Avr4 de *C. fulvum*, y que pudo iniciar en la planta modelo *N. benthamiana* una respuesta de defensa similar a la observada en tomate (*Solanum lycopersicum*). Este hecho se puede explicar debido a que diferentes hongos patógenos miembros de la clase Dothideomycete producen sus propias proteínas de virulencia las cuales, como se logró demostrar en este trabajo, comparten un porcentaje de identidad y funcionalidad (Arango-Isaza et al., 2016).

Actualmente se sabe sobre este modelo de interacción que requiere de otras dos proteínas receptoras, las proteínas RK BAK1 y SERK3, para formar un complejo de reconocimiento, el cual bajo la elicitación de Avr-4 en el apoplasto promueve la interacción de este complejo de receptores y la endocitosis dentro de los compartimentos positivos de la vía tardía endosomal ARA7 y ARA6, destinados a la degradación vacuolar (Postma et al., 2016).



**Figura 1.10 Dominios estructurales de Cf-4.** La proteína Cf-4 es una glicoproteína extracelular anclada a la membrana con repeticiones ricas en leucina (LRR). La secuencia es dividida en diversos dominios (A a G = 7 en total) para enfatizar las similitudes estructurales con Cf-9 (Jones et al. 1994). El dominio A) representa un péptido señal putativo, y B) es la N terminal madura. La secuencia consenso para la proteína LRR extracitoplásmica es mostrada en la caja y alineada bajo la secuencia consenso de Cf-4, con residuos correspondientes a la lámina beta mostrada en rojo. Los residuos correspondientes a el motivo de láminas beta / giro beta en PRI son indicados por un paréntesis y delimitado por líneas verticales en la secuencia Cf-4. Los dominios E, F, y G son predichos como anclados para las proteínas Cf-9 y Cf-4 y orientados en la membrana celular (Jones et al., 1994). Los aminoácidos idénticos entre Cf-4 y Cf-9 son mostrados en negro, y los aminoácidos variantes se encuentran en rojo. Las deleciones en Cf-4 relativas a Cf-9 son indicadas en puntos. Las potenciales secuencias de glucosilación NxS/T son delineadas (Thomas et al., 1997).

### 1.8. Estudios a escala genómica de la familia LRR-RLP en plantas

Los receptores transmembranales anclados en la membrana celular de tipo LRR-RLP presentan un papel fundamental en la percepción de patrones inmunogénicos extracelulares que desencadenen una respuesta de defensa efectiva para detener la dispersión del patógeno. Se han encontrado involucrados diversos miembros de genes de resistencia a enfermedades de la clase LRR-RLP que confieren resistencia a los patógenos más devastadores en la agricultura (Kanyuka y Rudd, 2019). Los análisis de genoma completo de la familia LRR-RLP en plantas modelo como *Arabidopsis*, tomate y arroz han proporcionado información valiosa sobre su estructura, organización genómica y evolución (Fritz-Laylin et al., 2005; Wang et al., 2008; Kang y Yeom, 2018; Steidele y Stam, 2021). Recientemente, se han ampliado los análisis sobre la familia de receptores LRR-RLP publicándose reportes en plantas no modelo como son algodón (Chen et al., 2015) y leguminosas (soya (*G.max*), frijol (*P. vulgaris*), barrel (*M. truncatula*), frijol mungo (*V. radiata*), caupi o alubia (*V. unguiculata*), judía adzuki (*V. angulans*), guandul (*C. cajan*)), (Restrepo-Montoya et al., 2021) en la planta maderable de álamo (Petre et al., 2014) y en Chile (Kang et al., 2021 a; Kang et al., 2021 b), lo cual podría permitir el descubrimiento de nuevos genes de resistencia a enfermedades en estos cultivos.

### 1.9. Reportes de Genes de Resistencia en plátano.

La principal fuente de recursos para mejoramiento genético contra alguna enfermedad en los cultivos son los ancestros silvestres, es por ello de gran importancia la secuenciación de los dos principales genomas de plátano el genoma de *M. acuminata* (D'hont et al., 2012) y *M. balbisiana* (Davey et al., 2013) , y entre estos la búsqueda dirigida hacia los llamados genes de resistencia (Hammond-Kosack y Kanyuka, 2007).

Los trabajos para mejorar la resistencia a patógenos en el cultivo de plátano, y la búsqueda de genes de resistencia, sobre todo para las enfermedades fúngicas más devastadoras, ha llevado a diversos análisis de perfiles transcriptómicos en búsqueda de genes, en las vías de señalización que podrían conferir resistencia ( Li et al., 2012; Passos et al., 2013; Guo et al., 2014; Li et al., 2013; Noar y Daub 2016; Ahmad et al., 2020).

Entre estos reportes los primeros y más destacables han buscado entre los genes del tipo NBS-LRR, encontrando con la ayuda de estrategias de cebadores degenerados (Pei et al., 2007) diferentes genes candidatos a resistencia (Peraza-Echeverria et al., 2008; 2009). Entre estos el gen más destacable, debido a su mayor avance, ha sido el RGA2 (o mejor conocido como RGC2), el cual fue transferido por transformación a las plantas del cultivar comercial 'Enano Gigante', y ha demostrado que confiere resistencia a *Fusarium oxysporum* TR4 en el cultivo en campo experimental (Dale et al., 2017).

Además, existen reportes de análisis genómicos globales sobre la familia de genes NBS-LRR, que son genes de resistencia; tanto (Miller et al., 2008) como el más reciente reporte de búsqueda global de miembros, realizado por (Chang et al., 2020) hacen referencia a esta familia como una buena fuente para la búsqueda de genes de resistencia. Este tipo de trabajo nos lleva a continuar la búsqueda del mejoramiento del cultivo de plátano en

las diferentes familias de genes de resistencia, por ello hemos propuesto en el presente trabajo, realizar una revisión de la familia LRR-RLP y sus miembros, debido a que se cuenta con suficiente evidencia inicial como indicativo de que podrían participar en la detección y encendido de los mecanismos de defensa en plátano.

## JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades de origen fúngico ocasionan grandes pérdidas económicas en la producción de plátano. En primer lugar, el mal de Panamá o marchitamiento por *Fusarium* causado por Foc TR4 no tiene ningún tratamiento efectivo, por lo que obliga a los agricultores a abandonar el cultivo de plátano en esas áreas; por otro lado, el manejo de la enfermedad de la Sigatoka negra causa grandes costos en la producción mundial de plátano, superando los \$500 millones de dólares por año. Para su control se requiere de múltiples aplicaciones de pesticidas que contaminan el ambiente y ponen en riesgo la salud humana de las familias que laboran en las plantaciones. Además, la producción y aplicación de los pesticidas requieren de combustibles fósiles, lo cual agudiza el problema actual del calentamiento global. De tal forma, se le puede considerar a la industria de plátano como una de las actividades más contaminantes en la agricultura. Actualmente se cuenta con la secuenciación de los genomas progenitores de banana: *M. acuminata* y *M. balbisiana* los cuales pueden aprovecharse para realizar análisis genómicos con ayuda de herramientas bioinformáticas acerca de una familia génica blanco y encontrar mediante este ejercicio de escrutinio genes blanco para la edición del genoma con las cuales conferir nuevas características deseables, como la resistencia a enfermedades.

Por tanto, una solución sería la generación de plantas de plátano resistentes a hongos como los agentes causales de las principales enfermedades en el cultivo, iniciando con la búsqueda y escrutinio en el genoma de familias de genes que puedan ser considerados Genes Candidatos de Resistencia o RGCs (Resistance Gene Candidates), por lo que en nuestro proyecto se propuso la búsqueda de genes de la familia RLP en el genoma de este cultivo, los cuales la evidencia ha demostrado, son receptores con excelente respuesta de resistencia ante hongos patógenos, sobre todo especies cercanas a los agentes causales del Mal de Panamá y Sigatoka Negra.

## **HIPÓTESIS**

La familia LRR-RLP de plátano está conformada por un grupo numeroso de genes que se distribuyen en la mayoría de los cromosomas de esta planta formando clústers génicos, y sus relaciones filogenéticas cercanas con genes de resistencia *LRR-RLP* permitirá identificar candidatos a genes de resistencia. Además, miembros de esta familia alterarán su expresión en respuesta a la infección con el hongo *Fusarium oxysporum*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar la estructura, localización cromosómica, filogenia y expresión de los miembros de la familia LRR-RLP de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar la estructura y localización cromosómica de los miembros de la familia *LRR-RLP* de plátano.
2. Caracterizar las relaciones filogenéticas de los miembros de la familia LRR-RLP de plátano y analizar su expresión en respuesta a Foc raza 1 y Foc TR4.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**Figura 1.11. Estrategia Experimental General.** El estudio genómico de la familia LRR-RLP en plátano se dividió en dos objetivos específicos. El primer objetivo fue la caracterización de estructura y localización de secuencias de genes LRR-RLP de plátano. El segundo objetivo contempla la caracterización de la relación filogenética y análisis de expresión de las secuencias de genes LRR-RLP de plátano.



## CAPÍTULO II CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA *LRR-RLP* DE PLÁTANO.

### 2.1 INTRODUCCIÓN

El plátano es el principal fruto tropical exportado y consumido a nivel mundial (FAO,2019). La limitada resistencia ante los patógenos hace necesaria la mejora genética, sin embargo, esta se ve obstaculizada por la esterilidad de algunos cultivares triploides, como los del subgrupo Cavendish. Una forma de superar este problema es desarrollar nuevos cultivares mediante métodos de mejoramiento no convencionales (Morais-Lino et al., 2016). Es por ello que se han desarrollado diversos protocolos de regeneración de plátano (Tumuhimbise y Talengera, 2018) y algunos protocolos de mejoramiento genético para la introducción de genes de resistencia, tanto con *Agrobacterium tumefaciens* (May et al., 1995) como por la técnica de biobalística (Sagi et al., 1994); hasta llegar a la nueva era de transformación mediante la edición génica (Tripathi et al., 2019; Wang et al., 2021). Es así como en los últimos años se ha aprovechado la tecnología de CRISPR-Cas9 para la edición génica en plátano, lográndose la edición de genes como el de la *PDS* (Phytoeno desaturase) (Naim et al., 2018) y algunos genes para defensa contra patógenos como el gen *DRM6* (Tripathi et al., 2021), así como la edición de genes para el combate del virus eBSV intrínseco en el genoma B de algunos cultivares (Tripathi et al., 2019) y la edición con el gen *MaACO1* para conceder un mayor tiempo de vida de anaquel al fruto (Hu et al., 2021). Además de estos avances significativos encontramos un gran acervo genético en los genomas publicados de plátanos silvestres diploides (<https://banana-genome-hub.southgreen.fr/>), en especial en el genoma A proveniente de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* que fue descrito por D'Hont y colaboradores (D'hont et al., 2012) y en el genoma de la especie aportadora del genoma B, *Musa balbisiana* (Davey et al., 2013) La disponibilidad de estos datos genómicos también despeja el camino para una identificación precisa de secuencias blanco para la tecnología de edición del genoma, minimizando la probabilidad de efectos fuera del objetivo en los plátanos modificados (Pua et al., 2019).

Se han estudiado diversas familias de genes en las especies silvestres de plátano, como fuente de resistencia hacia las principales enfermedades fúngicas causadas por Foc y *P. fijiensis*. Se han aislado candidatos a genes de resistencia de la clase de sitios de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina (NBS-LRR) (Peraza-Echeverria et al., 2008; 2009; Miller et al., 2008). Notablemente, uno de estos candidatos a genes de resistencia, el gen RGA2, también conocido como RGC2 (Peraza-Echeverria et al., 2009) demostró la capacidad de activar una respuesta de inmunidad en Cavendish contra Foc TR4 en pruebas de campo (Dale et al., 2017). Además, recientemente se publicó un análisis a escala genómica de la familia NBS-LRR de plátano (Chang et al., 2020). El análisis a escala genómica de diferentes clases de genes R en plátano podría facilitar la identificación de secuencias novedosas de genes R contra Foc o *P. fijiensis*, lo cual puede ser utilizado para mejoramiento genético de cultivares susceptibles de plátano destinados al consumo local o de exportación como es el caso del olvidado cultivar Gros Michel.

Las proteínas de resistencia transmembranales LRR-RLP han sido estudiadas en varias especies de plantas como *Arabidopsis* y Arroz (Fritz-Laylin et al., 2005; Steidele y Stam 2021), álamo (Petre et al., 2014), algodón (Chen et al., 2015), tomate (Kang y Yeom, 2018), legumbres (Restrepo-Montoya et al., 2021) y recientemente en Chile (Kang et al., 2021a; Kang et al., 2021b); en plátano no se habían realizado estudios, a pesar de que existe una gran probabilidad de que en esta familia se encuentren genes de resistencia para los hongos *F. oxysporum* y *P. fijiensis*. Para el caso del hongo *F. oxysporum* se han reportado genes de resistencia de la familia LRR-RLP en tomate y *Arabidopsis* que confieren resistencia para su forma *specialis lycopersici* (Fol), teniendo como ejemplos los casos de los genes *I* e *I-7* de tomate y del gene *RFO2* en *Arabidopsis* (Shen y Diener, 2013; Catanzariti et al., 2017; Gonzalez-Cendales et al., 2016). Por otra parte, se tienen reportes de un gen LRR-RLP de tomate denominado *Cf-4* responsable de conferir resistencia al hongo *C. fulvum* mediante el reconocimiento de la proteína efectora CfAVR4 y que a su vez puede reconocer a la proteína efectora PfAVR4 de *P. fijiensis*, la cual es homóloga a CfAVR4 (Postma et al., 2016). Este reconocimiento conduce a una respuesta tipo hipersensible en hojas de *N. benthamiana* (Stergiopoulos et al., 2010). Los hongos patógenos Fol y *C. fulvum* son taxonómicamente y filogenéticamente cercanos a los patógenos de plátano Foc y *P. fijiensis*, respectivamente (Arango-Isaza et al., 2016; Guo et al., 2014), y tanto sus interacciones con el genoma de su hospedero, como su función, nos podría acercar a descubrir las diferentes clases de genes de resistencia (R) que se podrían encontrar en el genoma de plátano y el papel de estos en la inmunidad del cultivo ante sus principales patógenos. Dado estos antecedentes, en este capítulo realizamos por primera vez la identificación, caracterización estructural y localización en los cromosomas de los miembros de la familia LRR-RLP de plátano.

## 2.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental llevada a cabo para el primer objetivo del proyecto se describe gráficamente en la figura 2.1 donde se mencionan los pasos y programas utilizados en cada etapa del análisis.



Figura 2.1. Estrategia Experimental.

## 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.1 Rastreo de secuencias *LRR-RLP* en el genoma de plátano.

La búsqueda de secuencias que presenten las características de una *LRR-RLP* en el genoma de *Musa acuminata* inició con la elaboración de un perfil HMM (Hidden Markov Model), con ayuda del programa hmmerbuild del paquete HMMER v3.3 (Eddy 2011) utilizando 20 secuencias de genes *LRR-RLP* previamente estudiadas y caracterizadas funcionalmente (anexo cuadro suplementario 1). La región considerada para realizar el perfil HMM fue la región correspondiente a los dominios C3 a D utilizando el alineamiento múltiple realizado en el programa Clustal Omega (Sievers y Higgins, 2018) como lo reportaron (Kang y Yeom, 2018) el resultado se observa en la figura 2.2. El perfil creado sirvió para realizar una búsqueda en el genoma de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* v2 publicado en la base de datos de plátano (<https://banana-genome-hub.southgreen.fr/>) mediante la herramienta hmmersearch del paquete HMMER v3.3. Los números de accesión obtenidos como resultado, se enlistaron y compilaron guardando las secuencias en formato fasta para los siguientes análisis.

### 2.3.2 Identificación de secuencias *LRR-RLP* en el genoma de plátano.

Después de obtener los resultados de búsqueda con el programa hmmersearch, se procedió a el análisis de motivos utilizando los programas SMART (Letunic et al., 2020) ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)) e InterProScan (Mulder y Apweiler, 2007) (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) con la finalidad de detectar la presencia de los dominios de repeticiones ricas en leucina (*LRR*) y el dominio transmembranal característicos de la familia *LRR-RLP*, realizando además una revisión de la longitud y posición de estos motivos. También se utilizó el programa Compute pI/Mw (Gasteriger et al., 2005) de la plataforma ExPasy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) para determinar el punto isoeléctrico y masa molecular de cada proteína predicha. Finalmente se empleó una búsqueda con el programa DeepLoc (Armenteros et al., 2017) para predecir la localización subcelular (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>). El programa DeepLoc es un algoritmo de predicción utilizando redes neurales profundas para predecir la localización subcelular apoyándose solo en la información de la secuencia aminoacídica, el modelo predictivo utiliza una red neural recurrente que procesa la secuencia completa de la proteína y un mecanismo de atención que identifica las regiones importantes de la localización subcelular (Armenteros et al., 2017).

### 2.3.3 Identificación de exones, intrones y regiones no traducibles en los genes *LRR-RLP*.

Las secuencias de genes y regiones codificantes de los miembros de la familia *LRR-RLP* de plátano se introdujeron al programa GSDS, Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) (Hu et al., 2015) con el objetivo de identificar las regiones de intrones y exones de cada gene, así como las regiones no codificantes o UTRs

(untranslated regions). Esta información se desplegó de forma gráfica junto con la filogenia de los miembros de la familia LRR-RLP de plátano.

### **2.3.4 Identificación de motivos conservados en las proteínas LRR-RLP**

Posteriormente se introdujeron al programa MEME v5.4.1 (Bailey et al., 2015) las secuencias proteicas de los LRR-RLP para obtener un perfil completo de motivos conservados identificados entre la familia RLP de plátano. A continuación, se desplegó de manera gráfica 10 motivos conservados localizados en las secuencias con ayuda del programa GSDS a la par de la filogenia de la familia de LRR-RLP de plátano.

### **2.3.5 Localización de los genes *LRR-RLP* en los cromosomas**

Las secuencias génicas fueron localizadas en el cromosoma correspondiente con el programa Map Gen 2 Chromosome v2 (MG2C) ([http://mg2c.iask.in/mg2c\\_v2.0/](http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/)) (Chao et al., 2021), de acuerdo a la información obtenida de su posición tras hacer un tBlastn con la secuencia proteica disponible en el genoma de *M. acuminata* spp. *malaccensis* DH-Pahang v2. El número de clústers fue determinado de acuerdo al criterio establecido por (Jupe et al., 2012), el cual estima que la distancia entre dos o más secuencias debe ser igual o menor a 200kb para ser considerado como un clúster.

### **2.3.6 Modelaje tridimensional de proteínas de la familia LRR-RLP de plátano**

El siguiente análisis que se realizó fue una predicción de la estructura tridimensional de los miembros LRR-RLP de plátano encontrados en la parte distal del cromosoma 10; para ello se utilizó la plataforma Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>). El modelo tridimensional obtenido se editó con el programa PyMoL v 2.0.7.

## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 Identificación, anotación y localización subcelular de secuencias *LRR-RLPs* en el genoma de plátano.

El alineamiento de la región que abarca del dominio C3 al D de 20 secuencias LRR-RLP y que se utilizó para la generación del perfil de búsqueda HMM se muestra en la figura 2.2. Con el perfil HMM se logró la obtención de 846 secuencias LRR del genoma de *M. acuminata* spp. *malaccensis*. Con la combinación de programas utilizados se logró la identificación 78 secuencias que cumplían con las características y dominios de la familia LRR-RLP (cuadro 2.1). Estos 78 miembros fueron subdivididos en dos clases, la primera subclase con 59 miembros (76%) es la subclase donde encontramos secuencias con motivo de péptido señal, dominio LRR y dominio transmembranal, así como la cola de residuos intracelular. La segunda subclase la conforman 19 miembros (24%), los cuales contienen el dominio LRR y el dominio transmembranal. La longitud de las proteínas LRR-RLP varió de 275 aa (MaLRR-RLP54) a 1728 aa (MaLRR-RLP26). Los genes *LRR-RLP* de plátano fueron nombrados con el prefijo 'Ma' de *M. acuminata* seguido por un número designado de acuerdo a su posición de arriba a abajo de los 11 cromosomas.



**Cuadro 2.1. Anotación de genes LRR-RLP en plátano.** Anotación de 78 genes LRR-RLP identificados en el genoma de *M. acuminata* spp. *malaccensis*.

Nombre de Gen	ID Secuencia	Dominios <sup>a</sup>	Longitud Proteína	kDa	pI	Localización Subcelular
<i>MaLRR-RLP01</i>	Ma01_p05590.1	SP-LRR-TM	976	104.65	6.27	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP02</i>	Ma01_p07780.1	SP-LRR-TM	280	29.80	7.60	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP03</i>	Ma02_p10510.1	SP-LRR-TM	280	29.77	6.71	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP04</i>	Ma02_p11370.1	SP-LRR-TM	465	49.35	9.33	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP05</i>	Ma02_p12110.1	SP-LRR-TM	1098	123.51	5.75	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP06</i>	Ma02_p12120.1	LRR-TM	684	76.37	5.00	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP07</i>	Ma02_p12140.1	LRR-TM	732	82.10	6.08	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP08</i>	Ma02_p12150.1	SP-LRR-TM	903	102.55	5.98	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP09</i>	Ma02_p12160.1	LRR-TM	1096	123.30	5.30	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP10</i>	Ma02_p12190.1	LRR-TM	584	65.46	5.73	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP11</i>	Ma02_p12580.1	SP-LRR-TM	976	108.33	5.75	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP12</i>	Ma02_p12610.1	SP-LRR-TM	795	89.78	5.55	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP13</i>	Ma02_p12630.1	LRR-TM	998	113.02	5.96	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP14</i>	Ma02_p12660.1	SP-LRR-TM	853	96.55	5.71	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP15</i>	Ma02_p12670.1	SP-LRR-TM	1076	120.27	6.48	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP16</i>	Ma03_p02400.1	SP-LRR-TM	973	106.68	5.15	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP17</i>	Ma03_p19590.1	SP-LRR-TM	772	84.27	6.44	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP18</i>	Ma03_p27010.1	SP-LRR-TM	281	29.90	5.88	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP19</i>	Ma03_p28990.1	SP-LRR-TM	1219	134.93	5.40	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP20</i>	Ma03_p29020.1	SP-LRR-TM	851	95.65	5.71	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP21</i>	Ma03_p29780.1	SP-LRR-TM	709	78.56	5.25	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP22</i>	Ma03_p29790.1	SP-LRR-TM	1073	119.30	5.36	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP23</i>	Ma03_p29840.1	SP-LRR-TM	1065	117.41	4.94	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP24</i>	Ma03_p29850.1	LRR-TM	704	78.89	5.81	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP25</i>	Ma03_p29910.1	LRR-TM	717	80.29	5.91	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP26</i>	Ma03_p29970.1	SP-LRR-TM	1728	191.53	5.29	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP27</i>	Ma03_p30010.1	LRR-TM	716	79.78	5.50	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP28</i>	Ma03_p31870.1	SP-LRR-TM	287	30.02	5.40	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP29</i>	Ma04_p06430.1	SP-LRR-TM	1092	118.88	5.18	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP30</i>	Ma04_p07610.1	SP-LRR-TM	721	77.83	8.41	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP31</i>	Ma04_p20720.1	SP-LRR-TM	841	92.49	5.50	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP32</i>	Ma04_p22770.1	SP-LRR-TM	728	81.22	5.01	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP33</i>	Ma04_p22780.1	SP-LRR-TM	943	104.62	5.64	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP34</i>	Ma04_p29910.1	SP-LRR-TM	984	107.17	5.60	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP35</i>	Ma04_p32290.1	SP-LRR-TM	599	66.07	7.07	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP36</i>	Ma04_p32300.1	SP-LRR-TM	597	65.97	5.97	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP37</i>	Ma04_p32760.1	SP-LRR-TM	974	108.41	5.11	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP38</i>	Ma04_p32770.1	LRR-TM	1009	111.79	4.82	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP39</i>	Ma04_p32780.1	LRR-TM	871	96.61	4.64	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP40</i>	Ma04_p32810.1	SP-LRR-TM	993	110.20	4.74	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP41</i>	Ma04_p33500.1	SP-LRR-TM	338	36.02	9.24	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP42</i>	Ma04_p35850.1	SP-LRR-TM	961	103.93	5.12	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP43</i>	Ma04_p36340.1	SP-LRR-TM	980	110.29	6.02	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP44</i>	Ma05_p12870.1	SP-LRR-TM	854	94.06	8.66	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP45</i>	Ma05_p16530.1	SP-LRR-TM	462	50.00	8.33	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP46</i>	Ma05_p19050.1	LRR-TM	481	52.82	4.94	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP47</i>	Ma06_p10770.1	SP-LRR-TM	982	107.99	6.20	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP48</i>	Ma06_p10790.1	SP-LRR-TM	925	103.14	5.72	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP49</i>	Ma06_p10800.1	SP-LRR-TM	1667	183.83	5.41	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP50</i>	Ma06_p10810.1	LRR-TM	974	107.05	5.93	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP51</i>	Ma06_p10820.1	SP-LRR-TM	990	109.57	5.94	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP52</i>	Ma06_p10830.1	SP-LRR-TM	972	107.84	5.78	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP53</i>	Ma06_p10880.1	SP-LRR-TM	475	51.97	5.45	Membrana Celular

---

<i>MaLRR-RLP54</i>	Ma06_p26220.1	SP-LRR-TM	275	29.17	8.51	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP55</i>	Ma06_p33510.1	SP-LRR-TM	427	45.03	8.64	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP56</i>	Ma07_p04260.1	SP-LRR-TM	733	79.43	6.71	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP57</i>	Ma07_p18320.1	LRR-TM	891	97.53	5.57	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP58</i>	Ma07_p19540.1	SP-LRR-TM	1115	122.28	5.73	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP59</i>	Ma07_p26290.1	SP-LRR-TM	465	49.96	5.06	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP60</i>	Ma07_p28580.1	SP-LRR-TM	285	29.63	5.16	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP61</i>	Ma08_p16720.1	SP-LRR-TM	484	52.98	5.32	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP62</i>	Ma09_p00750.1	SP-LRR-TM	478	52.30	6.09	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP63</i>	Ma09_p05420.1	SP-LRR-TM	424	44.62	8.48	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP64</i>	Ma09_p22650.1	SP-LRR-TM	1013	112.09	5.28	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP65</i>	Ma09_p22680.1	LRR-TM	1040	114.95	5.03	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP66</i>	Ma09_p22690.1	LRR-TM	1082	119.59	5.07	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP67</i>	Ma09_p22710.1	SP-LRR-TM	1336	148.51	5.11	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP68</i>	Ma09_p22720.1	LRR-TM	587	65.49	5.64	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP69</i>	Ma10_p00450.1	SP-LRR-TM	624	70.87	5.51	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP70</i>	Ma10_p00470.1	LRR-TM	585	65.92	6.66	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP71</i>	Ma10_p00480.1	LRR-TM	631	71.10	5.38	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP72</i>	Ma10_p00490.1	SP-LRR-TM	677	76.94	6.39	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP73</i>	Ma10_p00500.1	SP-LRR-TM	676	75.97	5.14	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP74</i>	Ma10_p00550.1	SP-LRR-TM	902	100.82	5.43	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP75</i>	Ma10_p00570.1	SP-LRR-TM	917	102.26	5.22	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP76</i>	Ma10_p16560.1	SP-LRR-TM	722	77.99	4.99	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP77</i>	Ma10_p20250.1	LRR-TM	449	49.50	5.28	Membrana Celular
<i>MaLRR-RLP78</i>	Ma10_p28400.1	SP-LRR-TM	1034	112.83	5.72	Membrana Celular

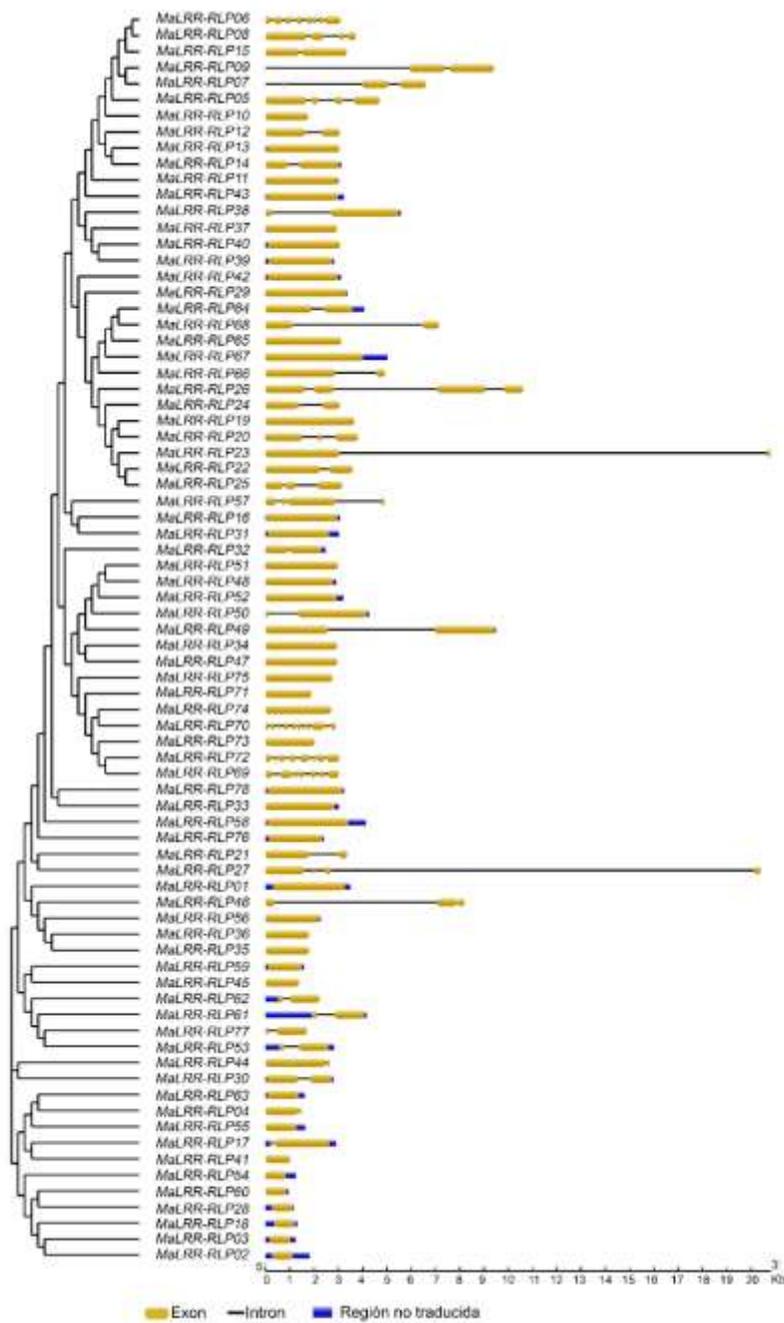
---

<sup>a</sup> SP, péptido señal; LRR, dominio de repeticiones ricas en leucina; TM, dominio transmembranal.

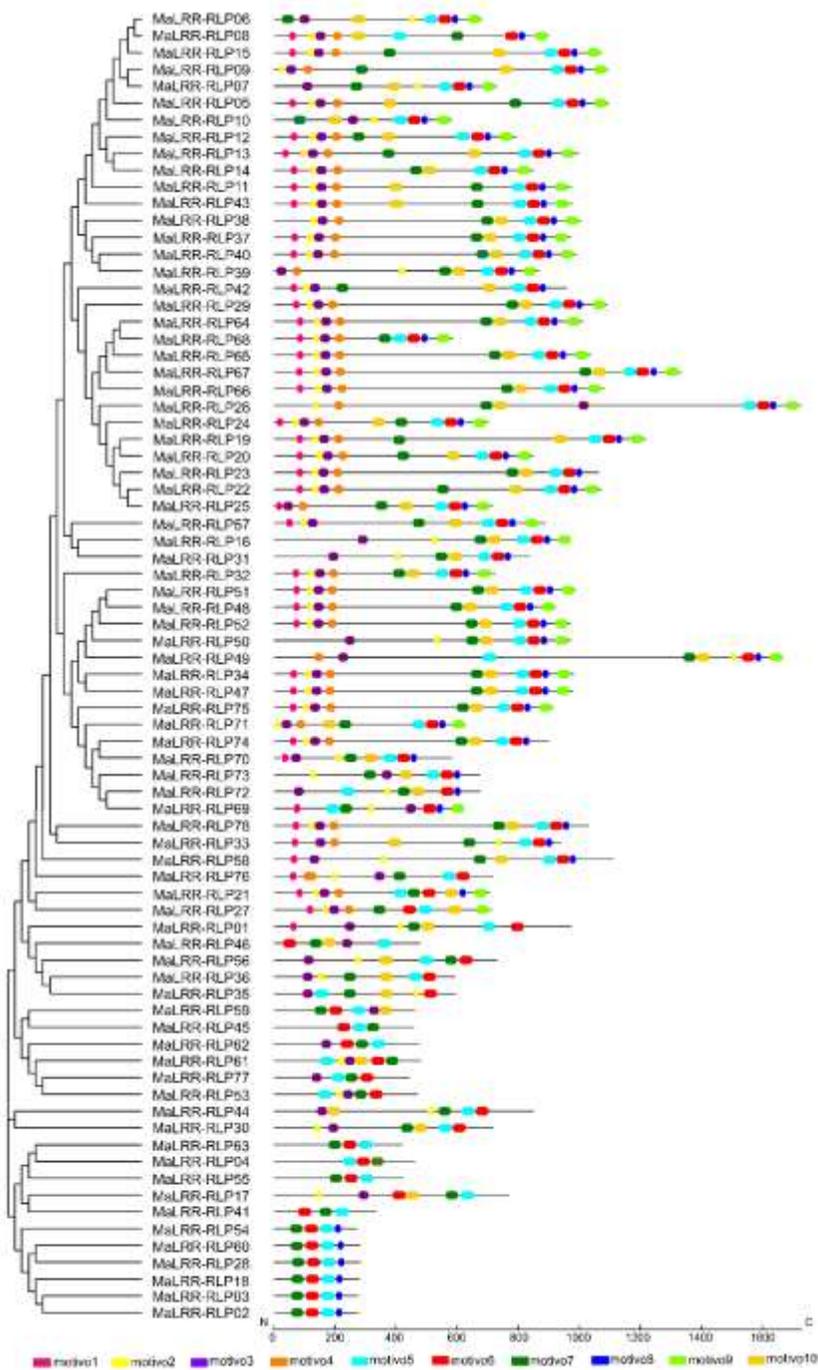
### **2.4.2 Análisis de la estructura génica de los *MaLRR-RLP* e identificación de motivos conservados en sus secuencias proteicas.**

La estructura génica de los genes *MaLRR-RLP* se muestra en la figura 2.3. En general se encontró que la mayoría de estos genes no cuentan con intrones o poseen solo uno. Se observó que 42 de los 78 genes *MaLRR-RLP* no presentaron intrones (54%) y 21 genes solo presentaron un intron (27%). El resto de los genes presentó 2 o más intrones; 6 genes presentaron 2 intrones, 5 genes presentaron 3 intrones, 2 genes presentaron 8 intrones, un gen presentó 9 intrones y finalmente el gen *MaLRR-RLP70* presentó el mayor número de intrones con 10.

Por otro lado, fueron identificados 10 motivos con el programa MEME mediante el escaneo de las 78 secuencias *MaLRR-RLPs* (Figura 2.4). En esta figura se observa la distribución de los motivos con base en la filogenia, la mayoría de los motivos detectados están asociados con la región de repeticiones ricas en leucina. No se encontraron motivos asociados con algún dominio cinasa. Estos datos apoyan la anotación presentada en la figura 2.4 e ilustra la distribución y conservación de estos motivos a lo largo de las 78 proteínas *MaLRR-RLP*. Las proteínas con estructuras similares se agruparon en el mismo clado filogenético.



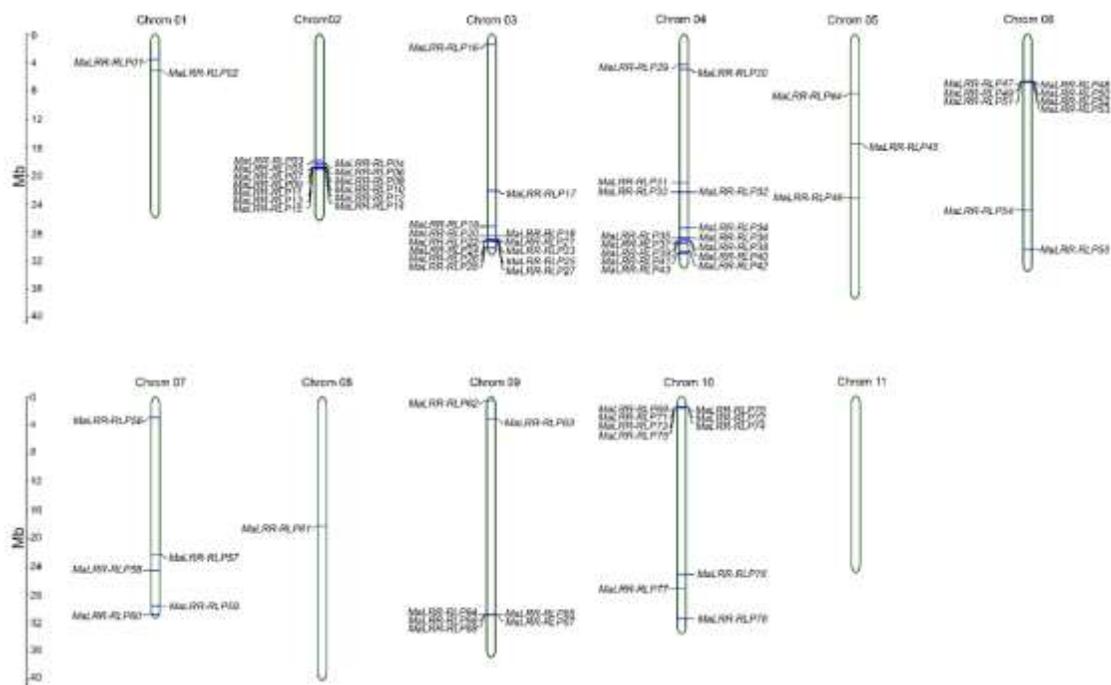
**Figura 2.3 Estructura de los genes *MaLRR-RLP* de plátano.** Los exones esta representados por barras de color amarillo, los intrones con líneas de color negro y los extremos 5' y 3' UTR se muestran en barras de color azul.



**Figura 2.4** Motivos conservados de las proteínas MaLRR-RLP de plátano. Los motivos conservados en las proteínas MaLRR-RLP fueron detectados con el programa MEME, se observan representados con diversos colores.

### 2.4.3 Localización de los genes *MaLRR-RLP* en los cromosomas

Como parte de la caracterización de las secuencias anotadas como proteínas LRR-RLP, en este trabajo nos dimos a la tarea de ubicar la posición de los 78 miembros de la familia LRR-RLP de plátano en los cromosomas de esta planta. Los 78 genes *MaLRR-RLP* se distribuyeron en 10 cromosomas con excepción del cromosoma 11, en el cual no se encontraron genes de este tipo. La mayoría de los genes *MaLRR-RLP*, 47 en total (60%) formaron clusters génicos dentro de los cromosomas. Se detectó un total de 10 clusters de acuerdo a los criterios de Jupe et al. (2012). En la figura 2.5 se ilustra la distribución de los clusters génicos; los cromosomas 6, 9 y 10 presentaron un solo clúster cada uno, y los cromosomas 2 y 3 presentaron dos clústers cada uno, mientras que en el cromosoma 4 se detectaron tres clústers. Los cromosomas 6 y 10 presentaron los clusters más grandes con 7 genes en cada cromosoma. Los 10 clústeres identificados se encontraron en la parte distal de sus cromosomas respectivos. Los 31 genes restantes se distribuyeron de forma dispersa, en pares o triples en los 10 cromosomas, en el cromosoma 8 sólo se encontró un gen en la parte central del mismo.



**Figura 2.5** Distribución de los genes *MaLRR-RLP* en *M. acuminata* ssp. *malaccensis*. La Distribución de los genes *MaLRR-RLP* en los cromosomas de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* se observa en diez de los once cromosomas, en algunos casos formando clústers génicos.

#### 2.4.4 Genes *LRR-RLP* de plátano con potencial de resistencia a Foc raza1 forman un clúster en el cromosoma 10.

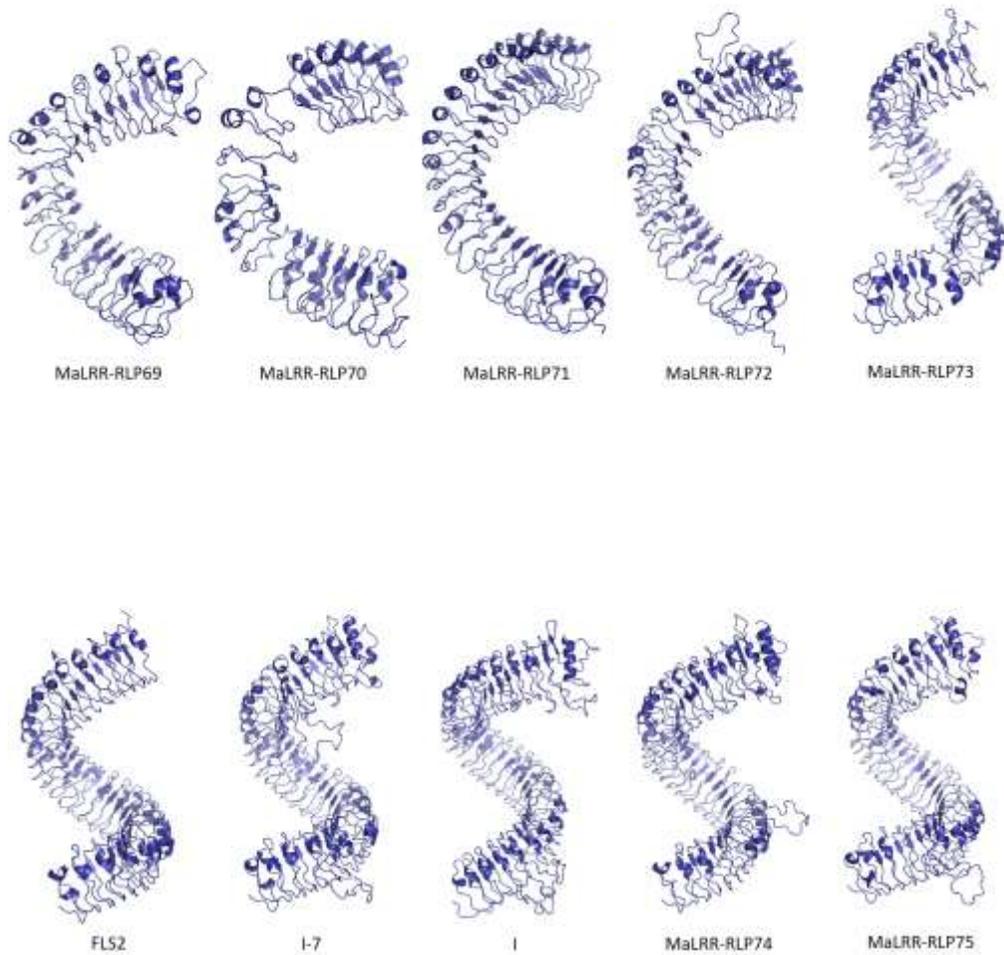
Recientemente, Ahmad y colaboradores (Ahmad et al., 2020) reportaron el mapeo genético de la resistencia hacia Foc raza 1 en el plátano silvestre *M. acuminata* ssp. *malaccensis*. Los autores descubrieron que un locus dominante es el responsable de la resistencia hacia Foc raza 1 y lo detectaron cerca de la parte distal del cromosoma 10. La región que mapearon asociada a este locus tuvo una extensión de aproximadamente 360 kb, la cual presentó 165 genes predichos, incluyendo 19 genes *LRR-RLKs*. El papel de los *LRR-RLKs* en la inmunidad de plantas los hace blancos obvios como candidatos a genes de resistencia (CGR) para iniciar la búsqueda del gen de resistencia a Foc raza 1. Debido a que en nuestro estudio encontramos siete genes *MaLRR-RLPs* (*MaLRR-RLP69*, *MaLRR-RLP70*, *MaLRR-RLP71*, *MaLRR-RLP72*, *MaLRR-RLP73*, *MaLRR-RLP74*, and *MaLRR-RLP75*) en la parte distal del cromosoma 10 (Figura 2.5), decidimos inspeccionar los 165 genes encontrados por Ahmad y colaboradores en 2020 (Ahmad et al., 2020), en la región de 360 kb asociada con la resistencia a Foc raza 1. Encontramos que los números de accesión de los siete genes identificados como *LRR-RLPs* en la parte distal del cromosoma 10 correspondieron a siete de los 19 genes *LRR-RLKs* putativos reportados por Ahmad et al y colaboradores. En base a este resultado se procedió a analizar la estructura de los 19 *LRR-RLKs* putativos con las plataformas InterProScan, SMART y DeepLoc. La anotación de estos genes no reveló a algún gen que codificará para una *LRR-RLK* (*LRR-TM-Kinase*), en cambio, se encontraron los siete *LRR-RLPs* mencionados anteriormente, mientras que los 12 genes restantes codificaron para dominios *LRR*, *Cinasa* y *Malectina* (Cuadro 2.2).

En la investigación de la presente tesis con respecto a la familia *LRR-RLP* en el genoma de *M. acuminata* spp. *malaccensis* v2, se observó que varias secuencias estaban anotadas como *LRR-RLKs*, sin embargo, nuestra anotación reveló que su estructura correspondía a *LRR-RLPs*. Considerando el papel de las *LRR-RLPs* en la resistencia contra la marchitez causada por *Fusarium* (Gonzalez-Cendales et al., 2016) se propusieron a estos siete genes *MaLRR-RLPs* como CGR contra Foc raza 1. Por lo tanto, el número de candidatos a genes de resistencia para Foc raza 1 en la parte distal del cromosoma 10 podría reducirse de 19 (Ahmad et al., 2020) a solamente 7 CGR. Además, entre las observaciones de los siete CGR contra Foc raza 1, se encontró que dos de ellos, *MaLRR-RLP74* y *MaLRR-RLP75* mostraron un tamaño similar y una estructura similar de superhélice *LRR* (Sun et al., 2013) a las proteínas de resistencia *I* e *I-7* que confieren resistencia a la marchitez de *Fusarium* en tomate (Cuadro 2.2 y Figura 2.6). Por lo tanto, en este estudio proponemos que estos dos genes *MaLRR-RLP* podrían ser un buen punto de partida para la identificación del gen responsable de la resistencia a Foc raza 1, reduciendo de esta forma la complejidad de los ensayos funcionales en un cultivo como plátano.

**Cuadro 2.2 Análisis de genes encontrados en la parte distal de cromosoma 10.** Siete genes *LRR-RLP* de plátano propuestos en este estudio como CGR para Foc raza 1 (resaltados en gris). Estos siete CGR para Foc raza 1 fueron localizados en la parte distal del cromosoma 10 de *M. acuminata* ssp. *malaccensis*, donde recientemente se mapeo la resistencia contra Foc raza 1 (Ahmad et al. 2020).

#	Gen <i>MaLRR-RLP</i>	ID Secuencia	Dominios <sup>a</sup>	Longitud Proteína (aa)	kDa	pI	Localización Subcelular
1		Ma10_p00400.1	Kinase	179	19.80	5.29	Núcleo
2		Ma10_p00410.1	Malectin	397	44.11	8.62	Extracelular
3		Ma10_p00420.1	SP-LRR	377	42.13	6.13	Extracelular
4		Ma10_p00430.1	Kinase	128	14.25	6.28	Citoplasma
5		Ma10_p00440.1	LRR	209	23.29	5.94	Núcleo
6	<i>MaLRR-RLP69</i>	Ma10_p00450.1	SP-LRR-TM	624	70.87	5.51	Membrana Celular
7		Ma10_p00460.1	Kinase	138	15.77	5.91	Mitocondria
8	<i>MaLRR-RLP70</i>	Ma10_p00470.1	LRR-TM	585	65.92	6.66	Membrana Celular
9	<i>MaLRR-RLP71</i>	Ma10_p00480.1	LRR-TM	631	71.10	5.38	Membrana Celular
10	<i>MaLRR-RLP72</i>	Ma10_p00490.1	SP-LRR-TM	677	76.94	6.39	Membrana Celular
11	<i>MaLRR-RLP73</i>	Ma10_p00500.1	SP-LRR-TM	676	75.97	5.14	Membrana Celular
12		Ma10_p00510.1	LRR	480	53.69	5.79	Citoplasma
13		Ma10_p00520.1	Malectin	241	26.28	5.26	Citoplasma
14		Ma10_p00530.1	SP-LRR	166	18.92	8.58	Extracelular
15	<i>MaLRR-RLP74</i>	Ma10_p00550.1	SP-LRR-TM	902	100.82	5.43	Membrana Celular
16		Ma10_p00560.1	SP-LRR	348	38.59	5.84	Extracelular
17	<i>MaLRR-RLP75</i>	Ma10_p00570.1	SP-LRR-TM	917	102.26	5.22	Membrana Celular
18		Ma10_p00650.1	LRR	641	71.47	5.62	Citoplasma
19		Ma10_p00660.1	LRR-TM	143	16.84	5.47	Retículo Endoplasmático
		I (Solyc11g011180) <sup>b</sup>	SP-LRR-TM	994	111.79	5.56	Membrana Celular
		I-7 (AKR80573) <sup>c</sup>	SP-LRR-TM	966	108.15	5.72	Membrana Celular

<sup>a</sup>SP, péptido señal; LRR, dominio de repeticiones ricas en leucina; TM, dominio transmembranal. <sup>b,c</sup> Genes de tomate LRR-RLP que confieren resistencia contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.



**Figura 2.6. Modelaje tridimensional de CGRs.** Modelaje tridimensional por homología de las proteínas cuyos genes se proponen como CGR para Foc raza 1, junto al modelo de cristalografía de la proteína FLS2 y la estructura de las LRR-RLP I e I-7 de tomate que confieren resistencia contra Fol, mostrando su plegamiento supe helicoidal.

## 2.5 DISCUSIÓN

El plátano es un monocultivo de reproducción vegetativa, lo que permite mantener una producción homogénea del fruto, pero que, por otra parte, lo hace vulnerable al ataque de patógenos debido a su poca variabilidad genética. Por lo tanto, la identificación de genes de resistencia en el germoplasma de plátano es de suma importancia para el mejoramiento genético de este cultivo y para la seguridad alimentaria en una gran parte del mundo.

Entre los genes de resistencia identificados hasta el momento destacan aquellos que codifican para receptores de membrana, entre los cuales se encuentran los genes LRR-RLP. Más de 20 genes de resistencia de esta clase se han identificado hasta el momento y varios estudios de escala genómica se han realizado para investigar la diversidad de genes LRR-RLP de plantas. Los estudios a escala genómica se han realizado en arroz y *Arabidopsis*, (Fritz-Laylin et al., 2005; Wang et al., 2008; Steidele y Stam, 2021), tomate (Kang y Yeom 2018), algodón (Chen et al., 2015), leguminosas (Restrepo-Montoya et al., 2021) y chile (Kang et al. 2021a; Kang et al. 2021b). Dada la importancia de esta familia de proteínas receptoras de membrana involucradas en el sistema inmune y sus aplicaciones en el mejoramiento genético de plantas, en el presente trabajo se abordó la búsqueda de miembros de esta familia en el genoma del cultivo de plátano.

Los resultados obtenidos de la anotación de los genes *MaLRR-RLP* y el número de miembros de esta familia (78 miembros en total) en plátano son congruentes con reportes previos en otros genomas de plantas, por ejemplo, en *Arabidopsis* se identificaron 57 *LRR-RLPs* (Fritz-Laylin et al., 2005) y en álamo 82 *LRR-RLPs* (Petre et al., 2014) En otras especies se han reportado un mayor número de genes *LRR-RLP*, por ejemplo, en tomate se han reportado 176 genes (Kang y Yeom, 2018) y en *Capsicum annuum* se han reportado 438 genes del tipo *LRR-RLP* (Kang et al., 2021). Este mayor número de genes tipo *LRR-RLP* reportados para estas especies se debe a que estos autores usaron otros criterios para definir una *LRR-RLP*, por ejemplo, consideraron proteínas con solo un dominio LRR como una *LRR-RLP* o bien la combinación SP-LRR, mientras que en nuestro estudio utilizamos criterios más astringentes para definir una *LRR-RLP*, similar a lo reportado por (Fritz-Laylin et al., 2005).

Con respecto a la localización de los 78 genes *MaLRR-RLPs* en el genoma de *M. acuminata* spp. *malaccensis*, se encontró una distribución cromosómica desigual en 10 de sus 11 cromosomas, es decir, unos cromosomas tuvieron más genes *LRR-RLP* que otros y en el cromosoma 11 se observó una ausencia de ellos. Para establecer si estos genes se encontraban agrupados en clúster se utilizó el criterio de (Jupe et al., 2012), con lo cual observamos un total de 10 clúster en el genoma, con un promedio de dos clúster por cromosoma; esto concuerda con los diversos reportes de receptores y genes de resistencia en los que la mayoría de sus miembros conservan una distribución aleatoria en los cromosomas, y a la vez, se encuentran organizados en clúster. Estos clúster de homólogos de genes de resistencia se han observado en todos los receptores involucrados en el sistema inmune de plantas, tal es el caso de los genes *NBS-LRR*, *LRR-RLK* y *LRR-RLP* (van Wersch y Li, 2019; Kang y Yeom, 2018; Kang et al., 2021; Ngou et al., 2022). La mayoría de los genes *MaLRR-RLP* (60%) se agruparon en clústers, lo que sugiere un origen por duplicación génica en tándem (Michelmore y Meyers 1998; Leister,

2004; Takos y Rook, 2012). Las familias de genes de resistencia generalmente se expanden por duplicación génica y están sujetas a una selección de diversificación, la cual permite que aparezcan nuevas especificidades de reconocimiento a patógenos (Houterman et al., 2008).

Por otra parte, han pasado más de 60 años desde la introducción del cultivar Cavendish resistente a Foc raza 1 como reemplazo del cultivar altamente susceptible Gros Michel, y aunque la resistencia mostrada por Cavendish contra Foc raza 1 hasta ahora ha sido robusta y durable, la identidad molecular del gen de resistencia ha permanecido desconocido. En este sentido, el mapeo realizado por Ahmad y colaboradores (2020) (Ahmad et al., 2020) del gen de resistencia a Foc raza 1 en la parte distal del cromosoma 10 y la identificación de 19 genes putativos RLK representó un gran paso hacia la identificación del gen de resistencia contra Foc raza 1. Ahora, como parte de este trabajo de tesis, durante la investigación de la familia *MaLRR-RLP*, se descubrió que siete miembros de esta familia se encontraron ubicados en la parte distal del cromosoma 10, y que su número de accesión coincidió con siete de las 19 proteínas RLK putativas reportadas en el trabajo de Ahmad (Ahmad et al., 2020). Como resultado de la anotación manual, de entre estos diecinueve marcos de lectura abiertos predichos en el genoma de plátano v2 (Martin et al., 2016) no todos mostraron tener la configuración de una proteína de resistencia de clase RLK, en cambio, siete de estos ORF se predijo que tenían la estructura de proteínas de resistencia del tipo LRR-RLP y se encontró que su localización era en la membrana celular. Estos siete *MaLRR-RLPs* fueron considerados entonces como candidatos de genes de resistencia para Foc raza 1. Es importante señalar que se han encontrado homólogos de los genes SIX en la secuencia del genoma de Foc raza 1 (Guo et al., 2014), por lo que cabe la posibilidad de que un LRR-RLP de plátano se encuentre involucrado en el reconocimiento de alguno de estos homólogos de los genes SIX en Foc raza 1. Por supuesto, se requerirá más investigación para probar esta hipótesis. Sin embargo, una contribución relevante del presente estudio, es que con base en las observaciones aquí descritas, el número de CGR asociados con la resistencia a Foc raza1 en el cromosoma 10 se ve reducido de diecinueve (Ahmad et al., 2020) a siete, facilitando la búsqueda de un gen de resistencia para este hongo.

En esta tesis se propone que para la caracterización funcional de los siete CGR antes descritos, se comience con los genes *MaLRR-RLP74* y *MaLRR-RLP75*, debido a que estos dos genes muestran una longitud y estructura 3D similar a las proteínas codificadas por los genes *I* e *I-7* que confieren resistencia a *F. oxysporum* en tomate. De hecho, la identificación de los genes de resistencia *I* e *I-7* siguieron un enfoque racional similar para reducir la complejidad del número de CGR. El gen *I* fue mapeado en una región de 1Mb junto con 98 genes, incluyendo tres genes *TIR-NBS-LRR* y un gen *LRR-RLP*. Ya que los tres genes de tipo *TIR-NBS-LRR* fueron asociados con la resistencia viral, el gen *LRR-RLP* fue elegido en cambio como el más prometedor para ser un gen de resistencia para Fol en un ensayo de funcionalidad, resultando en la identificación del gen *I* (Inmunidad) (Catanzariti et al., 2017). Por su parte, el gen *I-7* fue localizado en la región de 210 Kb con 29 genes, de los cuales dieciocho fueron expresados en raíces, y solo uno de ellos parecía ser un gen de resistencia con la estructura de un LRR-RLP, resultando en la identificación del gen *I-7* en un ensayo funcional (Gonzalez-Cendales et al., 2016). Curiosamente, estos dos genes de resistencia a Fol pertenecían a diferentes clados filogenéticos, aunque cercanos. Entonces, considerando todos estos datos, los descubrimientos de Ahmad y colaboradores (Ahmad et al., 2020), y los descubrimientos

de la familia de MaLRR-RLP en plátano en el presente estudio, se podría facilitar la clonación de un gen de resistencia a Foc raza 1. Una propuesta sería un ensayo de complementación genética usando un genotipo de plátano susceptible a Foc raza 1 como es el caso del cultivar manzano también conocido como Lady Finger; de esta manera se podrían realizar experimentos de transformación con los siete MaLRR-RLP RGC para evaluar su función de resistencia contra Foc raza 1. Se propone Lady Finger debido a que se ha demostrado que es un genotipo adecuado para el estudio del efecto de genes recombinantes antiapoptóticos en la resistencia a Foc raza 1 (Paul et al., 2011).



---

## 2.6 CONCLUSIONES

En este estudio, se identificaron 78 genes *MaLRR-RLPs* agrupados en nueve clados filogenéticos, y 60% de ellos se organizaron en clústers génicos en seis de los cromosomas de plátano.

La estructura génica de los *MaLRR-RLP* reveló que la mayoría de estos genes no cuentan con intrones o poseen solo uno, y se identificaron 10 motivos conservados en sus secuencias proteicas.

Se identificaron siete candidatos a genes de resistencia *MaLRR-RLP* asociados a la resistencia a Foc raza 1, los cuales formaron un clúster en la parte distal del cromosoma 10.

## CAPÍTULO III

### ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE EXPRESIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA LRR-RLP DE PLÁTANO

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de plátano a nivel comercial es uno de los más homogéneos, ya que sus cultivares provienen de un mismo origen, debido a que prácticamente todos son producto de la selección de los híbridos obtenidos entre el genoma A de *M. acuminata* y el genoma B de *M. balbisiana*; por ello su mejor atributo, la homogeneidad en producción, es a la vez, su talón de Aquiles para hacer frente a estreses de tipo biótico (Dale, et al., 2017) Los estudios para el mejoramiento de plátano son necesarios debido a esta vulnerabilidad ante las enfermedades, y como respuesta a la amenaza constante del surgimiento de nuevas variantes de las principales enfermedades fúngicas; recientemente se reportó el estudio a escala genómica de la familia NBS-LRR de plátano, esta familia de genes de resistencia desempeña un papel muy importante en el sistema inmune de plantas (Chang et al., 2020). No obstante, otras familias génicas involucradas en la resistencia a patógenos aún no se han explorado a escala genómica.

La inmunidad de plantas es un mecanismo innato que inicia con el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Daño o a un Patógeno (DAMPs/PAMPs) por sus siglas en inglés, así como algunos productos de genes de los patógenos mejor llamados genes de virulencia o Avr. Las proteínas encargadas de hacer este reconocimiento son llamadas Receptores de Reconocimiento de PAMPs (PRR) y dentro de estas, la familia de Proteínas tipo Receptores (LRR-RLPs) desempeñan un papel fundamental en el reconocimiento de moléculas derivadas de patógenos y en la activación de la respuesta de resistencia (Lu y Tsuda, 2021; J. Wang y Chai 2020; Jamieson et al., 2018). Uno de los genes más estudiados de esta familia es el gen *Cf-4* de tomate, el cual confiere resistencia al hongo *Cladosporium fulvum*, el cual tiene una relación filogenética cercana con el hongo *Pseudocercospora fijiensis*. Interesantemente, la proteína *Cf-4* es capaz de detectar a la proteína efectora *MfAVR4* de *P. fijiensis* y activar una respuesta tipo hipersensible en ensayos de agroinfiltración en la planta modelo *Nicotiana benthamiana* (Stergiopoulos et al., 2010; Postma et al., 2016), lo cual sugiere que en el genoma de plátano podría residir un gen de resistencia para *P. fijiensis* cuya proteína presente una estructura LRR-RLP. Otro caso interesante es el reconocimiento del hongo patogénico *Fusarium oxysporum* en diversas especies como *Arabidopsis* donde se encontró al gen *RFO2* el cual fue introducido en tomate para conferir resistencia contra *Fol*; así mismo los genes *I* de “inmunidad” identificados en los parentales silvestres *Solanum pimpinellifolium* (gen *I*) y *Solanum pennellii* (gen *I-3* e *I-7*), los cuales fueron transferidos al cultivar comercial de tomate confiriendo resistencia a diferentes cepas de esta especie de hongo (Shen y Diener, 2013; Gonzalez-Cendales et al., 2016; Catanzariti et al., 2017). Con base en estos antecedentes surge el interés de este trabajo por averiguar las relaciones filogenéticas de los genes *LRR-RLP* de plátano con genes *LRR-RLP* funcionales, lo cual podría permitir identificar candidatos a genes de resistencia que se agrupen en los mismos clados filogenéticos. Además, el estudio de la filogenia de los genes *LRR-RLP* de plátano con los genes *LRR-RLP* de otras especies de plantas, tal es el caso de las plantas modelo *Arabidopsis* y arroz, podría brindar información valiosa de la evolución de la familia LRR-RLP de plátano. Adicional a estos enfoques, en este capítulo de investigación

también proporcionamos un análisis de la expresión de varios miembros de esta familia en respuesta a Foc raza 1 y Foc TR4.

### 3.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia para concretar el objetivo 2 de investigación se basó en la utilización de herramientas bioinformáticas y plataformas de análisis de secuencias, junto con datos previamente publicados por otros grupos de investigación.



Figura 3.1. Estrategia Experimental.

### 3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.3.1 Alineamiento múltiple de secuencias y filogenia de los miembros de la familia LRR-RLP de plátano

Las secuencias encontradas en la versión 2 del genoma que cumplían con el criterio de tener motivos LRR y TM, característicos de las LRR-RLPs fueron sometidas a un alineamiento de aminoácidos con el programa MUSCLE del paquete MEGA v11.0.11 (Tamura, Stecher, and Kumar 2021). Para el alineamiento final se utilizó la región la región C3-F reportada por Fritz-Laylin y colaboradores (Fritz-Laylin et al., 2005). Posteriormente el método estadístico Maximun Likelihood (ML) basado en el modelo Jones–Taylor–Thornton (JTT) fue utilizado para la elaboración de los árboles filogenéticos, utilizando un parámetro Bootstrap de 100 del paquete MEGA. Finalmente, los árboles filogenéticos fueron editados para su mayor comprensión mediante el programa FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

#### 3.3.2 Filogenia de los miembros de la familia LRR-RLP de plátano con proteínas de resistencia LRR-RLP.

El segundo árbol filogenético se construyó con secuencias de proteínas LRR-RLP de plátano y proteínas LRR-RLP de resistencia caracterizadas funcionalmente con la finalidad de encontrar relaciones filogenéticas cercanas entre las secuencias de plátano y las proteínas LRR-RLP de resistencia para de esta forma determinar posibles funciones de los genes LRR-RLP de plátano. Un total de 98 secuencias de proteínas LRR-RLP (78 de plátano y 20 de otras especies de plantas) se sometieron al paquete MEGA v11.0.11 (Tamura et. al., 2021) <https://www.megasoftware.net/> en donde después de haber realizado un alineamiento múltiple con el programa MUSCLE (Edgar, 2004) de la región del dominio C3 al F, se procedió a procesar el árbol filogenético de acuerdo al método Maximum Likelihood con un Bootstrap de 100 repeticiones y editarlo con el programa FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/FigTree/>).

#### 3.3.3 Filogenia de las familias LRR-RLP de plátano, arroz y *Arabidopsis*.

Con el propósito de conocer las relaciones filogenéticas de las 78 proteínas LRR-RLP de plátano con los miembros de las familias LRR-RLP de *Arabidopsis* (57 miembros) y Arroz (109 miembros) (Fritz-Laylin et al., 2005; Jamieson et.al., 2018; Wang et al., 2008); se realizó un tercer árbol filogenético; con la región que va de los dominios C3 a F de todas las secuencias localizadas en *Musa acuminata* y las reportadas de *Arabidopsis* y Arroz. También en la construcción de este árbol filogenético se consideró el método ML y un parámetro bootstrap 100 réplicas como se describió anteriormente.

### 3.3.4 Análisis transcriptómico de los genes *LRR-RLP* de plátano en respuesta a Foc raza 1 y FOC TR4.

La expresión de los genes *LRR-RLP* de plátano fue analizada utilizando datos de expresión previamente publicados por Li et al. 2013 ( Li et al., 2013). Los transcriptomas reportados por Li et al. provienen de tejido de raíces del cultivar 'Baxi' perteneciente al subgrupo Cavendish el cual es resistente a la raza 1 de *F. oxysporum* f. sp.  *cubense*, pero susceptible a la raza tropical 4. Li y colaboradores utilizaron ambas razas del hongo para retar el tejido de raíz del cultivar antes mencionado. En su publicación identificaron una serie de genes participantes en esta interacción mediante la expresión génica digital, por lo cual nos dimos a la tarea de realizar la búsqueda de los genes *LRR-RLP* anotados en este trabajo, en las tablas suplementarias reportadas por Li y colaboradores. Los valores de expresión de los genes *LRR-RLP* detectados con expresión diferencial fueron utilizados para elaborar un heatmap en la plataforma Rstudio (<https://www.rstudio.com/>), para cada uno de los tiempos analizados por Li y colaboradores ( Li et al., 2013). Para ello se utilizó el paquete gplots, y el comando heatmap2, los gráficos obtenidos se utilizaron con el objetivo de observar el patrón de expresión de estos genes.

### 3.3.5 Modelaje tridimensional de proteínas de la familia *LRR-RLP* de plátano

El siguiente paso en la caracterización de los genes homólogos de la familia *LRR-RLP* fue realizar un análisis predictivo de la estructura tridimensional de los miembros de plátano agrupados en los clados de los *LRR-RLPs* caracterizados funcionalmente. Se utilizó la plataforma Swissmodel (Schwede et al., 2003) (<https://swissmodel.expasy.org/>) para modelar las secuencias *LRR-RLP* de plátano. Las imágenes obtenidas de este proceso se guardaron en formato pdb para poder editar los modelos tridimensionales de la estructura en el programa PyMoL v 2.0.7 y de esta forma obtener la estructura tridimensional finales de las proteínas *LRR-RLPs*.

### 3.4 RESULTADOS

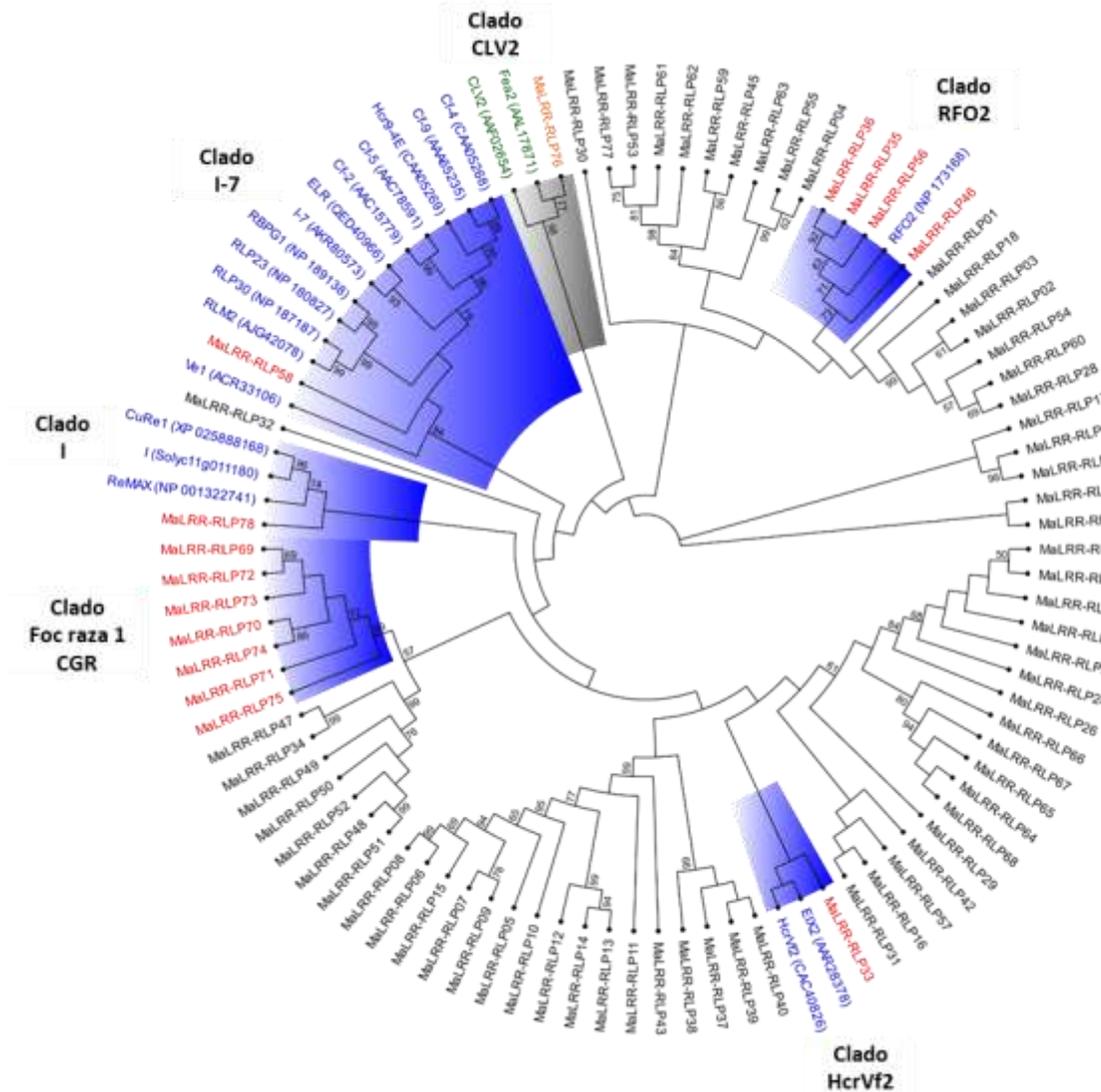
#### 3.4.1 Análisis Filogenético de la familia de LRR-RLPs en plátano

La filogenia de las 78 proteínas LRR-RLP identificadas en el proteoma de plátano mostró que estas secuencias se distribuyeron en un total de nueve clados (figura 3.2), encontrándose que varios miembros de un clado también compartieron su ubicación en el mismo cromosoma, tal es el caso de miembros de los clados I, III y IX, esto podría estar indicando una generación de sus miembros más recientes por fenómeno de duplicación en tándem, esta misma observación se encontró en tomate (Kang y Yeom, 2018) y en álamo (Petre et al., 2014) donde se menciona que igualmente la organización genómica se correlaciona con la filogenia, ya que los genes que se agrupan en los cromosomas del genoma se reúnen en el mismo clado filogenético. Al mismo tiempo se observa que estos clados (I, III y IX) poseen un mayor grado de expansión, ya que son los más numerosos, probablemente debido a que estos grupos siguen en generación de nuevas secuencias homologas de los receptores mediante mecanismos de duplicación obteniéndose nuevos parálogos (Gabaldón y Koonin, 2013).. Las familias de genes de resistencia, a menudo tienen una expansión por mecanismos de duplicación génica y se encuentran bajo la diversificación por selección, lo cual permite el reconocimiento hacia nuevos patógenos emergentes (Leister, 2004).



### 3.4.2 Análisis filogenético de los LRR-RLPs de plátano con proteínas de resistencia LRR-RLP caracterizadas funcionalmente.

Con el objetivo de elucidar las relaciones filogenéticas de las secuencias LRR-RLP de plátano con respecto a las proteínas de resistencia LRR-RLP funcionalmente identificadas, se generó un árbol filogenético con las 78 proteínas LRR-RLP encontrados en plátano, junto con 18 proteínas de resistencia LRR-RLP funcionalmente caracterizadas y 2 proteínas LRR-RLP involucradas en el desarrollo, para ello se utilizó la región C3-F de las secuencias proteicas, primero llevando a cabo un alineamiento y con éste la construcción del árbol filogenético, el resultado lo podemos observar en la figura 3.3. En este árbol filogenético se hace énfasis en 5 clados (sombreados en azul) que contienen candidatos a genes de resistencia (CGR) por su cercanía filogenética con proteínas de resistencia LRR-RLP o bien por estar asociados con el clúster de genes LRR-RLP que identificamos en el cromosoma 10 y que se encuentran asociados al locus para el gen de resistencia a la raza 1 de Foc. A cada uno de estos clados se le nombró con el nombre de un gen de resistencia representativo de cada clado. Para el caso del clado con genes asociados al locus de resistencia a Foc raza 1, a éste se le nombró como clado CGR a Foc raza 1. El clado I-7 fue el que más destaco en términos del número de genes de resistencia LRR-RLP que se agruparon en éste con 12 genes (67%) de los 18 genes de resistencia LRR-RLP utilizados en la construcción del árbol filogenético. Dado este patrón de agrupamiento de los genes LRR-RLP de plátano con los genes de resistencia LRR-RLP se logró la identificación de 7 candidatos a genes de resistencia (Tabla 3.1). También se consideraron como candidatos a genes de resistencia los 7 genes que se agruparon en el clado CGR a Foc raza 1, haciendo un total de 14 CGR (Tabla 3.1). Adicional a esta información se logró la identificación de un posible ortólogo de plátano (MaLRR-RLP76) a los genes CLV2 y Fea2 de *Arabidopsis* y arroz, respectivamente, los cuales están involucrados en el desarrollo.



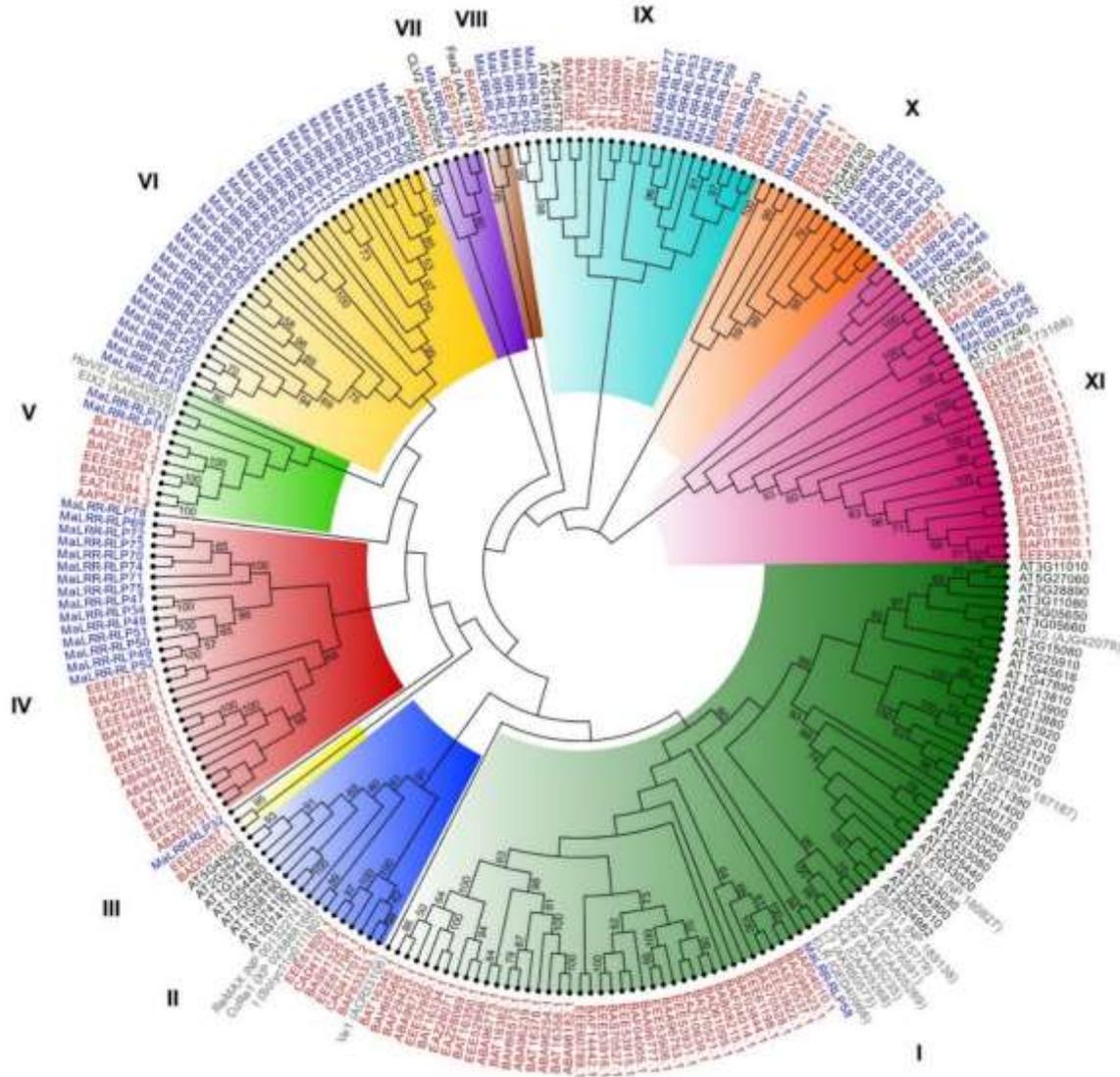
**Figura 3.3** Árbol filogenético Maximum-Likelihood de la familia LRR-RLP de plátano y LRR-RLPs de resistencia a patógenos. Los nombres y números de accesoión (en paréntesis) de los *LRR-RLP* involucrados en la inmunidad de plantas o desarrollo son resaltados en color azul o verde, respectivamente. Los números de accesoión de los *LRR-RLPs* de plátano con un potencial papel en la inmunidad de la planta o en su desarrollo son resaltados en color rojo (*MaLRR-RLP*33,35, 36, 46, 56, 58, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 78) o naranja (*MaLRR-RLP*76), respectivamente. Los números en las ramas indican el porcentaje de 100 réplicas de bootstrap que soportan los nodos en particular y solo se muestran aquellos que son  $\geq 50\%$ . Se utilizó la región C3-F de las secuencias LRR-RLPs para la construcción del árbol filogenético.

**Cuadro 3.1 Número total de LRR-RLPs de plátano propuestos en este estudio como candidatos a genes de resistencia (CGR).** Los genes presentados en negritas se han elegido con base a sus relaciones filogenéticas cercanas a los genes LRR-RLP de resistencia y los datos de mapeo de la resistencia contra Foc raza 1 (Ahmad et al. 2020). En la tabla se muestra el papel de los LRR-RLP involucrados en la inmunidad de plantas que son filogenéticamente cercanos a los LRR-RLP de plátano.

Nombre del clado	Nombre del LRR-RLP	Papel en la inmunidad de plantas
I-7	<b>MaLRR-RLP58</b>	Candidato a gen de resistencia
	Cf-2	Resistencia al hongo <i>Cladosporium fulvum</i>
	Cf-4	Resistencia al hongo <i>Cladosporium fulvum</i>
	Cf-5	Resistencia al hongo <i>Cladosporium fulvum</i>
	Cf-9	Resistencia al hongo <i>Cladosporium fulvum</i>
	Hcr9-4E	Resistencia al hongo <i>Cladosporium fulvum</i>
	ELR	Resistencia al oomyceto <i>Phytophthora infestans</i>
	I-7	Resistencia al hongo <i>Fusarium oxysporum</i>
	Ve1	Resistencia al hongo <i>Verticillium dahliae</i> and <i>V. albo-atrum</i>
	RLP23	Resistencia al hongo <i>Botrytis cinerea</i>
	RLP30	Resistencia al hongo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
RBPG1	Resistencia al hongo <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	
RLM2	Resistencia al hongo <i>Leptosphaeria maculans</i>	
I	<b>MaLRR-RLP78</b>	Candidato a gen de resistencia
	I	Resistencia al hongo <i>Fusarium oxysporum</i>
	CuRe1	Resistencia a la planta parasítica <i>Cuscuta reflexa</i>
	ReMAX	Percepción de la proteína eMAX de <i>Xanthomonas</i>
Foc race 1 CGR	<b>MaLRR-RLP69</b>	Candidato a gen de resistencia
	<b>MaLRR-RLP70</b>	Candidato a gen de resistencia
	<b>MaLRR-RLP71</b>	Candidato a gen de resistencia
	<b>MaLRR-RLP72</b>	Candidato a gen de resistencia
	<b>MaLRR-RLP73</b>	Candidato a gen de resistencia
	<b>MaLRR-RLP74</b>	Candidato a gen de resistencia
	<b>MaLRR-RLP75</b>	Candidato a gen de resistencia
HcrVf2	<b>MaLRR-RLP33</b>	Candidato a gen de resistencia
	HcrVf2	Resistencia al hongo <i>Venturia inaequalis</i>
	EIX2	Percepción de xylanase (EIX) de hongos
RFO2	<b>MaLRR-RLP35</b>	Candidato a gen de resistencia
	<b>MaLRR-RLP36</b>	Candidato a gen de resistencia
	<b>MaLRR-RLP46</b>	Candidato a gen de resistencia
	<b>MaLRR-RLP56</b>	Candidato a gen de resistencia
	RFO2	Resistance to fungus <i>Fusarium oxysporum</i>

### 3.4.3 Análisis filogenético de LRR-RLPs de plátano, arroz y *Arabidopsis*

Con el objetivo de elucidar las relaciones filogenéticas de la familia LRR-RLP de plátano con las familias LRR-RLP de las plantas modelo arroz y *Arabidopsis*, se llevó a cabo un alineamiento de las 78 secuencias LRR-RLP de plátano con 57 miembros LRR-RLP de *Arabidopsis thaliana* y 109 secuencias LRR-RLP de *Oryzae sativa*. El árbol filogenético obteniendo reveló un total de 11 clados (Figura 3.4). El clado I mostró el grupo más numeroso y diverso de miembros LRR-RLP de *Arabidopsis* y arroz, con 34 y 40 secuencias respectivamente. De forma notable este clado se subdivide en dos, uno por cada especie y con sus respectivos miembros, separando a las monocotiledóneas de las eudicotiledóneas. Dentro del clado I también se observan agrupados genes LRR-RLP de resistencia a enfermedades, entre ellos algunos miembros funcionalmente caracterizados pertenecientes a tomate, (ELR, I-7, Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-9, y Hcr9-4E), un gen de *Brassica napus* (RLM2) y tres de *Arabidopsis* (RLP23, RLP30, y RBPG1). A pesar de que el clado I es el de mayor expansión con respecto a los demás, solo se encuentra agrupado un gen de plátano en este clado (MaLRR-RLP58), junto a las secuencias de arroz. También, se descubrió que un total de cinco clados (I, VII, IX, X, y XI) comparten secuencias LRR-RLP de las 3 especies de plantas consideradas en este análisis filogenético (plátano, arroz y *Arabidopsis*), sugiriendo que el origen de estas secuencias es antiguo y que muy probablemente precede la divergencia de plantas monocotiledóneas y eudicotiledóneas. El clado VI es el único que se observa conformado exclusivamente por miembros LRR-RLP de plátano, mostrando además ser el clado con mayor expansión de miembros de este cultivo.

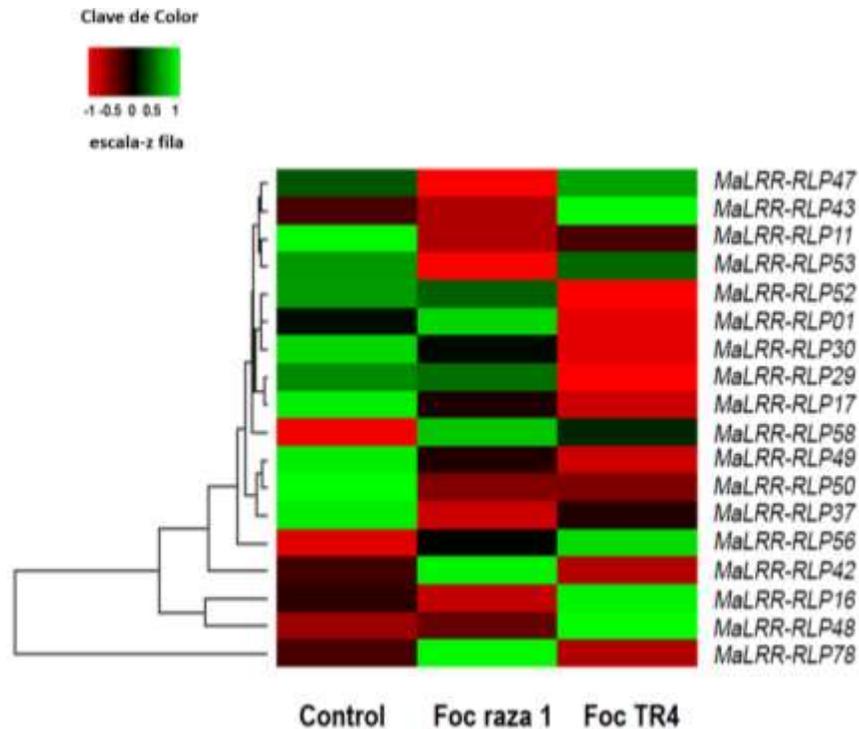


**Figura 3.4** Árbol filogenético Maximum-Likelihood de las familias LRR-RLP de plátano, arroz y *Arabidopsis*. Los números de accesión de los miembros LRR-RLP de plátano, arroz y *Arabidopsis* están resaltados en colores azul, rojo y negro, respectivamente. Los nombres y números de accesión (en paréntesis) de los LRR-RLP involucrados en inmunidad de plantas o desarrollo son resaltados en color gris o verde, respectivamente. Los números de las ramas indican el porcentaje de 100 réplicas de bootstrap dando soporte a los nodos y sólo se muestran aquellos con  $\geq 50\%$ . Se utilizó la región C3-F de los LRR-RLPs para la construcción el árbol filogenético.

#### 3.4.4 Análisis de expresión de los genes *LRR-RLP* de plátano

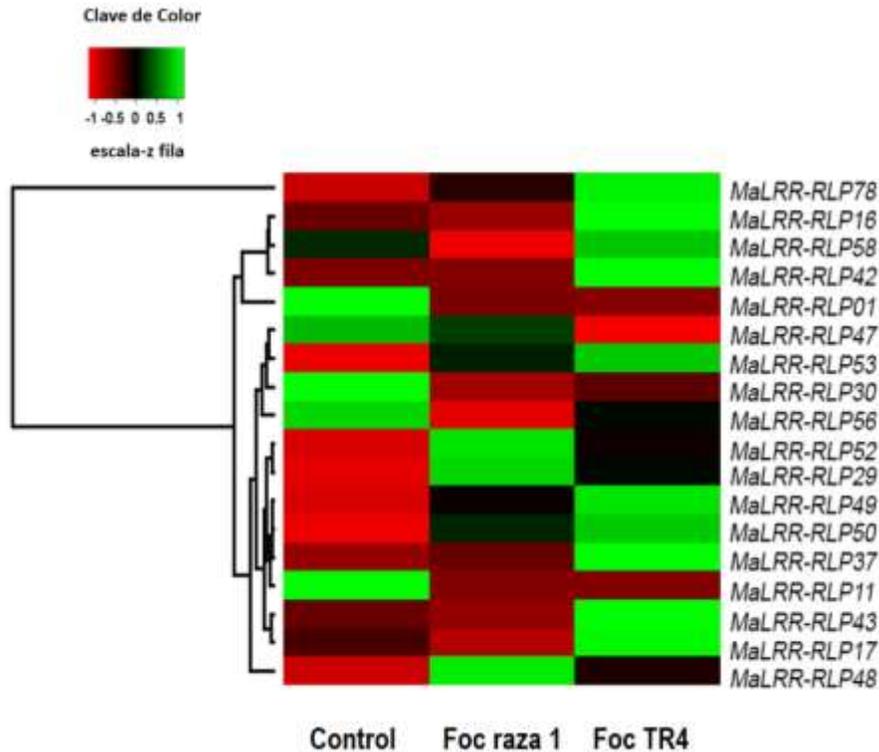
Con el objetivo de ampliar el panorama y explorar los patrones de expresión de los genes *LRR-RLP* de plátano, realizamos un análisis heatmap con datos procesados de expresión génica digital (DGE) previamente reportados por Li y colaboradores en 2013 ( Li et al., 2013) quienes recopilaron estos valores de la interacción plátano con Foc raza 1 o Foc TR4. En su análisis solo resaltaron genes con un gran valor de expresión génica, por ello nos dimos a la tarea de retomar los valores totales y entre estos buscar e identificar los genes *LRR-RLP* de plátano que pudieran estar expresados diferencialmente. Se identificó la expresión de 18 genes *LRR-RLP* de plátano de una población total de 11,412 genes expresados. Los datos de expresión de los 18 genes *LRR-RLP* de plátano se utilizaron para graficar en Rstudio los valores y presentarlos como un mapa de calor que pudiera ayudarnos a visualizar los cambios de expresión durante la infección de Foc raza 1 o Foc TR4. En las figuras 3.5, 3.6 y 3.7 observamos los perfiles de expresión de los genes *LRR-RLP* de plátano en respuesta a la presencia de Foc raza 1 o Foc TR4, junto con los datos del control.

En el primer tiempo evaluado de tres horas después de la inoculación del patógeno correspondiente observamos en el dendograma del mapa de calor la formación de grupos de expresión, entre ellos observamos a los genes *MaLRR-RLP47*, *MaLRR-RLP43*, *MaLRR-RLP11* y *MaLRR-RLP53* en un primer patrón de expresión donde al parecer hay una baja en la expresión ante Foc1. En el siguiente grupo formado se encuentran los genes *MaLRR-RLP52*, *MaLRR-RLP01*, *MaLRR-RLP30*, *MaLRR-RLP29*, y *MaLRR-RLP17* en un patrón de expresión similar entre los tratamientos mock y Foc raza 1 pero observándose una baja en la expresión en el tratamiento Foc TR4. También se observó la formación de otros dos grupos más pequeños uno con los genes *MaLRR-RLP49*, *MaLRR-RLP50* y *MaLRR-RLP37*, este grupo de genes tiene una expresión alta en el tratamiento control y disminuye ante la presencia de ambas razas del hongo Foc. Los genes *MaLRR-RLP16* y *MaLRR-RLP48* en este punto de la interacción incrementan su expresión solo ante la presencia de Foc TR4. Interesantemente, se detectó los patrones de expresión de tres CGR (*MaLRR-RLP58*, *MaLRR-RLP56*, *MaLRR-RLP78*), los cuales son homólogos a los *LRR-RLP* funcionalmente caracterizados que confieren resistencia a otras enfermedades fúngicas. El patrón de expresión de estos CGR en este primer punto de muestreo se diferencia y resalta entre los grupos formados.



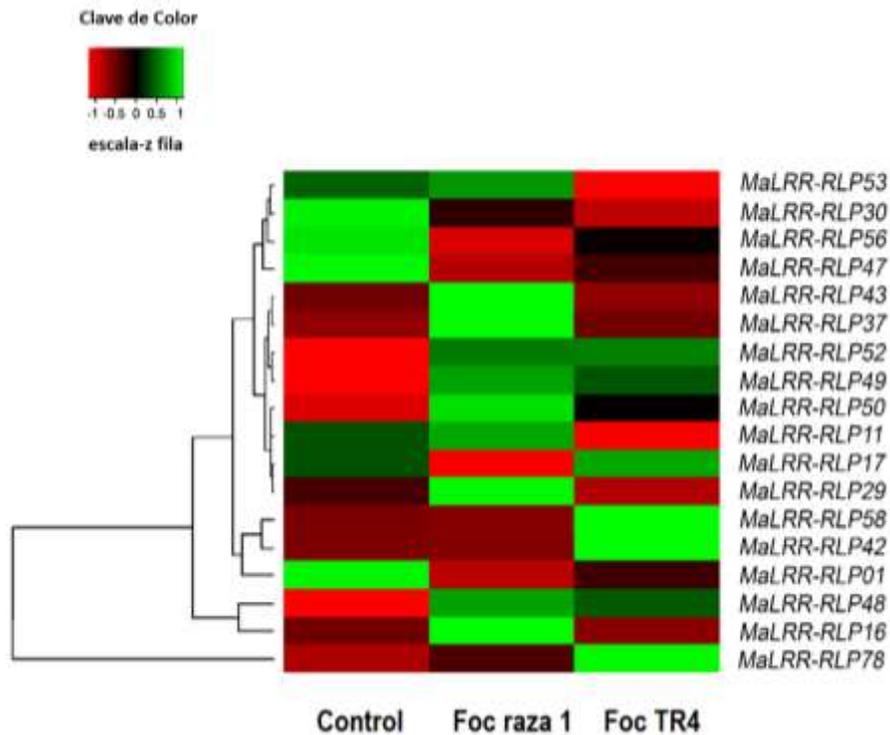
**Figura 3.5 Perfiles de expresión a 3 horas post infección.** Perfiles de expresión de genes *LRR-RLP* de plátano en respuesta a *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc raza 1) y raza tropical 4 (Foc TR4). Las muestras fueron colectadas 3 horas después de la inoculación de raíces de plátano (cultivar Cavendish) con las respectivas razas de Foc. La escala de color representa los niveles de expresión.

En el segundo punto de datos observados a las 27 horas posterior a la inoculación igualmente se encuentran agrupados diversos genes, los patrones de expresión más destacables son los de los genes *MaLRR-RLP52*, *MaLRR-RLP29* y *MaLRR-RLP48* los cuales son los únicos donde ocurre un incremento en la expresión en el tratamiento de Foc raza 1. En este tiempo resalta el patrón de expresión de cinco genes que no están agrupados del todo entre sí, pero que presentan un alto nivel de expresión en el control muy contrario a lo observado en los tratamientos con ambas razas del hongo Foc, lo que podría indicar que esta baja de expresión podría deberse a la presencia del hongo. Entre estos cinco genes encontramos al gen homólogo a *RFO2*, *MaLRR-RLP56* junto con los genes *MaLRR-RLP30*, *MaLRR-RLP01*, *MaLRR-RLP47* y *MaLRR-RLP11*.



**Figura. 3.6 Perfiles de expresión a 27 horas post infección.** Perfiles de expresión de genes *LRR-RLP* de plátano en respuesta a *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc raza 1) y raza tropical 4 (Foc TR4). Las muestras fueron colectadas 27 horas después de la inoculación de raíces de plátano (cultivar Cavendish) con las respectivas razas de Foc. La escala de color representa los niveles de expresión.

Los datos del último punto de muestreo a las 51 horas posterior a la inoculación muestran diversos genes con un patrón de aumento de la expresión en el tratamiento con Foc raza 1 y disminución de la expresión con Foc TR4. Entre los genes que se observaron con este patrón de aumento de la expresión se encuentran *MaLRR-RLP48*, *MaLRR-RLP16*, *MaLRR-RLP43*, *MaLRR-RLP37*, *MaLRR-RLP52*, *MaLRR-RLP49*, *MaLRR-RLP50* y *MaLRR-RLP11*. Por otra parte, se observaron solo tres genes que manifiestan un incremento en la expresión a diferencia de los otros dos tratamientos, dos de ellos se encuentran agrupados, estos son *MaLRR-RLP42* y *MaLRR-RLP58*, y por otro lado el gen *MaLRR-RLP78*. Interesantemente, el gen *MaLRR-RLP58* se encuentra en el clado I-7 y el gen *MaLRR-RLP78* se encuentra en el clado I (Figura 3.3) donde se encuentran genes de resistencia para *F. oxysporum*.



**Figura 3.7 Perfiles de expresión a 3 horas post infección.** Perfiles de expresión de genes *LRR-RLP* de plátano en respuesta a *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc raza 1) y raza tropical 4 (Foc TR4). Las muestras fueron colectadas 51 horas después de la inoculación de raíces de plátano (cultivar Cavendish) con las respectivas razas de Foc. La escala de color representa los niveles de expresión.

### 3.5 DISCUSIÓN

El cultivo de plátano carece de variabilidad genética debido a su reproducción vegetativa, lo cual es una ventaja desde el punto de vista agronómico ya que se obtienen frutos muy homogéneos, sin embargo, el aspecto clonal de su reproducción lo deja vulnerable ante el ataque de patógenos debido a la limitada variabilidad genética de su repertorio de genes de resistencia. Por lo tanto, el desarrollo de protocolos y la utilización de herramientas para el mejoramiento genético de este cultivo básico es apremiante. Para lograr el mejoramiento genético del cultivo de plátano, es esencial explorar el repertorio de genes de resistencia en genotipos silvestre de plátano que se reproducen de forma sexual y que son resistentes a las enfermedades que más afectan la producción de este cultivo.

Los genes *PRR* son un buen inicio para la exploración de homólogos de genes de resistencia. La familia de proteínas tipo receptores con un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR-RLP) son un grupo de receptores transmembranales que se han vinculado a diversos procesos de respuesta de resistencia contra patógenos, así como algunos procesos de desarrollo y respuesta a estrés abiótico (Wu et al., 2016; Steidele y Stam, 2021). Sin embargo, no se cuenta información al respecto de esta familia de receptores en plátano. En el presente estudio, abordamos el estudio de esta familia de receptores LRR-RLP a escala genómica en plátano con la finalidad de determinar su composición, localización cromosómica, evolución, expresión e identificación de candidatos a genes de resistencia con potencial para realizar mejoramiento genético en este cultivo.

Adicional a la localización de siete CGR en el cromosoma 10 asociados al locus de resistencia a Foc raza 1, en este segundo capítulo de investigación reportamos otros siete *MaLRR-RLPs* que consideramos como CGR basados en su relación filogenética cercana con los LRR-RLPs con función conocida en la inmunidad de plantas. Interesantemente, estas proteínas LRR-RLP con función conocida no estuvieron dispersas en todos los clados observados, si no que la mayoría de estos genes se agruparon en algunos clusters, y en cada uno de estos estuvo presente al menos uno de los miembros de la familia *MaLRR-RLP*. Dada las relaciones filogenéticas cercanas, los *MaLRR-RLPs* de estos clados podrían compartir una vía de transducción de señal común que desencadene la inmunidad, con lo cual se explica que se encuentren agrupadas en clúster en el árbol filogenético.

Previamente, se reportó en plátano un CGR de la clase de genes de resistencia a enfermedades del tipo NBS-LRR conocido como RGA2 (también llamado RGC2) que se agrupo en un clado filogenético compartido con el gen de tomate I-2 y el gen Fom-2 de melón, genes que confieren resistencia a *F. oxysporum* (Peraza-Echeverría et al., 2009). El análisis funcional de RGA2 mostró que este gen es capaz de desencadenar una respuesta de defensa efectiva contra Foc TR4 en campo (Dale et al., 2017). Estos descubrimientos apoyan la idea de que los *MaLRR-RLPs* agrupados con LRR-RLPs con función conocida e involucrados en la resistencia a enfermedades podrían estar involucrados en el sistema inmune de plátano. Por lo tanto, los *MaLRR-RLPs* presentados

en este trabajo como CGR representan una plataforma valiosa con la cual se podrían llevar a cabo ensayos funcionales que permitan la identificación de genes de resistencia novedosos para combatir las enfermedades más devastadores de plátano, como son la marchitez por *Fusarium* y la enfermedad de Sigatoka negra. Las nuevas tecnologías basadas en la cisgénesis o edición génica podrían facilitar la introducción de nuevos caracteres de resistencia en los cultivares de plátano utilizando recursos del mismo germoplasma de plátano.

Por lo que se refiere al análisis de las relaciones filogenéticas de las familias LRR-RLP de plátano, arroz, y *Arabidopsis*, descubrimos cinco clados que son compartidos entre las tres especies de plantas, sugiriendo un origen antiguo de los miembros en estos clados que quizá precedió al evento de divergencia entre plantas mono y eudicotiledoneas que ocurrió hace aproximadamente 200 millones de años atrás (Li et al., 2021). Además, el clado I mostró ser el clado de mayor grado de expansión y diversificación de los miembros LRR-RLP tanto de *Arabidopsis* como de arroz, pero no de plátano, el cual mostró una contracción radical de miembros en este mismo grupo con solo un miembro agrupado junto a estos genes. Por el contrario, el clado VIII mostró una mayor expansión y diversificación de los LRR-RLPs solo de plátano. La contracción o expansión de estos clados filogenéticos podría ser el resultado de diferentes fuerzas de presión de selección de los microbios que interactúan de forma diferencial con estas especies de plantas después de su separación del ancestro en común ( Li et al., 2021; Ngou et al., 2022).

Finalmente, el análisis transcripcional de los miembros de la familia *MaLRR-RLP* en respuesta al estrés biótico mostró la presencia de expresión de 18 genes en tejido de raíz, algunos de estos genes aumentaron su expresión en respuesta a Foc raza 1 o Foc TR4, sugiriendo la presencia de elementos de regulación en *Cis* que actúan en la región promotora de estos genes y que responden a señales de estrés biótico. Un estudio transcripcional reciente de la familia *LRR-RLP* en *Arabidopsis* mostró que la expresión de estos genes es modificada por estrés biótico en gran medida ya que del total de genes reportados en el genoma de *Arabidopsis*, el 87% de ellos resultó ser responsivo al estrés biótico (Wu et al., 2016). Por ejemplo, el patógeno fúngico *Erysiphe orontii* provocó un aumento de la expresión en el 50% de los miembros de la familia *AtLRR-RLP*, indicando que un número significativo de miembros *AtLRR-RLP* pueden responder a este patógeno en particular (Wu et al., 2016). Nosotros detectamos la expresión del 23% (18 genes) de los 78 genes *MaLRR-RLP*. Este porcentaje probablemente representa a los genes *MaLRR-RLP* con mayor abundancia de transcritos en el tejido de raíz, mientras que los genes restantes no se lograron detectar debido a su bajo nivel de expresión en este tejido que impidió su detección dentro de la cobertura de secuenciación utilizada por Li y colaboradores ( Li et al., 2013).

### 3.6 CONCLUSIONES

Los análisis filogenéticos nos permitieron identificar dentro de la familia de *LRR-RLPs* de plátano un total de nueve clados. El análisis filogenético con los miembros *MaLRR-RLP* de arroz y *Arabidopsis* reveló cinco clados compartidos entre los miembros de estos tres genomas, sugiriendo un origen antiguo que quizá preceda la divergencia de plantas monocotiledóneas y eudicotiledóneas. Además, se generó evidencia de la expansión y contracción del número de genes *MaLRR-RLP* en diferentes clados.

Se identificaron siete genes *MaLRR-RLP* que se consideraron como CGR en base a su relación filogenética cercana con genes de resistencia *LRR-RLP*.

Finalmente, se detectó la expresión de un total de 18 genes *MaLRR-RLP* de datos transcriptómicos de plátano provenientes de tejido de raíz tratado con los patógenos Foc raza 1 y Foc TR4. En estos datos se observó que algunos de los *MaLRR-RLP* aumentaron su expresión en respuesta a Foc raza 1 o Foc TR4.

---

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

#### 4.1 DISCUSIÓN GENERAL

La familia de receptores transmembranales LRR-RLP juega un papel preponderante en la percepción de señales extracelulares para el desarrollo y defensa de la planta. Los primeros genes reconocidos de esta familia de receptores han sido los genes Cf de tomate (Jones et al., 1994; Dixon et al., 1996; Thomas et al., 1997; Dixon et al., 1998; Westerink et al., 2004);, los genes CLV2 en *Arabidopsis* (Jeong et al., 1999) y Fea2 en maíz (Taguchi-Shiobara et al., 2001); actualmente con la llegada de la era de secuenciación masiva junto a los programas y plataformas de análisis de datos se han reportado los primeros escrutinios a escala genómica de esta familia de genes en *Arabidopsis* y arroz (Fritz-Laylin et al., 2005; Wang et al., 2008)) en donde se hace una introducción a la estructura de los LRR-RLPs y se establece los primeros conocimientos de la filogenia de la familia así como su organización y evolución, posteriormente surgieron los trabajos en tomate (Kang y Yeom, 2018) y el trabajo de Steidele y Stam (Steidele y Stam, 2021) utilizando datos de ómicos para establecer la función de los LRR-RLP de *Arabidopsis*. Esta búsqueda de nuevos genes de resistencia se había limitado a genomas de plantas modelo como *Arabidopsis*, sin embargo, recientemente se han publicado nuevos reportes en plantas que no son modelo de estudio, si no cultivos agrícolas, tal es el caso de los cultivos de álamo (Petre et al., 2014), algodón (Chen et al., 2015) y diversos genomas de legumbres (Restrepo-Montoya et al., 2021), y de Chile (Kang et al. 2021a; Kang et al. 2021b).

En esta tesis se presenta por primera vez el estudio de la familia *LRR-RLP* de plátano mediante un análisis a escala genómica. El número de genes *LRR-RLP* que identificamos en el genoma de plátano fue de 78, lo cual se encuentra dentro del rango de este tipo de genes que se ha encontrado en otros genomas de plantas, como por ejemplo *Arabidopsis* con 57 y álamo (*Populus trichocarpa*) con 82 (Fritz-Laylin et al., 2005; Petre et al., 2014). Además, se encontró evidencia de que ha habido evolución por duplicación de genes en tándem de los *LRR-RLP* de plátano, ya que al analizar su distribución en los cromosomas se encontró que la mayoría de ellos formaban grupos de genes. Cabe señalar que en los cromosomas de otras especies de plantas se ha encontrado este patrón de agrupamiento para genes de resistencia a enfermedades LRR-RLP y NBS-LRR (Kang y Yeom, 2018; Fritz-Laylin et al., 2005; Petre et al., 2014; Mizuno et al., 2020; Leister, 2004) Se sabe que las familias de genes de resistencia a enfermedades frecuentemente se expanden por duplicación de genes y se encuentran bajo una selección diversificadora, lo cual permite el surgimiento de nuevas especificidades de reconocimiento de patógenos (Houterman et al., 2008).

Hace más de 60 años que el cultivo de plátano superó el reto que representó Foc raza 1, mediante la introducción del cultivar Cavendish resistente a este hongo como reemplazo del cultivar Gros Michel que es altamente susceptible. A pesar de que la resistencia del cultivar Cavendish contra Foc raza 1 ha demostrado ser bastante robusta y duradera, hasta el momento se desconoce la identidad molecular del gen responsable de esta resistencia. En este sentido, el estudio realizado por Ahmad y colaboradores (Ahmad et

al., 2020) que reportó el mapeo del gen de resistencia de Foc raza 1 en la parte distal del cromosoma 10 de plátano, así como la identificación de 19 genes RLK putativos en esta misma región representa un paso muy importante hacia la identificación de un gen de resistencia contra Foc raza 1. En este trabajo de tesis, se realizó un estudio de la familia *LRR-RLP* de plátano, y se encontraron siete miembros de esta familia en la parte distal del cromosoma 10, y se encontró además que sus números de acceso correspondían con siete de los 19 genes putativos reportados por Ahmad y colaboradores (Ahmad et al., 2020). La anotación manual reveló que estos 19 marcos de lectura abiertos predichos en la secuencia del genoma del plátano v2 (Martin et al., 2016) no mostraron una configuración correspondiente a la clase RLK de proteínas de resistencia; por el contrario, se predijo que siete de estos genes poseían una estructura LRR-RLP de proteínas de resistencia con una ubicación en la membrana celular. Con base en estos resultados, se consideraron que estos siete LRR-RLP eran los genes con mayor probabilidad de estar asociados con la resistencia a Foc raza 1. Interesantemente, estos siete candidatos a genes de resistencia (CGR) LRR-RLP se agruparon en un clado junto al clado del gen de tomate I. Cabe señalar también que el gen de tomate I codifica para una proteína LRR-RLP que tiene la capacidad de reconocer la proteína de avirulencia SIX4 (secretada en el xilema 4) de Fol (Guo et al., 2014), y esta interacción desencadena una respuesta inmune que detiene su propagación (Houterman et al., 2008; van der Does et al., 2019). Es de relevancia señalar también que filogenéticamente, Fol está estrechamente relacionado con Foc raza 1 y Foc TR4, además de que se han encontrado homólogos a los genes SIX en la secuencia del genoma de Foc raza 1 (Guo et al., 2014), lo que plantea la posibilidad de que un LRR-RLP de plátano pueda estar involucrado en el reconocimiento de un homólogo SIX de Foc raza 1. Por supuesto, será necesario realizar más investigación dirigida a probar esta hipótesis. Sin embargo, un avance muy importante es que con base en estas observaciones, el número de CGR de plátano asociados con la resistencia a Foc raza 1 en el cromosoma 10 de plátano puede reducirse de 19 (Ahmad et al., 2020) a siete. Por todo lo anterior, se escogieron los genes *MaLRR-RLP74* y *MaLRR-RLP75* como un buen punto de partida para comenzar con la caracterización funcional de los siete CGR antes mencionados, ya que mostraron un tamaño y estructura 3D similares a las proteínas I e I-7 deducidas que confieren resistencia a *F. oxysporum* en tomate. De hecho, cabe mencionar que la identificación de los genes de resistencia I e I-7 siguió un enfoque racional similar con el fin de reducir la complejidad del número de CGR. El gen I fue mapeado en una región de 1 Mb con 98 genes, incluyendo tres *TIR-NBS-LRR* y un gen *LRR-RLP*. Dado que los tres genes *TIR-NBS-LRR* se asociaron con una resistencia viral, el gen *LRR-RLP* fue elegido como el gen con mayor probabilidad de conferir resistencia a Fol para un posterior ensayo funcional, lo que resultó en la identificación del gen I (Catanzariti et al., 2017). Por su parte, el gen I-7 se localizó en una región de 210 kb con 29 genes, de los cuales 18 se encontraron expresados en raíz, y solo uno de ellos tenía la apariencia de un gen de resistencia con una estructura LRR-RLP, lo cual resultó en la identificación del gen I-7 en el ensayo funcional (Gonzalez-Cendales et al., 2016). Curiosamente, estos dos genes de resistencia a Fol se encontraron en diferentes clados filogenéticos, aunque ambos clados estaban muy cercanos uno del otro.

Es importante reconocer que, tomando en conjunto los hallazgos de Ahmad y colaboradores (Ahmad et al., 2020) y los de esta tesis sobre la familia de banano LRR-RLP, se debería facilitar la clonación de un gen de resistencia a Foc raza 1 en plátano. En este sentido, resultaría interesante un enfoque de complementación genética utilizando un genotipo susceptible a Foc raza 1, por ejemplo 'Lady Finger', con el que se realizarían experimentos de transformación usando cada uno de los siete CGR LRR-RLP con el

objetivo de evaluar su función en la resistencia de Foc raza 1. Se sugiere que se podrían comenzar los estudios usando el cultivar Manzano también conocido como 'Lady Finger' debido a que se ha demostrado previamente que es un genotipo adecuado para el estudio de la función de los transgenes antiapoptóticos en la resistencia a Foc raza 1 (Wolfe et al., 1989). También resulta interesante el escenario en el que una vez obtenido un gen de resistencia a Foc raza 1 en plátano, y aunado a la disponibilidad del gen NBS-LRR RGA2 de plátano antes mencionado (Dale et al., 2017) se pudiera obtener una nueva variedad de plátano que sea resistente tanto a Foc raza 1 como a Foc TR4; en este escenario se podría incluso contemplar la 'resurrección' de un cultivar tan apreciado como lo era el cultivar Gros Michel, el cual podría regresar al comercio internacional 60 años de su salida del mercado.

En este estudio, además de los CGR de Foc raza 1 ubicados en el cromosoma 10, se encontraron otros siete LRR-RLP de plátano que se consideraron como CGR con base en su estrecha relación filogenética con LRR-RLP que tienen funciones conocidas en la inmunidad de las plantas. En este punto cabe recordar que en plátano tenemos el caso del gen *RGA2* (también conocido como *RGC2*) cuyo análisis funcional mostró que era capaz de conferir una respuesta inmune efectiva contra Foc TR4 en pruebas de campo (Dale, et al., 2017). Se sabe que en un principio este gen fue considerado como un CGR de la clase NBS-LRR de genes de resistencia y se observó que se agrupaba en un clado filogenético compartido por los genes *I-2* de tomate y *Fom-2* de melón, los cuales confieren resistencia a *F. oxysporum* (Peraza-Echeverría et al., 2009). Este antecedente apoya la idea de que los LRR-RLP de plátano que se agruparon con LRR-RLP conocidos involucrados en resistencia a enfermedades podrían tener una función en la inmunidad. Por lo tanto, en este trabajo de tesis también se sugiere que estos CGR *LRR-RLP* de plátano podrían representar una plataforma valiosa sobre la cual se pueden realizar posteriormente ensayos funcionales con el objetivo de identificar nuevos genes de resistencia para combatir las enfermedades más dañinas del plátano, incluyendo las ocasionadas por *Fusarium* y la enfermedad de la Sigatoka negra.

Con el fin de analizar las relaciones filogenéticas de los miembros de la familia LRR-RLP de plátano con el conjunto completo de LRR-RLP de otros genomas de plantas, se eligieron a las familias LRR-RLP de las plantas modelo *Arabidopsis* y arroz. Ambas plantas modelo compartieron cinco clados con plátano, lo que sugiere un origen antiguo para estos clados filogenéticos que pueden ser anteriores a la divergencia de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, lo cual ocurrió hace aproximadamente 200 millones de años (Li et al., 2021; Wolfe et al., 1989). La contracción o expansión de LRR-RLPs que se observó en algunos de los clados filogenéticos en las tres plantas puede deberse a diferentes presiones de selección de microorganismos que dan forma a la diversidad de receptores inmunes en estas especies de plantas después de haberse separado de su ancestro común (Li et al., 2021; Ngou et al., 2022).

En este trabajo de tesis también se realizó un análisis transcripcional de la familia *LRR-RLP* del plátano en respuesta al estrés biótico, el cual mostró la expresión de 18 genes que estaban presente en el tejido de la raíz del plátano, así como de algunos genes que fueron regulados de forma positiva en respuesta a Foc raza 1 o Foc TR4, lo cual sugiere la presencia de elementos reguladores en cis en los promotores de estos genes que responden a las señales de estrés biótico. Un estudio transcripcional reciente de la familia *LRR-RLP* en *Arabidopsis* mostró que el estrés biótico perturbó la expresión de la mayor proporción (87%) de 51 genes *LRR-RLP* (Wu et al., 2016). Por ejemplo, el patógeno fúngico *Erysiphe orontii* causó un incremento de la expresión del 50% de los miembros de la familia *LRR-RLP*, lo que indica que un número significativo de *LRR-RLPs* puede

responder a un patógeno en particular (Wu et al., 2016). También se detectó la expresión del 23% de los 78 *LRR-RLP* de plátano en los datos transcriptómicos de Li y colaboradores (Li et al., 2013) ; este porcentaje probablemente representa los genes *LRR-RLP* con los transcritos más abundantes en el tejido radicular, mientras que los genes restantes no fueron detectados muy probablemente debido a sus bajos niveles de expresión que no permitió su detección en la cobertura de secuenciación utilizada. Se puede decir que, en general, el análisis transcriptómico aquí presentado puede servir de base para posteriores estudios de expresión, así como también estudios funcionales de la familia *LRR-RLP* en plátano.

## 4.2 CONCLUSIONES GENERALES

En este estudio, se logró realizar un análisis a escala genómica de la familia de receptores LRR-RLP de plátano. A continuación, presentamos las conclusiones más notables:

1.-Se identificaron 78 genes *LRR-RLP* en el genoma de plátano que se distribuyeron en nueve clados filogenéticos y se descubrió que el 60% de ellos formaron clústers en un total de 6 cromosomas.

2.-Se identificó un clúster de siete genes *MaLRR-RLP* en la parte distal del cromosoma 10, donde se mapeó previamente la resistencia a la raza 1 de Foc, por lo que estos siete genes se consideraron como candidatos a genes de resistencia para Foc raza 1.

3.- Se identificamos otros siete genes que se proponen como candidatos a genes de resistencia con base en sus relaciones filogenéticas cercanas con genes de resistencia *LRR-RLP* conocidos. Por lo tanto, se logró identificar un total de 14 candidatos a genes de resistencia de la familia *LRR-RLP* de plátano.

4.-El análisis filogenético de las familias de genes *LRR-RLP* de plátano, arroz y *Arabidopsis* reveló cinco clados filogenéticos compartidos entre estas tres especies, sugiriendo un origen ancestral que podría preceder la división de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Además, se encontró evidencia de expansión y contracción del número de genes *MaLRR-RLP* de plátano en determinados clados filogenéticos.

5.-Finalmente, se detectó la expresión de 18 miembros de la familia LRR-RLP de plátano en datos transcriptómicos de plantas tratadas con Foc raza 1 y Foc TR4, donde algunos genes *MaLRR-RLP* mostraron aumentar o disminuir su expresión en respuesta a estas dos razas de *F. oxysporum*.

El análisis a escala genómica de la familia LRR-RLP en plátano proporcionó recursos valiosos que muy probablemente facilitarán la clonación de un gen de resistencia a la raza 1 de Foc y otros genes de resistencia a enfermedades para el mejoramiento genético de los cultivares de plátano y quizás de otros cultivos.

### 4.3 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo han sentado las bases para elucidar la función de los miembros de la familia *LRR-RLP* de plátano y entender su papel en el sistema inmune de esta planta. Los recientes hallazgos de Ahmad et al. 2020 (Ahmad et al., 2020) y nuestros descubrimientos sobre la familia *LRR-RLP* de plátano podrían facilitar la clonación de un gen de resistencia a Foc raza 1, lo cual permitirá entender el mecanismo de percepción de la proteína codificada por este gen y la cascada de señalización para activar la respuesta de resistencia. Con la finalidad de evaluar la función de los siete genes *LRR-RLP* que fueron considerados como candidatos a genes de resistencia para Foc raza 1 se propone una estrategia de complementación genética que utilice un genotipo susceptible a Foc raza 1 para realizar experimentos de transformación genética con cada uno de los siete genes *LRR-RLP* mencionados anteriormente y de esta forma evaluar su papel en la resistencia a Foc raza 1. Se ha demostrado que el cultivar Manzano también conocido como Lady Finger podría facilitar un estudio funcional de esta índole ya que se pueden obtener plantas transgénicas a partir de suspensiones embriogénicas en un tiempo más corto en comparación con otros cultivares y su utilidad para este fin ha sido demostrada en el estudio de transgenes antiapoptóticos en la resistencia a Foc raza 1 (Paul et al., 2011). La identificación de un gen de resistencia *LRR-RLP* para Foc raza 1 en plátano junto con el gen RGA2 (también conocido como RGC2) (Peraza-Echeverría et al., 2008; 2009; Dale et al., 2017) de la familia NBS-LRR de plátano y que confiere resistencia contra Foc TR4 abre numerosas oportunidades para el mejoramiento genético del cultivar Gros Michel para regresarlo al comercio internacional 60 años después de su desaparición. El mejoramiento genético de Gros Michel podría llevarse a cabo mediante una estrategia de cisgénesis o bien mediante edición de genes usando CRISPR.

Por otro lado, el repertorio de genes *LRR-RLP* identificados en este trabajo podría asistir en la búsqueda de un gen de resistencia para la Sigatoka negra tomando en cuenta que se tienen evidencias que apuntan a que en esta familia de genes podría residir un gen de resistencia para esta enfermedad.

## BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, Fajarudin, Nani M. Martawi, Yuyu S. Poerba, Hans de Jong, Henk Schouten, and Gert H.J. Kema. 2020. “Genetic Mapping of Fusarium Wilt Resistance in a Wild Banana *Musa Acuminata* Ssp. *Malaccensis* Accession.” *Theoretical and Applied Genetics* 133 (12): 3409–18. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03677-y>.
- Altendorf, Sabine. 2019. “Bananas and Major Tropical Fruits in Latin America and The Caribbean,” no. May. [http://www.fao.org/3/ca4526en/ca4526en\\_sf.pdf](http://www.fao.org/3/ca4526en/ca4526en_sf.pdf).
- Arango Isaza, Rafael E., Caucasella Diaz-Trujillo, Braham Dhillon, Andrea Aerts, Jean Carlier, Charles F. Crane, Tristan V. de Jong, et al. 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): 1–36. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005876>.
- Armenteros, Juan Almagro, Casper Kaae Sønderby, Søren Kaae Sønderby, Henrik Nielsen, and Ole Winther. 2017. “Sequence Analysis DeepLoc : Prediction of Protein Subcellular Localization Using Deep Learning.” *Bioinformatics* 33 (July): 3387–95. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx431>.
- Bailey, Timothy L., James Johnson, Charles E. Grant, and William S. Noble. 2015. “The MEME Suite.” *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W39–49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>.
- Baker, B, P Zambryski, B Staskawicz, and S P Dinesh-Kumar. 1997. “Signaling in Plant-Microbe Interactions.” *Science (New York, N.Y.)* 276 (5313): 726–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9115193>.
- Becker, D. K., and J. L. Dale. 2004. “Transformation of Banana Using Microprojectile Bombardment.” *Transgenic Crops of the World*, 131–43. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2333-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2333-0_10).
- Boutrot, Freddy, and Cyril Zipfel. 2017a. “Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance.” *Annual Review of Phytopathology* 55 (1): 257–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>.
- Burgh, Aranka M. van der, and Matthieu H.A.J. Joosten. 2019. “Plant Immunity: Thinking Outside and Inside the Box.” *Trends in Plant Science* 24 (7): 587–601. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.04.009>.
- Catanzariti, Ann Maree, Huong T.T. Do, Pierrick Bru, Mara de Sain, Louise F. Thatcher, Martijn Rep, and David A. Jones. 2017. “The Tomato I Gene for Fusarium Wilt Resistance Encodes an Atypical Leucine-Rich Repeat Receptor-like Protein Whose Function Is Nevertheless Dependent on SOBIR1 and SERK3/BAK1.” *Plant Journal* 89 (6): 1195–1209. <https://doi.org/10.1111/tpj.13458>.
- Cesari, Stella. 2018. “Multiple Strategies for Pathogen Perception by Plant Immune Receptors.” *New Phytologist* 219 (1): 17–24. <https://doi.org/10.1111/nph.14877>.
- Chang, Ti Cheng, Anthony Salvucci, Pedro W. Crous, and Ioannis Stergiopoulos. 2016. “Comparative Genomics of the Sigatoka Disease Complex on Banana Suggests a Link between Parallel Evolutionary Changes in *Pseudocercospora Fijiensis* and *Pseudocercospora Eumusae* and Increased Virulence on the Banana Host.” *PLoS Genetics* 12 (8): 1–36. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005904>.
- Chang, Wenjun, Heng Li, Hanqing Chen, Fan Qiao, and Huicai Zeng. 2020. “NBS-LRR Gene Family in Banana (*Musa Acuminata*): Genome-Wide Identification and

- Responses to *Fusarium Oxysporum* f. Sp. Cubense Race 1 and Tropical Race 4.” *European Journal of Plant Pathology* 157 (3): 549–63.  
<https://doi.org/10.1007/s10658-020-02016-7>.
- Chao, Jiangtao, Zhiyuan Li, Yuhe Sun, Oluwaseun Olayemi Aluko, Xinru Wu, Qian Wang, and Guanshan Liu. 2021. “MG2C: A User-Friendly Online Tool for Drawing Genetic Maps.” *Molecular Horticulture* 1 (1): 1–4. <https://doi.org/10.1186/s43897-021-00020-x>.
- Chen, Jie Yin, Jin Qun Huang, Nan Yang Li, Xue Feng Ma, Jin Long Wang, Chuan Liu, Yong Feng Liu, Yong Liang, Yu Ming Bao, and Xiao Feng Dai. 2015. “Genome-Wide Analysis of the Gene Families of Resistance Gene Analogues in Cotton and Their Response to Verticillium Wilt.” *BMC Plant Biology* 15 (1): 1–15.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-015-0508-3>.
- Churchill, Alice 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): 307–28. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x>.
- Colwyn M. Thomas, David A. Jones, Martin Parniske, Kate Harrison, Peter J. Balint-Kurti, Kostas Hatzixanthis, and Jonathan D.G. Jones. 1997. “Characterization of the Tomato Cf-4 Gene for Resistance to *Cladosporium Fulvum* Identifies Sequences That Determine Recognition Specificity in Cf-4 and Cf-9.” *The Plant Cell* 9 (December): 2209–24.
- Cote, F X, R Domerguc, S Monmarson, J Schwendiman, C Teisson, and V Escalant. 1996. “Embryogenic Cell Suspensions from the Male Flower of *Musa AAA Cv. Grand Nain*.” *Physiologia Plantarum*, no. 1994.
- D’hont, Angélique, France Denoeud, Jean Marc Aury, Franc Christophe Baurens, Françoise Carreel, Olivier Garsmeur, Benjamin Noel, et al. 2012. “The Banana (*Musa Acuminata*) Genome and the Evolution of Monocotyledonous Plants.” *Nature* 488 (7410): 213–17. <https://doi.org/10.1038/nature11241>.
- Dale, James, Anthony James, Jean-Yves Paul, Harjeet Khanna, Mark Smith, Santy Peraza-Echeverria, Fernando Garcia-Bastidas, et al. 2017. “Transgenic Cavendish Bananas with Resistance to *Fusarium* Wilt Tropical Race 4.” *Nature Communications*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01670-6>.
- Dale, James, Jean Yves Paul, Benjamin Dugdale, and Robert Harding. 2017. “Modifying Bananas: From Transgenics to Organics?” *Sustainability (Switzerland)* 9 (3). <https://doi.org/10.3390/su9030333>.
- Dangl, Jonathan D.G. Jones and Jeffery L. 2006. “The Plant Immune System.” *Nature Reviews* 444: 3–9.
- Davey, Mark W., Ranganath Gudimella, Jennifer Ann Harikrishna, Lee Wan Sin, Norzulaani Khalid, and Johan Keulemans. 2013. “A Draft *Musa Balbisiana* Genome Sequence for Molecular Genetics in Polyploid, Inter- and Intra-Specific *Musa* Hybrids.” *BMC Genomics* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-683>.
- Dita, Miguel, Marcia Barquero, Daniel Heck, Eduardo S.G. Mizubuti, and Charles P. Staver. 2018. “*Fusarium* Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs toward Sustainable Disease Management.” *Frontiers in Plant Science* 871 (October): 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>.
- Dixon, M S, K Hatzixanthis, D A Jones, K Harrison, and J D Jones. 1998. “The Tomato Cf-5 Disease Resistance Gene and Six Homologs Show Pronounced Allelic Variation in

- Leucine-Rich Repeat Copy Number.” *Plant Cell* 10 (11): 1915–25.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.10.11.1915>.
- Dixon, Mark S., David A. Jones, James S. Keddie, Colwyn M. Thomas, Kate Harrison, and Jonathan D.G. Jones. 1996. “The Tomato Cf-2 Disease Resistance Locus Comprises Two Functional Genes Encoding Leucine-Rich Repeat Proteins.” *Cell* 84 (3): 451–59.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81290-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81290-8).
- Dixon, Mark S, Kostas Hatzixanthos, David A Jones, Kate Harrison, and Jonathan D G Jones. 1998a. “The Tomato Cf-5 Disease Resistance Gene and Six Homologs Show Pronounced Allelic Variation in Leucine-Rich Repeat Copy Number” 10 (November): 1915–25.
- Does, H. C. van der, M. E. Constantin, P. M. Houterman, F. L.W. Takken, B. J.C. Cornelissen, M. A. Haring, H. A. van den Burg, and M. Rep. 2019. “Fusarium Oxysporum Colonizes the Stem of Resistant Tomato Plants, the Extent Varying with the R-Gene Present.” *European Journal of Plant Pathology* 154 (1): 55–65.  
<https://doi.org/10.1007/s10658-018-1596-3>.
- Eddy, Sean R. 2011. “Accelerated Profile HMM Searches.” *PLoS Computational Biology* 7 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195>.
- Edgar, Robert C. 2004. “MUSCLE: A Multiple Sequence Alignment Method with Reduced Time and Space Complexity.” *BMC Bioinformatics* 5: 1–19.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>.
- FAO. 2017. “Global Programme on Banana Fusarium Wilt Disease.” *FAO* 4 (October).  
———. 2020. “Análisis Del Mercado Del Banano:Panorama General Febrero 2020.” *Panorama General de Febrero de 2020*, 1–6.  
<http://www.fao.org/3/ca9212es/ca9212es.pdf>.
- . 2021. “Banana Market Review Preliminary Results 2020.” *FAO* 9 (September 2021): 1–6.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2019. *Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets*.
- Fritz-Laylin, Lillian K., Nandini Krishnamurthy, Mahmut Tor, Kimmen V. Sjolander, and Jonathan D G Jones. 2005. “Phylogenomic Analysis of the Receptor-Like Proteins of Rice and Arabidopsis.” *Plant Physiology* 138 (June): 611–23.  
<https://doi.org/10.1104/pp.104.054452.1>.
- Gabaldón, Toni, and Eugene V. Koonin. 2013. “Functional and Evolutionary Implications of Gene Orthology.” *Nature Reviews Genetics* 14 (5): 360–66.  
<https://doi.org/10.1038/nrg3456>.
- Ganapathi, T. R., N. S. Higgs, P. J. Balint-Kurti, C. J. Arntzen, G. May, and J. M. Van Eck. 2001. “Agrobacterium-Mediated Transformation of Embryogenic Cell Suspensions of the Banana Cultivar Rasthali (AAB).” *Plant Cell Reports* 20 (2): 157–62.  
<https://doi.org/10.1007/s002990000287>.
- Gasteriger, Elisabeth ; Hoogland, Christine,; Séverine; Gattiker, Alexandre; Duvaud, Marc R. ; Wilkins, Ron D.; and Appel, and Amos Bairoch. 2005. “Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server.” In *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 571–603.
- Göhre, Vera, and Silke Robatzek. 2008. “Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity.” *Annual Review of Phytopathology* 46 (1): 189–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.46.120407.110050>.
- Gonzalez-Cendales, Yvonne, Ann Maree Catanzariti, Barbara Baker, Des J. Mcgrath, and

- David A. Jones. 2016. "Identification of I-7 Expands the Repertoire of Genes for Resistance to Fusarium Wilt in Tomato to Three Resistance Gene Classes." *Molecular Plant Pathology* 17 (3): 448–63. <https://doi.org/10.1111/mpp.12294>.
- Gowen, S. 1995. *Bananas and Plantains*.
- Guo, Lijia, Lijuan Han, Laying Yang, Huicai Zeng, Dingding Fan, Yabin Zhu, Yue Feng, et al. 2014. "Genome and Transcriptome Analysis of the Fungal Pathogen *Fusarium Oxysporum* f. Sp. *Cubense* Causing Banana Vascular Wilt Disease." *PLoS ONE* 9 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095543>.
- Hammond- Kosack, Kim E, and Kostya Kanyuka. 2007. "Resistance Genes ( R Genes) in Plants ." *ELS*, no. X. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020119>.
- Han, Guan Zhu. 2019. "Origin and Evolution of the Plant Immune System." *New Phytologist* 222 (1): 70–83. <https://doi.org/10.1111/nph.15596>.
- Heslop-Harrison, J. S., and Trude Schwarzacher. 2007. "Domestication, Genomics and the Future for Banana." *Annals of Botany* 100 (5): 1073–84. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm191>.
- Hoorn, Renier A.L. Van Der, Franck Laurent, Ronelle Roth, and Pierre J.G.M. De Wit. 2000. "Agroinfiltration Is a Versatile Tool That Facilitates Comparative Analyses of Avr9/Cf-9-Induced and Avr4/Cf-4-Induced Necrosis." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (4): 439–46. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.4.439>.
- Houterman, Petra M., Ben J.C. Cornelissen, and Martijn Rep. 2008. "Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector." *PLoS Pathogens* 4 (5): 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000061>.
- Hu, Bo, Jinpu Jin, An Yuan Guo, He Zhang, Jingchu Luo, and Ge Gao. 2015. "GSDS 2.0: An Upgraded Gene Feature Visualization Server." *Bioinformatics* 31 (8): 1296–97. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817>.
- Hu, Chunhua, Ou Sheng, Guiming Deng, Weidi He, Tao Dong, Qiaosong Yang, Tongxin Dou, et al. 2021. "CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of MaACO1 (Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase 1) Promotes the Shelf Life of Banana Fruit." *Plant Biotechnology Journal* 19 (4): 654–56. <https://doi.org/10.1111/pbi.13534>.
- Jamieson P., Shan L. and He P. 2018. "Plant Cell Surface Molecular Cypher: Receptor-Like Proteins and Their Roles in Immunity and Development." *Plant Science*, no. 274: 242–51.
- Jamieson, Pierce A., Libo Shan, and Ping He. 2018. "Plant Cell Surface Molecular Cypher: Receptor-like Proteins and Their Roles in Immunity and Development." *Plant Science* 274 (February): 242–51. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.030>.
- Jeffery L. Dangl , Diana M. Horvath, Brian J. Staskawicz. 2013. "Pivoting the Plant Immune System." *Science* 341 (August): 746–52.
- Jeong, Sangho, Amy E. Trotochaud, and Steven E. Clark. 1999. "The Arabidopsis CLAVATA2 Gene Encodes a Receptor-like Protein Required for the Stability of the CLAVATA1 Receptor-like Kinase." *Plant Cell* 11 (10): 1925–33. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.10.1925>.
- Jones, David A., Colwyn M. Thomas, Kim E. Hammond-Kosack, Peter J. Balint-Kurti, and Jonathan D.G. Jones. 1994a. "Isolation of the Tomato Cf-9 Gene for Resistance to *Cladosporium Fulvum* by Transposon Tagging." *Science* 266 (5186): 789–93. <https://doi.org/10.1126/science.7973631>.
- Jupe, Florian, Leighton Pritchard, Graham J. Etherington, Katrin MacKenzie, Peter J.A.

- Cock, Frank Wright, Sanjeev Kumar Sharma, et al. 2012. "Identification and Localisation of the NB-LRR Gene Family within the Potato Genome." *BMC Genomics* 13 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-75>.
- Kang, Won-He, and Seon-In Yeom. 2018. "Genome-Wide Identification, Classification, and Expression Analysis of the Receptor-like Protein Family in Tomato." *Plant Pathology Journal* 34 (5): 435–44. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.02.2018.0032>.
- Kang, Won-hee, Boseul Park, Junesung Lee, and Seon-in Yeom. 2021. "Tissue-Specific RNA-Seq Analysis and Identification of Receptor-Like Proteins Related to Plant Growth in Capsicum Annum."
- Kanyuka, Kostya, and Jason J. Rudd. 2019. "Cell Surface Immune Receptors: The Guardians of the Plant's Extracellular Spaces." *Current Opinion in Plant Biology* 50: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.005>.
- Keller, Harald, Laurent Boyer, and Pierre Abad. 2016. "Disease Susceptibility in the Zig-Zag Model of Host-Microbe Interactions: Only a Consequence of Immune Suppression?" *Molecular Plant Pathology* 17 (4): 475–79. <https://doi.org/10.1111/mpp.12371>.
- Kimunye, Janet, Evans Were, Rony Swennen, Altus Viljoen, and George Mahuku. 2021. "Sources of Resistance to Pseudocercospora Fijiensis, the Cause of Black Sigatoka in Banana." *Plant Pathology* 70 (7): 1651–64. <https://doi.org/10.1111/ppa.13408>.
- Kruijt, Marco, Maarten J.D. De Kock, and Pierre J.G.M. De Wit. 2005. "Receptor-like Proteins Involved in Plant Disease Resistance." *Molecular Plant Pathology* 6 (1): 85–97. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2004.00264.X>.
- Langhe, Edmond De, Luc Vrydaghs, Pierre De Maret, Xavier Perrier, and Tim Denham. 2009. "Why Bananas Matter: An Introduction to the History of Banana Domestication." *Ethnobotany Research and Applications* 7: 165–78. <https://doi.org/10.17348/era.7.0.165-177>.
- Leister, Dario. 2004. "Tandem and Segmental Gene Duplication and Recombination in the Evolution of Plant Disease Resistance Genes." *Trends in Genetics* 20 (3): 113–16. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.01.001>.
- Letunic, Ivica, Supriya Khedkar, and Peer Bork. 2020. "SMART: Recent Updates, New Developments and Status in 2020." *Nucleic Acids Research* 49 (D1): D458–60. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937>.
- Li, Chun yu, Gui ming Deng, Jing Yang, Altus Viljoen, Yan Jin, Rui bin Kuang, Cun wu Zuo, et al. 2012. "Transcriptome Profiling of Resistant and Susceptible Cavendish Banana Roots Following Inoculation with Fusarium Oxysporum f. Sp. Cubense Tropical Race 4." *BMC Genomics* 13 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-374>.
- Li, Chunqiang, Jiaofang Shao, Yejun Wang, Wenbin Li, Dianjing Guo, Bin Yan, Yiji Xia, and Ming Peng. 2013. "Analysis of Banana Transcriptome and Global Gene Expression Profiles in Banana Roots in Response to Infection by Race 1 and Tropical Race 4 of Fusarium Oxysporum f. Sp. Cubense." *BMC Genomics* 14 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-851>.
- Li, Pingchuan, Xiande Quan, Gaofeng Jia, Jin Xiao, Sylvie Cloutier, and Frank M. You. 2016. "RGAugury: A Pipeline for Genome-Wide Prediction of Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants." *BMC Genomics* 17 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3197-x>.
- Li, Xiao-Tong, Guang-Can Zhou, Xing-Yu Feng, Zhen Zeng, Yang Liu, and Zhu-Qing Shao. 2021. "Frequent Gene Duplication/Loss Shapes Distinct Evolutionary Patterns

- of NLR Genes in Areaceae Species.” *Horticulturae* 7 (12): 539.  
<https://doi.org/10.3390/horticulturae7120539>.
- Lu, You, and Kenichi Tsuda. 2021. “Intimate Association of PRR- and NLR-Mediated Signaling in Plant Immunity.” *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI* 34 (1): 3–14. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0239-IA>.
- Martin, Guillaume, Franc Christophe Baurens, Gaëtan Droc, Mathieu Rouard, Alberto Cenci, Andrzej Kilian, Alex Hastie, et al. 2016. “Improvement of the Banana ‘Musa Acuminata’ Reference Sequence Using NGS Data and Semi-Automated Bioinformatics Methods.” *BMC Genomics* 17 (1): 1–12.  
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2579-4>.
- May, Gregory D., Rownak Afza, Hugh S. Mason, Alicja Wiecko, Frarrtisek J. Novak, and Charles J. Arntzen. 1995. “Generation of Transgenic Banana (*Musa Acuminata*) Plants via *Agrobacterium*-Mediated Transformation.” *Bio/Technology* 13 (5): 486–92.  
<https://doi.org/10.1038/nbt0595-486>.
- Michelmore, Richard W., and Blake C. Meyers. 1998. “Clusters of Resistance Genes in Plants Evolve by Divergent Selection and a Birth-and-Death Process.” *Genome Research* 8 (11): 1113–30. <https://doi.org/10.1101/gr.8.11.1113>.
- Miller, Robert N.G., David J. Bertioli, Franc C. Baurens, Candice M.R. Santos, Paulo C. Alves, Natalia F. Martins, Roberto C. Togawa, Manoel T. Souza, and Georgios J. Pappas. 2008. “Analysis of Non-TIR NBS-LRR Resistance Gene Analogs in *Musa Acuminata* Colla: Isolation, RFLP Marker Development, and Physical Mapping.” *BMC Plant Biology* 8: 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-15>.
- Mizuno, Hiroshi, Satoshi Katagiri, Hiroyuki Kanamori, Yoshiyuki Mukai, Takuji Sasaki, Takashi Matsumoto, and Jianzhong Wu. 2020. “Evolutionary Dynamics and Impacts of Chromosome Regions Carrying R-Gene Clusters in Rice.” *Scientific Reports* 10 (1): 1–2. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57729-w>.
- Morais-Lino, Lucymeire Souza, Janay Almeida Santos-Serejo, Edson Perito Amorim, José Raniere Ferreira de Santana, Moacir Pasqual, and Sebastião de Oliveira e Silva. 2016. “Somatic Embryogenesis, Cell Suspension, and Genetic Stability of Banana Cultivars.” *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 52 (1): 99–106.  
<https://doi.org/10.1007/s11627-015-9729-2>.
- Mulder, Nicola and, and Rolf Apweiler. 2007. “InterPro and InterProScan: Tools for Protein Sequence Classification and Comparison.” *Methods in Molecular Biology* 396 (February): 59–70. <https://doi.org/10.1385/1-59745-515-6:59>.
- Naim, Fatima, Benjamin Dugdale, Jennifer Kleidon, Anthony Brinin, Kylie Shand, Peter Waterhouse, and James Dale. 2018. “Gene Editing the Phytoene Desaturase Alleles of Cavendish Banana Using CRISPR/Cas9.” *Transgenic Research* 27 (5): 451–60.  
<https://doi.org/10.1007/s11248-018-0083-0>.
- Nelson, Rebecca. 2020. “International Plant Pathology: Past and Future Contributions to Global Food Security.” *Phytopathology* 110 (2): 245–53.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-19-0300-IA>.
- Ngou, Bruno Pok Man, Robert Heal, Michele Wyler, Marc W Schmid, and Jonathan D G Jones. 2022. “Concerted Expansion and Contraction of Immune Receptor Gene Repertoires in Plant Genomes.” *BioRxiv*.
- Noar, Roslyn D., and Margaret E. Daub. 2016. “Transcriptome Sequencing of *Mycosphaerella Fijiensis* during Association with *Musa Acuminata* Reveals Candidate Pathogenicity Genes.” *BMC Genomics* 17 (1): 1–25. <https://doi.org/10.1186/s12864->

016-3031-5.

- Noman, Ali, Muhammad Aqeel, and Yonggen Lou. 2019. "PRRs and NB-LRRs: From Signal Perception to Activation of Plant Innate Immunity." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (8): 21. <https://doi.org/10.3390/ijms20081882>.
- Passos, Marco A.N., Viviane Oliveira de Cruz, Flavia L. Emediato, Cristiane Camargo de Teixeira, Vânia C.Rennó Azevedo, Ana C.M. Brasileiro, Edson P. Amorim, et al. 2013. "Analysis of the Leaf Transcriptome of *Musa Acuminata* during Interaction with *Mycosphaerella Musicola*: Gene Assembly, Annotation and Marker Development." *BMC Genomics* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-78>.
- Paul, Jean Yves, Douglas K. Becker, Martin B. Dickman, Robert M. Harding, Harjeet K. Khanna, and James L. Dale. 2011. "Apoptosis-Related Genes Confer Resistance to Fusarium Wilt in Transgenic 'Lady Finger' Bananas." *Plant Biotechnology Journal* 9 (9): 1141–48. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00639.x>.
- Pei, Xinwu, Shengjun Li, Ying Jiang, Yongqiang Zhang, Zhixing Wang, and Shirong Jia. 2007. "Isolation, Characterization and Phylogenetic Analysis of the Resistance Gene Analogues (RGAs) in Banana (*Musa Spp.*)." *Plant Science* 172 (6): 1166–74. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.02.019>.
- Peraza-Echeverria, Santy, James L. Dale, Rob M. Harding, and Chris Collet. 2009. "Molecular Cloning and in Silico Analysis of Potential Fusarium Resistance Genes in Banana." *Molecular Breeding* 23 (3): 431–43. <https://doi.org/10.1007/s11032-008-9247-6>.
- Peraza-Echeverria, Santy, James L. Dale, Rob M. Harding, Mike K. Smith, and Chris Collet. 2008. "Characterization of Disease Resistance Gene Candidates of the Nucleotide Binding Site (NBS) Type from Banana and Correlation of a Transcriptional Polymorphism with Resistance to *Fusarium Oxysporum* f.Sp. *Cubense* Race 4." *Molecular Breeding* 22 (4): 565–79. <https://doi.org/10.1007/s11032-008-9199-x>.
- Petre, Benjamin, Stéphane Hacquard, Sébastien Duplessis, and Nicolas Rouhier. 2014. "Genome Analysis of Poplar LRR-RLP Gene Clusters Reveals RISP, a Defense-Related Gene Coding a Candidate Endogenous Peptide Elicitor." *Frontiers in Plant Science* 5 (MAR): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00111>.
- Postma, Jelle, Thomas W H Liebrand, Guozhi Bi, Alexandre Evrard, Ruby R Bye, Malick Mbengue, Hannah Kuhn, Matthieu H A J Joosten, and Silke Robatzek. 2016. "Avr4 Promotes Cf-4 Receptor-like Protein Association with the BAK1 / SERK3 Receptor-like Kinase to Initiate Receptor Endocytosis and Plant Immunity." *New Phytologist* 2010: 627–42.
- Pua, Teen Lee, Tian Tian Tan, Nurzatil S.M. Jalaluddin, Rofina Y. Othman, and Jennifer A. Harikrishna. 2019. "Genetically Engineered Bananas—From Laboratory to Deployment." *Annals of Applied Biology* 175 (3): 282–301. <https://doi.org/10.1111/aab.12538>.
- Restrepo-Montoya, Daniel, Phillip E. McClean, and Juan M. Osorno. 2021. "Orthology and Synteny Analysis of Receptor-like Kinases 'RLK' and Receptor-like Proteins 'RLP' in Legumes." *BMC Genomics* 22 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07384-w>.
- Sági, László, Bart Panis, Serge Remy, Hilde Schoofs, Kris De Smet, Rony Swennen, and Bruno P.A. Cammue. 1995. "Genetic Transformation of Banana and Plantain (*Musa Spp.*) via Particle Bombardment." *Bio/Technology* 13 (5): 481–85.

- <https://doi.org/10.1038/nbt0595-481>.
- Sagi, Laszlo, Serge Remy, Bart Panis, Rony Swennen, and Guido Volckaert. 1994. “Transient Gene Expression in Electroporated Banana (*Musa Spp.*, Cv. ‘Bluggoe’, ABB Group) Protoplasts Isolated from Regenerable Embryogenetic Cell Suspensions.” *Plant Cell Reports* 13 (5): 262–66. <https://doi.org/10.1007/BF00233316>.
- Saijo, Yusuke, Eliza Po iian Loo, and Shigetaka Yasuda. 2018. “Pattern Recognition Receptors and Signaling in Plant–Microbe Interactions.” *Plant Journal* 93 (4): 592–613. <https://doi.org/10.1111/tpj.13808>.
- Schwede, Torsten, Jürgen Kopp, Nicolas Guex, and Manuel C. Peitsch. 2003. “SWISS-MODEL: An Automated Protein Homology-Modeling Server.” *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3381–85. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>.
- Shao, Zhu Qing, Jia Yu Xue, Qiang Wang, Bin Wang, and Jian Qun Chen. 2019. “Revisiting the Origin of Plant NBS-LRR Genes.” *Trends in Plant Science* 24 (1): 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.015>.
- Shen, Yunping, and Andrew C. Diener. 2013. “Arabidopsis Thaliana RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM 2 Implicates Tyrosine-Sulfated Peptide Signaling in Susceptibility and Resistance to Root Infection.” *PLoS Genetics* 9 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003525>.
- SIAP. 2020. “PANORAMA AGROALIMENTARIO 2020.” *SIAP Mexico*, 99–117.
- . 2021. “Estudio Para Determinar El Impacto Económico de Foc R4T En México.”
- Sievers, Fabian, and Desmond G. Higgins. 2018. “Clustal Omega for Making Accurate Alignments of Many Protein Sequences.” *Protein Science* 27 (1): 135–45. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>.
- Steidle, C. E., and R. Stam. 2021. “Multi-Omics Approach Highlights Differences between RLP Classes in Arabidopsis Thaliana.” *BMC Genomics* 22 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07855-0>.
- Stergiopoulos, I., H. A. van den Burg, B. Okmen, H. G. Beenen, S. van Liere, G. H. J. Kema, and P. J. G. M. de Wit. 2010. “Tomato Cf Resistance Proteins Mediate Recognition of Cognate Homologous Effectors from Fungi Pathogenic on Dicots and Monocots.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (16): 7610–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002910107>.
- Stergiopoulos, Ioannis, Harrold A. Van Den Burg, Bilal Ökmen, Henriek G. Beenen, Sabine Van Liere, G. H J Kema, and P. J G M De Wit. 2010. “Tomato Cf Resistance Proteins Mediate Recognition of Cognate Homologous Effectors from Fungi Pathogenic on Dicots and Monocots.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (16): 7610–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002910107>.
- Stokstad, Erik. 2019a. “Banana Fungus Puts Latin America on Alert.” *Science* 365 (6450): 207–8. <https://doi.org/10.1126/science.365.6450.207>.
- . 2019b. “Devastating Banana Disease May Have Reached Latin America, Could Drive up Global Prices.” *Science*, 3–5. <https://doi.org/10.1126/science.aay7681>.
- Sukhanda Mohandas and Kundapura V. Ravishankar. 2016. *Banana : Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement*. Springer Science and Bussines Media Singapore. <https://doi.org/DOI 10.1007/978-981-10-1585-4>.
- Sun, Yadong, Lei Li, Alberto P. Macho, Zhifu Han, Zehan Hu, Cyril Zipfel, Jian Min Zhou, and Jijie Chai. 2013. “Structural Basis for Flg22-Induced Activation of the

- Arabidopsis FLS2-BAK1 Immune Complex.” *Science* 342 (6158): 624–28.  
<https://doi.org/10.1126/science.1243825>.
- Taguchi-Shiobara, F., Z. Yuan, S. Hake, and D. Jackson. 2001. “The Fasciated Ear2 Gene Encodes a Leucine-Rich Repeat Receptor-like Protein That Regulates Shoot Meristem Proliferation in Maize.” *Genes and Development* 15 (20): 2755–66.  
<https://doi.org/10.1101/gad.208501>.
- Takos, Adam M., and Fred Rook. 2012. “Why Biosynthetic Genes for Chemical Defense Compounds Cluster.” *Trends in Plant Science* 17 (7): 383–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.004>.
- Tamura, Koichiro, Glen Stecher, and Sudhir Kumar. 2021. “MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11.” *Molecular Biology and Evolution* 38 (7): 3022–27. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Thomas, Colwyn M., David A. Jones, Martin Parniske, Kate Harrison, Peter Balint-Kurti, Kostas Hatzixanthis, and Jonathan Dallas Jones. 1997. “Characterization of the Tomato Cf-4 Gene for Resistance to *Cladosporium Fulvum* Identifies Sequences That Determine Recognition Specificity in Cf-4 and Cf-9.” *Plant Cell* 9 (12): 2209–24.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.9.12.2209>.
- Trębicki, Piotr, and Kyla Finlay. 2018. “Pests and Diseases under Climate Change; Its Threat to Food Security.” *Food Security and Climate Change*, no. January 2020: 229–49. <https://doi.org/10.1002/9781119180661.ch11>.
- Tripathi, Jaina N., Valentine O. Ntui, Trushar Shah, and Leena Tripathi. 2021. “CRISPR/Cas9-Mediated Editing of DMR6 Orthologue in Banana (*Musa Spp.*) Confers Enhanced Resistance to Bacterial Disease.” *Plant Biotechnology Journal* 19 (7): 1291–93. <https://doi.org/10.1111/pbi.13614>.
- Tripathi, Jaina N., Valentine O Ntui, Mily Ron, Samwel K Muiruri, Anne Britt, and Leena Tripathi. 2019. “CRISPR/Cas9 Editing of Endogenous Banana Streak Virus in the B Genome of *Musa Spp.* Overcomes a Major Challenge in Banana Breeding.” *Communications Biology*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0288-7>.
- Tripathi, Jaina N., Richard O Oduor, and Leena Tripathi. 2015. “A High-Throughput Regeneration and Transformation Platform for Production of Genetically Modified Banana” 6 (November): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01025>.
- Tripathi, Leena, Valentine Otang Ntui, and Jaina Nath Tripathi. 2019. “Application of Genetic Modification and Genome Editing for Developing Climate-Smart Banana.” *Food and Energy Security* 8 (4): 1–16. <https://doi.org/10.1002/fes3.168>.
- Tumuhimbise, Robooni, and David Talengera. 2018. “Improved Propagation Techniques to Enhance the Productivity of Banana (*Musa Spp.*)” *Open Agriculture* 3 (1): 138–45.  
<https://doi.org/10.1515/opag-2018-0014>.
- Viljoen, Altus, Li-Jun Ma, and Augustin B. Molina. 2020. “CHAPTER 8: Fusarium Wilt (Panama Disease) and Monoculture in Banana Production: Resurgence of a Century-Old Disease.” *Emerging Plant Diseases and Global Food Security*, 159–84.  
<https://doi.org/10.1094/9780890546383.008>.
- Voss-Fels, Kai P., Andreas Stahl, and Lee T. Hickey. 2019. “Q&A: Modern Crop Breeding for Future Food Security 07 Agricultural and Veterinary Sciences 0703 Crop and Pasture Production 06 Biological Sciences 0607 Plant Biology 06 Biological Sciences 0604 Genetics.” *BMC Biology* 17 (1): 1–7.
- Wang, Guodong, Ursula Ellendorff, Ben Kemp, John W. Mansfield, Alec Forsyth, Kathy Mitchell, Kubilay Bastas, et al. 2008. “A Genome-Wide Functional Investigation into

- the Roles of Receptor-like Proteins in Arabidopsis.” *Plant Physiology* 147 (2): 503–17. <https://doi.org/10.1104/pp.108.119487>.
- Wang, Jizong, and Jijie Chai. 2020. “Structural Insights into the Plant Immune Receptors PRRs and NLRs.” *Plant Physiology* 182 (4): 1566–81. <https://doi.org/10.1104/PP.19.01252>.
- Wang, Xiaoyi, Renbo Yu, and Jingyang Li. 2021. “Using Genetic Engineering Techniques to Develop Banana Cultivars With Fusarium Wilt Resistance and Ideal Plant Architecture.” *Frontiers in Plant Science* 11 (January). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.617528>.
- Wersch, Solveig van, and Xin Li. 2019. “Stronger When Together: Clustering of Plant NLR Disease Resistance Genes.” *Trends in Plant Science* 24 (8): 688–99. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.05.005>.
- Westerink, Nienke, Bas F. Brandwagt, Pierre J.G.M. De Wit, and Matthieu H.A.J. Joosten. 2004. “Cladosporium Fulvum Circumvents the Second Functional Resistance Gene Homologue at the Cf-4 Locus (Hcr9-4E) by Secretion of a Stable Avr4E Isoform.” *Molecular Microbiology* 54 (2): 533–45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04288.x>.
- Wolfe, K. H., M. Gouy, Y. W. Yang, P. M. Sharp, and W. H. Li. 1989. “Date of the Monocot-Dicot Divergence Estimated from Chloroplast DNA Sequence Data.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (16): 6201–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6201>.
- Wu, Chih-Hang, Derevnina, Linda, Sophien Kamoun. 2018. “Receptor Networks Underpin Plant Immunity.” *Plant Pathology Journal*.
- Wu, Jinbin, Zhijun Liu, Zhao Zhang, Yanting Lv, Nan Yang, Guohua Zhang, Menyao Wu, et al. 2016. “Transcriptional Regulation of Receptor-like Protein Genes by Environmental Stresses and Hormones and Their Overexpression Activities in Arabidopsis Thaliana.” *Journal of Experimental Botany* 67 (11): 3339–51. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw152>.
- Zipfel, Cyril. 2014. “Plant Pattern-Recognition Receptors.” *Trends in Immunology* 35 (7): 345–51. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>.

**ANEXO**

Cuadro suplementario 1. Genes *LRR-RLP* con función conocida en inmunidad de plantas o desarrollo utilizadas en este estudio para la construcción del perfil HMM y el análisis filogenético.

<b>Gene</b>	<b>Número accesión Genbank</b>	<b>Especie</b>	<b>RLP Estructura*</b>	<b>Longitud Proteína (aa)</b>	<b>Localización Subcelular</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
<i>Cf-9</i>	AAA65235	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	SP-LRR-TM	863	Membrana Celular	Inmunidad de Planta	Jones et al. 1994
<i>Cf-2</i>	AAC15779	<i>Solanum</i>	SP-LRR-TM	1112	Membrana	Inmunidad	Dixon et al.

		<i>pimpinellifolium</i>			Celular	de Planta	1996
<i>Cf-4</i>	CAA05268	<i>Solanum</i>	SP-LRR-TM	806	Membrana	Inmunidad	Thomas et al.
		<i>habrochaites</i>			Celular	de Planta	1997
<i>Cf-5</i>	AAC78591	<i>Solanum</i>	SP-LRR-TM	968	Membrana	Inmunidad	Dixon et al.
		<i>lycopersicum</i>			Celular	de Planta	1998
<i>CLV2</i>	AAF02654	<i>Arabidopsis</i>	SP-LRR-TM	720	Membrana	Desarrollo	Jeong et al.
		<i>thaliana</i>			Celular		1999
<i>Fea2</i>	AAL17871	<i>Zea mays</i>	SP-LRR-TM	613	Membrana	Desarrollo	Taguchi-Shiobara
					Celular		2001
<i>Hcr9-4E</i>	CAA05269	<i>Solanum</i>	SP-LRR-TM	855	Membrana	Inmunidad	Westerink et al.
		<i>habrochaites</i>			Celular	de Planta	al. 2004.
<i>EIX2</i>	AAR28378	<i>Solanum</i>	SP-LRR-TM	1021	Membrana	Inmunidad	Ron and Avni
		<i>lycopersicum</i>			Celular	de Planta	2004
<i>HcrVf2</i>	CAC40826	<i>Malus</i>	SP-LRR-TM	980	Membrana	Inmunidad	Belfanti et al.
		<i>floribunda</i>			Celular	de Planta	2004
<i>Vel</i>	ACR33106	<i>Solanum</i>	SP-LRR-TM	1053	Membrana	Inmunidad	Fradin et al.
		<i>lycopersicum</i>			Celular	de Planta	2009
<i>ReMAX</i>	NP_001322	<i>Arabidopsis</i>	SP-LRR-TM	1077	Membrana	Inmunidad	Jehle et al.
	741	<i>thaliana</i>			Celular	de Planta	2013
<i>RFO2</i>	NP_173168	<i>Arabidopsis</i>	LRR-TM	756	Membrana	Inmunidad	Shen and Diener
		<i>thaliana</i>			Celular	de Planta	2013
<i>RLP30</i>	NP_187187	<i>Arabidopsis</i>	SP-LRR-TM	786	Membrana	Inmunidad	Zhang et al.
		<i>thaliana</i>			Celular	de Planta	2013
<i>RBPG1</i>	NP_189138	<i>Arabidopsis</i>	SP-LRR-TM	890	Membrana	Inmunidad	Zhang et al.
		<i>thaliana</i>			Celular	de Planta	2014
<i>ELR</i>	QED40966	<i>Solanum</i>	SP-LRR-TM	1093	Membrana	Inmunidad	Du et al.
		<i>microdontum</i>			Celular	de Planta	2015
<i>RLM2</i>	AJG42078	<i>Brassica napus</i>	SP-LRR-TM	925	Membrana	Inmunidad	Larkan et al.
					Celular	de Planta	2015
<i>CuRel</i>	XP_025888	<i>Solanum</i>	SP-LRR-TM	1121	Membrana	Inmunidad	Hegenauer et al.
	168	<i>lycopersicum</i>			Celular	de Planta	2016
<i>I-7</i>	AKR80573	<i>Solanum</i>	SP-LRR-TM	966	Membrana	Inmunidad	Gonzalez-Cendales et al.
		<i>pennellii</i>			Celular	de Planta	2016
<i>I</i>	Solyc11g01	<i>Solanum</i>	SP-LRR-TM	994	Membrana	Inmunidad	Catanzariti et al.
	1180	<i>pimpinellifolium</i>			Celular	de Planta	al. 2017
<i>RLP23</i>	NP_180827	<i>Arabidopsis</i>	SP-LRR-TM	890	Membrana	Inmunidad	Ono et al.
		<i>thaliana</i>			Celular	de Planta	2020