



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ANÁLISIS FUNCIONAL DE INTERACCIÓN POR
INTERFERENCIA DE GENES DE *Pseudocercospora*
fijiensis

Tesis que presenta

OSVALDO JHOSIMAR COUOH DZUL

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA)

Mérida, Yucatán, México

2023

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

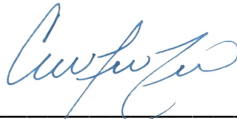


RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Oswaldo Jhosimar Couoh Dzul** titulado “**Análisis funcional de interacción por interferencia de genes de *Pseudocercospora fijiensis*”**, fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de investigación Agrobiotecnología, en el laboratorio de Biotecnología microbiana del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Blondy Beatriz Canto Canché** y el **Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela**, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Esta tesis tiene orientación al desarrollo socioeconómico de la región ya que aborda problemas relacionadas con fitopatógenos fúngicos que afectan a plantas de interés comercial.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 15 de agosto de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación 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 Federal de Protección a 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 se registrarán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: _____

Nombre: Osvaldo Jhosimar Couoh Dzul

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Enfoque agrogenómico en el estudio de la Sigatoka negra” bajo la dirección del Dra. Blondy Canto Canché y el Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela con financiamiento del CONACyT, número 220957.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada durante los cuatro años de doctorado. Número de becario 644399.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. por todas las facilidades que me otorgó como estudiante, incluyendo el uso de sus instalaciones y equipo.

A la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y al Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela por permitirme ser parte de su grupo de investigación y por el apoyo de cada uno en mi formación.

A mi comité tutorial y revisor por sus amables recomendaciones en este trabajo.

Al Dr. Ignacio Islas Flores por su apoyo y recomendaciones para llevar a cabo los experimentos de infección.

Al Dr. Roberto Carlos Vázquez Euan por sus consejos durante los experimentos de PCR en tiempo real.

Al Dr. Hernán Villanueva Alonzo por sus consejos en la utilización y bombardeo del vector viral usado en este trabajo.

Al M. en C. Bartolomé Chi Manzanero (q. e. p. d.) por el apoyo técnico en la infección de *Nicotiana benthamiana*.

A la Q.F.B. Yereni Minero García por el apoyo técnico en todas las pruebas de bombardeo que se llevaron a cabo durante mi doctorado.

Al Dr. César De los Santos por el apoyo técnico en las construcciones de VIGS y en los ensayos de qPCR.

Al M. en C. Miguel Alonso Tzec Simá por su apoyo técnico en la propagación de banano, así como su apoyo en la fotografía de los experimentos de infección.

Al M. en C. José Roberto Kú Cauich por su apoyo para la obtención de plantas de banano

de campo que sirvió de partida para su propagación *in vitro*.

A la M. en C. Angela Kú González por su apoyo en la utilización de estereoscopio de la UBBMP dentro de las instalaciones de CICY.

A la Dra. Karla Gisel Carreón Anguiano por su valiosa amistad, consejos técnicos, por su apoyo en la mayoría de los experimentos de infección y silenciamiento.

A Damián Mayo Ruiz por el apoyo con los ensayos de PCR en tiempo real.

A la M. en C. Nidia Hau Yama y a la M. en C. Adriana Chacón por su valiosa amistad y sus donaciones de semillas y plantas durante los tiempos de crisis.

Al M. en C. Rufino Gómez Tah, a la M. en C. Jewel Nicole Anna Todd, a la Dra. Denise Gutiérrez Esther Gutiérrez Domínguez por su compañerismo y amistad durante los tiempos difíciles.

A mis amigos y compañeros de CICY que de algún modo u otro me apoyaron en esta travesía.

DEDICATORIAS

A mi familia que son todo para mí en este mundo.

PRODUCTOS

Artículo 1

Considerations about interference RNA for the control of fungal diseases in Mexican and Latin American agricultura. Consideraciones sobre el ARN de interferencia para el control de enfermedades fúngicas en cultivos agrícolas en México y América Latina. Couoh-Dzul OJ, Carreón-Anguiano KG, Moreno-Valenzuela OA and Canto-Canché B. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2210-5>

Artículo de divulgación

El ARNi: empleando un mecanismo natural para el control de enfermedades en plantas. Osvaldo Jhosimar Couoh-Dzul, Bartolomé Chi-Manzanero, Oscar A. Moreno-Valenzuela, Blondy Canto-Canché. Memorias Agroevento 2022: Microorganismos en la producción agropecuaria de México. AgroEvento. Año 3, No. 3, septiembre de 2022. Número de Certificado de Reserva de Derechos al uso exclusivo: 04-2022-04141212372100-102. ISSN: 2954-4203.

ÍNDICE

ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	4
ANTECEDENTES	4
1.1 EL BANANO.....	4
1.1.1 ENFERMEDADES Y SU PROBLEMÁTICA	5
1.2 LA SIGATOKA NEGRA.....	6
1.3 <i>PSEUDOCERCOSPORA FIJENSIS</i>	7
1.3.1 CICLO DE VIDA	8
1.3.2 SINTOMATOLOGÍA DE LA SIGATOKA NEGRA.....	10
1.3.3 CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA.....	11
1.4 USO DEL ARNi PARA EL CONTROL DE HONGOS.....	13
1.5 SILENCIAMIENTO GÉNICO EN EUCARIOTAS	15
1.6 TRANSFERENCIA DE ARNs ENTRE REINOS (“CROSSKINGDOM”)	17
1.7 VIGS	18
1.8 VECTOR DE SILENCIAMIENTO BASADO EN EUMV-YP.....	21
1.9 DEFENSA VEGETAL Y USOS DE VIGS EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO.....	21
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25

JUSTIFICACIÓN	25
Hipótesis.....	26
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
CAPÍTULO II.....	29
INFECCIÓN DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> CON <i>PSEUDOCERCOSPORA FIJENSIS</i>	29
2.1 INTRODUCCIÓN.....	29
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	31
2.2.8 SÍNTESIS DE ADNC.....	34
2.3.1 INFECCIÓN DE <i>N. BENTHAMIANA</i> CON <i>P. FIJENSIS</i>	35
2.4 DISCUSIÓN.....	45
CAPÍTULO III.....	51
MODIFICACIÓN DEL VECTOR SILENCIAMIENTO EuMV-YP:ΔV1	51
3.1 INTRODUCCIÓN.....	51
3.2 MATERIALES Y METODOS.....	53
3.2.1 VECTOR DE SILENCIAMIENTO	53
3.2.2 DISEÑO DE CEBADORES	53
3.2.3 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE PFLYS2 Y PFAVR4 EN PGEM®.....	55
3.2.4 SUBCLONACIÓN EN EL VECTOR PEUMV-YP:ΔAV1	55
3.3 RESULTADOS	55
3.3.1 EXTRACCIÓN DE ARN Y AMPLIFICACIÓN DE <i>AVR4</i> Y <i>LYS2</i>	55

3.3.2	SUBCLONACIÓN EN PEUMV-YP:ΔAV1	58
3.4	DISCUSIÓN.....	61
CAPÍTULO IV		62
ANALISIS FUNCIONAL EN BANANO: EVALUACIÓN DEL SISTEMA VIGS BASADO EN EL EUMV-YP.....		62
4.1	INTRODUCCIÓN.....	62
4.2.1	DISEÑO DE CEBADORES	63
4.2.2	AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE MAPDS.....	63
4.2.3	BOMBARDEO	63
4.3	RESULTADOS	64
4.3.1	BOMBARDEO DE BANANO Y <i>N. BENTHAMIANA</i> CON EUMV-YP	65
4.4	DISCUSIÓN.....	68
CAPITULO V		71
5.1	DISCUSIÓN GENERAL	71
5.2	PERSPECTIVAS.....	76
Bibliografía.....		77

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Planta de banano. Tomado de https://www.promusa.org/Morfolog%C3%ADa+de+la+planta+del+banano	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>P. fijiensis</i> . Modificado de Churchill 2011.....	10
Figura 3. Mecanismo de ARN de interferencia en eucariotas. Inicia con el reconocimiento de dsRNA o hairpin RNA por DCL generando sRNA que posteriormente son unidos a la proteína AGO para dar lugar a la formación de RISC. Los sRNA son usados como guías para dar lugar al silenciamiento transcripcional o post transcripcional. En hongos el sistema de silenciamiento regula procesos de desarrollo, defensa y patogenicidad tanto a nivel transcripcional como post transcripcional.....	17
Figura 4. Esquema de la estrategia experimental utilizada en este estudio. El objetivo principal es establecer un sistema de interacción entre <i>N. benthamiana</i> - <i>P. fijiensis</i> , para que eventualmente sea un modelo de estudio de interacción para <i>P. fijiensis</i>	26
Figura 5. Proceso de interacción de <i>N. benthamiana</i> con <i>P. fijiensis</i> durante 35 días. Las hojas fueron infectadas con tres diferentes concentraciones de fragmentos de micelio por ml ($Fm\ ml^{-1}$). Los inóculos fueron de 4×10^4 , 8×10^4 y $12 \times 10^4\ Fm\ ml^{-1}$ en donde la concentración 0 corresponde al control sin fragmentos del hongo. Los puntos negros que se observan en los tratamientos testigo, corresponden a la tinta de marcador indeleble que delimita los límites del área foliar inoculada o no inoculada, con los fragmentos de <i>P. fijiensis</i>	37
Figura 6. Síntomas desarrollados en las hojas de <i>N. benthamiana</i> a los 35 días de interacción con <i>P. fijiensis</i> . Inoculaciones con concentraciones de 12×10^4 y 8×10^4 fragmentos de micelio respectivamente. Fotos tomados en el estereoscopio.	38
Figura 7. Análisis microscópico del comportamiento de <i>P. fijiensis</i> a los 35 días de interacción con las hojas de <i>N. benthamiana</i> . Muestras de plantas control (a) y con inóculos de 12×10^4 fragmentos de micelio (b, c y d) colectadas a 35 dpi. Vistas bajo el microscopio 40X. st, estoma; m, micelio.....	39

Figura 8. Muestras de plantas tratadas con 8×10^4 (a y b) y 4×10^4 fragmentos de micelio (c y d) colectadas a 35 días. Vistas al microscopio 40X. st, estoma; m, micelio.....	40
Figura 9. Comportamiento de la biomasa endógena de <i>P. fijiensis</i> durante el proceso de infección en <i>N. benthamiana</i> . El micelio epifílico fue eliminado lavando el tejido previamente a su extracción.....	41
Figura 10. Expresión relativa de PfLys2 de <i>P. fijiensis</i> a los 35 días de interacción con <i>N. benthamiana</i>	42
Figura 11. Expresión relativa del gen Avr4 de <i>P. fijiensis</i> durante la interacción con <i>N. benthamiana</i> . La gráfica es representativa de dos replicas biológicas con tres réplicas técnicas para cada día analizado. En la reacción se utilizó 100 ng de ADNc como templado. Usando como control el gen de β -tubulina de <i>P. fijiensis</i>	43
Figura 12. Expresión relativa de Ecp6 de <i>P. fijiensis</i> durante la interacción con <i>N. benthamiana</i> . La gráfica es representativa de dos replicas biológicas con tres réplicas técnicas para cada día analizado. En la reacción se utilizó 100 ng de ADNc como templado. Usando como control el gen de β -tubulina de <i>P. fijiensis</i>	43
Figura 13. Expresión relativa de PTI5 en <i>N. benthamiana</i> durante la infección con <i>P. fijiensis</i>	44
Figura 14. Expresión relativa de Acre en <i>N. benthamiana</i> durante la infección con <i>P. fijiensis</i>	45
Figura 15. Expresión relativa de PR1 en <i>N. benthamiana</i> durante la infección con <i>P. fijiensis</i>	45
Figura 16. Extracción de ARN y amplificación por PCR de <i>Lys2</i> y <i>Avr4</i> . a) Extracción de RNA de micelio de <i>P. fijiensis</i> ; se observan los ARNr 28S y 18S. b) Amplificación por PCR de <i>Lys2</i> y <i>Avr4</i> con cebadores conteniendo los adaptadores. Carriles 1 y 2 amplificación de <i>Lys2</i> en sentido y antisentido usando ADNc, carriles 3 y 4 amplificación de <i>Avr4</i> en sentido y antisentido usando ADNc, 5 y 6 amplificación de <i>Lys2</i> y <i>avr4</i> como testigo positivo usando ADNg, carril 7 agua como testigo negativo.....	56

Figura 17. PCR en colonia para confirmar la clonación de los fragmentos en sentido y antisentido de *Lys2* y *Avr4* en pGEM®-T Easy. Panel superior carriles 1 y 2 de *Lys2* en *sentido*, carriles 1-10 de *Lys2* en *antisentido*, último carril control positivo usando ADNg. Panel inferior, primer carril de *Avr4* en *sentido*, carriles 1-7 *Avr4* en *antisentido*, último carril control positivo usando ADNg. Ambos amplicones fueron de 345 pb. 57

Figura 18. Secuencia de nucleótidos *Lys2* ID 253 (clona 2). En rojo secuencia consenso. Los nucleótidos en azul corresponden a las secuencias de los adaptadores añadidos *SphI* y *EcoRV*, respectivamente..... 58

Figura 19. Clonación en antisentido del fragmento *PfLys2* en pEuMV-YP:ΔAVI. a) Carriles 1-7, ADN plasmídico recuperado de 7 colonias obtenidas en el proceso de transformación con pEuMV-YP:aLys2. b) Confirmación por PCR de cinco clonas que contenían el inserto de *Lys2* (carriles 1-5); carril 6, testigo positivo; carril 7 ADN plasmídico de la colonia 8. c) Esquema de obtención de pEuMV-YP:aLys2 a partir de pGEM:aLys2. 60

Figura 20. a) Confirmación de la construcción de pEuMV-YP:aLys2. El carril 1 muestra la liberación del inserto de 356 pb (incluyendo etiquetas) por doble digestión con *SphI* y *PstI*. Carril 2, digestión con *PstI*. Carril 3, plásmido no digerido. b) Digestión de pEuMV-YP:aLys2 y de pGEM:aAvr4 con *PstI* y *SphI*. Carril 1, liberación del fragmento aLys2 y linearización de pEuMV-YP:ΔV1. Carril 2, liberación de aAvr4. Base para la construcción de pEuMV-YP:aAvr4 a partir de pEuMV-YP:aLys2 como chasis. 60

Figura 21. Confirmación por PCR de la clonación de *Lys2* y *Avr4* en pEuMV-YP:ΔV1. Carril 1 y 2, fragmentos de *Lys2* en sentido y antisentido; carril 3 y 4, fragmento de *Avr4* en sentido y antisentido; MM, marcador molecular..... 61

Figura 23. Clonación de un fragmento en antisentido del gen de *MaPDS* en pEuMV-YP:ΔAVI. Carriles 1-4, clonas obtenidas en el proceso de transformación; Carril 6, clona positiva, con el inserto de PDS; Carril 7, testigo negativo. 64

Figura 24. Digestión de EuMV-YP:MaPDS. Carril 1, fragmento de MaPDS liberado con *SphI* y *PstI*; carril 2, EuMV-YP:MaPDS digerido con *EcoRV*; carril 3, EuMV-YP:MaPDS sin digerir. Gel de agarosa 1%. 65

Figura 25. Plantas de banano y *N. benthamiana* bombardeadas con EuMV-YP, y fotografiadas a los 14 y 21 dpi. Las plantas de *N. benthamiana* mostraron los síntomas característicos desde el día 14, mientras que banano no presentó ningún síntoma fenotípico por la infección por el virus. 66

Figura 26. Detección por PCR de la presencia de EuMV-YP en plantas bombardeadas de *Musa acuminata* y *Nicotiana benthamiana*. Carriles 2-4, plantas de banano bombardeadas; 5 planta de *N. benthamiana* bombardeada; 6 control positivo de la PCR usando genoma A de EuMV-YP como templado; 7 control negativo usando ADNg de banano sin infectar; 8 control negativo usando agua. El gel de la izquierda corresponde a las plantas 14 dpi; el gel de la derecha a las plantas con 21 dpi. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1%; la región amplificada corresponde al “core” del virus. 67

Figura 27. Plantas de banano (*Musa acuminata*) bombardeadas con EuMV-YP:AV1 (vector vacío) y EuMV-YP:PDS (VIGS:PDS) fotografiadas a los 14 y 23 dpi. Ninguna de las plantas bombardeadas con VIGS:PDS mostró síntoma de blanqueamiento. No se observaron diferencias respecto a las plantas control (VIGS vacío). 68

LISTADO DE CUADROS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *P. fijiensis*.....8

Tabla 2 Cebadores usados para amplificación y clonación de *Lys2* y *Avr4* para los constructos de silenciamiento en pEuMV-YP: Δ AV1.....29

ABREVIATURAS

ACMV	African cassava mosaic virus
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	ARN de doble cadena
ARNi	ARN de interferencia
BBrMV	Banana bract mosaic virus
BBTV	Banana bunchy top virus
BSV	Banana streak viruses
CaLCuV	Cabbage leaf curl virus
CLCrV	Cotton leaf crumple virus
CMV	Cucumber mosaic virus
dpb	días post bombardeo
dpi	días post infección
EuMV-YP	Euphorbia mosaic virus-Yucatan peninsula
Fm	Fragmentos de micelio
Foc1	Fusarium oxysporum cubense raza 1
HIGS	Host-induced gene silencig
miARN	micro ARN
PDS	Fitoeno desaturasa
PVX	Potato virus X
RC	Región común
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
siARN	ARN interferentes pequeños
SMC	Sitio múltiple de clonación
SN	Sigatoka negra
TGMV	Tomato golden mosaic virus
TMV	Tobacco mosaic virus
TRV	Tobacco rattle virus
TYLCCNV	Tomato yellow leaf curl china virus
VIGS	Virus-induced gene silencing

RESUMEN

La Sigatoka negra (SN), enfermedad causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis* se describe como la enfermedad foliar más devastadora y costosa para los cultivos de banano. A pesar de que mucho se le ha estudiado, hay muy pocos trabajos de análisis funcional de los genes del patógeno debido a las dificultades que implica su manejo en el laboratorio, así como el manejo del patosistema banano-*P. fijiensis*, por lo que realizar estudios en este patosistema puede implicar demoras de tiempo en el rango de al menos un año. Lo anterior, sin mencionar las complicaciones que pueden darse durante el periodo. En este trabajo se evaluó un sistema artificial de interacción entre *Nicotiana benthamiana* y *Pseudocercospora fijiensis* con el objetivo de analizar la posibilidad de que dicho sistema pueda servir como herramienta para estudios más rápidos que los que toma en el sistema de interacción natural. Para ello se analizó la expresión de genes involucrados en el metabolismo y en la virulencia del hongo, como es el caso de Lys2, Avr4 y Ecp6, en donde sus expresiones se observan a partir del día 28 y más fuertemente en el día 35 de la infección. En ese sentido también se evaluaron genes PR1, Acre31 y PTI5 de la planta, relacionados al sistema de defensa vegetal tipo PTI; éstos estuvieron expresados en el proceso de infección, evidenciando la respuesta de la planta a la infección con *P. fijiensis*. En este trabajo se planteó evaluar el silenciamiento *in planta* de genes de *P. fijiensis* por lo que se diseñaron constructos de silenciamiento dirigidos hacia los genes Lys2 y Avr4. Se consiguió su clonación en el vector EuMV-YP, pero ya no fue posible evaluarlos. El silenciamiento por ARN de interferencia es una herramienta que puede ser usada para el análisis funcional a mediana o alta escala, y que tiene el potencial para ser usado de manera práctica para el control de hongos patógenos, por lo que será útil probar post-tesis los constructos. Interesantemente, en este mismo trabajo se demostró que EuMV-YP puede replicarse y moverse de manera transitoria en banano.

ABSTRACT

Black Sigatoka (BS), a disease caused by the fungus *Pseudocercospora fijiensis*, is described as the most devastating and costly foliar disease for banana cultivars. Although much has been studied about it, there are very few works on the functional analysis of the genes of the pathogen due to the difficulties involved in its management in the laboratory, as well as the management of the banana-*P. fijiensis* pathosystem, so carrying out studies in this pathosystem may imply time delays in the range of at least one year. Not to mention the complications that can occur during your period. In this work, an artificial interaction system between *Nicotiana benthamiana* and *Pseudocercospora fijiensis* was evaluated to analyze the possibility that said system could serve as a tool for faster studies than those taken in the natural interaction system. For this, the expression of genes involved in the metabolism and virulence of the fungus was analyzed, as is the case of Lys2, Avr4, and Ecp6, where their expressions are observed from day 28 and more strongly on day 35 of the infection. In this sense, PR1, Acre31, and PTI5 genes of the plant were also evaluated, related to the PTI-type plant defense system; these were expressed in the infection process, evidencing the response of the plant to the infection with *P. fijiensis*. In this work, it was proposed to evaluate the in-planta silencing of *P. fijiensis* genes, for which silencing constructs directed towards the Lys2 and Avr4 genes were designed. Their cloning in the EuMV-YP vector was achieved, but it was no longer possible to evaluate them. RNA interference silencing is a tool that can be used for functional analysis on a medium or high scale, and that has the potential to be used practically for the control of fungal pathogens, so it will be useful to test post-thesis. the constructs. Interestingly, in this same work, it was shown that EuMV-YP can replicate and move transiently in banana.

INTRODUCCIÓN

El banano se encuentra entre los cultivos alimenticios económicamente más importantes del mundo, después del arroz, trigo y maíz. Es cultivado en más de 130 países y es la mayor fuente de ingresos como de carbohidratos para millones de agricultores en las regiones tropicales del mundo (Churchill, 2011).

Los cultivares de banano son susceptibles a una gama de enfermedades bastante graves y debilitantes que son una constante preocupación para los agricultores, sobre todo de los dedicados a la industria de exportación. Las enfermedades causadas por hongos y virus son las más importantes desde el punto de vista económico. Sin embargo, la Sigatoka negra (SN), una enfermedad causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*, se describe como la enfermedad foliar más devastadora y costosa para los cultivares de banano, con pérdidas económicas y productivas hasta de 80 al 100%. Dicha enfermedad no mata a las plantas inmediatamente, sino que las debilita, reduce la capacidad fotosintética de las hojas causando una reducción en la calidad y cantidad del fruto; así como también la inducción prematura de la maduración de los frutos (Churchill, 2011; Bellaire *et al.*, 2010).

El control de la SN se basa principalmente en el uso de fungicidas químicos y prácticas culturales (Marín *et al.*, 2003). Pero también existen otros métodos de control, por ejemplo, el control biológico que usa otros microorganismos antagónicos, y el control biotecnológico, que aprovecha las tecnologías recombinantes del ADN para el mejoramiento genético del banano contra muchas de las enfermedades que lo atacan. En ese mismo sentido, en los últimos años se ha propuesto el uso de tecnologías para el control de hongos patógenos basados en el silenciamiento por ARN de interferencia (ARNi), un mecanismo altamente conservado en la mayoría de las células eucariotas (Qi *et al.*, 2019; Zotti *et al.*, 2018). Esta tecnología basada en ARNi, tiene como base el transporte de pequeños ARNi que se trasladan entre las células de organismos en interacción, ya sea en simbiosis, parasitismo o en patogenicidad (Weiberg *et al.*, 2015).

La comunicación célula-célula puede llevarse a cabo entre especies no relacionadas de diferentes reinos. Se tiene evidencia que pequeños ARNs pueden ser transportados de un organismo a otro para suprimir la expresión de los genes del patógeno o del hospedero (Cai *et al.*, 2018). Por lo tanto, los patógenos pueden usar este mecanismo para atacar o inhibir

el sistema de defensa de la planta. A su vez, las plantas pueden usar este mismo mecanismo para contrarrestar la virulencia de un patógeno que la ataca.

El uso de silenciadores génicos inducidos por virus es una herramienta muy importante que puede ser aprovechada para el control de plagas y patógenos que atacan a cultivos económicamente importantes. Aprovechando el mecanismo de interferencia de ARN es posible silenciar genes que ayudan a la infección en un organismo patógeno. Uno de los patógenos más agresivos es *P. fijiensis* que causa importantes pérdidas en el cultivo de banano. En este trabajo se planteó evaluar la capacidad de esta estrategia de control para contrarrestar a este patógeno, utilizando a *N. benthamiana* como planta modelo. El desarrollo de esta tesis enfrentó diversos problemas durante la pandemia de SARS-CoV-2 (COVID-19); entre las consecuencias más importantes estuvo que el tiempo de trabajo se afectó significativamente. Sin embargo, se logró la infección de la planta no hospedera *N. benthamiana* con *P. fijiensis* y también el diseño y generación de los constructos en el virus EuMV-YP para el silenciamiento de los genes PfLys2 y PfAvr4, pero quedó pendiente por evaluar el silenciamiento de estos genes de *P. fijiensis*. Paralelamente se realizaron ensayos de bombardeo de EuMV-YP en banano y se encontró que, aunque de manera temporal, es capaz de replicarse y moverse en la planta de banano.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 El banano

El banano (Figura 1) es una gran planta herbácea perenne (D' Hont *et al.*, 2012), monocotiledónea, perteneciente al género *Musa* y de la familia de las Musaceae (Tripathi *et al.*, 2016). De esta planta se pueden distinguir tres partes fundamentales: el cormo con hijuelos y el sistema radical, el pseudotallo con el sistema foliar y el racimo o inflorescencia (Manzo-Sánchez *et al.*, 2005).

Se encuentra entre los cultivos alimenticios económicamente más importantes del mundo después del arroz, trigo y maíz (Churchill, 2011) y es la segunda fruta con mayor producción después de los cítricos (Mohapatra *et al.*, 2010), con más de 100 millones de toneladas producidas anualmente (Churchill, 2011). Es cultivada en más de 130 países y es la mayor fuente de ingresos y de carbohidratos para millones de agricultores en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Tripathi *et al.*, 2016). Aunque la mayoría de la producción es consumida localmente, las exportaciones de este fruto representan un negocio multimillonario (Friesen, 2016). India es el principal país productor de banano mientras que Ecuador es el principal exportador, con una venta aproximada de un tercio de la producción global (Churchill, 2011).



Figura 1. Planta de banano. Tomado de <https://www.promusa.org/Morfolog%C3%ADa+de+la+planta+del+banano>.

El fruto del banano es altamente nutritivo y de mucha más fácil digestión que muchas otras frutas. Es rico en carbohidratos, antioxidantes, vitaminas y una buena fuente de minerales especialmente de potasio y hierro. La cáscara es rica en vitaminas, azúcares, pectina y lignina, puede ser usada como alimento para ganado, material base para la producción de etanol, producción de biogás y ser usado para la extracción de pectina (Mohapatra *et al.*, 2010).

El proceso de domesticación de *Musa* comenzó hace aproximadamente 7,000 años en el sudeste de Asia, un proceso que implicó hibridaciones entre diferentes especies y subespecies, fomentadas por las migraciones humanas y la selección de híbridos partenocárpicos diploides y triploides, posteriormente fueron dispersados ampliamente por la propagación vegetativa (D' Hont *et al.*, 2012). Actualmente, la mayoría de los cultivares de banano son estériles, triploides partenocárpicos, derivados de dos especies, *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B) (Tripathi *et al.*, 2016), los cuales son propagados clonalmente y crecidos en enormes monocultivos de individuos genéticamente idénticos. Hoy en día el comercio internacional de banano está basado únicamente en unos pocos clones relacionados del tipo Cavendish, todos los cuales son altamente susceptibles a diferentes patógenos (Arango-Isaza *et al.*, 2016).

1.1.1 Enfermedades y su problemática

Los cultivares de banano son susceptibles a una gama de enfermedades que son una constante preocupación para los agricultores dedicados a la industria de exportación (Marín *et al.*, 2003). La producción de estos cultivares en muchos casos es mermada por diferentes enfermedades causadas por hongos, virus, bacterias, insectos y nematodos, siendo las enfermedades causadas por hongos y virus las más peligrosas.

Un ejemplo de ello es la enfermedad llamada mal de Panamá, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 (Foc 1). En el siglo anterior, esta enfermedad hizo desaparecer gigantescas extensiones de cultivos de la variedad Gros Michel, que era la principal variedad de banano exportado en esa época. En respuesta a ello, la industria bananera tuvo que reemplazarlo por la variedad Cavendish, más resistente a Foc 1. Actualmente la variedad Cavendish sigue siendo la más consumida, sin embargo, es susceptible a las nuevas cepas emergentes de Foc, como la raza tropical 4 (Butler, 2013).

En cuanto a las enfermedades virales bananeras, también se consideran una preocupación importante para la producción, debido a sus efectos sobre el rendimiento y la calidad, así como a las limitaciones de multiplicación y al intercambio internacional de germoplasma. Existen alrededor de 20 diferentes tipos de virus reportados en todo el mundo que infectan al banano. Sin embargo, los virus económicamente importantes son el *Banana bunchy top virus* (BBTV), *Banana streak viruses* (BSV), *Banana bract mosaic virus* (BBrMV) y *Cucumber mosaic virus* (CMV). Entre éstos, el BBTV y el BSV son las mayores amenazas para la producción de banano (Tripathi *et al.*, 2016).

Las enfermedades causadas por bacterias también son importantes, y causan impactos significativos en la producción de banano a nivel mundial y las prácticas adecuadas de manejo no son siempre conocidas o adoptadas por los agricultores (Blomme *et al.*, 2017).

Sin embargo, la Sigatoka negra, una enfermedad causada por un hongo, ha sido descrita como la enfermedad foliar más devastadora y costosa para los cultivares de banano en la actualidad (Arango Isaza *et al.*, 2016; Churchill, 2011; Marín *et al.*, 2003), con pérdidas productivas bastante elevadas (de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2010).

1.2 La Sigatoka negra

La Sigatoka negra (SN) o enfermedad de la raya negra de la hoja (BLSD, por sus siglas en inglés) es causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*. Este hongo es parte de un complejo mayor de la enfermedad de Sigatoka, que incluye además a *Pseudocercospora musae* causante de la Sigatoka amarilla y *Pseudocercospora eumusae* causante de la mancha foliar eumusae. Estas tres especies surgieron de un ancestro en común reciente y muestran claras diferencias en cuanto a su virulencia, donde *P. eumusae* y *P. fijiensis* son las más virulentas (Chang *et al.*, 2016). *P. fijiensis* fue identificado y descrito por primera vez en las islas Fiji en 1963, pero se cree que ha estado distribuido en el Pacífico desde mucho antes (Churchill, 2011; Marín *et al.*, 2003). En México su aparición fue en el estado de Chiapas en 1980, desde entonces la enfermedad se propagó rápidamente en todos los estados productores del país (Aguilar-Barragan *et al.*, 2014).

La SN no mata a las plantas inmediatamente sino que las debilita, reduce la capacidad fotosintética de las hojas causando una reducción también en la calidad y cantidad del fruto e induce una maduración prematura del fruto cosechado de plantas infectadas (Churchill,

2011). Se estima que, en ausencia de fungicidas, las pérdidas por esta enfermedad pueden llegar hasta un 80% o 100%, por lo que su control es clave. Sin embargo, el control químico en los cultivares Cavendish se ubica entre los primeros insumos globales de fungicidas agrícolas, con más de 500 millones de dólares en gastos al año. Se estima que más del 30% de la producción de banano requiere de control químico para *P. fijiensis*. A medida que se han estado incrementando la superficie de cultivos y la producción de bananos, también aumentaron los fungicidas y con ello la resistencia del patógeno (Churchill, 2011). Un estimado durante el 2010 menciona que los productores mexicanos de banano gastaron más de 55 millones de dólares en la compra de fungicidas, con un costo aproximado de 1100 dólares por hectárea (Aguilar-Barragan *et al.*, 2014).

1.3 *Pseudocercospora fijiensis*

Este hongo es el miembro más agresivo y predominante del complejo de la enfermedad de Sigatoka (Arango Isaza *et al.*, 2016). *P. fijiensis* es un hongo ascomiceto que pertenece a la clase de los Dothideomicetos (Tabla 1), orden de los Capnodiales y familia de las Mycosphaellaceae (Chang *et al.*, 2016). Es un organismo haploide, heterotálico, con reproducción tanto sexual como asexual. La fase sexual se caracteriza por la formación de ascosporas, mientras que en la asexual tiene lugar la formación de conidios. Tiene un comportamiento hemibiotrófico y crecimiento filamentosos (Arango-Isaza *et al.*, 2016).

Los conidios o ascosporas germinan formando micelio, que inicialmente crece en forma epífita sobre la superficie de la hoja hasta penetrar a través de las estomas al interior de la hoja. En su fase biotrófica el hongo coloniza los espacios intercelulares de la hoja, en la cual establece una relación de nutrición aparentemente no perjudicial para la planta. Después de un periodo de tiempo que es variable, el hongo cambia a la fase necrotrófica, matando a las células de forma agresiva y formando lesiones necróticas en la hoja (Noar y Daub, 2016). *P. fijiensis* tiene un alto grado de diversidad genética, ocasionada por su reproducción sexual y ciclo de vida cortos, que ocasiona numerosas generaciones por año y un elevado índice de recombinación genética (Manzo-Sánchez *et al.*, 2005).

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *P. fijiensis*

Reino	Fungi
División	Ascomicota
Clase	Dothideomiceto
Orden	Capnodiales
Familia	Mycospharellaceae
Genero	<i>Pseudocercospora</i>
Especie	<i>Pseudocercospora fijiensis</i>

1.3.1 Ciclo de vida

Las ascosporas y conidios de *P. fijiensis* son las principales fuentes de infección y son desplazados a través del viento, por la lluvia y el rocío de agua (Churchill, 2011; Marín *et al.*, 2003). Las ascosporas y conidios germinan en la hoja (Figura 2), seguido por un crecimiento epifílico de los tubos germinativos, los cuales entran en la hoja a través del estoma para después proliferar en el espacio intercelular de la hoja (Meredith y Lawrence, 1969). El patógeno establece una relación biotrófica de tiempo variable, frecuentemente de 3 a 4 semanas después de la penetración por el estoma, antes de la aparición de síntomas necróticos (Hoss *et al.*, 2000). El desarrollo de la enfermedad es favorecido cuando existe alta humedad y altas precipitaciones, mientras que las temperaturas menores de 20°C y periodos secos inhiben el crecimiento del hongo y retardan el cambio de fase (Manzo Sánchez *et al.*, 2005).

El estado sexual se caracteriza por la formación de peritecios, espermagonios y ascosporas. El peritecio y espermagonio ocurren en proporciones variables durante los estadios 2 y 3 de desarrollo de los síntomas. Los espermagonios son más abundantes en el envés de la hoja y frecuentemente se desarrollan en la cámara subestomática; constituyen la parte masculina y en estado maduro contienen la espermátida en forma de bastoncillos o varillas hialinas que actúan como gametos que fertilizan a los peritecios que

aparecen en los estados 5 y 6 de la enfermedad (Meredith y Lawrence, 1969). Los peritecios son estructuras anfígenas, globosas, con un ostiolo esférico papilado, de paredes pardo-oscuro y células poligonales, ligeramente hundidos en el tejido de la hoja. Se presentan más frecuentemente en el envés de las hojas y en su estado maduro contienen numerosas ascas bitunicadas que contienen ocho ascosporas cada una, como resultado del proceso sexual (Meredith y Lawrence, 1969). Las ascosporas son hialinas, fusiformes, biseriadas, septadas con una constricción leve al nivel del septo y clavadas en el asca con la parte más grande o prominente de la célula; germinan en ambos lados de la superficie de las hojas y penetran al tejido del hospedero a través de los estomas. Las ascosporas son la fuente principal de inóculo de enfermedad a distancia, puesto que son diseminadas por el viento y depositadas principalmente en la hoja "cigarro" y en las cuatro hojas más jóvenes de la planta (Manzo Sánchez *et al.*, 2005). Sin embargo, la diseminación es limitada a unos pocos kilómetros debido a su susceptibilidad a la radiación ultravioleta (Marín *et al.*, 2003). Cuando las hojas densamente infectadas se cortan y se colocan en el suelo, liberan las ascosporas durante dos a cuatro semanas más (Marín *et al.*, 2003).

El estado asexual es reconocido porque los conidios son hialinos, obclavados a cilíndricos, rectos o ligeramente curvos, con 6 a 9 septos, delgados en el ápice y más anchos en la base, con una cicatriz en el hilum basal (punto de unión entre el conidio y el conidióforo) (Meredith y Lawrence, 1969). Los conidióforos pueden emerger directamente por el estoma de manera individual o en grupos, o bien pueden formarse a partir de células del estroma de color oscuro y son fácilmente vistos en el estado 2 de la enfermedad. De un solo conidióforo pueden formarse cuatro conidios maduros (Meredith y Lawrence, 1969)

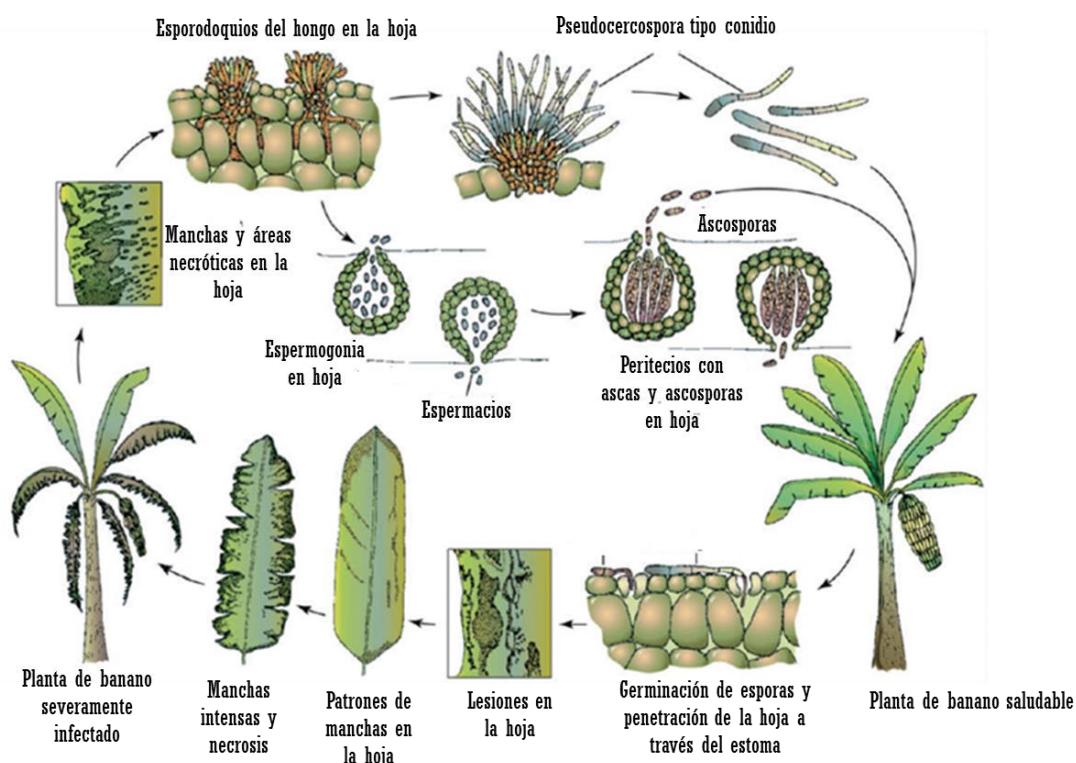


Figura 2. Ciclo de vida de *P. fijiensis*. Modificado de Churchill 2011.

1.3.2 Sintomatología de la Sigatoka negra

De acuerdo con Fouré (1985) y Meredith y Lawrence (1969), se han identificado seis estados de evolución de los síntomas de la enfermedad en banano: uno de punto, dos de raya y tres de mancha. 1) Estado de punto inicial: aparición de puntos pequeños de color amarillo pálido de 0.25 mm de diámetro, visibles en el envés de la hoja; 2) primer estado de estría: formación de estrías de color castaño de 1 mm de ancho por 2 mm de largo, visibles en el haz y paralelas a las venas laterales de la hoja; 3) segundo estado de estría: alargamiento de las estrías hasta alcanzar 20-25 mm de longitud y 2 mm de ancho, las cuales toman una coloración marrón oscuro y son visibles en el envés como rayas amarillas; 4) primer estado de mancha: ensanchamiento de las estrías que se tornan color marrón oscuro y son rodeadas por una zona amarilla pálida; puede considerarse el primer estado de mancha; 5) segundo estado de mancha: inicio del colapso del centro de color negro de la mancha y formación de un halo amarillo ligero en el tejido de la hoja que rodea el borde acuoso de la mancha; 6) tercer estado de mancha: el centro de la mancha se seca, adquiere un color gris claro y además se torna hundido o comprimido. La mancha es rodeada por un

borde estrecho bien definido, color pardo oscuro o negro. Entre este borde y el color verde normal de la hoja, hay frecuentemente una zona de transición amarillo brillante.

1.3.3 Control de la Sigatoka negra

El control de la SN se basa principalmente en el uso continuo de fungicidas y prácticas culturales (Orozco-Santos *et al.*, 2008). El control químico se logra alternando fungicidas de protección (mancozeb o clorotalonil), con fungicidas sistémicos que pertenecen al grupo de los bencimidazoles, triazoles, morfolinas y estrobilurinas (QoI) (Marín *et al.*, 2003).

Estos fungicidas son aplicados con aceite o emulsiones de agua con aceite, siendo el aceite de petróleo el más usado en las mezclas (Ploetz *et al.*, 2003). El uso de mezclas de fungicidas de protección con los sistémicos son parte de una estrategia para retrasar y manejar la resistencia a los fungicidas. El aceite mismo es un fungistático, porque retrasa el desarrollo del patógeno en la hoja (Ploetz *et al.*, 2003). El aceite en emulsión con agua y en combinación con los fungicidas sistémicos incrementa la penetración en la hoja y un mejor control de la enfermedad (Marín *et al.*, 2003; Ploetz *et al.*, 2003). Sin embargo, la acumulación de aceite en las hojas interfiere con el intercambio gaseoso y por lo tanto con la fotosíntesis (Israeli *et al.*, 1993).

El fungicida de protección mancozeb está disponible en formulaciones de uso solo con agua o en mezclas con agua y aceite. El Clorotalonil, sin embargo, es aplicado solo en agua porque es fitotóxico en presencia de aceite.

Los fungicidas sistémicos usados en el control de la SN dan un mejor control que los fungicidas de protección, porque penetran en la cutícula de la hoja e inhiben al patógeno dentro de la hoja. Por otra parte, los fungicidas de protección tienen que ser depositados en la superficie de la hoja antes de la infección, donde actúan inhibiendo la germinación de la espora y la penetración del patógeno en las hojas. Por lo tanto, debido a que la mayoría de las infecciones ocurren en la superficie inferior durante el despliegue de las nuevas hojas, la efectividad de los fungicidas protectores depende de qué tan bien el sistema de rociado cubra la superficie inferior de las hojas durante el despliegue y del intervalo entre aplicaciones (Marín *et al.*, 2003).

Por otra parte, el control químico y su uso prolongado trae consigo pérdida de la sensibilidad

del hongo a los fungicidas (Ploetz *et al.*, 2003). Además, incrementa el grado de la contaminación ambiental y el deterioro de la salud humana (Manzo-Sánchez *et al.*, 2005).

Las practicas agronómicas tienen un papel importante en el manejo de las plantaciones, ya que permiten proporcionarle las condiciones favorables para el desarrollo de las plantas y evitar un ambiente microclimático propicio para la enfermedad (Orozco-Santos *et al.*, 2008). La práctica más importante para reducir la fuente de inóculo es la remoción de las hojas afectadas o porciones de éstas. El tejido removido se deposita en el suelo y es factible la aplicación de urea para acelerar su descomposición. Adicionalmente, otros componentes del manejo agronómico del cultivo ayudan a reducir las condiciones favorables (humedad) para el desarrollo de la SN e incrementar el vigor de las plantas: manejo de la densidad de población, deshierbe, sistemas de drenaje, métodos de riego, control de malezas, fertilización química, fertilización biológica, control de plagas y nematodos (Orozco-Santos *et al.*, 2008).

El control biológico mediante el uso de microorganismos antagónicos naturales se ha convertido en una alternativa prometedora (Cawoy *et al.*, 2011), como es el caso del género *Bacillus* spp., que ha tenido buenos resultados para el control de patógenos (Gutiérrez-Monsalve *et al.*, 2015). Este género bacteriano usa tres principales mecanismos involucrados en el control biológico de las enfermedades de plantas: competencia por el nicho ecológico y sustrato en la rizósfera, producción de metabolitos inhibitorios y la inducción de la resistencia sistémica en las plantas hospedadas (Cawoy *et al.*, 2011). Hace algunos años se demostró con éxito la habilidad de un fungicida biológico a base de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 y sus metabolitos para el control de la SN de banano (Gutiérrez-Monsalve *et al.*, 2015). Otro ejemplo es el caso del *Trichoderma harzianum* que tiene varios modos de acción en el control biológico de hongos biótrofos y necrotróficos, como por ejemplo, la competencia por nutrientes, por la restricción de las enzimas patógenas y la inducción de la resistencia de plantas (Elad, 2000). *T. harzianum* ha sido un buen agente de control biológico contra la SN en experimentos *in vitro* y de invernadero (Arzate-Vega *et al.*, 2006), y tiene potencial para su uso en condiciones de campo (Cavero *et al.*, 2015). También se ha probado el uso *in vitro* de *Pseudomonas* spp., pero con dificultades para ser establecidas en el ambiente superficial de la hoja (Marín *et al.*, 2003).

Existen varios híbridos que se han desarrollado en algunos centros de investigación, como son los obtenidos por la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA), el

Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) en Nigeria y el Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el desarrollo (CIRAD-FLHOR) en Francia (Bakry *et al.*, 2009). Estos materiales presentan cierta tolerancia a la SN, sin embargo, los frutos son poco aceptados por el consumidor (Manzo-Sánchez *et al.*, 2005).

Mediante ingeniería genética se ha logrado transformar genéticamente plantas de banano, a través del bombardeo de micropartículas (Sagí *et al.*, 1995), por *Agrobacterium* (Kovács *et al.*, 2013) y CRISPR/Cas9 (Naim *et al.*, 2018). Mediante *Agrobacterium* se sobre-expresaron genes que codifican quitinasas vegetales, lo que permitió incrementar la resistencia contra *P. fijiensis* (Kovács *et al.*, 2013). Sin embargo, el uso de plantas modificadas genéticamente sigue en discusión en muchos países.

1.4 Uso del ARNi para el control de hongos

En los últimos años se ha propuesto el uso del silenciamiento con ARN de interferencia (ARNi) para el control de hongos patógenos (Zotti *et al.*, 2018; Majumdar *et al.*, 2017; Baulcombe, 2015; Nunes y Dean, 2012). El ARNi es un mecanismo ubicuo presente en las células eucariotas, con algunas excepciones como en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* y *Ustilago maydis*; el ARNi regula la expresión génica a través de la degradación del ARN mensajero (ARNm) (silenciamiento postranscripcional); o también mediante la represión de la traducción o el remodelamiento de la cromatina (silenciamiento transcripcional) (Zotti *et al.*, 2018). Este mecanismo es desencadenado por cadenas dobles de ARN (ARNdc), las cuales son estructuras aberrantes en la célula, que son reconocidas por las proteínas tipo Dicer que las cortan en ARN más pequeños. Estos ARN pequeños, de secuencia específica, son reclutados por la proteína Argonauta (AGO) y procesados en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés). El complejo RISC regula los genes blancos, permitiendo el silenciamiento génico de una manera específica de secuencia (Qi *et al.*, 2019) (Figura 3).

El silenciamiento génico inducido por el hospedero (HIGS, por sus siglas en inglés) es un enfoque basado en el ARNi, en el cual pequeños ARN de interferencia son clonados en la planta hospedera para ser producidos *in vivo*, y subsecuentemente ser transportados al patógeno para silenciar alguno de sus genes de virulencia (Govindarajulu *et al.*, 2015). Existen reportes en donde la expresión en plantas transformadas que producen ARNdc

contra secuencias fúngicas produjeron el silenciamiento de estos mismos genes en estos patógenos. Por ejemplo, en el patosistema cebada-*Blumeria graminis*, el silenciamiento de dos genes efectores de *B. graminis*, *Avrk1* y *Avra10*, por HIGS, resultó en la reducción de la formación del haustorio (Nowara *et al.*, 2010).

La tecnología de HIGS también se ha aplicado para silenciar genes que codifican a proteínas y factores de transcripción involucrados en el crecimiento, desarrollo y patogénesis de Foc 1 (hongo que daña al banano tipo Gros Michel) (Ghag *et al.*, 2014). Otro ejemplo del uso de HIGS fue el silenciamiento del gen de la quitina sintasa de *Fusarium graminearum* para el control del Tizón en trigo; este enfoque resultó ser una estrategia efectiva con gran potencial de establecerse en condiciones de campo (Cheng *et al.*, 2015). Govindarajulu *et al.* (2015), generaron una lechuga transgénica que expresaba ARN interferentes pequeños (siARN) que silenciaban genes importantes de *Bremia lactucae*, un oomiceto biotrófico que causa el mildiu vellosa, la enfermedad más importante de lechugas en el mundo. En este trabajo se redujo fuertemente el crecimiento de *B. lactucae* y se inhibió su esporulación.

También la expresión transitoria de siARN en plantas inhibe transcritos importantes de genes de patógenos; en este caso, el silenciamiento génico es inducido por virus (VIGS). Esta herramienta biotecnológica usa vectores virales para producir ARNdc dirigidos a un fragmento del gen blanco, lo que desencadena el silenciamiento por ARNi (Becker y Lange, 2009). Un excelente ejemplo es el sistema de silenciamiento en trigo desencadenado por la expresión de ARNi a través del *Barley stripe mosaic virus* (BSMV), y que pudo silenciar genes importantes del hongo *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) (Yin *et al.*, 2011). Posteriormente, otros investigadores usaron este mismo sistema para silenciar los transcritos de *PsCPK1*, gen que es altamente inducido en las primeras etapas de la enfermedad causada por *Pst*. Dicho silenciamiento ocasionó una reducción significativa en la infección y los síntomas de la enfermedad. Este resultado mostró que *PsCPK1* es un importante factor de la patogenicidad, que regula el crecimiento y desarrollo de *Pst* (Qi *et al.*, 2018). Estos datos sugieren que tanto HIGS como VIGS son dos herramientas biotecnológicas con gran potencial para el control y estudio de hongos patógenos en cultivos de interés comercial, como el banano.

Muchos trabajos han reportado que los siARN son transportados desde las células de los

hospederos a los patógenos, y viceversa (Cai *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016; Weiberg *et al.*, 2015). Este movimiento de siARN entre organismos es un mecanismo crucial que hace posible que este tipo de tecnologías pueda ser usado para el control basado en ARNi.

La disponibilidad pública de más de 100 genomas fúngicos y genomas de plantas disponibles en las bases de datos, combinado con el uso de transcriptomas, ofrece un arsenal grande de genes candidatos para el diseño de constructos de silenciamiento (Nunes y Dean, 2012), así como evitar silenciar genes no blanco.

1.5 Silenciamiento génico en eucariotas

El fenómeno fue inicialmente descubierto en 1990, cuando botánicos que se encontraban trabajando con petunias intentaron sobre-expresar a la enzima que produce el color púrpura (llamada chalcona sintasa). Para ello, introdujeron varias copias del gen que codifica para esta enzima, esperando encontrar que las plantas que sobre-expresaran a la chalcona sintasa fueran púrpuras. Sin embargo, descubrieron que generaban flores sin color o con parches blancos. Al analizar los niveles de la enzima encontraron que eran 50 veces menores a los de las plantas originales. Esta observación implicaba que los genes que se introdujeron no se estaban expresando, pero también que el gen natural de la planta dejaba de expresarse; por esta razón al fenómeno se le llamó co-supresión (Napoli *et al.*, 1990). Un fenómeno similar fue descrito tiempo después en el hongo *Neurospora crassa*, y a este fenómeno se le llamó *quelling* (Romano y Macino, 1992). En 1998 se descubrió que tras la inyección de ARNdc dentro del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, se producía un silenciamiento de la expresión de genes, específico de la secuencia de ARNdc, es decir, que se inhibía la expresión del gen que presenta la misma secuencia que el ARNdc. Este fenómeno explicaba tanto la co-supresión como el *quelling* y fue denominado ARN de interferencia (ARNi) (Lee *et al.*, 1993). El mecanismo fue investigado y se encontró que las moléculas largas de ARNdc eran cortadas en fragmentos pequeños, con una estructura específica de dos cadenas de 21 a 25 nucleótidos, donde 19 nucleótidos se encontraban formando ARN de doble cadena y dos nucleótidos sin aparearse en los extremos. Estas moléculas fueron denominadas ARN interferentes pequeños (siARN) y se demostró que son las mediadoras del proceso de interferencia (Lee *et al.*, 1993).

En plantas, se han descrito varias clases de moléculas pequeñas de ARN que desencadenan el proceso de silenciamiento por interferencia, los más descritos son los ARN interferentes pequeños (siARN) y los microARN (miARN) (Martinez de Alba *et al.*, 2013).

Los siARN son moléculas que tienen un tamaño de 21 a 25 nucleótidos y son producidos a partir de precursores de ARN de doble cadena, que pueden variar de tamaño y de origen. Estos precursores son procesados por miembros de la familia de las enzimas que degradan ARNdc hasta siARN, que se conocen como Dicer. Los siARN resultantes son incorporados a un complejo denominado RISC. Este complejo está compuesto por numerosas proteínas celulares. La incorporación del siARN al RISC esta acoplada a la separación de las dos cadenas en cadenas sencillas, solo una de las cuales, conocida como cadena guía, se mantiene asociada al complejo y sirve para identificar el ARNm con la secuencia complementaria. Cuando las moléculas de ARNm complementarias son encontradas, la interacción entre el siARN y este ARNm desemboca en el corte del ARNm y su posterior degradación (Chang *et al.*, 2012). En las plantas, los siARN pueden ser transportados al núcleo e inhibir la síntesis del ARNm a partir del gen correspondiente, fenómeno que se conoce como silenciamiento transcripcional.

Los microARN presentan mucha similitud con los siARN. Los microARN son producidos por una vía de síntesis diferente. Los precursores de los microARN son transcritos a partir de genes, tal y como se producen los ARNm. A esta primera molécula de ARN se le denomina microARN primario (pri-microARN) y es procesado en el núcleo por otra enzima de la familia ARNasa tipo III denominada drosha. El resultado del corte por drosha es una molécula de ARN de entre 70 y 100 nucleótidos, con una estructura compleja. Partes de la molécula forman una estructura de doble cadena de ARN unida por una sección de cadena sencilla. A este tipo de estructura le llamamos de tipo hairpin. A esta molécula de ARN se le llama el precursor del microARN (pre-microARN), el cual posee múltiples burbujas y una serie de “miss-matches” (zonas dentro de las regiones de doble cadena que no pueden unirse entre sí porque no son complementarias). El pre-microARN es posteriormente exportado del núcleo al citoplasma por una vía que depende de la proteína exportina-5. Esta permite y regula el paso de moléculas entre el núcleo y el citoplasma. Ya en el citoplasma, el pre-microARN es cortado hasta adquirir la estructura de microARN maduro, es decir, una

molécula de ARNdc lineal de entre 21 y 24 nucleótidos, en donde en el extremo 5' sobresalen dos nucleótidos. Este último procesamiento es realizado, al igual que en el caso de los siARN, por Dicer. Los microARN maduros se incorporan a un complejo ribonucleoproteínico que es similar, y posiblemente idéntico, al RISC. Una vez que estas moléculas de ARN se encuentran ensambladas en el RISC, el complejo dirige el silenciamiento génico post-transcripcional (Martinez de Alba *et al.*, 2013; Baulcombe, 2004).

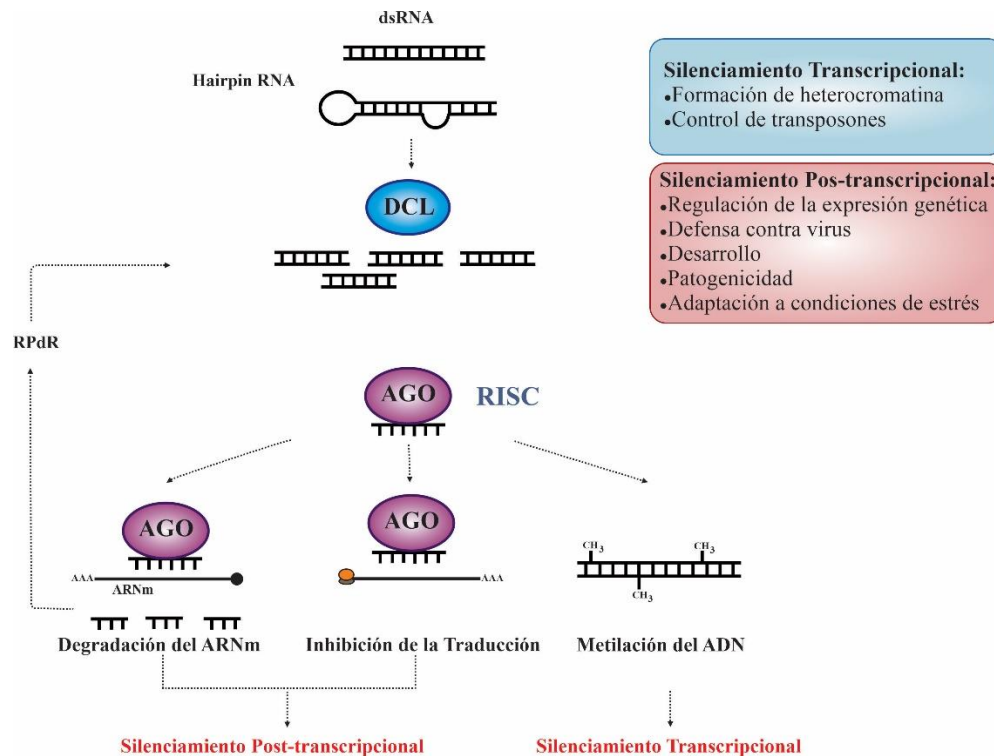


Figura 3. Mecanismo de ARN de interferencia en eucariotas. Inicia con el reconocimiento de dsRNA o hairpin RNA por DCL generando sRNA que posteriormente son unidos a la proteína AGO para dar lugar a la formación de RISC. Los sRNA son usados como guías para dar lugar al silenciamiento transcripcional o post transcripcional. En hongos el sistema de silenciamiento regula procesos de desarrollo, defensa y patogenicidad tanto a nivel transcripcional como post transcripcional.

1.6 Transferencia de ARNs entre reinos (“crosskingdom”)

La comunicación célula-célula puede llevarse a cabo entre células de organismos de diferentes especies e incluso reinos, donde éstos interactúan en simbiosis, parasitismo o son patógeno-hospedero. Ésta comunicación involucra el transporte de moléculas

regulatorias como siARN o miARN a través de las células de los organismos en interacción (Weiberg *et al.*, 2015). A este tipo de comunicación a través de ARN entre organismos no relacionados se le llama “entre reinos” o “*Crosskingdom*”. Se tiene evidencia que pequeños ARN (tanto siARN como microARN) pueden ser transportados de un organismo a otro, para suprimir la expresión de los genes del contrario (Wang *et al.*, 2016).

Las plantas como organismos sésiles deben estar siempre en constante comunicación con su entorno y con otros organismos, de forma que puedan protegerse. Una respuesta de defensa puede ser inducida por patógenos, plagas y parásitos, o la transducción de señales puede ser desencadenada por la comunicación entre hospederos y simbioses, o comunidades de organismos endófitos. Los ARN pequeños y posiblemente sus precursores, en ciertas situaciones, funcionan como señales móviles que propagan la información de silenciamiento, lo que influye en la interacción de los organismos (Weiberg *et al.*, 2015).

Algunos patógenos producen pequeños ARNs, que también son capaces de inducir silenciamiento génico en plantas. La función de los pequeños ARNs en la virulencia de hongos es apoyada por el hecho de que éstos ARNs fúngicos se acumulan diferencialmente durante el proceso de infección (Weiberg *et al.*, 2013). *Botrytis cinerea* es un hongo patógeno vegetal muy virulento, que se mueve en las células del huésped durante la infección temprana y secuestra la proteína AGO del hospedero, proteína clave en el sistema de ARN de interferencia (Weiberg *et al.*, 2013). Por su parte, se ha observado que el parásito *Helogmosomoides polygyrus* libera microARNs en las células de su hospedero mamífero y silencia genes involucrados en la inmunidad innata de éste (Buck *et al.*, 2014).

Así mismo, se ha demostrado que durante una infección, las células de *Arabidopsis thaliana* pueden secretar vesículas extracelulares tipo exosomas, los cuales transportan pequeños ARNs que posteriormente llegan al hongo *B. cinerea* y silenciar genes involucrados en su virulencia (Cai *et al.*, 2018).

1.7 VIGS

El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, por sus siglas en inglés) describe una técnica que emplea a virus recombinantes para el silenciamiento postranscripcional (PTGS) (Baulcombe, 1999). Los vectores virales comúnmente utilizados para VIGS se manipulan

para incorporar un fragmento del gen blanco. Las plantas emplean PTGS como su línea de defensa antiviral innata, para contrarrestar la proliferación viral, empleando un mecanismo de degradación de ARN muy similar a las vías de interferencia de ARN (Becker y Lange, 2009). El silenciamiento de genes inducidos por virus involucra tres principales pasos: a) ingeniería del genoma viral, para impedir su dispersión en la naturaleza o regular a voluntad algunas de sus funciones; incluye agregar fragmentos de genes de los hospederos, que serán los blancos para el silenciamiento; b) infección de plantas hospederas apropiadas y c) silenciamiento de los genes blancos (Senthil-Kumar y Mysore, 2011).

Originalmente, se observó el silenciamiento génico en *Nicotiana benthamiana* en respuesta a vectores virales de ARN, manipulados genéticamente. El gen de la fitoeno desaturasa (*PDS*), un gen involucrado en la ruta de biosíntesis de los carotenoides, fue silenciado incorporando partes de su ADNc en un vector viral híbrido, compuesto de secuencias del virus del mosaico del tabaco y del virus del mosaico del tomate. El fragmento del gen *PDS* introducido por el virus como ARN antisentido inhibió la síntesis de carotenoides, corriente abajo del fitoeno, y se observó que esta inhibición ocurría sistémicamente en toda la planta, lo que indicaba movilidad de los ARNi. Los niveles reducidos de carotenoides fotoprotectores condujeron a la rápida destrucción de la clorofila por fotooxidación, que posteriormente resultó en un fenotipo de hoja blanca que se podía seguir visualmente (Kumagai *et al.*, 1995).

Tanto los virus de ARN y ADN han sido modificados para ser utilizados como vectores de silenciamiento (Dommes *et al.*, 2019). El uso de vectores virales para silenciar en las plantas genes endógenos requiere la clonación de fragmentos del gen blanco dentro del virus, sin comprometer la replicación viral y el movimiento. Esto ya está demostrado con virus de ARN con la inserción de secuencias en el TMV y en los virus de ADN con el reemplazamiento del gen de la proteína de la cápside con una secuencia complementaria del gen blanco a silenciar. Estos reportes han usado “marcadores visibles para el silenciamiento” como son los genes *PDS* y *Chill* (Robertson, 2004). La ventaja de los VIGS es que no necesitan protocolos establecidos para la transformación genética estable (Becker y Lange, 2009).

Los virus de ARN se replican en el citoplasma, mientras los virus de ADN se replican en el núcleo de la planta, usando la maquinaria de replicación del hospedero. Ambos tipos de

virus inducen un silenciamiento de genes endógenos dependiente de la homología, y que es sistémico, es decir, difusible. Sin embargo, el alcance de la propagación del silenciamiento y la severidad de los síntomas virales pueden variar significativamente en diferentes plantas hospederas y dependiendo de las combinaciones virus/hospedero. Con la variedad de virus y la diversidad de patrones de infección, transmisión por vectores y defensa de las plantas, no es sorprendente que los virus difieran con respecto al grado de silenciamiento (Robertson, 2004).

La mayoría de los virus de ADN usados para VIGS son geminivirus, los cuales son virus de ADN de cadena simple, que se replican en el hospedero por el mecanismo de círculo rodante, a través de intermediarios de ADN de doble cadena (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). Varios miembros de esta familia han sido modificados para su uso como VIGS, entre ellos el *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan península (EuMV-YP) (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). Los geminivirus comprenden nueve géneros diferentes, pero los begomovirus constituyen el género más grande (Kumar, 2019). Los begomovirus son transmitidos por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). La eliminación del gen que codifica la proteína de la cápside les otorga seguridad en cuanto a su uso como VIGS, ya que no puedan ser transmitidos por el vector y por lo tanto no pueden transmitirse accidentalmente en el campo (Höhnle *et al.*, 2001).

Existen varios métodos para infectar las plantas con VIGS, como son la inoculación mecánica usando ARN transcrito *in vitro* o extractos de hojas infectadas, agroinoculación o por bombardeo de microproyectiles (Robertson, 2004). El bombardeo con microproyectiles de oro o tungsteno recubiertos con material genético ha sido extremadamente útil para los virus de ADN, que tienen que alcanzar el núcleo.

Los VIGS han sido usados para silenciar una gran variedad de genes en plantas, así como para indagar más sobre los componentes de señalización involucrados en la resistencia a enfermedades. Se ha observado que, al silenciar genes relacionados a la defensa, la infección por el patógeno es mayor (Fodor *et al.*, 2018). Es importante señalar que en la mayoría de los casos, *N. benthamiana* ha sido usada ampliamente para estudios de silenciamiento, debido a que es un hospedero susceptible a un amplio número de virus y es un excelente modelo de estudio (Goodin *et al.*, 2008).

1.8 Vector de silenciamiento basado en EuMV-YP

El vector de silenciamiento derivado del virus EuMV-YP funciona de forma eficiente en *N. benthamiana*. El EuMV-YP es un begomovirus que fue aislado de la planta silvestre *Euphorbia heterophylla* de la península de Yucatán (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). Es un virus bipartita; el componente A tiene 2613 nucleótidos y el componente B 2602 nucleótidos. Los componentes A y B comparten una secuencia de región común (RC) que tiene un tamaño de 165 nucleótidos y una identidad de 86% entre sí. Así mismo, el componente A codifica genes que son requeridos para la replicación y la encapsidación, mientras que el componente B provee funciones para su movimiento local y sistémico (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). El vector de silenciamiento derivado de este virus es una modificación del EuMV-YP silvestre, al cual se le ha eliminado la secuencia del gen que codifica para la cápside, haciéndolo de esta manera más seguro, y se le reemplazó por un sitio múltiple de clonación (SMC) que contiene los sitios de corte para las enzimas *SphI*, *SmaI*, *PstI* y *EcoRV* (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013).

1.9 Defensa vegetal y usos de VIGS en la interacción planta-patógeno.

Las plantas como organismos sésiles son constantemente atacadas por una gran diversidad de patógenos, sin embargo, durante su evolución han desarrollado un sofisticado sistema de defensa que es capaz de contrarrestar la mayoría de las infecciones que pueden ser causados por patógenos (Jones y Dangl, 2006). En primera instancia la cutícula, ceras y la pared celular constituyen barreras físicas que impiden la penetración de patógenos potenciales. Adicionalmente, en el apoplasto existen hidrolasas, inhibidores de proteasas y otros componentes antimicrobianos que impiden las infecciones. Sin embargo, una vez que estas primeras barreras físicas son superadas existen receptores proteicos sobre la superficie celular que reconocen diversos compuestos moleculares derivados de los patógenos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, pathogen-associated molecular pattern) y que activan un primer sistema de defensa nombrado inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI, PAMP-triggered immunity), incluyendo especies reactivas de oxígeno (ROS), flujo de iones, producción de metabolitos secundarios, reforzamiento de la pared celular y expresión de genes relacionados a la defensa vegetal (Jones y Dangl, 2006). Un ejemplo de PAMPs son la flagelina, peptidoglucanos en el caso de bacterias, o componentes extracelulares como la quitina y

glucanos en el caso de hongos. Así mismo, en coevolución con las plantas, los patógenos han desarrollado diversas estrategias para poder contrarrestar esas respuestas de defensa. Una de ellas es el uso de efectores proteicos que proveen ventajas al patógeno para superar dichas defensas, de este modo, tener éxito en su invasión, mecanismo conocido como susceptibilidad desencadenada por efectores. Sin embargo, las plantas en esa constante evolución también han desarrollado receptores proteicos transmembranales más especializados capaces de sensar tales efectores y desencadenar finalmente un tipo de respuesta más acelerada y amplificada que PTI, este tipo de respuesta es llamada inmunidad desencadenada por efectores (ETI, effector-triggered immunity) (Jones y Dangl 2006). El conocimiento actual de los eventos de señalización de defensa vegetal es derivado de una gran cantidad de estudios basados en modelos como *Arabidopsis thaliana* y *N. benthamiana* (Goodin *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2018). Pero particularmente, una combinación de modelos vegetales y herramientas biotecnológicas como VIGS ha permitido el estudio funcional de genes vegetales como de patógenos. Por ejemplo, Segonzac *et al.* (2011) usando una combinación de dos enfoques distintos; usando inhibidores del flujo de Ca^{2+} y otra por silenciamiento viral (basado en TRV) en *N. benthamiana* estudió los eventos de señalización tempranos inducidos por flagelina y quitina, y su papel en la respuesta de defensa contra bacterias. Otro ejemplo, Fodor *et al.* (2018) usó una construcción de silenciamiento basado en TRV para el análisis funcional de dos genes de *N. benthamiana* (COI1 y EIN2) involucrados en las vías de señalización de ácido jasmónico y etileno, observando que el silenciamiento promovía el desarrollo de síntomas necróticos causados por *Cercospora nicotianae*. Zhu *et al.* (2014) usaron un enfoque similar de silenciamiento para investigar la función de biosíntesis de ácido jasmónico y ácido salicílico o señalización de genes en el sistema de respuesta al virus del mosaico de tabaco (TMV, por sus siglas en inglés). De modo que silenciando dichos genes incrementaron la susceptibilidad de las plantas de *N. benthamiana* a TMV. Un ejemplo en el que se aborda el silenciamiento aprovechando la comunicación entre reinos por ARNi (Crosskingdom RNAi) es el trabajo de Qi *et al.*, (2018) en donde utilizaron el sistema de silenciamiento basado en *barley stripe mosaic virus* (BMSV) para silenciar una subunidad de una cinasa A de *Puccinia striiformis f. sp. tritici* y con ello demostrar la importancia de esta proteína en la virulencia y en el otorgamiento de resistencia.

Más recientemente, Villanueva-Alonzo *et al.*, (2022) usaron el sistema de silenciamiento

basado en el EuMV-YP para la producción de pequeños ARN de interferencia derivado de virus (vsiRNA) usando *N. benthamiana* como biofábrica para silenciar el gen *krt18* en macrófagos de ratón, demostrando el silenciamiento “cross-kingdom” y la utilidad de este sistema para silenciar genes. Estas herramientas son de mayor utilidad cuando se trata de abordar preguntas en las que los sistemas de transformación por *Agrobacterium* son limitantes o altamente recalcitrantes.

1.10 Limitaciones de estudio para el sistema de interacción Banano – *Pseudocercospora fijiensis*

El estudio funcional de genes tanto de banano como de *P. fijiensis* durante su interacción son una tarea bastante retadora. A pesar de los avances en el uso herramientas para el estudio de genes mediante edición génica usando CRISPR Cas9 (Tripahi *et al.*, 2020; Naim *et al.*, 2018) o transformación mediada por *Agrobacterium* (Kovács *et al.*, 2012) los estudios funcionales durante la interacción de *Musa* spp. con sus patógenos son escasos. Aunado al hecho que dichos estudios requieren largos periodos de tiempo para la regeneración de plantas editadas o transformadas. Lo que resulta en un proceso lento, de mayor demanda de recursos económicos y humanos para su estudio en comparación con otros modelos como *Arabidopsis* o *N. benthamiana*. Por otro lado, los estudios de este tipo en *P. fijiensis* requieren protocolos de transformación que no siempre son reproducibles, y aunque existen avances (Onyilo *et al.*, 2018), los trabajos no son rutinarios. Ahora bien, un experimento de este tipo para dicho patosistema resultaría demasiado tardado y complejo para desarrollar y puede demorar de 6 meses a 1 año; además de que se deben considerar diversos factores que se deben controlar como son el espacio requerido y el tiempo que debe transcurrir para observar los resultados. Lo anterior, sin considerar que las plantas pudiesen verse afectadas por contaminaciones que pudieran provocar la interrupción del experimento.

Con base en todo lo anterior, en este trabajo se tiene el interés de evaluar un sistema alternativo de interacción entre *N. benthamiana* y *P. fijiensis*, aprovechando todas las bondades que el hospedero presenta con la finalidad de realizar estudios funcionales en *P. fijiensis* de una forma más rápida y eficiente.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar un sistema alternativo de interacción *Nicotiana benthamiana*-*Pseudocercospora fijiensis* para su posible empleo en estudios funcionales de genes mediante VIGS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un sistema de interacción *Nicotiana benthamiana* – *Pseudocercospora fijiensis*
- Evaluar la infectividad de *Pseudocercospora fijiensis* durante su interacción con *Nicotiana benthamiana*.
- Evaluar el nivel de susceptibilidad (respuesta molecular) de *Nicotiana benthamiana* ante *Pseudocercospora fijiensis*.
- Modificación y evaluación del uso de EuMV-YP:ΔV1 como VIGS en banano.

JUSTIFICACIÓN

Pseudocercospora fijiensis, el agente causal de la SN es la principal amenaza para la producción de plátanos y bananos en el mundo. Su estilo de vida hemibiotrófico se caracteriza por tener una fase biotrófica inicial sin causar daño aparente en el hospedero, que puede llevar varias semanas hasta pasar a la fase necrotrófica, esta última con síntomas visibles en el hospedero. Los experimentos para estudiar genes en la interacción banano-*P. fijiensis* son una tarea bastante retadora. Tan solo la producción *in vitro* de las plántulas hasta su establecimiento *ex vitro* pueden demorar 6 meses. Un experimento exitoso y completo puede llevar hasta un año, sin tener en cuenta las plantas que pudiesen verse afectadas por contaminaciones. Por otra parte, hasta antes de este estudio no se había realizado en *P. fijiensis* ensayos de análisis funcional de genes de manera rutinaria debido a que la transformación de este hongo es altamente recalcitrante. El presente trabajo busca una alternativa para establecer un protocolo que permita realizar análisis funcionales de genes de *P. fijiensis*.

HIPÓTESIS

Si *Pseudocercospora fijiensis* es capaz de infectar *in vitro* a *Nicotiana benthamiana*, entonces es probable que sea capaz de expresar genes de virulencia como PfAvr4 y PfEcp6 durante esta interacción. Por lo tanto, la interacción *in vitro* de *Pseudocercospora fijiensis* y *Nicotiana benthamiana* permitiría el análisis funcional de genes del patógeno mediante silenciamiento génico mediado por VIGS.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

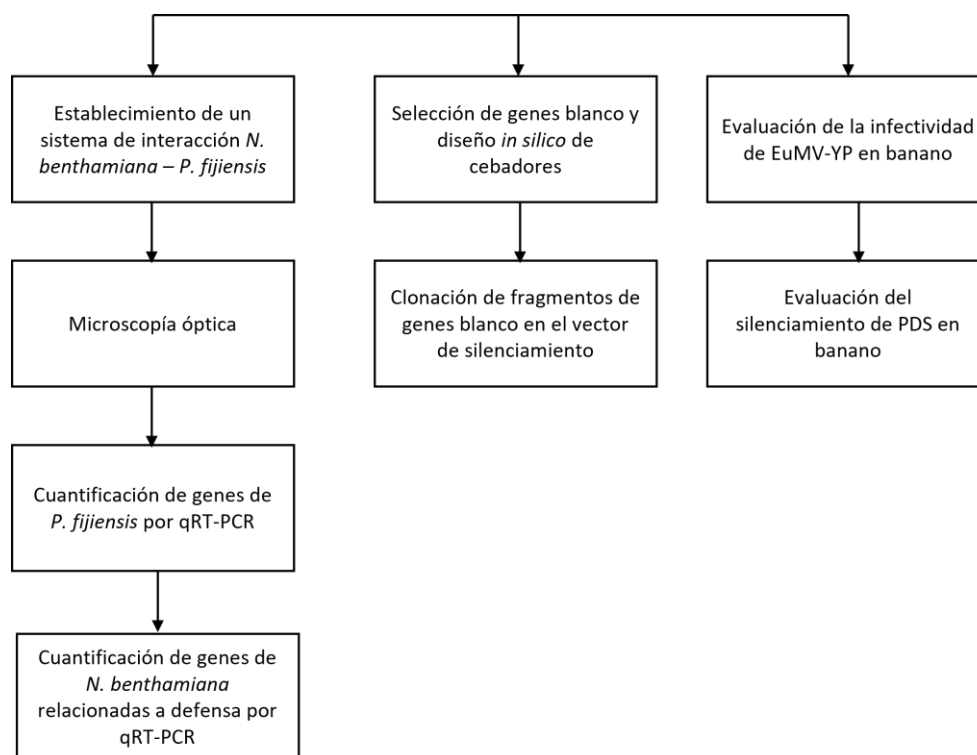


Figura 4. Esquema de la estrategia experimental utilizada en este estudio. El objetivo principal es establecer un sistema de interacción entre *N. benthamiana*-*P. fijiensis*, para que eventualmente sea un modelo de estudio de interacción para *P. fijiensis*.

CAPÍTULO II

INFECCIÓN DE *NICOTIANA BENTHAMIANA* CON *PSEUDOCERCOSPORA FIJIENSIS*

2.1 INTRODUCCIÓN

En estudios de interacciones planta patógeno, tanto *N. bethamiana* como *Arabidopsis thaliana* son excelentes plantas modelo por diversas razones, por ejemplo, son de fácil cultivo, ciclo de vida corto y son susceptibles a una gran cantidad de patógenos (Goodin *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2018), es por ello por lo que su uso está ampliamente aceptado. *A.thaliana* es usada de forma rutinaria en estudios de interacción con hongos patógenos como *Botrytis cinerea* (Soltis *et al.*, 2020, Ono *et al.*, 2020), especies de *Fusarium* (Wang *et al.*, 2022; Koch *et al.*, 2013), y bacterias como *Pseudomonas syringae* (Katagiri *et al.*, 2002; Hassan *et al.*, 2018). Por otro lado, *N. benthamiana* se caracteriza también por ser susceptible a muchos patógenos como bacterias, hongos y especialmente virus (Goodin *et al.*, 2008). *N. benthamiana* particularmente ha sido extensamente usado como hospedero para expresión transitoria de proteínas usando *Agrobacterium tumefaciens* (Kettles *et al.*, 2017), permitiendo el análisis funcional por agroinfiltración; además es importante mencionar que el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) es altamente eficiente en esta planta, el cual es una herramienta poderosa para estudios funcionales (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). Adicionalmente, *N. benthamiana* también es aceptada como modelo en el estudio de interacciones tipo “no hospedero” (Friesen, 2017). El uso de *N. benthamiana* como modelo para estudios de interacciones planta-patógeno sigue en crecimiento, dado que ha sido usada como hospedera alternativa del hongo patogénico *Cercospora nicotianae* (Fodor *et al.*, 2018), así como del nematodo *Meloidoyine graminicola* (Naalden *et al.*, 2018). Esta planta también ha sido usada para el reconocimiento de múltiples candidatos de efectores apoplásticos de *Zimoseptoria tritici* (Kettles *et al.*, 2017). La alta flexibilidad de esta planta como modelo ha permitido que incluso las hojas desprendidas sean usadas para estudios de interacción planta-patógeno (Chen *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2016) permitiendo el estudio de mecanismos de defensa contra hongos como *B. cinerea* o *Alternaria alternata*. Así mismo, este modelo vegetal ha servido como base para demostrar que Avr4 de *P. fijiensis* es un ortólogo funcional de Avr4 de *Cladosporium fulvum* a través de un ensayo de expresión transitoria de MfAVr4 y Cf-4, resultando en una

respuesta hipersensible (HR) (Stergiopoulos *et al.*, 2010). Este mismo enfoque ha sido utilizado para la identificación de diversas proteínas efectoras causantes de HR (Du *et al.*, 2021; Raffaello y Asiegbu, 2017; Kettles *et al.*, 2017), así como la expresión de genes que se desencadenan a causa de estas proteínas efectoras (Du *et al.*, 2021; Raffaello y Asiegbu, 2017). Con todo lo anterior se resalta la importancia del uso de *N. benthamiana* en estudios de interacción planta-patógeno.

El patosistema banano - *P. fijiensis* es complejo dadas las características de poliploidía del hospedero y la morfofisiología del hongo (Soares *et al.*, 2021). A la fecha, los estudios sobre la biología de este hongo y el modo de acción de los productos de los genes involucrados en la interacción planta-patógeno es limitado (Soares *et al.*, 2021; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2018; Arango-Isaza *et al.*, 2016). La poca docilidad experimental de *P. fijiensis* ha limitado el entendimiento de su biología, así como el desarrollo de herramientas para su estudio (Arango-Isaza *et al.*, 2016). Los protocolos de transformación eficiente para el análisis funcional en banano son escasos, agregado a que los ensayos de análisis funcional de genes en *P. fijiensis* no se realizan de manera rutinaria debido a que la transformación de este hongo es altamente recalcitrante (Alakonya *et al.*, 2018). Además, los experimentos de infección requieren condiciones ambientales muy específicos como la temperatura, luz, humedad, y el desarrollo de la enfermedad puede durar largos periodos (Arango-Isaza *et al.*, 2016). Es por ello, en este patosistema, el estudio de genes durante la interacción con su hospedero es una tarea bastante retadora. A la fecha, los trabajos de investigación de banano-*P. fijiensis* se basan en investigaciones *in vitro*, de invernadero y de campo (Soares *et al.*, 2021). Los primeros comprenden trabajos de laboratorio donde realizan análisis de actividad enzimática a partir de fragmentos foliares infectados (Islas-Flores *et al.*, 2015), de regeneración de plantas a partir de suspensiones de células embriogénicas (Liu *et al.*, 2017; Tripathi *et al.*, 2015) o de interacción planta patógeno usando fragmentos foliares (Burgos-Canul *et al.*, 2019; Kovács *et al.*, 2013; Kantún-Moreno *et al.*, 2013; Peraza-Echeverría *et al.*, 2008). Así mismo, la infección artificial de hojas provenientes de plantas derivadas de la multiplicación *in vitro* es una opción (Abadie *et al.*, 2008), sin embargo, este método resulta ser más laborioso y tardado. El uso de fragmentos foliares está preferentemente dirigido al estudio de las primeras horas o días de la infección (biotrofia), mientras que para estudios que incluyan fases avanzadas se suele usar material vegetal de campo (necrotrofia) (Kantún-Moreno, *et al.*, 2013; Couoh-Uicab *et al.*, 2011). Las infecciones de

campo son mayormente usadas en estudios que abarcan todas las etapas de la enfermedad (Beltrán-García *et al.*, 2014; Couoh-Uicab *et al.*, 2011). Los trabajos experimentales en campo suelen ser usados en la mayoría de los casos para evaluaciones de plantas resistentes o en los que se requiere también evaluaciones del fruto (Kimunye *et al.*, 2021; Fullerton y Casonato, 2019). La gran desventaja de este tipo de estudios es que requiere mayores costos de mantenimiento, largos periodos de tiempo y los factores bióticos como abióticos pueden influir en el estudio. En cuanto a estudios de interacción se prefiere en su mayoría usar plantas monitoreadas en invernadero (Soares *et al.*, 2021), ya que estos permiten un mayor control de las condiciones ambientales. Los estudios de interacción en invernadero son más útiles para estudios de expresión diferencial de genes, genes del metabolismo primario, de defensa vegetal y de interacción (Chi-Manzanero *et al.*, 2021; Rodríguez *et al.*, 2019; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2018; Sánchez-Timm *et al.*, 2016). Sin embargo, también requiere de plantas previamente obtenidas de sistemas *in vitro* y aclimatadas al invernadero, proceso que puede durar varios meses (~6 meses), además del requerimiento de un sistema de invernadero que no siempre está disponible. Por último, para el avance del conocimiento sobre la interacción, muchas veces son necesarias herramientas que permitan el análisis funcional tanto del hospedero como del patógeno, los cuales son limitantes en el caso del patosistema banano-*P. fijiensis*. Es por lo que surge la necesidad de un modelo que potencialmente permita realizar análisis funcional de genes de una manera más rápida y eficiente para el estudio de *P. fijiensis* durante su interacción con el hospedero. En este capítulo se presenta la infección de *N. benthamiana* con *P. fijiensis* y la evaluación de genes de hongo y de la planta, para caracterizar este proceso de infección.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Se germinaron semillas frescas de *N. benthamiana* y las plantas fueron crecidas en una mezcla (1:3) de agrolita y tierra (Sunshine® Sungro Horticulture). Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad, a 25°C hasta su inoculación con *P. fijiensis*.

2.2.2 Condiciones de crecimiento de *P. fijiensis*

Todos los experimentos fueron realizados con *P. fijiensis* aislado C1233 (Burgos-Canul et al., 2019). El hongo se mantuvo en medio agar papa dextrosa (PDA, Difco), pH 5.8 a 25°C. Para la preparación del inóculo se dejó crecer al hongo por 14 días en medio caldo papa dextrosa (PDB, Difco), pH 5.8 con agitación constante (150 rpm). El micelio se molió en licuadora y se filtró usando tres mallas metálicas para obtener fragmentos de micelio de 0.7 a 1 mm. La concentración fue medida bajo el microscopio con una cámara de conteo Sedgewick Rafter ajustando la concentración a 12×10^4 , 8×10^4 o 4×10^4 fragmentos de micelio por ml. Para resguardo por periodos cortos, la cepa fue crecida y mantenida en medio PDB a temperatura ambiente (25°C) en agitación constante o en cajas con PDA a 16 °C.

2.2.3 Infección artificial de *N. benthamiana* con fragmentos de micelio

El experimento de infección se llevó a cabo por inoculación con fragmentos de micelio fresco. La inoculación fue realizada empleando una punta de micropipeta de 1000 µl cortada, inoculando 4×10^4 , 8×10^4 o 12×10^4 fragmentos de micelio en un volumen de 0.5 ml en una solución de gnetina 1% (p/v); el micelio se aplicó cubriendo una superficie de 6.25 cm² en la región central del haz de la hoja. El grupo de plantas control fueron tratadas solamente con una solución de gnetina 1% (p/v). El experimento fue mantenido en condiciones de fotoperiodo 16/8 h, luz/oscuridad, 25 °C, con riego continuo en lugar cerrado para generar alto porcentaje de humedad durante 35 días. El proceso fue monitoreado frecuentemente y fotografiados cada 7 días. Cada grupo experimental se realizó por triplicado.

2.2.4 Análisis histológicos de *N. benthamiana* infectada.

Los fragmentos de hoja inoculados con *P. fijiensis* C1233 fueron desteñidos con etanol al 90%. Las hojas fueron sometidas 3 veces a temperaturas de ebullición por dos minutos hasta su aclarado (Burgos-Canul et al., 2019). Después de la remoción de la clorofila, las muestras fueron incubadas 24h en una solución de azul de algodón para teñir el micelio. Las muestras se observaron bajo el microscopio (Nikon Eclipse E200) y se fotografiaron en un campo claro de 40X.

2.2.5 Extracción de ADN genómico de *N. benthamiana* infectada con *P.*

fijiensis.

La extracción de ADN total de hojas infectadas se llevó a cabo con el método descrito por Tapia-Tussel y colaboradores (2005). Para la extracción, 40 mg de hoja infectada fueron pesados y macerados con nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvo fino. Inmediatamente las muestras fueron transferidas a un tubo Eppendorf para ser incubadas en baño maría a 65°C por 15 min. Posteriormente a cada tubo con muestra se le añadieron 0.6 ml de cloroformo, mezclándose por inversión durante 10 min. Las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió a otro tubo Eppendorf en donde se le añadió 0.7 ml isopropanol frío. Las muestras fueron mezcladas gentilmente por inversión e incubadas por 10 min en hielo. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante y lavando la pastilla con 0.5 ml de etanol al 70% (v/v). Las muestras se dejaron secar y fueron resuspendidas en 50 µl de agua libre de nucleasas.

2.2.6 Extracción de ARN del micelio de *P. fijiensis*

La extracción de ARN fúngico se llevó a cabo con el método de TRIzol™ Reagent. Para la extracción, 100 mg de micelio fueron pesados y macerados con nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvo fino. Las muestras maceradas fueron transferidas a tubos Eppendorf de 2 ml e inmediatamente se agregó 1 ml de reactivo de TRIzol, homogenizando y dejando incubar por 5 min a temperatura ambiente. En seguida se agregaron 0.2 ml de cloroformo, se homogenizó vigorosamente, y se incubó por 15 min y centrifugó a 12000 rpm por 10 min. La fase acuosa superior fue transferida a otro tubo libre de ARNasas y se agregaron 0.5 ml de isopropanol para la precipitación del ARN. La muestra fue centrifugada a 12000 rpm por 10 min a 4°C, descartando el sobrenadante y lavando la pastilla con 1 ml de etanol 70% (v/v), dejando secar por aproximadamente 15 min. Todas las muestras fueron resuspendidas en 25 µl de agua libre de ARNasas, cuantificadas y guardadas a -80°C hasta su uso.

2.2.7 Extracción de ARN de *Nicotiana benthamiana*

Para la extracción de ARN a partir de las muestras infectadas de *N. benthamiana* se

utilizó el reactivo Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se pesaron 100 mg de hoja infectada, dichas muestras fueron maceradas con nitrógeno líquido y transferidas a un tubo Eppendorf, inmediatamente agregando 0.5 ml de reactivo Concert™ y mezclando vigorosamente. Las muestras se incubaron por 5 min, y posteriormente fueron centrifugadas por 2 min a 12000 rpm, a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo libre de nucleasas, el cual se le agregó 0.1 ml de NaCl 5 M y 0.3 ml de cloroformo, mezclando por inversión. Las muestras se centrifugaron a 4°C por 10 min a 12000 rpm para la separación de fases; la fase superior (fase acuosa) se transfirió a otro tubo libre de nucleasas. A la fase acuosa se le añadió un volumen de isopropanol, mezclando y dejando reposar por 10 min. Nuevamente la muestra se centrifugó a 4°C por 10 min a 12000 rpm, descartando el sobrenadante y lavando la pastilla con etanol 75% (v/v). Todas las muestras fueron resuspendidas en 25 µl de agua libre de ARNasas, cuantificadas y guardadas a -80 °C hasta su uso.

2.2.8 Síntesis de ADNc

Antes de iniciar la síntesis de ADNc, el ARN extraído se sometió a una reacción de digestión con ADNasa para eliminar cualquier remanente de ADN genómico (ADNg). Para la obtención de ADNc se siguió el protocolo de la SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). La siguiente reacción está diseñada para obtener un volumen final de 20 µl.

Como primer paso se realizó la mezcla de 1 µg de ARN, 1 µl de oligo dT (50 µM) y 1 µl de mezcla de dNTPs (10 mM) aforados a un volumen de 13 µl con agua ultrapura. La mezcla fue calentada a 65°C por 5 min e incubada en hielo por 3 min. Posteriormente fueron agregados 4 µl de tampón 5X First-Strand, 1 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de inhibidor de ARNsa recombinante RNaseOUT™ (40 U µl⁻¹) y 1 µl de enzima SuperScript™ III RT (200 U µl⁻¹). La mezcla fue incubada a 50°C durante una hora y posteriormente la enzima fue inactivada calentando a 70°C por 15 min. Los ADNc fueron cuantificados por espectrofotometría en nanodrop. Todas las muestras se guardaron a -20 °C hasta su uso.

2.2.9 Determinación de la expresión génica por qRT-PCR.

Todas las amplificaciones de qPCR fueron desarrolladas en un volumen final de 15 μ l, con 7.5 μ l de SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystem), 0.4 μ l (4 mM) de cada primer y ADNc sintetizado a partir de micelio de *P. fijiensis* o *N. benthamiana* infectada. La expresión de los genes del hongo MfAvr4, PfEcp6 y PfLys2 fueron medidos y normalizados usando β -tubulina (del hongo) como gen de referencia. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 30 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. La expresión relativa se normalizo con respecto a la muestra del calibrador (expresión de micelio en medio PDB). Para *N. benthamiana* se evaluó la expresión de los genes PTI5, ACRE31 y PR1 y normalizados usando el gen NbEF1 α , como gen de referencia. Las condiciones de PCR fueron 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 s y 58 °C por 1 min. La expresión relativa se normalizó usando como calibrador una muestra de *N. benthamiana* a 0 dpi. Para cada reacción de PCR se realizó el análisis de la curva de disociación, para asegurar en cada caso que un solo producto fue obtenido. Las relaciones de expresión relativa fueron calculadas usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak y Schmittgen (2001). Los resultados finales son una muestra representativa de experimentos por triplicado, de dos experimentos diferentes.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Infección de *N. benthamiana* con *P. fijiensis*

Se inocularon tres grupos de plantas de *N. benthamiana* con 12×10^4 , 8×10^4 y 4×10^4 fragmentos de micelio respectivamente; cada grupo se realizó por triplicado. Por cada planta se inocularon dos hojas jóvenes cubriendo 6.25 cm² de la región central del haz de la hoja. El experimento de infección fue monitoreado cada 7 días durante 35 dpi (Figura 5). A las dos semanas de inoculación, el micelio sobre la hoja adquirió una tonalidad grisácea-oscura en los tres grupos estudiados, y se mantuvo así hasta el final del experimento.

A los 28 dpi, en el grupo de plantas inoculadas con 12×10^4 fragmentos, mostraron pequeñas áreas ~1 cm de diámetro donde las hojas se veían significativamente más delgadas y ligeramente necrosadas (Figura 5). Las plantas inoculadas con 8×10^4 y 4×10^4 fragmentos aún no presentaban síntomas aparentes. A los 35 dpi el grupo con 12×10^4 fragmentos presentaron áreas de infección cada vez más grandes, abarcando desde un

centímetro de diámetro hasta el 50% de la superficie seleccionada de la hoja. El necrosamiento del tejido estuvo acompañado con pérdida de pigmentación (Figura 5 y 6). A los 35 días, las plantas inoculadas con 8×10^4 y 4×10^4 fragmentos también presentaron áreas de necrosis, distinguiéndose mejor para el grupo inoculado con 8×10^4 fragmentos.

A los 35 días el 66% de las hojas inoculadas con 12×10^4 fragmentos presentaron síntomas de necrosis, mientras que con 8×10^4 fragmentos 33% de las hojas inoculadas mostraron necrosis y solo 16% para la inoculación con 4×10^4 fragmentos. Por lo tanto, la mejor respuesta se obtuvo con 12×10^4 seguida por 8×10^4 fragmentos, mientras que las hojas control permanecieron verdes y sin daño alguno.

A los 35 dpi se puede apreciar el daño generado sobre la hoja, muy probablemente debido al micelio creciendo. En la Figura 6 se pueden apreciar distintos acercamientos del micelio sobre la hoja, donde se observa claramente el micelio con crecimiento en sus bordes con aspecto de estrella.

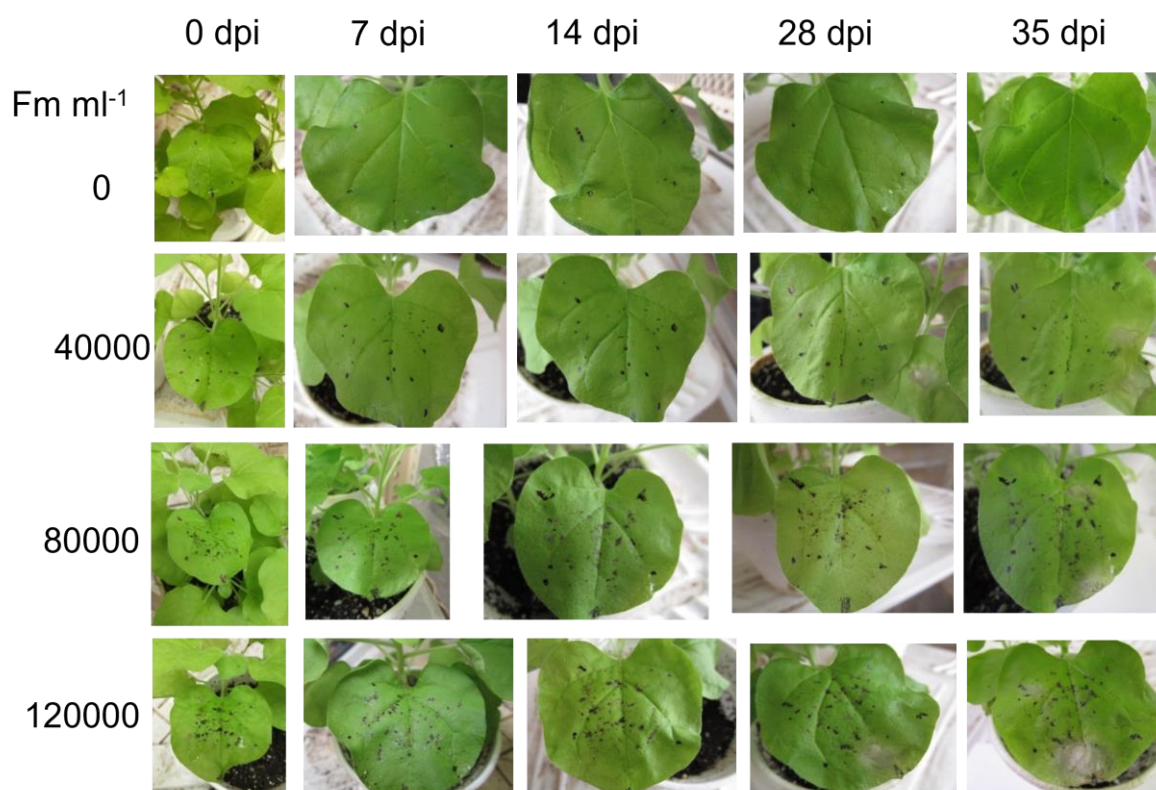


Figura 5. Proceso de interacción de *N. benthamiana* con *P. fijiensis* durante 35 días. Las hojas fueron infectadas con tres diferentes concentraciones de fragmentos de micelio por ml (Fm ml⁻¹). Los inóculos fueron de 4×10^4 , 8×10^4 y 12×10^4 Fm ml⁻¹ en donde la concentración 0 corresponde al control sin fragmentos del hongo. Los puntos negros que se observan en los tratamientos testigo, corresponden a la tinta de marcador indeleble que delimita los límites del área foliar inoculada o no inoculada, con los fragmentos de *P. fijiensis*.



Figura 6. Síntomas desarrollados en las hojas de *N. benthamiana* a los 35 días de interacción con *P. fijiensis*. Inoculaciones con concentraciones de 12×10^4 y 8×10^4 fragmentos de micelio respectivamente. Fotos tomados en el estereoscopio.

Con el propósito de obtener mayor evidencia de la colonización del tejido vegetal de *N. benthamiana* por parte de *P. fijiensis* se realizaron observaciones histológicas en las muestras colectadas a los 35 dpi (Figura 7 y 8). Se comparó la colonización lograda por el hongo con las diferentes cantidades de inóculo y, congruente con lo observado sobre la hoja, se observó mayor cantidad de micelio en el tratamiento con 12×10^4 fragmentos de inóculo inicial. Se notaron hifas en crecimiento hacia las estomas de la planta (7b) y justo en las aberturas de éstas (Figura 7c) y una gran cantidad de hifas septadas (Figura 7 y 8). En algunas muestras inoculadas con 8×10^4 fragmentos se observaron hifas creciendo y siguiendo el patrón del espacio intercelular (8a y 8b), lo que sugiere la colonización de los espacios apoplásticos. En todos los casos se observaron hifas septadas y en crecimiento. Las muestras control no contenían micelio de ningún tipo (7a).

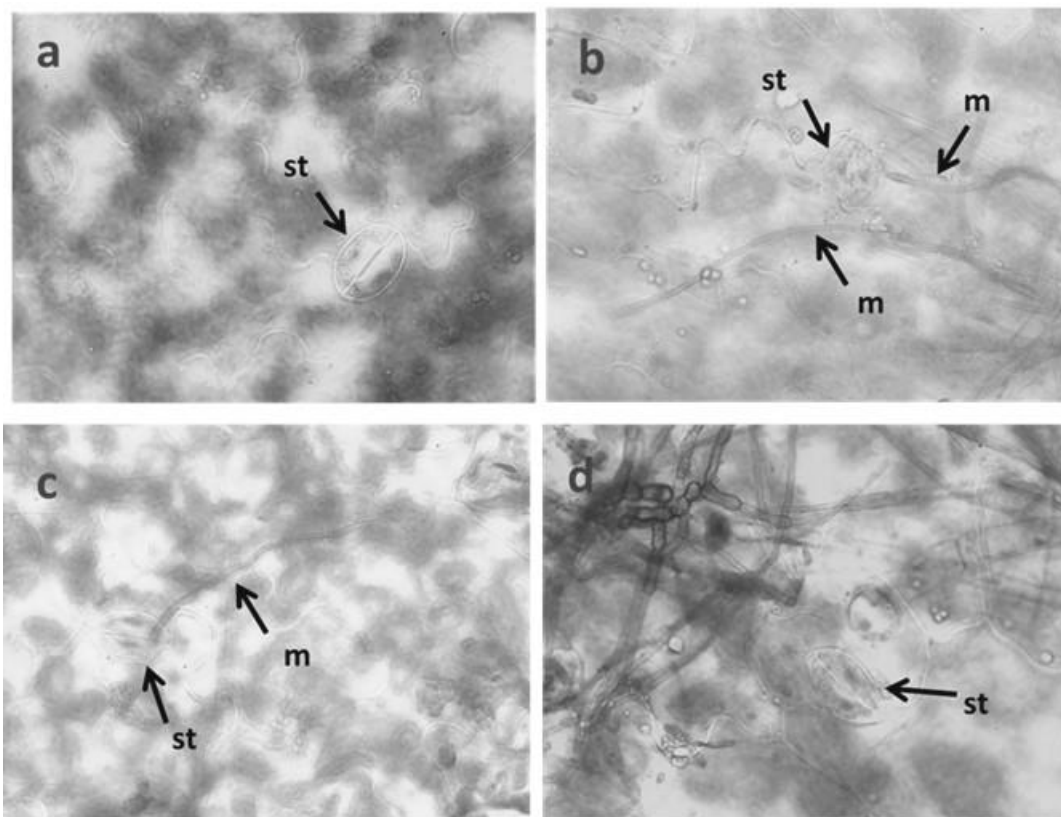


Figura 7. Análisis microscópico del comportamiento de *P. fijiensis* a los 35 días de interacción con las hojas de *N. benthamiana*. Muestras de plantas control (a) y con inóculos de 12×10^4 fragmentos de micelio (b, c y d) colectadas a 35 dpi.

Vistas bajo el microscopio 40X. st, estoma; m, micelio.

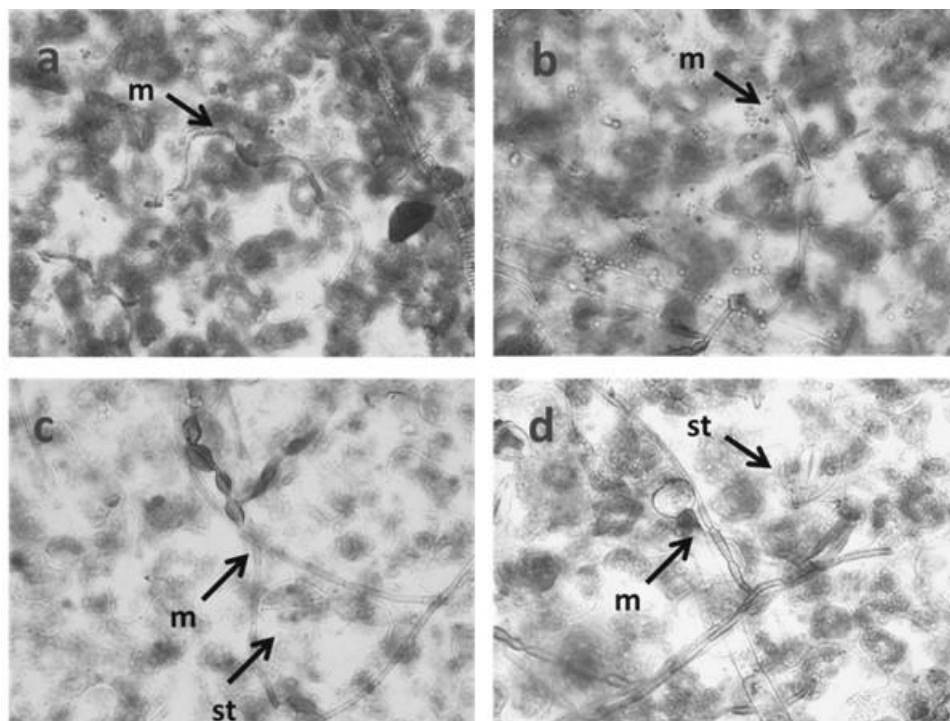


Figura 8. Muestras de plantas tratadas con 8×10^4 (a y b) y 4×10^4 fragmentos de micelio (c y d) colectadas a 35 días. Vistas al microscopio 40X. st, estoma; m, micelio.

2.3.2 Biomasa y actividad metabólica de *P. fijiensis* en *N. benthamiana*

Una vez establecidas las condiciones de edad de la planta y concentración de inóculo inicial, se repitió el experimento bajo las condiciones establecidas de temperatura, humedad y fotoperiodo. El experimento se llevó a cabo usando tres réplicas biológicas e inoculando con 12×10^4 fragmentos de micelio y la evolución del mismo se monitoreo durante 35 días (35 dpi) (Figura 9). Aunque la sintomatología desarrollada por la planta no fue idéntica a la observada en el experimento previo (zonas transparentes), la tonalidad grisácea-oscura del micelio después de los 14 días de inoculación fue reproducible, lo que permitió continuar con los análisis. Con la finalidad de cuantificar la biomasa y la expresión relativa de genes relacionados a *P. fijiensis* se realizaron muestreos los días 0, 14, 21, 28 y 35. Todas las muestras fueron lavadas con agua estéril para eliminar todo el micelio que estuviese sobre la superficie foliar, quedándonos únicamente con la biomasa endógena. Inesperadamente se observó una disminución progresiva de la cantidad de biomasa durante los 35 días del curso temporal (Figura 9).

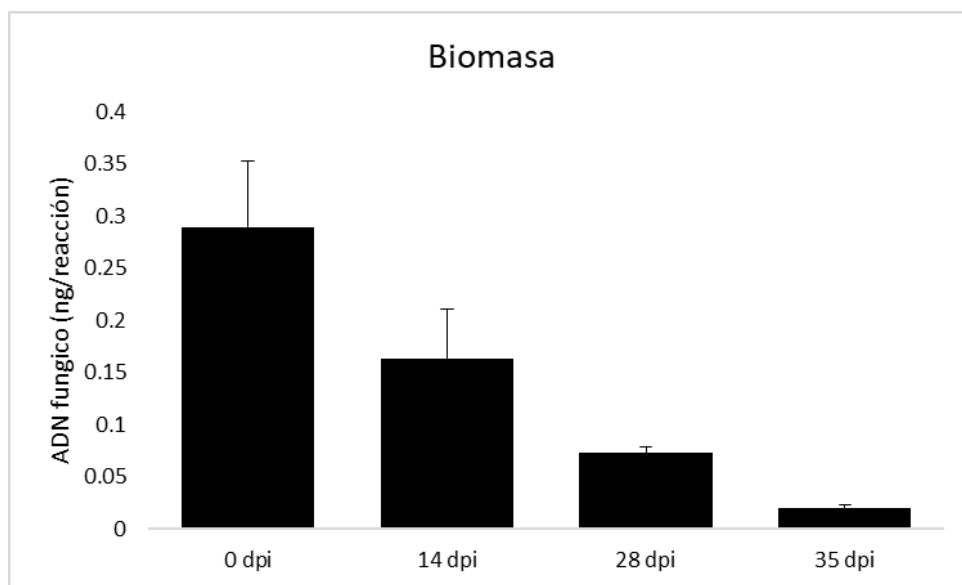


Figura 9. Comportamiento de la biomasa endógena de *P. fijiensis* durante el proceso de infección en *N. benthamiana*. El micelio epifítico fue eliminado lavando el tejido previamente a su extracción.

Para evaluar la actividad metabólica de *P. fijiensis* en *N. benthamiana* se analizaron los genes que codifican a la aminodipato reductasa (PfLys2) y a la lisina pemeasa (PfLyp1). Lys2 fue detectado solamente en el día 35 dpi, mientras que PfLyp1 no se detectó en ningún punto durante el curso temporal analizado (0 a 35 dpi). Es importante destacar que en el caso de Lys2, al día 35 de la infección, no obstante que la biomasa de *P. fijiensis* disminuyó, se observó un incremento en la expresión relativa de Lys2 (~40 veces) con respecto al control (Figura 10).

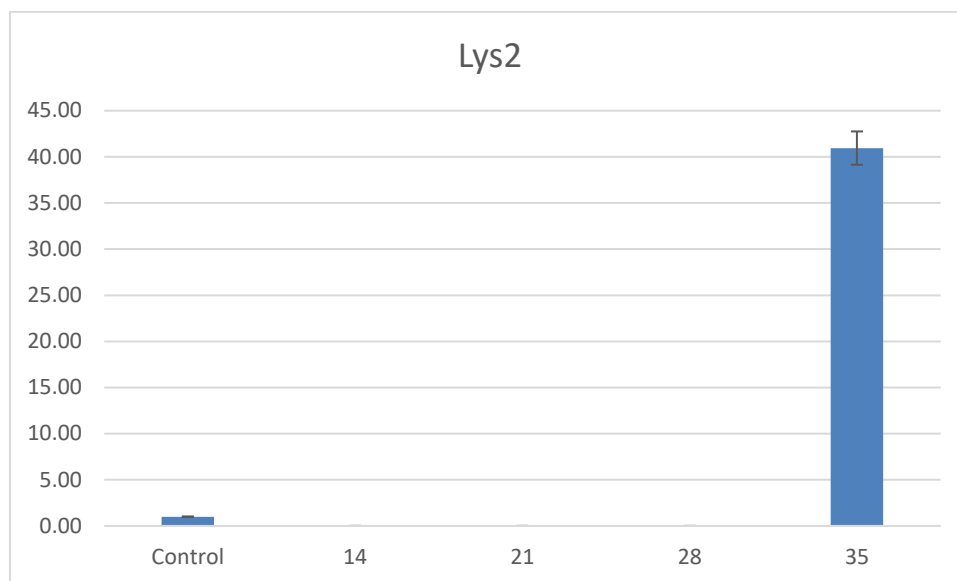


Figura 10. Expresión relativa de PfLys2 de *P. fijiensis* a los 35 días de interacción con *N. benthamiana*.

También se evaluó la expresión de dos genes relacionados a la virulencia de *P. fijiensis*, Avr4 y Ecp6. Avr4 es un efector que actúa uniéndose a la pared celular del hongo, protegiéndolo y evitando su degradación por las quitinasas vegetales (Stergiouopoulos et al., 2010; van Esse et al., 2007); la expresión de este gen en la interacción de *N. benthamiana*-*P. fijiensis* fue observada a partir del día 28 con un nivel de expresión mayor a 70 veces al control y incrementándose a más de 500 veces en el día 35 de la interacción (Figura 11). No se observó expresión de Avr4 a los 14 y 21 dpi. Es interesante que la expresión tanto de Avr4 como de Lys2 se incrementaron de manera notoria en las últimas etapas del experimento, a pesar de que la biomasa del hongo que fue disminuyendo. Por otro lado, Ecp6 corresponde también a un gen de virulencia, que al igual que Avr4 codifica una proteína efectora. Este gen solo fue detectado en la muestra de 35 días de interacción, mostrando una expresión aproximada de tres veces sobre el control (Figura 12). Durante la infección Ecp6 secuestra los oligómeros de quitina, evitando su reconocimiento y de esta manera también bloquea la cascada de señalización del sistema de defensa vegetal (de Jonge et al, 2010). Todos los genes detectados en *P. fijiensis* son expresados mayormente a 35 dpi con excepción de Avr4 que inicialmente fue detectado a los 28 dpi (días después de la inoculación).

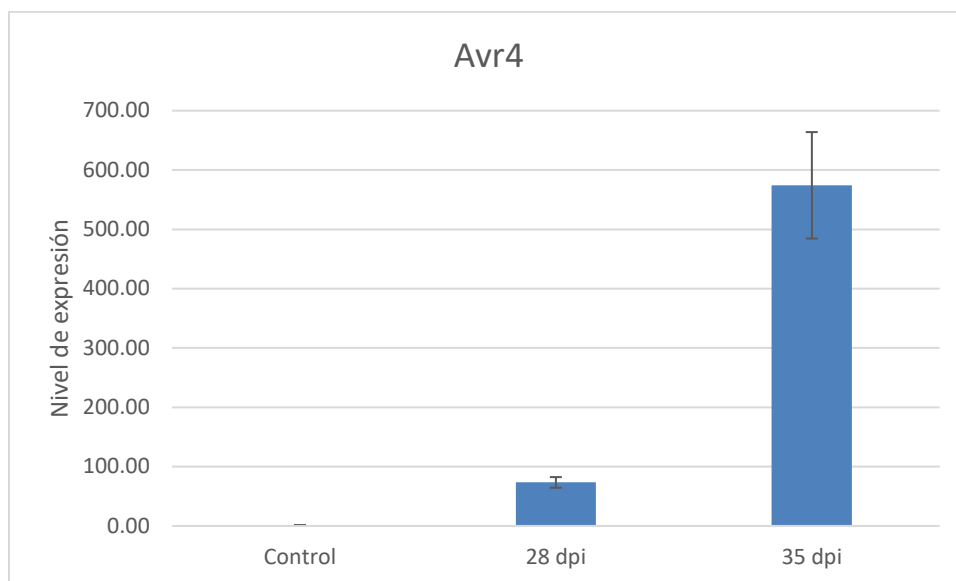


Figura 11. Expresión relativa del gen Avr4 de *P. fijiensis* durante la interacción con *N. benthamiana*. La gráfica es representativa de dos replicas biológicas con tres réplicas técnicas para cada día analizado. En la reacción se utilizó 100 ng de ADNc como templado. Usando como control el gen de β -tubulina de *P. fijiensis*.

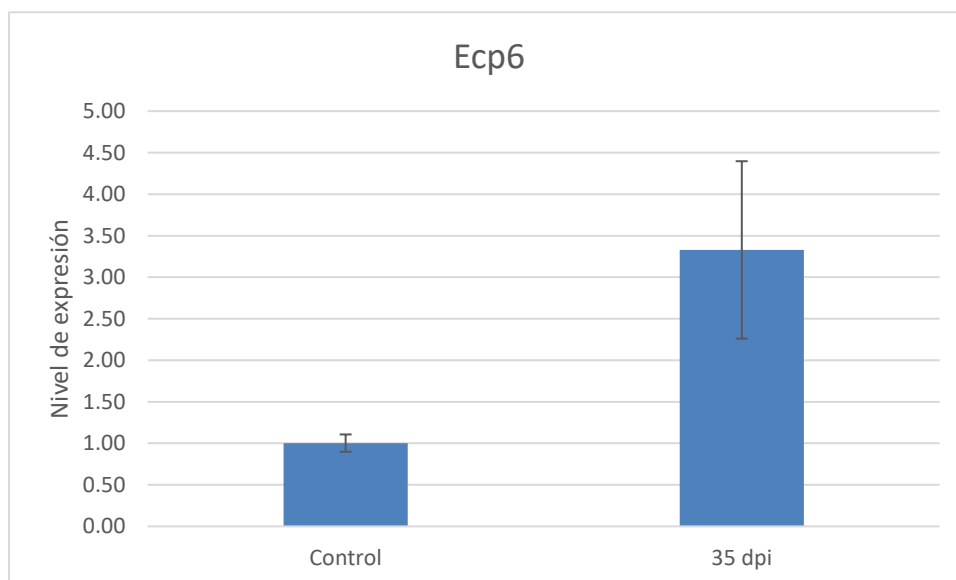


Figura 12. Expresión relativa de Ecp6 de *P. fijiensis* durante la interacción con *N. benthamiana*. La gráfica es representativa de dos replicas biológicas con tres réplicas técnicas para cada día analizado. En la reacción se utilizó 100 ng de

ADNc como templado. Usando como control el gen de β -tubulina de *P. fijiensis*.

2.3.3 Respuesta de *N. benthamiana* ante la infección con *P. fijiensis*

Para evaluar la respuesta de la planta en la interacción *N. benthamiana*- *P. fijiensis* se evaluaron los genes PTI5 y ACRE12 como genes marcadores de la inmunidad desencadenada por PAMPs o PTI (Nguyen et al., 2010) y PR1, un gen marcador de la defensa mediada por el ácido salicílico y la reacción de hipersensibilidad (Zhu et al., 2014). La expresión de estos genes fueron inducidos significativamente tras la inoculación con *P. fijiensis*. PTI5 se observó durante todo el curso temporal, alcanzando su máxima expresión a los 21 dpi y descendiendo a los 28 y 35 dpi (Figura 13). ACRE31 por su parte tuvo un comportamiento similar, expresandose a los 14 días y alcanzando su máximo pico de expresión a los 21 días, y disminuyendo a los 28 y 35 dpi (Figura 14). En el caso de PR1 el perfil de la expresión fue aumentando hasta alcanzar su máximo en los días 28 y 35, este comportamiento fue inverso al observado en PTI5 y ACRE31 (Figura 15). Estos resultados sugieren que *N. benthamiana* puede reconocer a *P. fijiensis* y activar su sistema de defensa al principio mediante PTI5 y ACRE31 y posteriormente por PR1 y así permanecer activo por un periodo largo de tiempo.

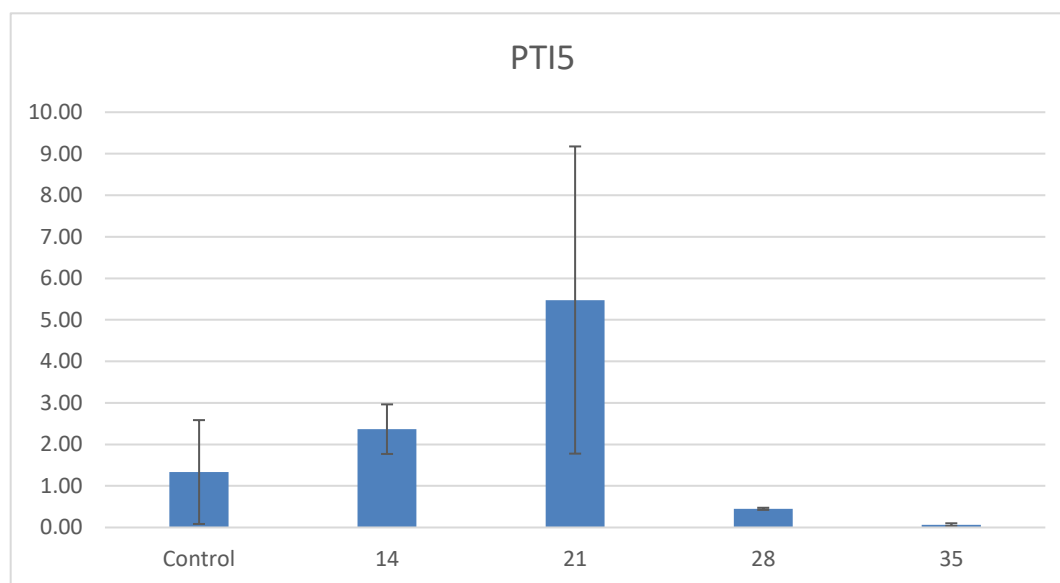


Figura 13. Expresión relativa de PTI5 en *N. benthamiana* durante la infección con *P. fijiensis*.

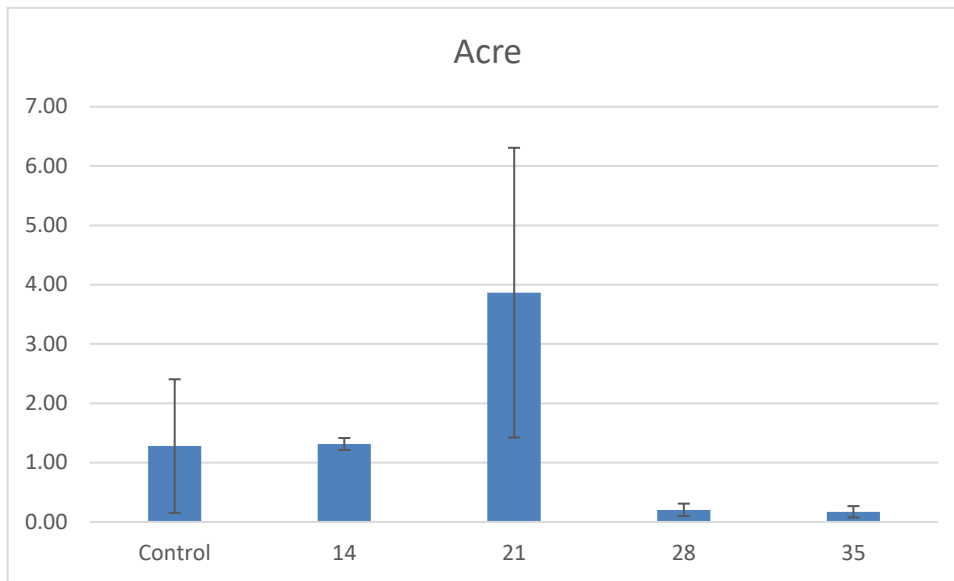


Figura 14. Expresión relativa de Acre en *N. benthamiana* durante la infección con *P. fijiensis*.

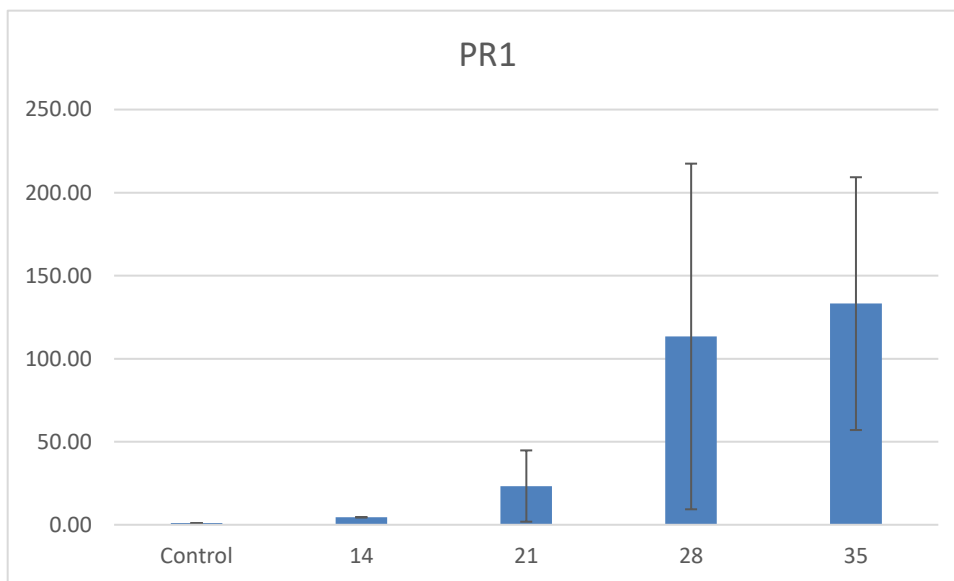


Figura 15. Expresión relativa de PR1 en *N. benthamiana* durante la infección con *P. fijiensis*.

2.4 DISCUSIÓN

Se ha estado trabajando con un sistema de infección artificial de *N. benthamiana* con *P. fijiensis*, como potencial sistema modelo, con el objetivo de estudiar la expresión de genes de *P. fijiensis* y su potencial análisis funcional, como el silenciamiento. Esta estrategia

mantiene cierta similitud descrita por Burgos-Canul *et al.*, (2019) que usó fragmentos de micelio de *P. fijiensis* para infectar fragmentos foliares de banano, su hospedero natural en campo, en el presente trabajo se usaron fragmentos foliares del hongo para infectar *N. benthamiana*. A la fecha se conocen pocas plantas que puedan ser hospederos alternativos de *P. fijiensis*, además del género *Musa*; se pueden mencionar a *Heliconia psittacorum*, *Digitaria* spp, *Wedelia trilobata* y *Xantosoma robustum* (Vázquez-Euán *et al.*, 2019).

En el presente trabajo se exploró la posibilidad de establecer un patosistema usando a *N. benthamiana* como hospedero artificial de *P. fijiensis*, aprovechando las bondades que esta planta ofrece como herramienta de estudio. A diferencia de infecciones con otros hongos no adaptados que infectan a *N. benthamiana* en 4 días (Fodor *et al.* 2018, Adachi *et al.*, 2016), la infección con *P. fijiensis*, un patógeno hemibiotrófico de crecimiento lento *in vitro*, requirió un tiempo prolongado para generar los síntomas visuales de la infección; las observaciones visuales de las hojas de *N. benthamiana* inoculadas con *P. fijiensis* fueron similares a las observaciones por Burgos-Canul *et al.* (2019) en fragmentos foliares de banano. Las observaciones al microscopio mostraron que el hongo se mantiene vivo y en crecimiento por un largo periodo en el tejido y sobre la superficie foliar de *N. benthamiana*, pues se observaron formación de nuevos septos y las puntas de las hifas en crecimiento, los cuales son indicios de división celular; similar crecimiento superficial ha sido reportado para el hongo no adaptado *Ustilaginoidea virens* sobre la planta “Non-host” *Arabidopsis thaliana* a través de la adhesión de los tricomas de esta planta (Andargie *et al.*, 2016).

Pseudocercospora fijiensis fue capaz de penetrar las hojas de *N. benthamiana*, las observaciones microscópicas evidenciaron la cercanía de las hifas con los estomas, sugiriendo que el hongo ingresa dentro del tejido foliar por mecanismos similares a su hospedero natural (Kantún-Moreno *et al.*, 2013). Contrariamente a lo que se esperaba, la biomasa del hongo decayó progresivamente durante el curso temporal de interacción planta-patógeno. Se observó que el hongo logra mantenerse sobre la superficie del tejido foliar de *N. benthamiana*, pero aparentemente no logra establecer una invasión exitosa en el interior. Un factor que pudiera influir en la ineficiente infección es que los genes relacionados a la defensa vegetal que regulan el cierre de los estomas (Lee *et al.*, 2017) estén evitando que suficiente masa fúngica ingrese al tejido foliar de *N. benthamiana*. Trabajos previos han mostrado que oligosacáridos de quitina derivados de pared fúngica

inducen el cierre de las estomas a través de receptores tipo CERK previniendo la penetración del hongo (Ye *et al.*, 2020; Kaundal *et al.*, 2017). Por lo que es probable que solo una fracción de las hifas logran ingresar completamente en el tejido vegetal en las primeras etapas de la infección.

Adicionalmente, se ha cuantificado la expresión por qPCR de dos genes efectores, PfAvr4 y PfEcp6, demostrando la actividad transcripcional del hongo en la planta. Avr4 es una proteína que pertenece a un grupo de efectores que es secretado por hongos como *Cladosporium fulvum* (CfAvr4) durante la infección y juega un papel importante en la virulencia del patógeno, ya que su silenciamiento en *C. fulvum* reduce su virulencia en tomate (van Esse *et al.*, 2007). Esta proteína actúa como lectina uniéndose a la pared celular del hongo protegiéndola y evitando su degradación por las quitinasas vegetales (Stergiopoulos *et al.*, 2010; van Esse *et al.*, 2007). Por otro lado Ecp6 actúa secuestrando los oligómeros de quitina, impidiendo la detección del hongo por la planta y de esta manera evita la cascada de señalización del sistema de defensa vegetal (de Jonge *et al.*, 2010). La expresión de ambos genes da indicios del comportamiento del hongo en la planta, pues ambas proteínas están relacionadas con funciones de enmascaramiento para volver al hongo imperceptible dentro de la planta para ampliar el éxito de su invasión. Específicamente Avr4 contribuye a la virulencia de los patógenos fúngicos que invaden a un hospedero (van Esse *et al.*, 2007), aunque no en todos los casos comparten el mismo mecanismo, por ejemplo, en la infección a soya por *Cercospora cf. flagellaris* el efector Avr4 está asociado a la biosíntesis de cercosporina que probablemente contribuya a la virulencia (Rezende *et al.*, 2020). Sin embargo en el caso de *P. fijiensis* (antes *Mycosphaerella fijiensis*) PfAvr4 es un gen ortólogo de CfAvr4, con 42% de identidad a nivel de proteína, también con capacidad de unirse a la quitina y de proteger a la pared celular (Stergiopoulos *et al.*, 2010). Ecp6 por su parte también es un efector que contribuye a la virulencia. En este trabajo PfEcp6 solo fue expresado en las últimas etapas del experimento (35 dpi), sin embargo aún desconocemos el tiempo máximo de desarrollo en este patosistema. En una situación similar en un estudio transcriptómico en donde se evaluó Ecp6 de *Colletotrichum fructicola* durante la infección en fresa, se observó que este efector se expresaba en las últimas etapas de la infección (96 h) (Zhang *et al.*, 2018). Este patrón de expresión coincide con reportes previos en donde la expresión de Ecp6 fue gradualmente sobrerregulado y alcanzado su punto máximo a los 13 dpi durante la interacción de *Cladosporium fulvum* con

tomate (Bolton *et al.*, 2008). Ambos genes han sido usados como marcadores de virulencia durante el estudio de patosistemas (Ökmen *et al.*, 2014). En estudios de SN donde se evaluó la expresión de Ecp6 como de Avr4 estos aumentaban gradualmente a medida que la infección avanzaba (Kantun-Moreno, datos no publicados).

Las quitinasas por su parte, proteínas identificadas dentro del grupo PR constituyen un poderoso arsenal de defensa de las plantas contra patógenos fúngicos (Grover, 2012) debido a que la quitina por sí misma tiene la capacidad de actuar como inductor y desencadenar la cascada de señalización tipo PTI (Inmunidad desencadenada por PAMPs) durante las primeras etapas de infección (López *et al.* 2020; Li *et al.*, 2022). Curiosamente, las expresiones de PfEcp6 y PfAvr4 no se detectaron en los primeros días por lo que es posible que la planta haya detectado al hongo cuando este ingresó al tejido foliar. Recientemente Li y colaboradores (2022) reportaron que la quitina induce genes marcadores de PTI en hojas de *N. benthamiana* después de 3h. En el presente trabajo no se midió la expresión de genes en las primeras horas, pero congruentemente se detectó la expresión de los marcadores PTI durante el curso temporal, desde el inicio.

A pesar de que el hongo no prospera en el interior de la hoja, no está muerto, como evidencia la expresión de PfLys2, PfEcp6 y PfAvr4 en los días 28 y 35 post-infección. La expresión de estos genes coincide con la caída en la expresión de los genes de defensa PTI5 y ACRE31. Falta determinar si la expresión de estos genes está relacionado o es un hecho circunstancial. Llevar a cabo un curso temporal más largo ayudaría a esclarecer este punto.

CAPÍTULO III

MODIFICACIÓN DEL VECTOR SILENCIAMIENTO EUMV-YP:ΔV1

3.1 INTRODUCCIÓN

El ARN de interferencia se ha establecido como una importante estrategia para el estudio y control en las plantas de diversos patógenos (Dalakouras *et al.*, 2020; Qi *et al.*, 2019; Zotti *et al.*, 2018) además de ser una tecnología amigable con el medio ambiente (Mann, Kashyap, Sanghera, Singh, & Singh, 2008; Sang & Kim, 2020). Las tecnologías de protección vegetal basadas en el mecanismo de ARN de interferencia consisten en silenciar genes blancos de plantas, hongos u otros organismos patógenos que tienen estrecha relación con las plantas (Qi *et al.*, 2019). Esto se logra induciendo a las plantas para que promuevan la producción de ARNdc, complementaria a la secuencia blanco del patógeno, ya sea por medio de la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* o empleando virus modificados como vehículos (Chuntao Yin & Hulbert, 2015). En las plantas se han reportado varios sistemas de inducción del silenciamiento ya sea a través de vectores binarios que sobreexpresan secuencias invertidas separados por un intrón (hpARN) o por el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS), dando lugar a la formación de ARNdc. En la planta de banano, por ejemplo, se ha utilizado el sistema HIGS usando sistemas de transformación por *Agrobacterium* para silenciar genes de virus y hongos (Dou *et al.*, 2020; Ghag, Shekhawat, & Ganapathi, 2014; Shekhawat, Ganapathi, & Hadapad, 2012) así como también se ha empleado sistemas de VIGS para silenciar genes endógenos de banano (Tzean *et al.*, 2009).

El termino VIGS describe una técnica que emplea virus recombinantes que reducen la expresión de genes endógenos mediante el silenciamiento post transcripcional (Baulcombe, 1999). Los VIGS son una alternativa para aquellas plantas en las que no existen mutantes o presentan recalcitrancia a la transformación. Los VIGS son desarrollados a partir de virus vegetales de ADN o de ARN que son modificados para llevar fragmentos del gen a silenciar. Algunos de los VIGS más comunes derivados de virus de ARN son el PVX y el TRV. Por otro lado, la mayoría de los VIGS derivados de ADN provienen de geminivirus, los cuales son virus circulares de cadena simple que se replican por circulo rodante. EuMV-YP:ΔV1 es un VIGS basado en el virus EuMV-YP, aislado de la

planta silvestre *Euphorbia heterophylla* de la península de Yucatán (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). El virus silvestre consiste en dos componentes, el componente A de 2613 nucleótidos y el componente B de 2602 nucleótidos. Estos a su vez comparten una región común (RC) de 165 nt, con una identidad de 86% entre sí. Así mismo, el componente A codifica genes que son requeridos para la replicación y la encapsidación, mientras que el componente B provee funciones para su movimiento local y sistémico (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). El EuMV-YP:ΔV1 (VIGS) es una construcción modificada para crear hemidímeros, añadiendo una región común extra en cada componente. Adicionalmente, el componente A se modificó reemplazando gran parte del gen de AV1 (responsable de la encapsidación) y en su lugar añadiendo un sitio de multiclonaje (SMC, por sus siglas en inglés). Este vector ha demostrado ser capaz de silenciar eficientemente genes endógenos de *N. benthamiana* y de *Capsicum annuum* (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). En un trabajo reciente, Villanueva-Alonzo y colaboradores lograron silenciar genes de macrófagos de ratón (*Mus musculus*) usando el constructo pEuMV-YP: Krt18 que induce la producción de vsiARN en plantas de *N. benthamiana*, logrando el silenciamiento “cross-kingdom” entre plantas y mamíferos (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2022). Un factor importante para tomar en cuenta en el diseño de VIGS y un eficaz silenciamiento es el gen blanco, especialmente en un silenciamiento entre reinos. En el caso de los hongos la mayoría de los genes blanco han sido genes estructurales, reguladores del desarrollo y factores de patogenicidad (Chuntao Yin & Hulbert, 2015). En este trabajo se plantea el silenciamiento de dos genes del hongo fitopatógeno *P. fijiensis*, un gen de tipo estructural (PfLys2) y otro de virulencia (PfAvr4).

Mientras que la lisina es un aminoácido esencial en humanos y animales, que solamente pueden obtenerla con la ingesta de proteínas en su dieta, este aminoácido es sintetizado *de novo* por algas, bacterias, plantas y hongos (Torruella *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2006). Entre los 20 aminoácidos que forman a las proteínas, la lisina es la única conocida que tiene dos rutas biosintéticas: la ruta del diaminopimelato (DAP) presente en bacterias, plantas y algas, y la ruta de α -aminoadipato (AAA) presente en euglenoides y en hongos superiores (ascomicetos y basidomicetos) (Torruella *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2006; Zabriskie y Jackson, 2000). En los hongos, la ruta del α -aminoadipato requiere de ocho pasos y siete enzimas (Zabriskie *et al.*, 2000), entre los cuales la α -aminoadipato reductasa (LYS2) es clave (Nishida y Nishiyama, 2000). Las enzimas de esta ruta representan importantes blancos

para el control de hongos patógenos *in vivo* (Xu *et al.*, 2006), ya que intervienen directamente con el crecimiento y la supervivencia de éstos.

Por su parte Avr4, como se mencionó en el capítulo anterior, es una proteína efectora que es secretada durante la infección y juega un papel importante en la virulencia del patógeno, ya que, por ejemplo, su silenciamiento en *C. fulvum* reduce su virulencia en tomate (van Esse *et al.*, 2007).

Se cree que PfLys2 y PfAvr4 son cruciales en la supervivencia y virulencia de *P. fijiensis* respectivamente, lo que los convierte en blancos atractivos para el silenciamiento y usarlos como modelos para la prueba de concepto, esto es, para evaluar si EuMV-YP:ΔV1 puede ser empleado como vector de silenciamiento contra genes de *P. fijiensis* infectando *N. benthamiana*.

3.2 MATERIALES Y METODOS

3.2.1 Vector de silenciamiento

Se usó el vector de silenciamiento generado por Villanueva-Alonzo *et al.* (2013). Este vector viral es una modificación del EuMV-YP, al cual se le eliminó el gen que codifica para la cápside y se le reemplazó con un sitio de multiclonaje (SMC) que contiene los sitios para las enzimas de restricción *SphI*, *SmaI*, *PstI* y *EcoRV*; el vector fué denominado pEuMV-YP:ΔV1. En este trabajo se escogieron 3 sitios de clonación, *SphI*, *PstI* y *EcoRV*, para asegurar la clonación dirigida de los fragmentos de silenciamiento.

3.2.2 Diseño de cebadores

Los cebadores fueron diseñados a partir del genoma de *P. fijiensis*, disponible en el JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/Mycfi2/Mycfi2.home.html>). Se seleccionó un fragmento de las secuencias codificantes ID 87167 y 46827 de los genes PfAvr4 y PfLys2, respectivamente. Cabe señalar que los fragmentos seleccionados para el silenciamiento tienen un tamaño de 345 pares de bases.

Para realizar el silenciamiento, para cada gen se construyó un par de constructos a partir de pEuMV-YP:ΔAV1, uno que alberga la secuencia en sentido (*sentido*) y otro en sentido opuesto (*antisentido*). Los adaptadores escogidos estuvieron en función del MCS de

pEuMV-YP:ΔAV1. Para los fragmentos *en sentido*, a los cebadores en sentido (Fw) y cebador reverso (Rv) de ambos genes se les añadió el sitio de corte para la enzima *SphI* y *EcoRV* para que la inserción en el sitio de multiclonaje (MCS) del vector sea con orientación dirigida. Para los fragmentos en antisentido se emplearon las mismas secuencias de cebadores, pero se les añadieron los sitios de corte *PstI* y *SphI* respectivamente (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Cebadores usados para la amplificación y clonación de los constructos de silenciamiento de *Lys2* y *Avr4* en pEuMV-YP:ΔAV1.

Gen	Orientación en pEuMV-YP: ΔAV1	Cebador-adaptador	Secuencia 5' a 3'	Tm °C*
<i>Lys2</i>	Sentido	<i>sLy_SphI</i>	<u>GCATGCTGAGATTTTCGCAGCCAACGC</u>	62.6
		<i>sLy_EcoRV</i>	<u>GATATCCCGCTTCCTTCTTAGCCT</u>	64.3
<i>Lys2</i>	Antisentido	<i>aLy_PstI</i>	<u>CTGCAGTGAGATTTTCGCAGCCAACGC</u>	62.6
		<i>aLy_SphI</i>	<u>GCATGCCCGCTTCCTTCTTAGCCT</u>	64.3
<i>Avr4</i>	Sentido	<i>sAv_SphI</i>	<u>GCATGCGAGAATAAACTGCTCGCCAC</u>	63.8
		<i>sAv_EcoRV</i>	<u>GATATCTGTGCGATCCTGTTTCGTGCGC</u>	64.2
<i>Avr4</i>	Antisentido	<i>aAvr_PstI</i>	<u>CTGCAGCGAGAATAAACTGCTCGCCAC</u>	63.8
		<i>aAvr_SphI</i>	<u>GCATGCTGTGCGATCCTGTTTCGTGCGC</u>	64.2

La Tm (*) fue calculada sin considerar los adaptadores. Las secuencias subrayadas corresponden a los sitios de las enzimas de restricción indicadas. El tamaño de los productos esperados en todos los casos son de 345 pb.

El diseño de cebadores se realizó con el software Oligo Explorer 1.5 y fueron analizados con el Oligo Analyzer 1.5 para descartar la formación de posibles estructuras secundarias.

3.2.3 Amplificación y clonación de PflLys2 y PfAvr4 en pGEM®.

Para la amplificación de *Lys2* y *Avr4* cada reacción consistió en 7.5 µl de Master Mix Go Taq, 0.5 µl de cebador sentido (10 mM), 0.5 µl de cebador reverso (10 mM), 1 µl de ADNc (200 ng µl⁻¹), aforado con agua a volumen final de 15 µl. Se procedió con la reacción de PCR con 30 ciclos, en donde cada ciclo consistió de un paso de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, un paso de alineamiento a 59°C por 30 segundos y un paso de elongación a 72°C por 30 segundos.

Los dos fragmentos (sentido y antisentido) de cada uno de los dos genes, fueron clonados en ligaciones individuales en el vector comercial pGEM®-T Easy. La reacción de ligación fue de acuerdo con el manual técnico del fabricante. Posteriormente se transformaron células competentes DH5α, se seleccionaron las clonas positivas y se obtuvo el material plasmídico por lisis alcalina. Los plásmidos se enviaron a secuenciar para confirmar la identidad de los fragmentos clonados.

3.2.4 Subclonación en el vector pEuMV-YP:ΔAV1

Para realizar la clonación de los fragmentos de silenciamiento en el plásmido pEuMV-YP:ΔAV1, se procedió con las dobles digestiones de los plásmidos recombinantes en pGEM®-T Easy, con las enzimas *SphI* y *EcoRV* para liberar los insertos correspondientes a los fragmentos en sentido, y con las enzimas *PstI* y *SphI* para los fragmentos en antisentido. El plásmido pEuMV-YP:ΔAV1 fue sometido a dobles digestiones cada vez, con las enzimas correspondientes, *SphI* y *EcoRV* para clonar los fragmentos en sentido, y *PstI* y *SphI* para clonar en antisentido. Una vez purificados los fragmentos liberados de pGEM-T Easy y el plásmido pEuMV-YP digerido con las parejas de enzimas mencionadas, se procedió a la ligación y tales mezclas de reacción se usaron para transformar células competentes DH5α. Las colonias transformadas se seleccionaron en medio LB en presencia de ampicilina (100 µgml⁻¹). Se realizó PCR en colonia para confirmar la presencia del inserto y se aisló el ADN plasmídico, confirmando por digestión la presencia del inserto. Se prepararon múltiples cultivos de 5 ml de cada clona para aislar suficiente ADN plasmídico de cada constructo de silenciamiento, para los ensayos de bombardeo.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Extracción de ARN y amplificación de *Avr4* y *Lys2*

Se obtuvo ARN total del micelio, observándose las bandas ribosomales (ARNr) 28S y 18S, lo cual demuestra el estado íntegro del material extraído. El ARN total fue utilizado para sintetizar ADNc y realizar las posteriores reacciones de PCR. Las Tms teóricas de los cebadores variaban entre 62°C y 64°C; se usó una Tm 5°C menor, como lo recomienda la ficha técnica del Go Taq® Green Master Mix.

Se realizó la amplificación por PCR de ambos genes, usando la misma temperatura de amplificación (59°C), obteniendo el fragmento del tamaño esperado (345 pb) en ambos casos (Figura 16).

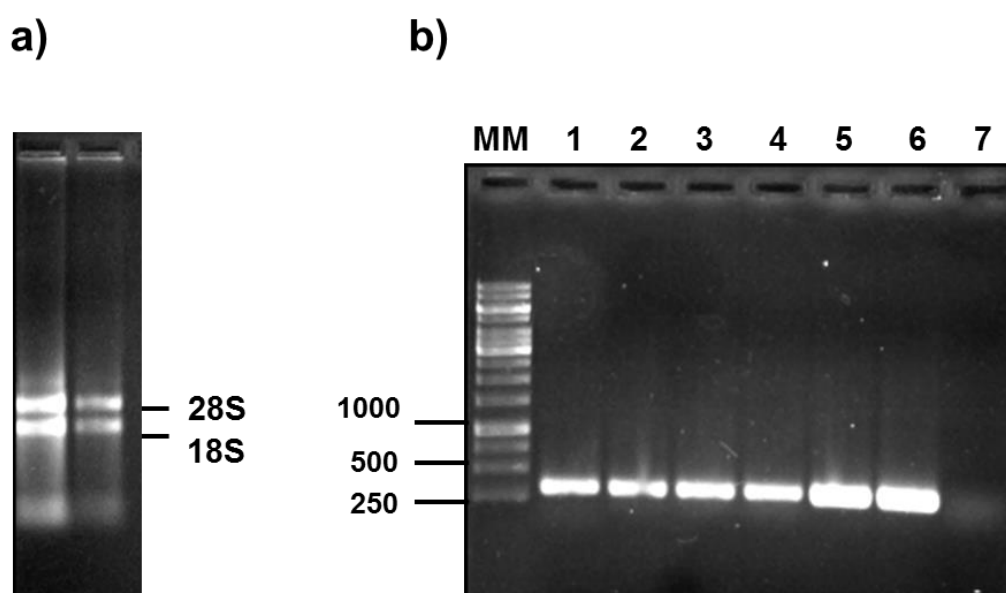


Figura 16. Extracción de ARN y amplificación por PCR de *Lys2* y *Avr4*. a) Extracción de RNA de micelio de *P. fijiensis*; se observan los ARNr 28S y 18S. b) Amplificación por PCR de *Lys2* y *Avr4* con cebadores conteniendo los adaptadores. Carriles 1 y 2 amplificación de *Lys2* en sentido y antisentido usando ADNc, carriles 3 y 4 amplificación de *Avr4* en sentido y antisentido usando ADNc, 5 y 6 amplificación de *Lys2* y *avr4* como testigo positivo usando ADNg, carril 7 agua como testigo negativo.

Una vez amplificados los fragmentos de interés, se procedió con sus clonaciones en el vector pGEM®-T Easy. Se obtuvieron dos colonias para la construcción con el fragmento *sentido* de *Lys2* (fragmentos del gen que contienen *SphI* y *EcoRV* en sus extremos 5' y 3' respectivamente) y 10 colonias para el fragmento en antisentido de *Lys2* (fragmentos del

gen que contienen *Pst*I y *Sph*I en sus extremos 5' y 3' respectivamente). En cuanto al fragmento del gen *Avr4* se obtuvo una sola colonia para el fragmento en sentido y 7 colonias para el fragmento en antisentido (Figura 17). Todas las colonias fueron analizadas por PCR en colonia usando los cebadores específicos para cada gen. Los resultados de PCR en colonia confirmaron que todas las colonias amplificaron los fragmentos esperados.

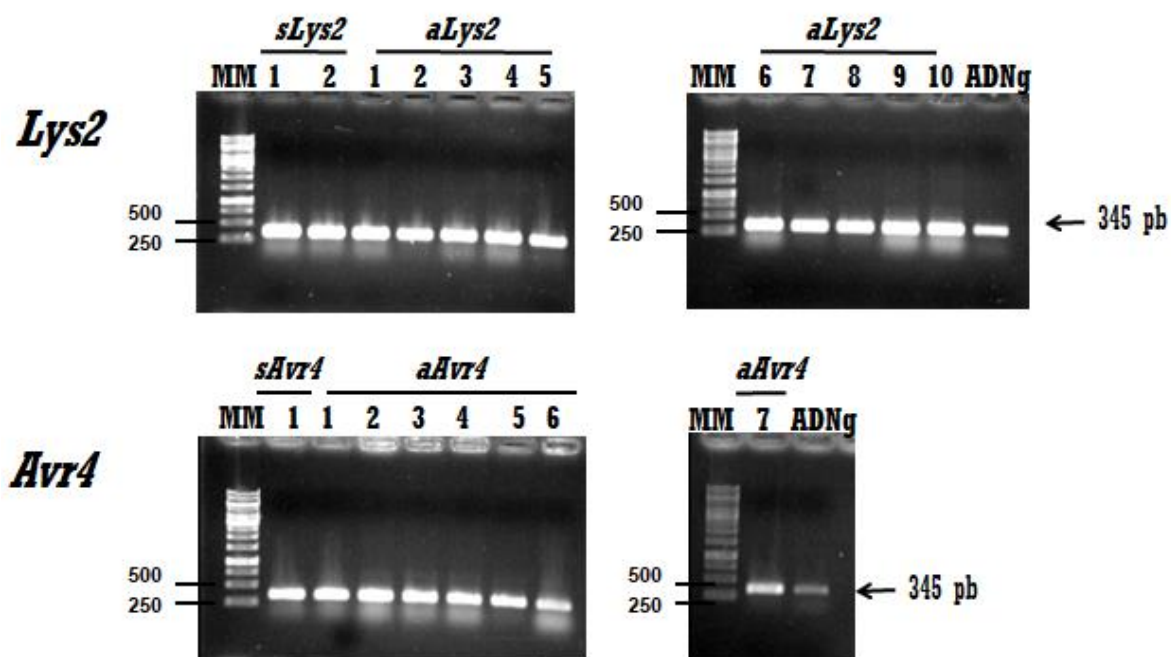


Figura 17. PCR en colonia para confirmar la clonación de los fragmentos en sentido y antisentido de *Lys2* y *Avr4* en pGEM®-T Easy. Panel superior carriles 1 y 2 de *Lys2* en *sentido*, carriles 1-10 de *Lys2* en *antisentido*, último carril control positivo usando ADNg. Panel inferior, primer carril de *Avr4* en *sentido*, carriles 1-7 *Avr4* en *antisentido*, último carril control positivo usando ADNg. Ambos amplicones fueron de 345 pb.

El resultado de la secuenciación confirmó que los fragmentos de *PfLys2* y *PfAvr4* amplificados y clonados coincidieron 100% con las secuencias depositadas en la base de datos JGI y GenBank. En el caso de *PfLys2* correspondió a la secuencia con número de acceso XM_007934283.1 y en el caso de *Avr4* correspondió a la secuencia con número de acceso XM_007927856.1. La Figura 18 corresponde al fragmento consenso (sentido y antisentido) secuenciados de las clonas *PfLys2*.

En el caso de Avr4 se observó 99% de identidad entre las secuencias clonadas y las secuencias en las bases de datos.

Cabe señalar que en todos los casos se añadieron exitosamente los adaptadores para su subclonación en EuMV-YP: Δ V1.

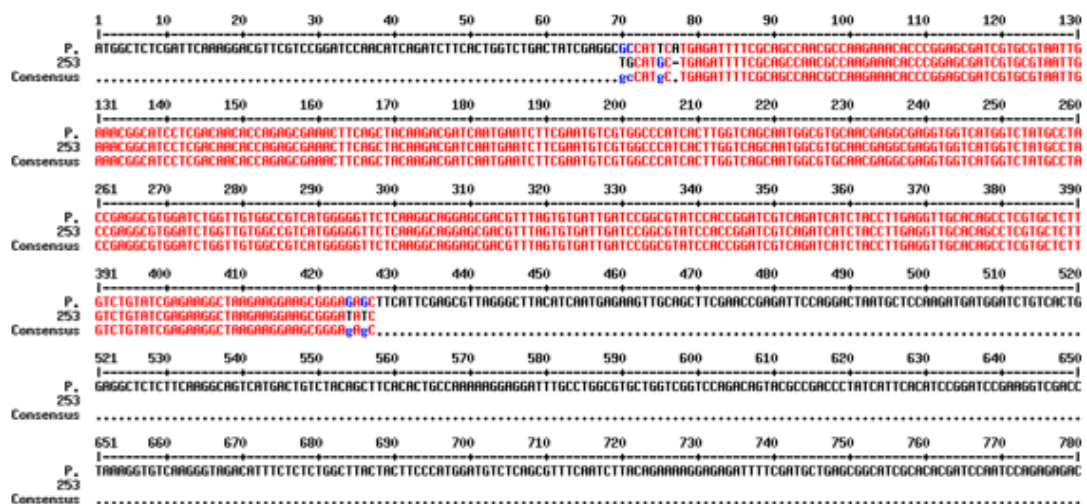


Figura 18. Secuencia de nucleótidos *Lys2* ID 253 (clona 2). En rojo secuencia consenso. Los nucleótidos en azul corresponden a las secuencias de los adaptadores añadidos *SphI* y *EcoRV*, respectivamente.

3.3.2 Subclonación en pEuMV-YP: Δ AV1

Debido a que las enzimas inicialmente usadas estaban presentando algunas fallas en cuanto a su eficiencia en el corte, se decidió adquirir nuevos lotes de *SphI* y *PstI*.

Uno de los problemas posteriores fue que las enzimas no eran compatibles en el uso del amortiguador, por lo que se optó por otra estrategia para liberar los insertos. Los plásmidos (psLys2, paLys2, psAvr4 y paAvr4) primero se digirieron con *SphI* para linearizarlos, enseguida cada digestión se corrió en un gel de agarosa y cada ADN linearizado se purificó

y posteriormente se sometió a una segunda digestión con la enzima de restricción necesaria (*EcoRV* ó *PstI*). Para preparar el vector pEuMV-YP: Δ AV1 se realizó el mismo procedimiento, es decir, digerirlo con las mismas enzimas de restricción correspondientes,

SphI y *EcoRV* para los fragmentos que se clonaron en sentido, y *PstI* y *SphI* para los fragmentos que se clonaron en antisentido (Tabla 2.1).

Usando *SphI* y *PstI* se llevó a cabo la liberación del fragmento del gen de *Lys2* contenido dentro de pGEM T-Easy. De forma similar, usando las mismas enzimas de restricción se llevó a cabo la digestión de pEuMV-YP:ΔAVI para abrir el plásmido (Figura 19C). Luego se llevó a cabo la ligación del fragmento de *Lys2* en pEuMV-YP: ΔAVI como se observa en la figura 19C. Los productos de las ligaciones se usaron para transformar células competentes DH5α y se obtuvieron ocho colonias transformadas (Figura 19A). Se realizó la extracción de ADN plasmídico de cada una de estas colonias y se analizaron cinco transformantes mediante PCR punto final para confirmar que el fragmento estuviese clonado. Se obtuvieron 5 clonas positivas, las cuales se llamaron pEuMV-YP:aLys2 (Figura 19B, carriles 1-5). En el resultado de PCR se observa la amplificación de *Lys2* con un tamaño de 345 pb y se puede observar una ligera banda en el testigo positivo como se aprecia en la figura 19B, debido a la gran cantidad de plásmido usado como templado se observa una contrastante diferencia entre el testigo positivo y las amplificaciones de cada una de las clonas.

La obtención del constructo pEuMV-YP:aLys2 fue confirmada por secuenciación teniendo 100% de identidad. Además, una doble digestión de este vector usando las enzimas de restricción *SphI* y *PstI* demostró la liberación del fragmento de interés (Figura 20A). Para la clonación del fragmento en sentido (sLys2) se usaron las enzimas *SphI* y *EcoRV* mediante digestiones individuales.

Para la clonación en pEuMV-YP:ΔV1 del fragmento antisentido de *Avr4* (pEuMV-YP:aAvr4) se usó como chasis el constructo pEuMV-YP:aLys2, es decir, se liberó el fragmento aLys2 con *PstI* y *SphI* y el vector vacío se purificó y se le ligó el fragmento de aAvr4 previamente liberado de pGEM-T Easy, también liberado con las mismas enzimas. En la figura 20B se observa las digestiones de pEuMV-YP:aLys2 y de pGEM:aAvr4 con las enzimas de restricción *PstI* y *SphI*. Para la construcción de pEuMV-YP:sAvr4 se usó una estrategia similar, pero usando las enzimas *EcoRV* y *SphI* sobre el constructo pEuMV-YP:sLys2, realizando digestiones individuales y secuenciales. Finalmente, las construcciones se confirmaron mediante PCR (Figura 21) con cebadores específicos de los insertos.

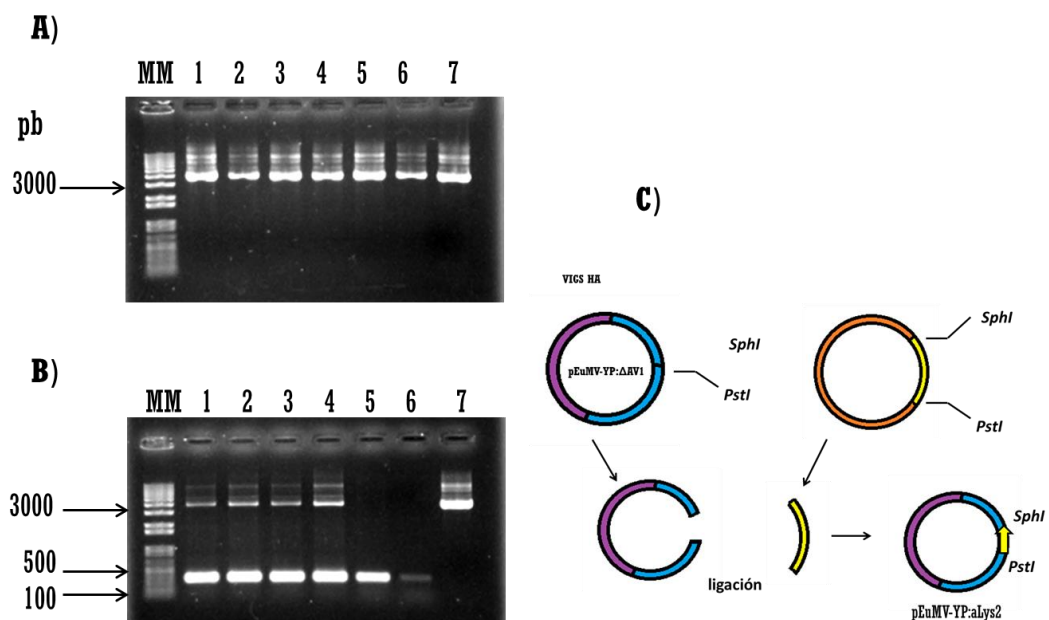


Figura 19. Clonación en antisentido del fragmento *PfLys2* en pEuMV-YP:ΔAVI. a) Carriles 1-7, ADN plasmídico recuperado de 7 colonias obtenidas en el proceso de transformación con pEuMV-YP:aLys2. b) Confirmación por PCR de cinco clonas que contenían el inserto de *Lys2* (carriles 1-5); carril 6, testigo positivo; carril 7 ADN plasmídico de la colonia 8. c) Esquema de obtención de pEuMV-YP:aLys2 a partir de pGEM:aLys2.

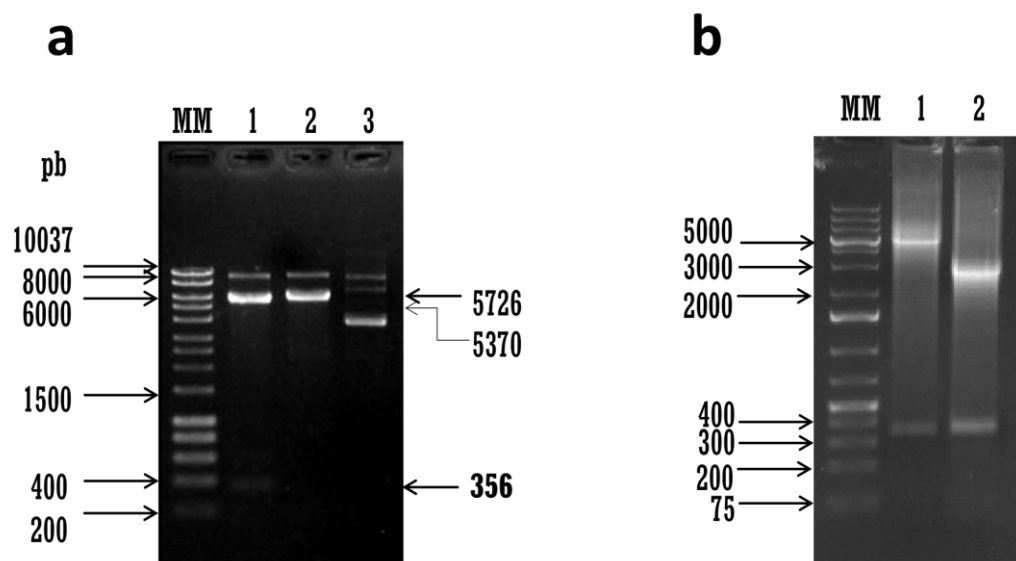


Figura 20. a) Confirmación de la construcción de pEuMV-YP:aLys2. El carril 1 muestra la liberación del inserto de 356 pb (incluyendo etiquetas) por doble

digestión con SphI y PstI. Carril 2, digestión con PstI. Carril 3, plásmido no digerido. b) Digestión de pEuMV-YP:aLys2 y de pGEM:aAvr4 con PstI y SphI. Carril 1, liberación del fragmento aLys2 y linearización de pEuMV-YP:ΔV1. Carril 2, liberación de aAvr4. Base para la construcción de pEuMV-YP:aAvr4 a partir de pEuMV-YP:aLys2 como chasis.

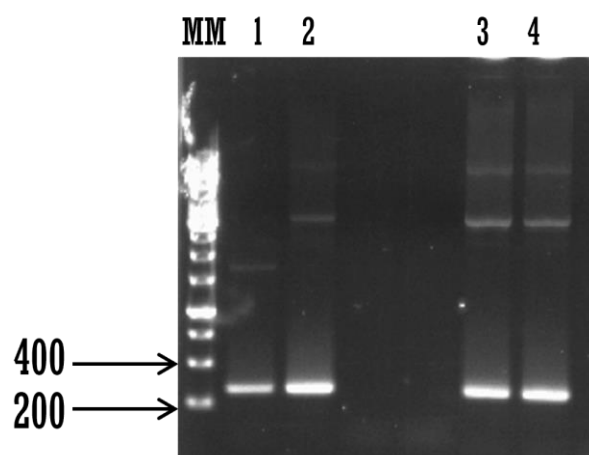


Figura 21. Confirmación por PCR de la clonación de Lys2 y Avr4 en pEuMV-YP:ΔV1. Carril 1 y 2, fragmentos de Lys2 en sentido y antisentido; carril 3 y 4, fragmento de Avr4 en sentido y antisentido; MM, marcador molecular.

3.4 DISCUSIÓN

A pesar de que la clonación de solo un fragmento del gen a silenciar es suficiente para la producción de siRNA por este vector viral (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013), la mayoría de los trabajos de silenciamiento de genes en otros organismos a través de “crosskingdom” se diseñan de tal modo que los vectores produzcan estructuras tipo horquillas (Ghag y Ganapathi, 2019; Qi *et al.*, 2018). De hecho, Villanueva-Alonzo *et al.* (2022) reportaron que la acumulación más grande de vsiRNA provenía de las regiones que se superponen (formación de dsRNA) y que esto era consistente con otros virus del género begomovirus (Chellappan *et al.*, 2005). En este trabajo, las construcciones de silenciamiento se diseñaron para que las estructuras sentido y antisentido produzcan una mayor cantidad de vsiRNA, y por lo tanto incrementa la probabilidad de éxito de silenciar los genes Avr4 y Lys2.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS FUNCIONAL EN BANANO: EVALUACIÓN DEL SISTEMA VIGS BASADO EN EL EUMV-YP

4.1 INTRODUCCIÓN

Se han reportado varios sistemas de inducción del silenciamiento de genes vegetales, como por ejemplo a través del silenciamiento génico inducido por virus (VIGS), dando lugar a la formación de ARNdc. Sin embargo, son pocos los reportes en los que usa vectores virales para análisis funcional en banano. En el caso del banano son más los reportes que usan el sistema HIGS para silenciar genes de virus como de hongos (Dou et al., 2020; Ghag, Shekhawat, & Ganapathi, 2014; Shekhawat, Ganapathi, & Hadapad, 2012).

Por ejemplo el grupo de Ghag (2014) generó un total de 23 líneas transgénicas a partir de cultivos embriogénicos que sobreexpresaban fragmentos invertidos de dos genes de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (Foc), patógeno causante del marchitamiento de banano. Estos genes codifican proteínas importantes de Foc llamadas *velvet* y *Factor 1 de la transcripción*, ambos relacionados con el crecimiento, el desarrollo y la patogénesis. Las plantas expresaban siARNs a partir de fragmentos invertidos separados por un intrón, formando una estructura tipo horquilla (hpARN). Dichas líneas fueron capaces de sobrevivir al menos durante seis semanas sin generar síntomas de Foc1. Más tarde otro grupo de investigación generó cuatro líneas transgénicas de banano capaces de silenciar genes de Foc4 involucrados en la síntesis de ergosterol (Dou et al., 2020). Estos genes correspondían a *C-24 esteroil metiltransferasa* (ERG6) y al *citocromo P450 lanosterol C-14 α dimetilasa* (ERG11). Estas cuatro líneas tuvieron menor tasa de infección comparado con el control, tanto en el primer como en el segundo año.

HIGS y VIGS son dos herramientas biotecnológicas con potencial para estudiar hongos patógenos en cultivos de interés comercial, como el banano. Sin embargo, el uso de HIGS es un tema debatido y tiene que ser regulado. Hasta el momento son pocos los sistemas en banano que se han desarrollado sin que implique una modificación genética de la planta. Un ejemplo es el trabajo de Tzean et al (2019) en el que desarrollaron un sistema de silenciamiento viral VIGS basado en el *Cucumber mosaic virus* (CMV), un virus previamente

aislado de plantas de banano. La eficiencia de este vector se demostró al silenciar dos genes endógenos de *Musa* subgrupo Cavendish y *Nicotiana benthamiana*. Ambos genes funcionaron como marcadores visuales del silenciamiento, los cuales fueron la *glutamato 1-semialdehído aminotransferasa* (GSA) y la *fitoeno desaturasa* (PDS), que al ser silenciados mostraron un fenotipo de clorosis y blanqueamiento, respectivamente (Tzean *et al.*, 2019).

En este trabajo se desea evaluar el vector viral basado en el EuMV-YP para silenciar genes endógenos marcadores de *M. acuminata*.

4.2 MATERIALES Y METODOS

4.2.1 Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores de *MaPDS* se tomó en cuenta la secuencia No. JQ762260.1 reportada en el Genbank. Las secuencias de nucleótidos 5'-CTGCAGTATCGGATCTGTCTCTCCCA-3' y 5'-GCATGCACAGTGTCTCAAGTTCAGGC-3' corresponden a los cebadores sentido y reverso, respectivamente, a los que se les añadieron los adaptadores.

4.2.2 Amplificación y clonación de MaPDS

Para la amplificación de MaPDS la reacción consistió en 7.5 µl de Master Mix Go Taq, 0.5 µl de cebador sentido (10 mM), 0.5 µl de cebador reverso (10 mM), 1 µl de ADNg (100 ng µl⁻¹), aforado con agua a volumen final de 15 µl. Se procedió con la reacción de PCR con 30 ciclos, en donde cada ciclo consistió en un paso de desnaturalización de 95°C por 30 segundos, un paso de alineamiento de 59°C por 30 segundos y un paso de elongación a 72°C por 30 segundos. El producto de PCR fue clonado en pGEM-T Easy. Posteriormente, fue subclonado a EuMV-YP:ΔV1 para dar lugar a la construcción EuMV-YP:MaPDS.

4.2.3 Bombardeo

Se bombardearon plantas de *Musa acuminata* cv. Enano gigante y *N. benthamiana* (testigo positivo) con partículas de oro de 1 µm cubiertas con 5 µg de ADN de cada uno de los hemidímeros A y B de EuMV-YP, como se describió previamente (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013; Kjemtrump *et al.*, 1998).

El bombardeo fue realizado a 2 cm de distancia del haz de la hoja, con una presión de 60 PSI, con equipo de fabricación artesanal, utilizando gas helio. Después de ello, las plantas se mantuvieron en un cuarto de cultivo a 25°C en condiciones de fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad. El virus fue bombardeado en las hojas número 3 y 4 (numeradas de arriba hacia abajo).

4.3 RESULTADOS

Con el fin de establecer si el virus es capaz de replicarse y moverse en el banano, se muestrearon 100 mg de tejido del ápice de las hojas más jóvenes en los días 14 y 21 posteriores a la inoculación (dpi). Es decir, se muestrearon hojas jóvenes, que no fueron las que se bombardearon.

Con el objetivo de evaluar la eficiencia del silenciamiento de genes en banano (*Musa acuminata*) por pEuMV-YP: Δ VI se usó un marcador visual de fácil seguimiento (MaPDS). El silenciamiento de la PDS tiene como consecuencia la fotooxidación de la clorofila (Kumagai *et al.*, 1995) y por lo tanto se esperaba en un fenotipo de hoja blanca con pEuMV-YP:MaPDS. La construcción del pEuMV-YP:MaPDS se llevó a cabo de forma similar a la cdescrita en el capítulo anterior. En la figura 23 se observan 4 clonas del fragmento antisentido. Se analizó una clona y resultó positiva (Figura 24). A esta construcción se le llamó pEuMV-YP:MaPDS, el cual fue confirmada por secuenciación.

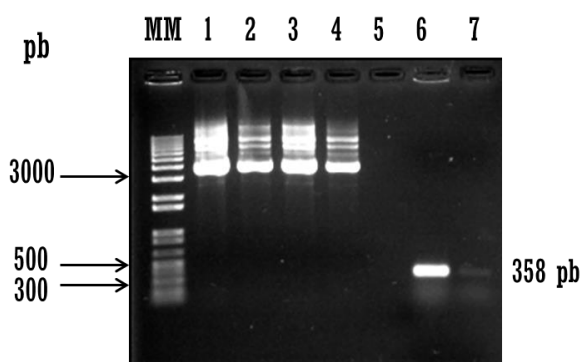


Figura 22. Clonación de un fragmento en antisentido del gen de *MaPDS* en pEuMV-YP: Δ AVI. Carriles 1-4, clonas obtenidas en el proceso de transformación; Carril 6, clona positiva, con el inserto de PDS; Carril 7, testigo negativo.

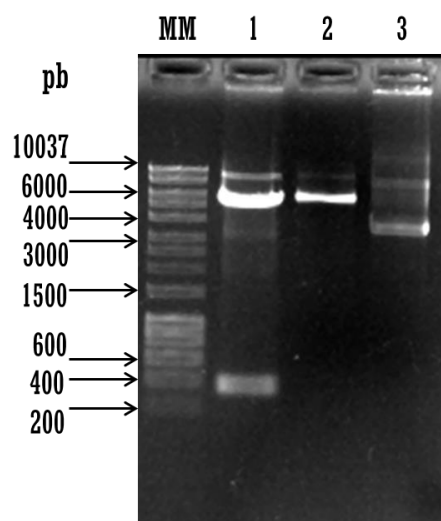


Figura 23. Digestión de EuMV-YP:MaPDS. Carril 1, fragmento de MaPDS liberado con *SphI* y *PstI*; carril 2, EuMV-YP:MaPDS digerido con *EcoRV*; carril 3, EuMV-YP:MaPDS sin digerir. Gel de agarosa 1%.

4.3.1 Bombardeo de banano y *N. benthamiana* con EuMV-YP

Se bombardearon plantas de banano y de *N. benthamiana* con el virus silvestre EuMV-YP. Los síntomas fueron monitoreados en ambas plantas durante los días posteriores a la inoculación (dpi). Como era de esperarse, los síntomas característicos que causa el virus se presentaron en los primeros 14 dpi en las plantas de *N. benthamiana* (Figura 25); estos son, enrollamiento de las hojas, mosaicos ligeros y ondulaciones en la superficie.

Por otra parte, en las plantas de banano no se observó síntoma alguno (Figura 25); a pesar de ello, cuando se realizaron las pruebas por PCR anidada para la detección del begomovirus se comprobó que a los 14 y 21 dpi el virus se había replicado y dispersado del sitio de inoculación en *N. benthamiana* (Figura 25). Este fragmento llamado “core” tiene un tamaño aproximado de 576 pb que contiene regiones únicas y conservadas del gen de la cápside de los begomovirus. Cabe señalar que la amplificación se realizó con cebadores degenerados que amplifican la región “core” de los begomovirus. En la figura 26 la región “core” corresponde a las bandas inferiores, mientras que las bandas superiores son amplificaciones inespecíficas. En banano se observó en los triplicados tanto a los 14 como 21 dpi.

Es importante mencionar que la toma de muestra en ambos casos se llevó a cabo en hojas nuevas, es decir, que no habían sido bombardeadas, lo que permitió evaluar la movilidad del virus dentro de la planta. Este resultado es importante porque sugiere que EuMV-YP es capaz de replicarse y moverse en banano.

Para evaluar la eficacia del vector viral se bombardearon plantas de *M. acuminata* con los vectores virales que contenían el fragmento en antisentido de la PDS. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia en cuanto a la coloración durante los 14 y 21 días con respecto al vector vacío (Figura 27).

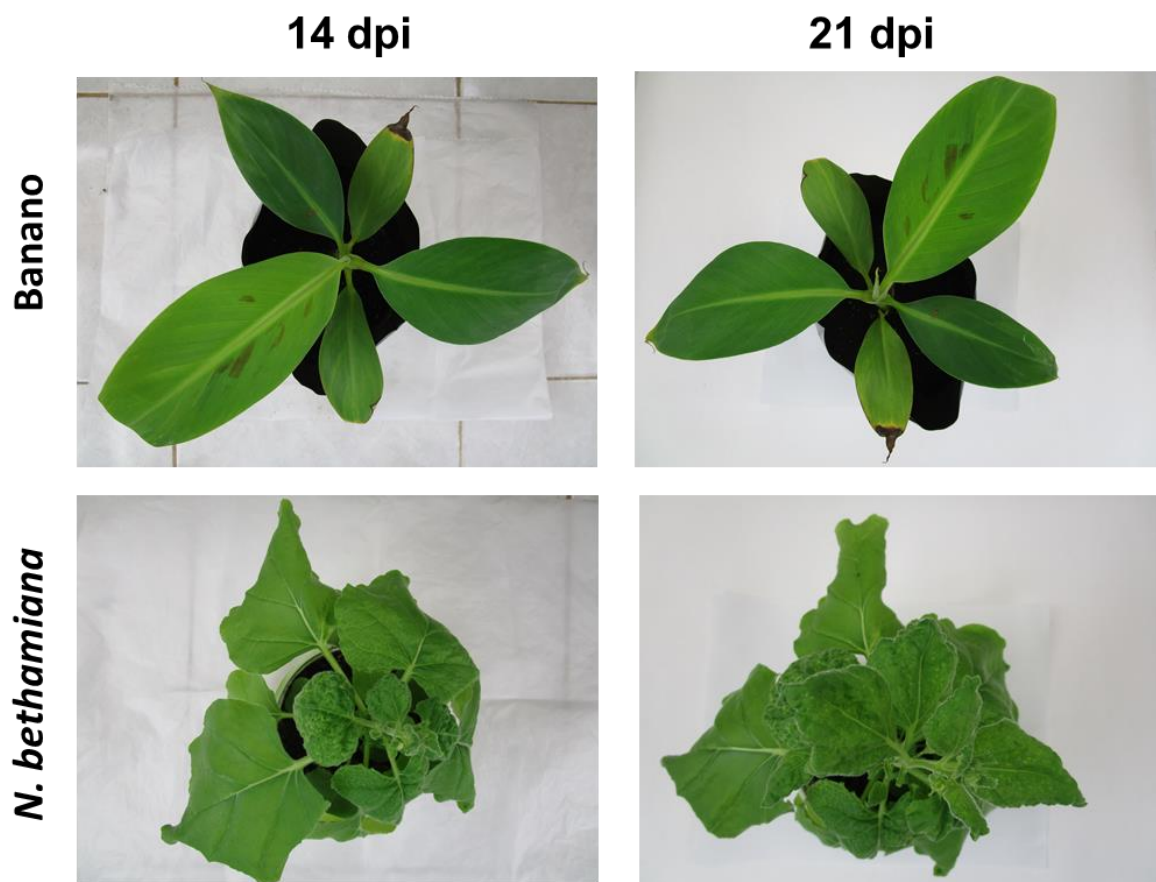


Figura 24. Plantas de banano y *N. benthamiana* bombardeadas con EuMV-YP, y

fotografiadas a los 14 y 21 dpi. Las plantas de *N. bethamiana* mostraron los síntomas característicos desde el día 14, mientras que banano no presentó ningún síntoma fenotípico por la infección por el virus.

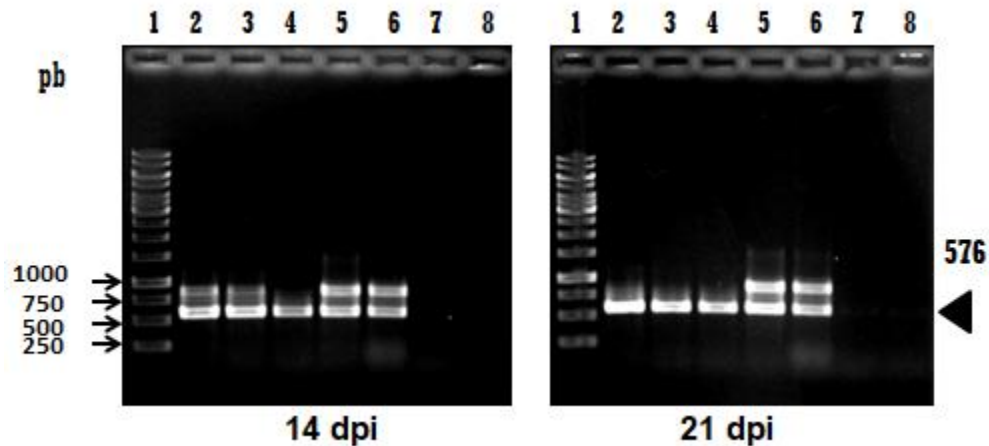


Figura 25. Detección por PCR de la presencia de EuMV-YP en plantas bombardeadas de *Musa acuminata* y *Nicotiana bethamiana*. Carriles 2-4, plantas de banano bombardeadas; 5 planta de *N. bethamiana* bombardeada; 6 control positivo de la PCR usando genoma A de EuMV-YP como templado; 7 control negativo usando ADNg de banano sin infectar; 8 control negativo usando agua. El gel de la izquierda corresponde a las plantas 14 dpi; el gel de la derecha a las plantas con 21 dpi. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1%; la región amplificada corresponde al “core” del virus.



Figura 26. Plantas de banano (*Musa acuminata*) bombardeadas con EuMV-YP:AV1 (vector vacío) y EuMV-YP:PDS (VIGS:PDS) fotografiadas a los 14 y 23 dpi. Ninguna de las plantas bombardeadas con VIGS:PDS mostró síntoma de blanqueamiento. No se observaron diferencias respecto a las plantas control (VIGS vacío).

4.4 DISCUSIÓN

Los patógenos fúngicos representan un grupo importante de invasores vegetales que son agentes causales de una gran variedad de enfermedades y pérdidas económicas (Hua et al., 2018). Una de las enfermedades más importantes en el sentido económico es la SN causada por el hongo *P. fijiensis*, que afecta gravemente la producción de banano. A consecuencia de todas esas enfermedades causadas por hongos han surgido una gran variedad de métodos para combatirlas, desde los métodos tradicionales hasta los métodos biotecnológicos. En ese sentido en las últimas décadas se han venido desarrollando métodos basados en ARNi. Existen datos en la literatura que sugieren que el uso de HIGS y VIGS son herramientas biotecnológicas importantes con gran potencial para el control de hongos (Zotti et al., 2018; Majumdar et al., 2017; Baulcombe, 2015; Nunes y Dean, 2012).

Hasta el momento no hay reportes en la literatura que use el sistema de ARNi para el control de la SN en banano. En este trabajo se evaluó un sistema de silenciamiento inducido por virus (VIGS), basado en EuMV-YP, explorando su potencial como un modelo rutinario para estudiar a mayor profundidad la interacción banano-*P. fijiensis*. Se ha reportado que además de su hospedero natural (*Euphorbia heterophylla*) (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007), este virus es capaz de infectar a una gran diversidad de especies de plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Capsicum chinense*, *N. benthamiana*, *Jatropha curcas* y *Ricinus comunis*, con diferentes grados de severidad (Villanueva-Alonzo, 2013). Este rango de hospederos abarca al menos 4 familias de plantas. Banano pertenece a la familia de las *Musaceae* y similar a lo reportado en *A. thaliana* (Villanueva-Alonzo, *et al.*, 2013), banano no mostró síntomas causados por EuMV-YP; sin embargo, los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que el virus puede replicarse y moverse en la planta durante 21 días. Un hecho relevante es que las plantas hospederas de los begomovirus son dicotiledóneas y aunque banano es una planta monocotiledónea, el virus fue capaz de interaccionar con sus proteínas para llevar a cabo la replicación. En solanáceas los síntomas son el reflejo de los altos nivel de transcripción del virus en el hospedero, que altera la homeostasis y el desarrollo vegetal (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013), en contraste con la ausencia de cambios aparentes en la planta de banano; esto sugiere poca transcripción del virus. En este trabajo también se evaluó la capacidad del vector viral EuMV-YP:ΔAVI (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013) para silenciar el gen de la PDS en banano. El gen que codifica a la fitoeno desaturasa (*PDS*), está involucrado en la ruta de biosíntesis de los carotenoides; donde al reducirse la expresión de *PDS* conduce a una rápida destrucción de la clorofila por fotooxidación, que posteriormente resulta en un fenotipo de hoja blanca (Kumagai *et al.*, 1995). El silenciamiento de *PDS* es ampliamente usado como gen reportero para evaluar la eficiencia de un vector viral y realizar un seguimiento visual del proceso de silenciamiento (Romero *et al.*, 2011). Para evaluar el silenciamiento de *MaPDS*, se tomaron en cuenta los mismos periodos de tiempo en el que el EuMV-YP fue previamente detectado. Para ello se monitoreó visualmente en los días 14 y 21 después del bombardeo. Desafortunadamente, en ninguno de los días evaluados se observó fenotipo de hoja blanca en la planta de banano. Este resultado es contrastante con los resultados obtenidos con *N. benthamiana* (Villanueva-Alonzo, 2013), principalmente debido a que las solanáceas son hospederas naturales de los begomovirus como el EuMV-YP. Además *N. benthamiana* es un modelo por excelencia para el estudio de virus

o estudios funcionales de genes usando VIGS (Godin *et al.*, 2008). Por lo tanto, a pesar de que el vector VIGS pudiese estar replicándose en banano, probablemente no tiene suficiente eficiencia para lograr silenciar el gen en cuestión. Banano no es un hospedero natural de EuMV-YP, por lo que, puede existir poca afinidad entre las proteínas del hospedero con las del virus, pero suficiente para que el virus sea replicado y transportado a otros sitios de donde se bombardeó. En un trabajo realizado por Tzean y colaboradores (2019), desarrollaron un sistema de silenciamiento VIGS basado en el “cucumber mosaic virus” (CMV), un virus previamente aislado de plantas de banano. Este grupo logró silenciar la expresión de MaPDS y MaGSA (Glutamato 1-semialdehído aminotransferasa) logrando observar fenotipos de blanqueamiento y clorosis, respectivamente. Es muy probable que el contraste en los resultados con este trabajo se deba a que el CMV pueda infectar de manera natural a banano.

Aunque al momento no hay reportes de silenciamiento tipo HIGS con el patosistema de banano-*P. fijiensis*, existen argumentos que sugieren que tendría éxito al menos en condiciones del laboratorio. Existen trabajos pioneros donde se han silenciado genes de hongos del género *Fusarium* usando el sistema HIGS en banano (Dou *et al.*, 2020; Ghag *et al.*, 2014) y también se ha comprobado la funcionalidad de la maquinaria de silenciamiento de *P. fijiensis* (Onyilo *et al.*, 2018).

CAPITULO V

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

La Sigatoka negra es una de las enfermedades más devastadoras para los cultivares de banano y plátano, y es causada por el hongo hemibiotrófico *P. fijiensis*. El estilo de vida de este hongo incluye una fase inicial biotrófica asintomática larga, y otra fase necrotrófica, en la que destruye a las células de forma agresiva, generando lesiones necróticas en la hoja (Alakonya *et al.*, 2018; Churchill, 2011). Un mejor entendimiento sobre los procesos celulares y genes relacionados a la virulencia y a la interacción de este patógeno con su hospedero contribuyen a la búsqueda de alternativas para el control de este hongo. A la fecha, numerosos estudios se han realizado sobre los procesos de interacción planta-patógeno (Chi-Manzanero *et al.*, 2021; Arango-Isaza *et al.*, 2016; Sánchez-Timm *et al.*, 2016; Noar y Daub, 2016). Sin embargo, los conocimientos sobre la expresión de genes y especialmente el análisis funcional durante esta interacción aún son limitados (Soares *et al.*, 2021; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2018; Arango-Isaza *et al.*, 2016). Una de las principales causas de estas limitaciones es la poca disponibilidad de herramientas tecnológicas como lo son los protocolos de transformación rutinaria de *P. fijiensis* así como de banano. Así como de sistemas convencionales de silenciamiento génico que permiten un estudio más detallado de la funcionalidad de un gen en particular. Existen varios protocolos *in vitro* para el estudio de la infección del hospedero o de los genes de *P. fijiensis* durante la infección del hospedero, por ejemplo, infectando plantas en invernadero (Cuéllar Quintero *et al.*, 2011), o plántulas producidas *in vitro* (Rodríguez-García *et al.*, 2010), hojas arrancadas de plantas pequeñas (2-4 meses) de banano (Twizeyimana *et al.*, 2007), o fragmentos foliares (Rosa-Manzano *et al.*, 2021; Rodríguez-García *et al.*, 2016), los dos últimos provienen de plantas producidas *in vitro* y crecidas en invernadero. Aunque los dos últimos superan el problema de amplio espacio que demanda el uso de plantas de banano completas, requieren ~9 meses de preparación de las plantas para tener el material biológico disponible para las infecciones artificiales bajo condiciones controladas. Los experimentos completos desde la generación de las plantas *in vitro*, su enraizamiento, establecimiento en invernadero para disponer del tejido foliar, hasta las infecciones artificiales y desarrollo de síntomas, lleva aproximadamente un año. La experiencia de nuestro equipo de trabajo y de otros grupos, es que, por lo prolongado del experimento,

está sujeto a muchos peligros, como la infestación de las plantas por araña roja u otras plagas, o el daño de las plantas por condiciones climatológicas adversas inesperadas (vientos fuertes, lluvias intensas). Todo eso hace que el progreso en los estudios de los genes involucrados en la infección de *P. fijiensis* en el hospedero sea lento.

En este trabajo se abordó un sistema de interacción artificial entre *P. fijiensis* y *N. benthamiana* para aprovechar los beneficios que este hospedero aporta como hospedero artificial (Fodor *et al.*, 2018; Naalden *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2016). A diferencia de la mayoría de los estudios reportados en *N. benthamiana*, en este trabajo la infección requirió un tiempo prolongado. La sintomatología en este trabajo fue observada hasta los 35 dpi, consistente con el tiempo reportado de la infección de hojas del hospedero natural (banano) (Burgos-Canul *et al.*, 2019). Además, las observaciones microscópicas confirmaron crecimiento sobre los tricomas, la formación de nuevos septos y el crecimiento de las puntas de las hifas, siendo ésta última, punto característico de la división celular (Riquelme *et al.*, 2018). Así mismo, también se observó que el crecimiento de las hifas seguía un patrón similar a la de los espacios intracelulares y cercano a los estomas, sugiriendo que el hongo ingresa dentro del tejido foliar por mecanismos similares a los seguidos en su hospedero natural (Kantún-Moreno *et al.*, 2013).

También se cuantificó la biomasa fúngica dentro de las hojas, pero inesperadamente la biomasa disminuyó progresivamente durante los 35 días en los que se realizó el curso temporal. Sin embargo, al evaluar la expresión de un gen del metabolismo primario (Lys2) y dos genes efectores (Avr4 y Ecp6), se detectó que estos tenían un máximo de expresión en el día 35 dpi. Se especula que el mayor porcentaje de biomasa fúngica prolifera sobre la superficie de la hoja y se pierde al ser asperjado con agua para la generación de humedad y al momento de lavado de la muestra. Mientras tanto, solo una fracción del hongo logra ingresar dentro del tejido foliar pero tiene la suficiente actividad transcripcional para ser detectado por qPCR. En otro trabajo, la infección de *Ustilagoideae virens* sobre la planta "Non-host" *Arabidopsis thaliana*, resultó en la colonización y proliferación sobre la superficie foliar, a través de la adhesión de los tricomas y también a la colonización del tejido a través de las capas de la epidermis y por los estomas (Andargie *et al.*, 2016). Estos autores mencionan que los tricomas pueden ayudar al proceso de infección pues proveen de humedad, nutrientes y un microambiente protector para el crecimiento del hongo. El

crecimiento observado de *P. fijiensis* sobre la planta no-hospedera natural *N. benthamiana* fue similar a lo descrito por esos autores. Adicionalmente, se ha encontrado que los oligosacáridos de quitina derivados de la pared fúngica influyen en el cierre de estomas a través de receptores tipo CERK y de otros genes relacionados con la defensa vegetal, limitando el ingreso del hongo (Ye *et al.*, 2020; Kaundal *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017). A pesar de tales limitaciones, se demostró el crecimiento y proliferación de *P. fijiensis* en *N. benthamiana*.

La detección de la expresión de Pflys2 a los 35 dpi es un resultado importante, pues refleja la actividad metabólica primaria, y por lo tanto la supervivencia del hongo, siendo Pflys2 un gen esencial para la supervivencia de hongos como *P. fijiensis* (Xu *et al.*, 2006; Zabriskie & Jackson, 2000). Avr4 y Ecp6 son genes que tienen funciones en la mimetización del hongo dentro del tejido vegetal, pero sobre todo en su virulencia (de Jonge *et al.*, 2010; Stergiopoulos *et al.*, 2010; van Esse *et al.*, 2007). La expresión de ambos genes dan pistas importantes en cuanto a la interacción con *N. benthamiana*. En el caso de Avr4, la expresión se detectó a partir del día 28 dpi y aumentó a los 35 dpi. En *C. fulvum*, CfAvr4 juega un papel importante en la virulencia del patógeno, se ha demostrado que su silenciamiento reduce la virulencia en tomate (van Esse *et al.*, 2007). Avr4 de *P. fijiensis* tiene un mecanismo similar a *C. fulvum* contribuyendo del mismo modo a la virulencia (Stergiopoulos *et al.*, 2010). En *Cercospora cf. flagellaris* el efector Avr4 está asociado a la biosíntesis de cercosporina, que probablemente contribuya a la virulencia durante la infección en soja (Rezende *et al.*, 2020), pero no se ha demostrado la asociación de Avr4 con la producción de otras toxinas en las Mycosphaerellaceas, por lo que no se sabe si tuviera una función similar en *P. fijiensis*, pero al igual que la cercosporina que es foto-activada en los hongos del género *Cercospora*, *P. fijiensis* produce toxinas que se activan con la luz, aunque no se conocen sus identidades (Churchill, 2011).

Por su parte, la expresión de Ecp6 solo fue detectada a los 35 dpi. En *Colletotrichum fructicola* durante la infección en fresa, se observó que este efector se expresaba en las últimas etapas de la infección (96 h) (Zhang *et al.*, 2018), lo cual es consistente con lo observado aquí. Ecp6 probablemente sea expresado en etapas tardías de la infección, pues no fue detectado en días previos. La expresión de Avr4 y Ecp6 durante la interacción con *N. benthamiana* no solo evidencian la presencia del hongo vivo, sino que también dan

indicios de la lucha de *P. fijiensis* por expresar su virulencia. De hecho, ambos genes han sido usados como marcadores de virulencia (Ökmen *et al.*, 2014).

Los genes PTI5 y ACRE son marcadores vegetales de la inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI) (Nguyen *et al.*, 2010). En este trabajo la expresión de ambos genes se observó a los 14 dpi, alcanzando su máxima expresión a los 21 dpi, y posteriormente disminuyendo en el día 35 dpi. PTI es la primera línea de defensa de las plantas (Jones & Dangl, 2006) y su incremento en los primeros días de la infección es consistente con las funciones de ambos genes. PR1 es un marcador de la vía del ácido salicílico, en donde la acumulación de este fitoregulador desemboca en la respuesta de hipersensibilidad (HR) y a una protección de mayor duración (Pieterse & Van Loon, 2004). En este trabajo, se observó que PR1 va incrementándose de manera gradual desde los 14 dpi hasta alcanzar aproximadamente 150 veces su estado basal a los 35 dpi. La sobrerregulación de los genes PR refleja la lucha de *N. benthamiana* con el patógeno (Shen *et al.*, 2016). Con todo lo anterior, las observaciones microscópicas del crecimiento, la sintomatología observada, la expresión de genes de metabolismo como de virulencia por parte de *P. fijiensis* apoyan la validación de este patosistema artificial como modelo para futuros estudios. Adicionalmente, la expresión de los genes de defensa demuestra la interacción que existe entre *P. fijiensis* y *N. benthamiana*.

Alternativamente, en este trabajo también se planteó la posibilidad de usar un sistema de silenciamiento basado en el virus EuMV-YP (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013) para el estudio funcional de *P. fijiensis* durante su interacción con *N. benthamiana*. Se ha demostrado que los genes de hongos pueden ser silenciados cuando dos organismos están en interacción (Cai *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016). Este tipo de silenciamiento se lleva a cabo cuando los ARN pequeños de silenciamiento (sRNA) son producidos en un organismo y son transportados vía vesículas hacia el organismo con el que interactúan, logrando en el último silenciar genes, proceso llamado “cross-kingdom RNA” (Hou *et al.*, 2019; Cai *et al.*, 2018). Este tipo de silenciamiento tiene el potencial de ser usado para estudios funcionales en hongos que tengan la dificultad de ser transformados o manipulados genéticamente, siendo el caso de *P. fijiensis*. Recientemente Villanueva-Alonzo *et al.* (2022) logró silenciar el gen Krt18 de *mus musculus* (ratón) usando vsRNA derivados de un fragmento clonado en pEuMV-YP:ΔV1 y producido en *N. benthamiana*,

logrando de esta forma inducir el silenciamiento “cross-kingdom”.

Con el objetivo de silenciar a Lys2 y Avr4 respectivamente, en el presente trabajo se diseñaron dos juegos de vectores. Así mismo, ambos juegos de vectores fueron bombardeados en *N. benthamiana* que se infectaron posteriormente con *P. fijiensis* para la evaluación de silenciamiento en este último. Desafortunadamente, la contingencia SARS-CoV-2 afectó la presente investigación y la retrasó más de dos años. Aunque se tuvieron logros importantes, los resultados de este último experimento clave no pudieron evaluarse durante este programa de doctorado y ser parte de esta tesis, pues se agotó el tiempo máximo de permanencia en el programa de Doctorado después de Maestría, incluidos los permisos extraordinarios.

Por otro lado, también se evaluó la infectividad de EuMV-YP en banano, con el motivo de explorar la posibilidad de usar el sistema VIGS basado en EuMV-YP para el análisis funcional directamente sobre el hospedero natural. Los resultados obtenidos inicialmente fueron sorprendentes, ya que se observó replicación y movimiento del virus dentro de la planta. Se ha reportado que además de su hospedero natural, (*Euphorbia heterophylla*) (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007), este virus es capaz de infectar a una gran diversidad de especies como *Arabidopsis thaliana*, *Capsicum chinense*, *N. benthamiana*, *Jatropha curcas* y *Ricinus Communis*, con diferentes grados de severidad (Villanueva-Alonzo, 2013). Pero a diferencia de los resultados en los hospederos mencionados, la infección de banano no mostró síntomas visibles. Se ha descrito que los begomovirus como EuMV-YP solo infectan a plantas dicotiledóneas, siendo estas sus hospederos naturales (Fondong, 2013). En solanáceas, los síntomas de marchitamiento y mosaicos son el reflejo de altos niveles de transcripción que altera la homeostasis y el desarrollo vegetal (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013), sugiriendo un bajo nivel de replicación y transcripción del virus en las hojas del banano. Adicionalmente, se evaluó el silenciamiento del gen de la PDS con el fin de verificar la funcionalidad del vector viral en la planta de banano, sin embargo, los resultados no mostraron el fenotipo de blanqueamiento esperado. Recientemente se reportó un trabajo que usó un vector viral para el silenciamiento de genes de banano (Tzean *et al.*, 2019), y el éxito que tuvieron se debió a que emplearon un vector basado en el “*Cucumber Mosaic Virus*” (CMV), un virus que infecta a la planta de banano de manera natural. Sin embargo, la infección de una monocotiledónea con EuMV-YP, su replicación y movilidad transitoria

en el tejido vegetal es conocimiento novedoso que puede estar evidenciando lo que ocurre en la naturaleza en las interacciones con plantas “no-hospederas”

En resumen, los resultados obtenidos con respecto al modelo propuesto de *N. benthamiana*- *P. fijiensis* es probable que el vector basado EuMV-YP sea de gran utilidad en estudios funcionales de genes de este patógeno. Para facilitar esta infección artificial no-hospedera pudieran silenciarse en *N. benthamiana* algunos de los genes de defensa, como NbPTI o NbPR1, esperando mayor crecimiento de *P. fijiensis* que facilite su estudio.

5.2 PERSPECTIVAS

A corto plazo se busca sentar las bases en el establecimiento de un modelo artificial de interacción planta-patógeno entre *N. benthamiana* y *P. fijiensis*, ya que permitiría estudiar de manera más sencilla las bases moleculares entre ambos organismos, en particular, de la patogenicidad del hongo. Este trabajo es un enfoque inicial para entender el comportamiento de *P. fijiensis in planta* en un sistema “no hospedero” (“non-host interaction”), haciendo uso del silenciamiento por ARNi en condiciones de laboratorio. La perspectiva a futuro de este trabajo es ofrecer una herramienta para silenciar la expresión de genes particulares de *P. fijiensis* para estudiar su efecto y eventualmente sentar las bases para realizar silenciamiento en el hospedero natural, como lo es en banano.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar-Barragan, A., García-Torres A.E., Odriozola-Casas O., Macedo-Raygoza G., T. Ogura, Manzo-Sánchez G., James A.C., Islas-Flores I. y Beltrán-García M.J. (2014). Chemical management in fungicide sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* collected from banana fields in México. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 359-364.
- Alakonya, A. E., Kimunye, J., Mahuku, G., Amah, D., Uwimana, B., Brown, A., & Swennen, R. (2018). Progress in understanding *Pseudocercospora* banana pathogens and the development of resistant *Musa* germplasm. *Plant Pathology*, 67(4), 759-770. <https://doi.org/10.1111/ppa.12824>
- Arango-Isaza, R. E., C. Diaz-Trujillo, B. Dhillon, A. Aerts, J. Carlier, C. F. Crane, V. d. Jong, I. de Vries, R. Dietrich, A. D. Farmer, C. Fortes Ferreira, S. Garcia, M. Guzman, R. C. Hamelin, E. A. Lindquist, R. Mehrabi, O. Quiros, J. Schmutz, H. Shapiro, E. Reynolds, G. Scalliet, M. Souza, Jr., I. Stergiopoulos, T. A. J. Van der Lee, P. J. G. M. De Wit, M.-F. Zapater, L.-H. Zwiars, I. V. Grigoriev, S. B. Goodwin y G. H. J. Kema (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, 1-36.
- Arzate-Vega, J., Michel-Aceves A.C., Domínguez-Márquez V.M. y Santos-Eméstica O.A. (2006). Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoka negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 4, 98-104.
- Bakry, F., Carreel F., Jenny C. y Horry J.P., (2009). Genetic improvement of banana, en: *Breeding plantation tree crops: tropical species*, Mohan Jain, S. y P. M. Priyadarshan, (eds). pp. 3-50.
- Baulcombe, D. C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 109-113.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431, 356-363.

-
- Baulcombe, D. C. (2015). VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 141-146.
- Becker, A. y M. Lange (2009). VIGS - genomics goes functional. *Trends in Plant Science*, 15, 1-4.
- Beltrán-García, M. J., Prado, F. M., Oliveira, M. S., Ortiz-Mendoza, D., Scalfio, A. C., Jr, A. P., Medeiros, M. H. G., White, J. F., & Mascio, P. D. (2014). Singlet Molecular Oxygen Generation by Light-Activated DHN-Melanin of the Fungal Pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in Black Sigatoka Disease of Bananas. *PLOS ONE*, 9(3), e91616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091616>
- Blomme, G., M. Dita, K. S. Jacobsen, L. Pérez Vicente, A. Molina, W. Ocimati, S. Poussier y P. Prior (2017). Bacterial diseases of bananas and enset: current state of knowledge and integrated approaches toward sustainable management. *Frontiers in plant science*, 8, 1-25.
- Buck, A. H., G. Coakley, F. Simbary, H. J. McSorley, J. F. Quintana, T. Le Bihan, S. Kumar, C. Abreu-Goodger, M. Lear, Y. Harcus, A. Ceroni, S. A. Babayan, M. Blaxter, A. Ivens y R. M. Maizels (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cell and modulate innate immunity. *Nature Communications*, 5, 1-11.
- Burgos-Canul, Y. Y., Canto-Canché, B., Berezovski, M. V., Mironov, G., Loyola-Vargas, V. M., Barba de Rosa, A. P. Islas-Flores, I. (2019). The cell wall proteome from two strains of *Pseudocercospora fijiensis* with differences in virulence. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(105), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2681-2>
- Butler, D. (2013). Fungus threatens top banana. *Nature*, 504, 195-196.
- Cai, Q., L. Qiao, M. Wang, B. He, F. M. Lin, J. Almquist, S. D. Huang y H. Jin (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, 360, 1126-1129.

-
- Cavero, P. A., R. E. Hanada, L. Gasparotto, R. A. Coelho Neto y J. T. de Souza (2015). Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*. *Ciência Rural*, 45, 951-957.
- Cawoy, H., W. Bettiol, P. Fickers y M. Ongena, (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases, en: Pesticides in modern world - pesticides use and management, Stoytcheva, M., (ed). pp. 273-302.
- Chang, S.-S., Z. Zhang y Y. Liu (2012). RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annual Review Microbiology*, 66, 305-323.
- Chang, T.-C., A. Salvucci, P. W. Crous y I. 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, 1-35.
- Chen, Q., Dong, C., Sun, X., Zhang, Y., Dai, H., & Bai, S. (2020). Overexpression of an apple LysM-containing protein gene, MdCERK1–2, confers improved resistance to the pathogenic fungus, *Alternaria alternata*, in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biology*, 20(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02361-z>
- Cheng, W., X.-S. Song, H.-P. Li, L.-H. Cao, K. Sun, X.-L. Qiu, Y.-B. Xu, P. Yang, T. Huang, J. B. Zhang, B. Qu y Y.-C. Liao (2015). Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium head blight* and seedling blight in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 1335-1345.
- Churchill, A. C. L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12, 307-328.
- Couoh-Uicab, Y., Islas-Flores, L., Kantún-Moreno, N., Zwiers, L. H., Tzec-Simá, M., Echeverría, S. P.-, Brito-Argáez, L., Peraza-Echeverría, L., Grijalva-Arango, R., James, A., Rodríguez-García, C., & Canto-Canché, B. (2012). Cloning, in silico structural characterization and expression analysis of MfAtr4, an ABC transporter from the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *African Journal of*

- Dalakouras, A., Wassenegger, M., Dadami, E., Ganopoulos, I., Pappas, M. L., & Papadopoulou, K. (2020). Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants. *Plant Physiology*, *182*, 1–13. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00570>
- D' Hont, A., F. Denoeud, J. M. Aury, F. C. Baurens, F. Carreel, O. Garsmeur, B. Noel, S. Bocs, G. Droc, M. Rouard, C. Da Silva, K. Jabbari, C. Cardi, J. Poulain, M. Souquet, K. Labadie, C. Jourda, J. Lengellé, M. Rodier-Goud, A. Alberti, M. Bernard, M. Correa, S. Ayyampalayam, M. R. Mckain, J. Leebens-Mack, D. Burgess, M. Freeling, D. Mbéguié-A-Mbéguié, M. Chabannes, T. Wicker, O. Panaud, J. Barbosa, E. Hribova, P. Heslop-Harrison, R. Habas, R. Rivallan, P. Francois, C. Poiron, A. Kilian, D. Burthia, C. Jenny, F. Bakry, S. Brown, V. Guignon, G. Kema, M. Dita, C. Waalwijk, S. Joseph, A. Dievart, O. Jaillon, J. Leclercq, X. Argout, E. Lyons, A. Almeida, M. Jeridi, J. Dolezel, N. Roux, A. M. Risterucci, J. Weissenbach, M. Ruiz, J.-C. Glaszmann, F. Quétier, N. Yahiaoui y P. Wincker (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, *488*, 213-217.
- Dommes, A. B., Gross, T., Herbert, D. B., Kivivirta, K. I., & Becker, A. (2019). Virus-induced gene silencing: Empowering genetics in non-model organisms. *Journal of Experimental Botany*, *70*(3), 757-770. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery411>
- Dou, T., Shao, X., Hu, C., Liu, S., Sheng, O., Bi, F., ... Yi, G. (2020). Host-induced gene silencing of Foc TR4 ERG6/11 genes exhibits superior resistance to Fusarium wilt of banana. *Plant Biotechnology Journal*, *18*, 11–13. <https://doi.org/10.1111/pbi.13204>
- de Lapeyre de Bellaire, L., E. Fouré, C. Abadie y J. Carlier (2010). Black leaf streak disease is challenging the banana industry. *Fruits*, *65*, 327-342.
- de Jonge, R., Peter van Esse, H., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M. H. A. J., & Thomma, B. P. H. J. (2010). Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants. *Science*,

329(5994), 953-955. <https://doi.org/10.1126/science.1190859>

Du, J., Wang, Q., Zeng, C., Zhou, C., & Wang, X. (2022). A prophage-encoded nonclassical secretory protein of «*Candidatus Liberibacter asiaticus*» induces a strong immune response in *Nicotiana benthamiana* and citrus. *Molecular Plant Pathology*, 23(7), 1022-1034. <https://doi.org/10.1111/mpp.13206>

Elad, Y. (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* of potential modes of action. *Crop Protection*, 19, 709-714.

Fodor, J., Kámán-Tóth, E., Dankó, T., Schwarczinger, I., Bozsó, Z., & Pogány, M. (2018). Description of the *Nicotiana benthamiana*-*Cercospora nicotianae* pathosystem. *Phytopathology*, 108(1), 149–155. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-16-0448-R>

Fofana, I. B. F., A. Sangaré, R. Collier, C. Taylor y C. M. Fauquet (2004). A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant Molecular Biology*, 56, 613-624.

Fouré, E. 1985. Black Leaf Streak Disease of Bananas and Plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. IRFA CIRAD, París.

Friesen, T. L. (2016). Combating the sigatoka disease complex on banana. *Plos Genetics*, 12, 1-4.

Fullerton, R. A., & Casonato, S. G. (2019). The infection of the fruit of 'Cavendish' banana by *Pseudocercospora fijiensis*, cause of black leaf streak (black Sigatoka). *European Journal of Plant Pathology*, 155(3), 779-787. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01807-x>

Ghag, S. B. (2017). Host induced gene silencing, an emerging science to engineer crop resistance against harmful plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100, 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.10.003>

Ghag, S. B., U. K. S. Shekhawat y T. R. Ganapathi (2014). Host-induced post-transcriptional hairpin RNA mediated gene silencing of vital fungus genes confers efficient

-
- resistance against Fusarium wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal*, 12, 541-553.
- Goodin, M. M., D. Zaitlin, R. A. Naidu y S. A. Lommel (2008). *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogens interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 1015-1026.
- Govindarajulu, M., L. Epstein, T. Wroblewsky y R. W. Michelmore (2015). Host-induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy mildew of lettuce. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 875-883.
- Gutierrez-Monsalve, J. A., S. Mosquera, L. M. González-Jaramillo, J. J. Mira y V. Villegas-Escobar (2015). Effective control of black sigatoka disease using a microbial fungicide based on *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture. *Biological Control*, 87, 39-46.
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D., & Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: Masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3117>
- Hassan, J. A., de la Torre-Roche, R., White, J. C., & Lewis, J. D. (2018). Soil mixture composition alters *Arabidopsis* susceptibility to *Pseudomonas syringae* infection. *Plant Direct*, 2(2), e00044. <https://doi.org/10.1002/pld3.44>
- Hoss, R., J. Helbig y H. Bochow (2000). Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black sigatoka disease pathosystem (*Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis*). *Journal of Phytopathology*, 148, 387-394.
- Hua, C., Z. Jian-Hua y G. Hui-Shan (2018). Trans-Kingdom RNA silencing in plant-fungal pathogen interactions. *Molecular Plant*, 11, 235-244.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), Article 7117. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Israeli, Y., E. Shabi y W. R. Slabaugh (1993). Effect of banana spray oil on banana yield in

-
- the absence of Sigatoka (*Mycosphaerella* sp.). *Scientia Horticulturae*, 56, 107-117.
- Kantún-Moreno, N., Vázquez-Euán, R., Tzec-Simá, M., Peraza-Echeverría, L., Grijalva-Arango, R., Rodríguez-García, C., James, A. C., Ramírez-Prado, J., Islas-Flores, I., & Canto-Canché, B. (2013). Genome-wide in silico identification of GPI proteins in *Mycosphaerella fijiensis* and transcriptional analysis of two GPI-anchored β -1,3-glucanosyltransferases. *Mycologia*, 105(2), 285-296. <https://doi.org/10.3852/12-103>
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. Y. (2002). The Arabidopsis Thaliana-Pseudomonas Syringae Interaction. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 1, e0039. <https://doi.org/10.1199/tab.0039>
- Kaundal, A., Ramu, V. S., Oh, S., Lee, S., Pant, B., Lee, H.-K., Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. S. (2017). GENERAL CONTROL NONREPRESSIBLE4 Degrades 14-3-3 and the RIN4 Complex to Regulate Stomatal Aperture with Implications on Nonhost Disease Resistance and Drought Tolerance. *The Plant Cell*, 29(9), 2233-2248. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00070>
- Kimunye, J., Were, E., Swennen, R., Viljoen, A., & Mahuku, G. (2021). Sources of resistance to *Pseudocercospora fijiensis*, the cause of black Sigatoka in banana. *Plant Pathology*, 70(7), 1651-1664. <https://doi.org/10.1111/ppa.13408>
- Kjemtrump, S., K. S. Sampson, C. G. Peele, L. V. Nguye, M. A. Conkling, W. F. Thompson y D. Robertson (1998). Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *The Plant Journal*, 14, 91-100.
- Koch, M. A. (2019). The plant model system Arabidopsis set in an evolutionary, systematic, and spatio-temporal context. *Journal of Experimental Botany*, 70(1), 55-67. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery340>
- Kovács, G., L. Sagí, G. Jacon, G. Arinaitwe, J.-P. Busogoro, E. Thiry, H. Strosse, R. Swennen y S. Remy (2013). Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana ('Gros Michel', AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease. *Transgenic Research*, 22, 117-130.
- Kumagai, M. H., J. Donson, G. della-Cioppa, D. Harvey y L. K. Grill (1995). Cytoplasmic

-
- inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1679-1683.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum y V. Ambros (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-854.
- Lee, S., Senthil-Kumar, M., Kang, M., Rojas, C. M., Tang, Y., Oh, S., Choudhury, S. R., Lee, H.-K., Ishiga, Y., Allen, R. D., Pandey, S., & Mysore, K. S. (2017). The small GTPase, nucleolar GTP-binding protein 1 (NOG1), has a novel role in plant innate immunity. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08932-9>
- Majumdar, R., K. Rajasekaran y J. W. Cary (2017). RNA interference (RNAi) as a potential tool for control micotoxin contamination in crop plants: concepts and considerations. *Frontiers in plant science*, 8, 1-14.
- Mann, S. K., Kashyap, P. L. ., Sanghera, G. S. ., Singh, G. ., & Singh, S. (2008). RNA Interference : An Eco-Friendly Tool for Plant Disease Management. *Transgenic Plant Journal*, 2(2), 110–126.
- Manzo Sánchez, G., S. Guzmán González, C. M. Rodríguez García, A. James y M. Orozco Santos (2005). Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23, 87-96.
- Marín, D. H., R. A. Romero, M. Guzmán y T. B. Sutton (2003). Black sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87, 208-222.
- Martinez de Alba, A. E., E. Elvira-Matelot y H. Vaucheret (2013). Gene silencing in plants: A diversity of pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1829, 1300-1308.
- Mendoza-Rodríguez, M. F., Portal, O., Oloriz, M. I., Ocaña, B., Rojas, L. E., Acosta-Suárez, M., Roque, B., Canales, E., Borrás-Hidalgo, O., & Jiménez, E. (2018). Early regulation of primary metabolism, antioxidant, methyl cycle and phenylpropanoid pathways during the *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp. Interaction. *Tropical Plant Pathology*, 43(1), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0188-7>
- Meredith, D. S. y J. S. Lawrence (1969). Black leaf streak disease of bananas

-
- (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. Transactions of the British Mycological Society, 52, 459-476.
- Mohapatra, D., S. Mishra y N. Sutar (2010). Banana and its by-product utilisation: an overview. Journal of Scientific & Industrial Research, 69, 323-329.
- Naalden, D., Verbeek, R., & Gheysen, G. (2018). *Nicotiana benthamiana* as model plant for *Meloidogyne graminicola* infection. Nematology, 20(5), 491-499. <https://doi.org/10.1163/15685411-00003154>
- Naim, F., B. Dugdale, J. Kleidon, A. Brinin, K. Shand, P. Waterhouse y J. Dale (2018). Gene editing the phytoene desaturase alleles of Cavendish banana using CRISPR/Cas9. Transgenic Research, 27, 451-460.
- Napoli, C., C. Lemieux y R. Jorgensen (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell, 2, 279-289.
- Nguyen, H. P., Chakravarthy, S., Velásquez, A. C., McLane, H. L., Zeng, L., Nakayashiki, H., Park, D.-H., Collmer, A., & Martin, G. B. (2010). Methods to Study PAMP-Triggered Immunity Using Tomato and *Nicotiana benthamiana*. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 23(8), 991-999. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-8-0991>
- Nishida H. y M. Nishiyama (2000). What is characteristic of fungal lysine synthesis through the α -aminoadipate pathway?. Journal Molecular Evolution, 51, 299-302.
- Noar, R. D. y M. E. Daub (2016). Transcriptome sequencing of *Mycosphaerella fijiensis* during association with *Musa acuminata* reveals candidate pathogenicity genes. BMC Genomics, 17, 1-25.
- Nowara, D., A. Gay, C. Lacomme, J. Shaw, C. Ridout, D. Douchkov, G. Hensel, J. Kumlehn y P. Schweizer (2010). HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. The Plant Cell, 22, 3130-3141.
- Nunes, C. C. y R. A. Dean (2012). Host-induced gene silencing: a tool for understanding

-
- fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. *Molecular Plant Pathology*, 13, 519-529.
- Ono, E., Mise, K., & Takano, Y. (2020). RLP23 is required for Arabidopsis immunity against the grey mould pathogen *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70485-1>
- Onyilo, F., Tusiime, G., Tripathi, J. N., Chen, L.-H., Falk, B., Stergiopoulos, I., Tushemereirwe, W., Kubiriba, J., & Tripathi, L. (2018). Silencing of the Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) Fus3 and Slit2 in *Pseudocercospora fijiensis* Reduces Growth and Virulence on Host Plants. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00291>
- Orozco-Santos, M., J. Orozco-Romero, O. Pérez-Zamora, G. Manzo-Sánchez, J. Farías-Larios y W. da Silva Moraes (2008). Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos. *Tropical Plant Pathology*, 33, 189-196.
- Pieterse, C. M., & Van Loon, L. (2004). NPR1: The spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 456-464. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.006>
- Peele, C., C. V. Jordan, N. Muangsan, M. Turnage, E. Egelkrout, P. Eagle, L. Hanley-Bowdoin y D. Robertson (2001). Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *The Plant Journal*, 27, 357-366.
- Ploetz, R. C., J. E. Thomas y W. R. Slabaugh, (2003). Diseases of banana and plantain, en: *Diseases of tropical fruit crops*, Ploetz, R. C., (ed). pp. 73-134.
- Qi, T., X. Zhu, C. Tan, P. Liu, J. Guo, Z. Kang y J. Guo (2018). Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor *PsCPK1* in *Puccinia striiformis* f. sp. tritici enhances resistance of wheat to stripe rust. *Plant Biotechnology Journal*, 16, 797-807.
- Qi, T., J. Guo, H. Peng, P. Liu, Z. Kang y J. Guo (2019). Host-induced gene silencing: a powerful strategy to control diseases of weath and barley. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1-15.

-
- Raffaello, T., & Asiegbu, F. O. (2017). Small secreted proteins from the necrotrophic conifer pathogen *Heterobasidion annosum* s.l. (HaSSPs) induce cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08010-0>
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G. H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., Mouriño-Pérez, R. R., Takeshita, N., & Fischer, R. (2018). Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(2), 10.1128/membr.00068-17. <https://doi.org/10.1128/membr.00068-17>
- Robertson, D. (2004). Vigs vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annual Review Plant Biology*, 55, 495-519.
- Romano, N. y G. Macino (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 6, 3343-3353.
- Sagí, L., B. Panis, S. Remy, H. Schoofs, K. De Smet, R. Swennen y B. P. A. Cammue (1995). Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. *Nature Biotechnology*, 13, 481-485.
- Sang, H., & Kim, J. II. (2020). Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS). *Plant Biotechnology Reports*, 14, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00588-3>
- Segonzac, C., Feike, D., Gimenez-Ibanez, S., Hann, D. R., Zipfel, C., & Rathjen, J. P. (2011). Hierarchy and Roles of Pathogen-Associated Molecular Pattern-Induced Responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology*, 156(2), 687-699. <https://doi.org/10.1104/pp.110.171249>
- Senthil-Kumar, M. y K. S. Mysore (2011). New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends in Plant Science*, 10, 656-665.
- Shen, D., Chai, C., Ma, L., Zhang, M., & Dou, D. (2016). Comparative RNA-Seq analysis of

-
- Nicotiana benthamiana* in response to *Phytophthora parasitica* infection. *Plant Growth Regulation*, 80(1), 59-67. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0163-1>
- Shekhawat, U. K. S., Ganapathi, T. R., & Hadapad, A. B. (2012). Transgenic banana plants expressing small interfering RNAs targeted against viral replication initiation gene display high-level resistance to banana bunchy top virus infection. *Journal of General Virology*, 93, 1804–1813. <https://doi.org/10.1099/vir.0.041871-0>
- Soares, J. M. S., Rocha, A. J., Nascimento, F. S., Santos, A. S., Miller, R. N. G., Ferreira, C. F., Haddad, F., Amorim, V. B. O., & Amorim, E. P. (2021). Genetic Improvement for Resistance to Black Sigatoka in Bananas: A Systematic Review. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.657916>
- Soltis, N. E., Caseys, C., Zhang, W., Corwin, J. A., Atwell, S., & Kliebenstein, D. J. (2020). Pathogen Genetic Control of Transcriptome Variation in the *Arabidopsis thaliana* – *Botrytis cinerea* Pathosystem. *Genetics*, 215(1), 253-266. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303070>
- Stergiopoulos, I., H. A. van den Burg, B. Okmen, H. G. Beenen, S. van Liere, G. H. J. Kema y P. J. G. M. de Wilt (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, 7610-7615.
- Tao, X. y X. Zhou (2004). A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. *The Plant Journal*, 38, 850-860.
- Timm, E. S., Pardo, L. H., Coello, R. P., Navarrete, T. C., Villegas, O. N., & Ordóñez, E. S. (2016). Identification of Differentially-Expressed Genes in Response to *Mycosphaerella fijiensis* in the Resistant *Musa* Accession ‘Calcutta-4’ Using Suppression Subtractive Hybridization. *PLOS ONE*, 11(8), e0160083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160083>
- Timmermans, M. C. P., O. P. Das y J. Messing (1994). Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45, 79-112.

-
- Torrueola, G., H. Suga, M. Riutort, J. Peretó y I. Ruiz-Trillo (2009). The evolutionary history of lysine biosynthesis pathways within eukaryotes. *Journal Molecular Evolution*, 69, 240-248.
- Tripathi, L., Ntui, V. O., & Tripathi, J. N. (2020). CRISPR/Cas9-based genome editing of banana for disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.05.003>
- Tripathi, S., B. L. Patil y R. Verma, (2016). Viral diseases of banana and their management, en: *Plant Viruses: Evolution and Management*, Anonymous, Springer Singapore. pp. 289-308.
- Turnage, M. A., N. Muangsan, C. G. Peele y D. Robertson (2002). Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 30, 107-114.
- Tuttle, J. R., A. M. Idris, J. K. Brown, C. H. Haigler y D. Robertson (2008). Geminivirus mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. *Plant Physiology*, 148, 41-50.
- Tzean, Y., Lee, M. C., Jan, H. H., Chiu, Y. S., Tu, T. C., Hou, B. H., ... Yeh, H. H. (2019). Cucumber mosaic virus-induced gene silencing in banana. *Scientific Reports*, 9(11553), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47962-3>
- Van den Burg, H. A., S. J. Harrison, M. H. A. J. Joosten, J. Vervoort y P. J. G. M. de Wilt (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19, 1420-1430.
- Van Esse, H. P., M. D. Bolton, I. Stergiopoulos, P. J. G. M. de Wilt y B. P. H. J. Thomma (2007). The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20, 1092-1101.
- Vázquez-Euán, R., Chi-Manzanero, B., Hernández-Velázquez, I., Tzec-Simá, M., Islas-Flores, I., Martínez-Bolaños, L., Garrido-Ramírez, E. R., & Canto-Canché, B. (2019). Identification of New Hosts of *Pseudocercospora fijiensis* Suggests Innovative Pest Management Programs for Black Sigatoka Disease in Banana Plantations.

- Villanueva-Alonzo, H. de J., Haro-Álvarez, A. P., Alvarado-Segura, A. A., Valle-Gough, R. E., Collí-Mull, J. G., Cal-Torres, A., Arana-Argáez, V. E., Torres-Romero, J. C., Moreno-Valenzuela, O. A., Nic-Can, G., Ayil-Gutiérrez, B. A., & Acosta-Viana, K. Y. (2022). A Method to Produce vsiRNAs in Plants with Cross-Kingdom Gene Silencing Capacity. *Applied Sciences*, 12(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/app12115329>
- Villanueva-Alonzo, H. J., R. Y. Us-Camas, L. A. López-Ochoa, D. Robertson, O. Guerra-Peraza, Y. Minero-García y O. A. Moreno-Valenzuela (2013). A new virus-induced gene silencing vector based on Euphorbia mosaic virus-Yucatán peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *capsicum annum* var. Anaheim. *Biotechnology Letters*, 35, 811-823.
- Wang, M., A. Weiberg, F. M. Lin, B. P. Thomma, H. D. Huang y H. Jin (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, 2, 1-10.
- Wang, M., N. Thomas y H. Jin (2017). Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 133-141.
- Weiberg, A., M. Bellinger y H. Jin (2015). Conversations between kingdoms: small RNAs. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 207-215.
- Weiberg, A., M. Wang, F. M. Lin, H. Zhao, Z. Zhang, I. Kaloshian, H. D. Huang y H. Jin (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, 342, 118-123.
- Xu, H., B. Andi, J. Qian, A. H. West y P. F. Cook (2006). The α -Amino adipato pathway for lysine biosynthesis in fungi. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 46, 43-64.
- Ye, W., Munemasa, S., Shinya, T., Wu, W., Ma, T., Lu, J., Kinoshita, T., Kaku, H., Shibuya, N., & Murata, Y. (2020). Stomatal immunity against fungal invasion comprises not only chitin-induced stomatal closure but also chitosan-induced guard cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(34), 20932-20942.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1922319117>

Yin, C., J. E. Jurgenson y S. H. Hulbert (2011). Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24, 554-561.

Yin, Chuntao, & Hulbert, S. (2015). Host Induced Gene Silencing (HIGS), a Promising Strategy for Developing Disease Resistant Crops. *Gene Technology*, 4(130).
<https://doi.org/10.4172/2329-6682.1000130>

Zabriskie, T. M. y M. D. Jackson (2000). Lysine biosynthesis and metabolism in fungi. *Natural Product Reports*, 17, 85-97.

Zhu, F., Xi, D.-H., Yuan, S., Xu, F., Zhang, D.-W., & Lin, H.-H. (2014). Salicylic Acid and Jasmonic Acid Are Essential for Systemic Resistance Against Tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 27(6), 567-577.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-11-13-0349-R>

Zotti, M., E. Avila dos Santos, D. Cagliari, O. Christiaens, C. N. T. Taning y G. Smagghe (2018). RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science*, 74, 1239-1250.