



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DEL
HONGO *Mycosphaerella fijiensis* CAUSANTE DE LA
SIGATOKA NEGRA**

Tesis que presenta

INÉS ARANA GUEVARA

En opción al título de

MAESTRA EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2017

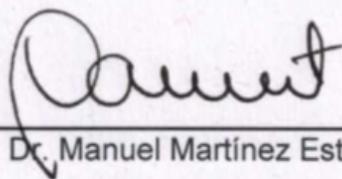
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Inés Arana Guevara** titulado “**ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DEL HONGO *Mycosphaerella fijiensis* CAUSANTE DE LA SIGATOKA NEGRA**”, fue realizado en los laboratorios de Agrobiotecnología, en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plátano del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché y la Dra. Clelia De la Peña Seaman, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 12 de Junio de 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____



Nombre: INÉS ARANA GUEVARA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada No.308766 para la realización de estudios de maestría en Ciencias Biológicas opción Biotecnología.

También al proyecto “ENFOQUE AGROGENÓMICO EN EL ESTUDIO DE LA SIGATOKA NEGRA”. CB-2013 (clave 220957) por el financiamiento brindado para la realización del presente trabajo.

Se agradece el apoyo económico de la Red Nacional de Cuerpos Académicos “Biotecnología para el Desarrollo de una Agricultura Sustentable” para la asistencia al III Simposio Nacional “Herramientas de Biotecnología para una Agricultura Sustentable”, llevado a cabo en Zacatecas del 23 al 26 de Septiembre de 2014.

Al CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatán) por las instalaciones y equipos prestados. A la beca de Movilidad para asistir al III Simposio Nacional “Herramientas de Biotecnología para una Agricultura Sustentable”, llevado a cabo en Zacatecas. Al posgrado en ciencias biológicas por las enseñanzas y a la unidad de biotecnología por el apoyo brindado durante la maestría.

Al M. en C. Miguel Alonso Tzec Simá por su asesoramiento técnico en el cultivo de micelio de *Mycosphaerella fijiensis*, las técnicas de biología molecular y la toma de fotos las cuales contribuyeron en la realización de la tesis, al M. en C. Bartolomé Humberto Chi Manzanero por su asesoramiento intelectual en el diseño de oligonucleicos. Gracias por su apoyo, amistad y compañía.

A la M. C. Fátima Duarte por su asesoramiento técnico e intelectual en el equipo de HPLC y cuantificación de metilación global. A la M. C. Rosa Us Camas y la M. C. Sara Hernandez Castellanos por su asesoramiento técnico e intelectual en la realización de la extracción de proteínas nucleares y la técnica de western blot. Gracias por sus enseñanzas, su gran apoyo y su maravillosa compañía.

A la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché por su asesoramiento intelectual en los temas de interacción planta-patógeno y también en la cuantificación global de genes efectores

mediante PCR en tiempo real y la asesoría brindada durante el desarrollo de la tesis. Agradezco su paciencia y apoyo brindado, han sido pilares fundamentales en la conclusión de la misma. Por su confianza, por creer en mí, por el cariño y su amistad, gracias mil gracias.

A la Dra. Clelia de la Peña Seaman por el asesoramiento intelectual en los temas de epigenética, de extracción de proteínas nucleares y de western blot, el asesoramiento técnico sobre la técnica del CHIP y la asesoría brindada para la realización del presente trabajo. Agradezco todo el apoyo brindado.

Al Comité revisor integrado por la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché, la Dra. Clelia De la Peña Seaman, el Dr. Luis Saenz Carbonell, el Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores y el Dr. Jairo Cristobal Alejo, gracias por sus valiosas observaciones y comentarios.

A mis compañeros de grupo de biología molecular de plátano, Gisel Carreón, M. C. Jaime Castro, M. C. Miguel Angel Canseco Pérez, Dr. Jose Abraham Obrador Sánchez, M. C. Sergio Ramos, M. C. Yamily Burgos, y a mis compañeros del laboratorio de epigenética de plantas Eduardo Castillo, M. C. Víctor Cansino, M. C. Fátima Duarte, M. C. Rosa Us, M. C. Sara Hernandez, Augusto Almeida, gracias por sus observaciones y apoyo durante los seminarios de grupo.

A mis amigos inseparables M. C. Miguel Angel Canseco Pérez y Dr. Jose Abraham Obrador Sánchez quienes me acompañan y apoyan en todo momento, agradezco inmensamente el haberles conocido y tener la oportunidad de contar con ustedes. A mis amigos M. C. Sergio Ramos, M. C. Maria Jose Garcia, M. C. Rosa Us Camas, M. C. Sara Hernandez Castellanos, Osiris Villegas, M. C. Yamily Burgos y M. C. Leticia Peraza por sus palabras de aliento y apoyo incondicional. A todos ustedes queridos amigos muchas gracias, mi estancia de maestría fue más placentera gracias a su amistad, cuidado y cariño. Espero conservar su amistad a través del tiempo y la distancia, atesorare su amistad por siempre, los quiero mucho.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a la memoria de mi padre y a mi familia de la cual provengo, padres y hermanos, gracias por sus enseñanzas y afecto. A la familia que forme, mi esposo e hija gracias por apoyarme y creen en mí, gracias por su paciencia y todo el amor y cariño que me demuestran, los AMO.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE general.....	i
LISTADO DE FIGURAS	v
LISTADO DE CUADROS	vii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I	3
1.1. EL BANANO, IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA	3
1.2. PROBLEMÁTICA DEL CULTIVO DE PLÁTANO	3
1.2.1. LA SIGATOKA	4
1.2.2. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN	4
1.2.3. CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA.....	5
1.2.4. SINTOMATOLOGÍA DE LA SIGATOKA NEGRA.....	5
1.3. <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i>	7
1.3.1. CICLO DE VIDA DE <i>M. FIJENSIS</i>	8
1.3.2. PROCESO DE CONIDIACIÓN.....	9
1.4. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO	10
1.4.1 INMUNIDAD ACTIVADA POR EFECTOR (ETI).....	12

ÍNDICE general

1. 5. 1 EFECTOR AVR4	14
1. 5. 2 EFECTOR ECP2.....	15
1. 5. 3 EFECTOR ECP6	16
1. 5. 4 CONTROL EPIGENÉTICO DE GENES EFECTORES.....	16
1. 6. 1 EPIGENÉTICA Y CROMATINA	17
1. 6. 2 HISTONAS	19
1. 6. 3 METILACIÓN DEL ADN.....	21
1. 6. 4 INTERACCIONES ENTRE LAS MODIFICACIONES DE HISTONAS Y LA METILACIÓN DE ADN	22
1. 6. 4.1 H3K9ME	23
2. 1. OBJETIVO GENERAL	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
2.3. JUSTIFICACIÓN	26
CAPÍTULO II	28
EXPRESIÓN DE GENES EFECTORES	28
INTRODUCCIÓN	28
MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1. CEPA C1233 DE <i>M. FIJENSIS</i>	30
2.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE MICELIO DE <i>M. FIJENSIS</i>	30
2.2.1. DIGESTIÓN DE ADNG DE <i>M. FIJENSIS</i> PRESENTE EN EL ARN	31
2.2.2. SÍNTESIS DE ADNc.....	31
2.3. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA GENES EFECTORES.....	31

2.3.1. EXPRESIÓN DE GENES B- <i>TUBULINA</i> , AVR4 Y ECP6	32
2.4. RESULTADOS	32
2.7. DISCUSIÓN	40
CAPÍTULO III	43
METILACIÓN GLOBAL DEL ADN DE <i>M. FIJENSIS</i>	43
INTRODUCCIÓN	43
MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE MICELIO DE <i>M. FIJENSIS</i>	44
3.2. PORCENTAJE DE METILACIÓN GLOBAL (HPLC)	44
3.3. CONDICIONES DE LA CROMATOGRAFÍA	45
3.4 RESULTADOS	45
3.5. DISCUSIÓN.....	49
CAPÍTULO IV	51
MARCAS EPIGENÉTICAS EN <i>M. FIJENSIS</i>	51
INTRODUCCIÓN	51
MATERIALES Y MÉTODOS	51
4.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES.....	51
4.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES	52
4.3. WESTERN BLOT DE LAS PROTEÍNAS NUCLEARES AISLADAS CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA LAS MARCAS H3K4ME ² Y H3K9ME ²	53
4.3.1. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS SDS PAGE	53

4.3.2. TRANSFERENCIA.....	53
4.3.3. INMUNODETECCIÓN.....	53
4.3.4. DETECCIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA	54
4. 4. RESULTADOS	55
4. 5.DISCUSIÓN.....	59
CAPÍTULO V	61
5.1. CONCLUSIONES.....	61
5.2. PERSPECTIVAS.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Etapas de la Sigatoka negra de acuerdo a Fouré (Herrera y Naranjo, 2007)....	7
Figura 1. 2 Ciclo de vida de <i>M. fijiensis</i> y desarrollo de la enfermedad de la Sigatoka negra en banano (Agrios, 2005).....	9
Figura 3 A Conidióforos de <i>M. fijiensis</i> . (Arzanlou <i>et al.</i> , 2008; Pérez-Vicente 2002). B Conidios de <i>M. fijiensis</i> (Pech-Balan, 2012).....	10
Figura 4 Vista frontal del nucleosoma. (Luger <i>et al.</i> , 1997).....	18
Figura 5 Estructura de la cromatina activa e inactiva (Gronbæk <i>et al.</i> 2007).....	19
Figura 6 Modificaciones en las histonas H3 y H4 (Modificado de Benjamin Lewin, 2009).	20
Figura 7 Metilación del ADN y su relación con la transcripción (Menéndez <i>et al.</i> , 2011)..	21
Figura 8 Crecimiento de micelio de <i>M. fijiensis</i> durante 6 semanas. A cada una de las semanas se le denominó “tiempo (T)” numerándolas de manera cronológica, en relación a la semana de colecta.....	33
Figura 9 Aspecto del micelio de <i>M. fijiensis</i> con 6 y 10 semanas de crecimiento.	34
Figura 10 Evaluación de la integridad del ARN extraído de micelio de <i>M. fijiensis</i> . Gel representativo de los ARNs obtenidos en agarosa al 1% con TAE 1X con H ₂ O DEPC.....	35
Figura 11 Ejemplo representativo de la estandarización de oligonucleótidos empleando el gen constitutivo β -tubulina..	37
Figura 12 Niveles relativos de transcritos del gen <i>Avr4</i> de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> crecido <i>in vitro</i>	38
Figura 13 Niveles relativos de transcritos del gen <i>Ecp6</i> de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> crecido <i>in vitro</i>	39

LISTADO DE FIGURAS

Figura 14 Estandarización de 5 metil-desoxicitocina y 2 desoxicitocina.....	47
Figura 15 Porcentaje de metilación global de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> cultivado en PDA.	48
Figura 16 Análisis electroforético de las proteínas nucleares aisladas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (cepa C1233) 30 µg.....	56
Figura 17 Inmunoblot de las proteínas nucleares aisladas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (cepa C1233)	57
Figura 18 Análisis densitométrico de los inmunoblot de proteínas nucleares aisladas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (cepa C1233).	58

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Clasificación taxonómica de <i>M. fijiensis</i>	7
Cuadro 2 Concentraciones de los ARN extraídos en las distintas etapas de crecimiento de <i>M. fijiensis</i> cuantificadas a 260/280 nm, cada muestra se realizó por triplicado.	34
Cuadro 3 Lista de oligonucleótidos diseñados empleando el programa bioinformático de PRIMERQUEST, en la página www.idt.com/site	35
Cuadro 4 Concentraciones de ADN. Cuantificación por espectrofotometría en NanoDrop 2000 de cada uno de los ADN extraídos durante distintas etapas de crecimiento de <i>M. fijiensis</i>	46
Cuadro 5 Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunodetección.	54

ABREVIATURAS

ARNi, interference, RNA (ARN de interferencia)

Avr, avirulencia

ETI, Effector triggered Immunity (inmunidad desencadenada por efector)

FAO, Food and Agriculture Organization (Organización de Agricultura y Comida)

HDACs histone deacetylase (histonas desacetilasas)

HP1, heterochromatin protein 1 (proteína de heterocromatina 1)

MAMPs, microbe-associated molecular patterns (patrones moleculares asociados a microorganismos)

MBDs dominios de proteína a CpG

NB-LRRs, nucleotide-binding and leucine rich repeat (Proteínas con sitios de unión a nucleótido y ricas en leucina)

PAMPs, Pathogen associated molecular patterns (patrones moleculares asociados a patógeno)

PTI, immunity triggered by PAMPs (Inmunidad desencadenada por PAMPs)

R, proteína de resistencia

SN, Sigatoka negra

PRR Pattern recognition receptor (receptores de reconocimiento de patrones)

Cf *Cladosporium fulvum*

Ecp proteínas extracelulares

Cf-Avr4 efector de *Cladosporium fulvum*

ABREVIATURAS

Cf-ECP6 proteína extracelular de *Cladosporium fulvum*

HR Hypersensitive response (reacción hipersensible)

ADN ácido desoxiribonucleico

ARN ácido ribonucleico

HPLC High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta eficiencia)

SIAP servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

SN Sigatoka negra

ROS reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)

NO óxido nítrico

SAR Resistencia Sistémica Adquirida

JA ácido jasmónico

ET etileno

H3K9me3 trimetilación de la lisina 9 en la histona H3

H3K9me2 dimetilación de la lisina 9 en la histona H3

H3K14Ac acetilación en la lisina 14 en la histona H3

CpG Citocina fosfato Guanina

H3PS10 fosforilación en la serina 10 en la histona H3

CGIs islas CpG

DNMT metiltransferasas

RIP mutaciones inducidas por repeticiones puntuales

C citosina, T timina, G guanina, A adenina

H2Bub ubiquitinación en la histona 2B en K123

ARNm ARN mensajero

Ct threshold cycle

$\Delta\Delta Ct$ delta delta Ct

PDA Potato dextrose agar (agar de papa y dextrosa)

H₂O UP agua ultrapura

DEPC diethyl pyrocarbonate (dietil pirocarbonato)

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

ADNc Acido desoxiribonucleico de cadena sencilla

dNTPs Deoxynucleotides (desoxirribonucleótidos trifosfato)

DTT Dithiothreitol (ditiotreitolo)

RT transcriptasa reversa

IDT por sus siglas en ingles INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

PCR reacción en cadena de la polimerasa

HPLC cromatografía líquida de alta eficiencia

5mdC 5 metildesoxicitocina

ddC 2- desoxicitocina

ANOVA análisis de varianza

NIB nuclear isolation buffer (amortiguador de extracción de núcleos)

ABREVIATURAS

PIPES piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)

pH indicador del potencial de hidrógeno

MgCl₂ Cloruro de magnesio

KCl cloruro de potasio

NaCl cloruro de sodio

PMFS fluoruro de fenilmetilsulfonilo

CaCl₂ cloruro de calcio

H₂SO₄ ácido sulfúrico

BSA albúmina sérica bovina

DOC desoxicolato de sodio

TCA ácido tri-cloroacético

CuSO₄.5H₂O sulfato de cobre pentahidratado

Na₂CO₃ carbonato de sodio

NaOH hidróxido de sodio

MeOH metanol

PBST amortiguador fosfato salino con Tween 20

HRP horseradish peroxidase (peroxidasa de rábano)

RESUMEN

Dentro de los hongos fitopatógenos los del género *Mycosphaerella* representan uno de los más importante y devastadores de cultivos de plátanos y bananos alrededor del mundo. En México esta enfermedad es reportada como un problema continuo y ha aumentado su incidencia en los Estados productores de Colima, Tabasco y Chiapas. El manejo de la Sigatoka negra y del complejo Sigatoka en general es actualmente casi completamente dependiente de la aplicación semanal de fungicidas a lo largo de la temporada de crecimiento del banano, representando un alto costo socioeconómico que incluye medio ambiente, salud humana y la generación de resistencia en el patógeno, por lo que es necesario buscar alternativas para su control. En la actualidad se están utilizando herramientas biotecnológicas para conocer y comprender más la biología de este patógeno. Un aspecto que ha sido muy poco explorado es el papel que desempeña la regulación epigenética en el desarrollo de patógenos fúngicos. Es por ello que este trabajo tuvo como objetivo analizar la regulación epigenética durante el desarrollo *in vitro* del hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Para lo cual se realizó la colecta de micelio de *M. fijiensis* durante seis semanas de crecimiento, las cuales se nombraron tiempo 1 (T1), tiempo 2 (T2) y así sucesivamente a las muestras colectadas semana a semana, durante seis semanas, comenzando con la cepa madre como tiempo cero (T0). Se analizó el perfil de metilación global mediante la técnica de HPLC, para observar y conocer el porcentaje de metilación a nivel de ADN en el micelio de *M. fijiensis* en distintas etapas de crecimiento. Para evaluar la metilación de histonas se utilizó la técnica de inmunobloting empleando anticuerpos específicos contra H3K9me2, una marca asociada a represión por generar un cambio conformacional de condensación de la cromatina en heterocromatina, así como también se evaluó una marca de eucromatina H3K4me2. Los resultados mostraron que en T5 se da una mayor formación de heterocromatina con respecto a T1, en el caso de la marca de eucromatina en los tiempos evaluados no se observaron diferencias significativas. Quedan pendientes muchas preguntas sobre cómo éstos estados de la cromatina pueden estar influenciando el nivel de expresión de las proteínas efectoras relacionadas con el mecanismo infectivo del patógeno.

ABSTRACT

Within phytopathogenic fungi, the genus *Mycosphaerella* represents one of the most important and devastating banana and banana crops around the world. In Mexico, this disease is reported as an ongoing problem and has increased its incidence in the producing states of Colima, Tabasco and Chiapas. The management of black Sigatoka and the Sigatoka complex in general is currently almost completely dependent on the weekly application of fungicides throughout the banana growth season, representing a high socioeconomic cost that includes environment, human health and the generation of Resistance in the pathogen, so it is necessary to look for alternatives for its control. Biotechnology tools are now being used to better understand and understand the biology of this pathogen. One aspect that has been little explored is the role of epigenetic regulation in the development of fungal pathogens. Therefore, this work aimed to analyze the epigenetic regulation during the in vitro development of the fungus *Mycosphaerella fijiensis*. For this purpose, the mycelial collection of *M. fijiensis* was performed during six weeks of growth, which were named time 1 (T1), time 2 (T2) and so on to the samples collected week to week, for six weeks, starting With the mother strain as time zero (T0). The global methylation profile was analyzed by the HPLC technique, to observe and to know the percentage of DNA methylation in the mycelium of *M. fijiensis* in different stages of growth. To evaluate the histone methylation the immunoblotting technique was used using specific antibodies against H3K9me2, a mark associated with repression for generating a conformational change in the condensation of chromatin in heterochromatin, as well as evaluating a marker of eucromatin H3K4me2. The results showed that in T5 there is a higher formation of heterochromatin with respect to T1, in the case of the mark of eucromatina in the evaluated times no significant differences were observed. Many questions remain about how these chromatin states may be influencing the expression level of the effector proteins related to the infective mechanism of the pathogen.

INTRODUCCIÓN

Más de 120 países del trópico y subtropical se dedican al cultivo de plátanos y bananos, incluyendo México. Es el cuarto cultivo más importante a nivel mundial, presentando una producción de 106,714,204.76 toneladas. Sin embargo, su producción se ha visto seriamente amenazada por diversas enfermedades.

La Sigatoka negra es la enfermedad foliar más devastadora de los cultivos de plátanos y bananos alrededor del mundo. La enfermedad reduce la capacidad fotosintética de la planta debido a las lesiones necróticas e induce alteraciones fisiológicas en la planta, dando en consecuencia bajo rendimiento de los cultivos y la reducción de la calidad de la fruta. Es causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* (anamorfo *P. fijiensis*).

Durante la colonización de los patógenos a su hospedero, las plantas poseen una primera línea de defensa basada en la percepción sensitiva de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR). Sin embargo los patógenos exitosos rebasan mediante la producción de proteínas efectoras esa primera línea de defensa llamada inmunidad activada por PAMPs (PTI). Algunas plantas pueden percibir dichos efectores a través de receptores adicionales, proteínas con repeticiones ricas en leucina que unen nucleótidos (NB-LRR), las cuales desencadenan una segunda línea de defensa llamada inmunidad desencadenada por efector (ETI).

En estudios realizados sobre efectores secretados por *Cladosporium fulvum* al apoplasto del hospedero encontraron que el efector Cf-Avr4, protege la quitina de hifas fúngicas contra la degradación de las quitinasas presentes en la planta. La proteína extracelular (ECP), Cf-ECP2 de *Cladosporium fulvum* tiene una función desconocida; sin embargo, se ha visto que en mutantes que han perdido su función por supresión del gen, pierden virulencia, si la planta cuenta con la proteína R induce una fuerte reacción hipersensible (HR). Cf-ECP6 se propone que contribuye con la virulencia al evitar la activación de la inmunidad desencadenada por efector (PTI). Se cree que ECP6 es secretada por *Cladosporium fulvum* para secuestrar oligosacáridos de quitina e interferir entre el hongo y su hospedero. Estudios realizados en *Mycosphaerella fijiensis* reportaron proteínas homólogas de estos efectores, conservando su funcionalidad.

INTRODUCCIÓN

Sin embargo el papel de la regulación epigenética en la patogenicidad y desarrollo de patógenos fúngicos no ha sido muy explorada. En 1940 Conrad Waddington definió por primera vez a la epigenética como las interacciones entre genes y el ambiente que definen el fenotipo de cada ser vivo. Los informes sobre el papel de la epigenética en la regulación de la virulencia fúngica a través de proteínas efectoras es un ejemplo de las áreas inexploradas de la regulación epigenética.

En los hongos la regulación epigenética ha sido estudiada en hongos modelos no patogénicos, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* y hongos filamentosos como *Neurospora crassa*. Los estudios sobre estos modelos revelaron tres mecanismos epigenéticos prevalentes de regulación, la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y el sistema de silenciamiento de ARN.

Los procesos de modificación de histonas y la metilación del ADN a menudo implican interacciones dinámicas que puede reforzar o inhibir los cambios epigenéticos. Por lo tanto, los procesos de modificaciones de las histonas y la metilación del ADN son interdependientes, y ambos contribuyen a la situación general de la cromatina y su control epigenético en la expresión génica. Actualmente no se cuenta con ningún trabajo previo que explore la importancia de la regulación epigenética en el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis*, por lo que se tiene el interés de realizar el análisis de la regulación epigenética a nivel ADN y de histonas, y con ello comprender de qué manera influye la remodelación de la cromatina durante las distintas etapas de desarrollo de vida de *M. fijiensis*, mediante el uso de dos técnicas como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la cual determina los porcentajes de metilación global y el western blot para observar el cambio en la estructura de la cromatina a nivel histonas, mediante el uso de anticuerpos específicos para la histona 3.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1. El banano, importancia socioeconómica

El banano es el cuarto cultivo de mayor importancia a nivel mundial luego del trigo, arroz y maíz, con una producción anual aproximada de 100 millones de toneladas. Es la fruta de mayor exportación en términos de volumen y es la segunda fruta tropical más importante por su consumo a nivel mundial después de los cítricos (Friesen, 2016). Más de 120 países del trópico y subtropico se dedican al cultivo de los bananos y plátanos, incluyendo México (Churchill, 2010).

En cuanto a su valor nutricional, los bananos y plátanos son ricos en vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, minerales, carbohidratos, aminoácidos como la lisina, leucina y valina y su fibra favorece la flora bacteriana benéfica y estimula la digestión (Canto-Canche y Castillo-Ávila, 2011).

De acuerdo a la FAO, en el año 2016 se cosecharon 106,714,204.76 toneladas de plátano en todo el mundo, siendo los países con mayor superficie cultivada, la India, Tanzania, Brasil y Filipinas. México, por su parte, ocupa el décimo lugar con un volumen de 2,127,772.29 toneladas. Es el producto agrícola número veintiséis en nuestro país, generando alrededor de \$5,411,964.86 (FAO, 2016; SIAP, 2014).

1.2. Problemática del cultivo de plátano

En los últimos años, la producción de plátanos se ha visto seriamente amenazada por la disminución de la fertilidad del suelo, fenómenos naturales, declive del rendimiento, problemas de plagas. Se han registrado alrededor de 470 especies de insectos y ácaros que atacan en mayor o menor medida a los cultivos. Entre los principales agentes patógenos causantes de enfermedades se enlistan: nematodos, virus, bacterias y hongos (Alvarado y Días, 2007).

En las enfermedades causadas por hongos se encuentran el mal de Panamá (*Fusarium*

oxysporum), la punta de cigarro (géneros *Stachylidium*, *Fusarium* y *Deightoniella*), *Cordana* (*Cordana musae*), Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*) y la Sigatoka negra (*M. fijiensis*), siendo la Sigatoka negra la enfermedad foliar más devastadora de los cultivos de plátanos y bananos alrededor del mundo (Shirani *et al.*, 2012).

1.2.1. La Sigatoka

El complejo de la Sigatoka produce la enfermedad foliar más seria y económicamente importante de los bananos y plátanos en México y el mundo; es atribuida a especies de *Mycosphaerella*. Tres hongos son reconocidos como los principales del complejo: *Mycosphaerella musicola* (anamorfo *Pseudocercospora musae*) que causa la enfermedad de la Sigatoka amarilla, *M. eumusae* (anamorfo *P. emusae*) que causa la enfermedad de la mancha foliar eumusae y *M. fijiensis* (anamorfo *P. fijiensis*) que causa la enfermedad de la Sigatoka negra (Churchill, 2011). La enfermedad reduce la capacidad fotosintética debido a las lesiones necróticas, e induce alteraciones fisiológicas en la planta, dando en consecuencia bajo rendimiento de los cultivos y la reducción de la calidad de la fruta (Arzolou *et al.*, 2008).

1.2.2. Origen y distribución

La Sigatoka negra (SN), se describió como una enfermedad foliar grave en 1963, en Viti Levu (Fiji), aunque hay evidencias de su presencia en Hawai y en algunas zonas del Pacífico desde mucho antes (Stover y Dickson, 1976). Rhodes (1964) la describió como la enfermedad de la raya negra de las hojas y más tarde se conoció como enfermedad de Sigatoka negra. Morelet (1969) validó la especie con el nombre de *M. fijiensis*, Deighton (1976) colocó este anamorfo en el grupo *Pseudocercospora*, como *P. fijiensis*. En Centroamérica, en 1974 se describió en Honduras una nueva variedad de *M. fijiensis* y nombrado como *M. fijiensis* var. *Difformis*, desde allí se dispersó por la región. En Sudamérica, se registró por primera vez en Colombia en 1981; posteriormente en 1989 en Ecuador, Cuba y Venezuela (Marín *et al.*, 2003). En México la SN se presentó por primera vez en 1981 en Tabasco y Chiapas y se dispersó al resto de los estados productores de banano (Vázquez, 2005).

1.2.3. Control de la Sigatoka negra

El control de esta enfermedad está basado en el uso de agroquímicos con frecuencias relativamente altas, esta práctica resulta muy costosa debido a que se realiza por medio de avionetas o helicópteros (Nakyanzi, 2002). Sin embargo, tales aplicaciones son potencialmente perjudiciales para el medio ambiente, fauna y los seres humanos que viven y trabajan en zonas bananeras. La situación es aún más preocupante para los pequeños agricultores que no pueden pagar por el uso de fungicidas, y por lo tanto no tienen los medios prácticos para controlar efectivamente el impacto o la propagación del hongo (Marin, 2003; Churchil, 2011).

Los fungicidas son el agente mayoritario de control, aunado a prácticas culturales. Desde 1950 se ha empleado aceite mineral para reducir el volumen de fungicidas, formando una niebla homogénea que distribuye los ingredientes activos sobre la hoja, impidiendo la evaporación y mejorando, en el caso de muchos fungicidas sistémicos, la penetración al tejido vegetal. Los bis-ditiocarbamatos de etileno, como son maneb y mancozeb son ampliamente usados, tienen un modo no específico de acción con el grupo tiol bloqueando la respiración y otros procesos metabólicos. Los benzamidazoles fueron los primeros fungicidas sitio-específico para el control de la enfermedad (Fouré y Ganry, 2008).

1.2.4. Sintomatología de la Sigatoka negra

La enfermedad presenta varias etapas. *M. fijiensis* es un hongo hemibiotrófico, debido a que durante su ciclo de vida tiene un comportamiento biotrófico y necrotrófico. En las primeras etapas (3-4 semanas) de infección, el hongo presenta el comportamiento biotrófico, en el cual establece una relación de nutrición aparentemente no perjudicial para la planta; en esta etapa no se observan síntomas de daño provocado por el patógeno en la planta infectada. Posteriormente el hongo inicia su fase necrotrófica, la cual se caracteriza porque el patógeno invade el tejido vegetal de manera agresiva, matando las células del hospedero mediante toxinas o enzimas; a partir de estos sucesos se manifiestan los síntomas de la enfermedad (Hoss *et al.*, 2000).

De acuerdo a Fouré (1985) se han identificado seis etapas necrotróficas con base en el progreso de los síntomas. La primeras tres etapas aparecen aproximadamente a los 7, 14

y 22 días después de la infección, aunque este período es variable dependiendo del tipo de cultivar, la cantidad de inóculo, la virulencia del hongo, las condiciones ambientales, la nutrición y el genotipo de la planta.

A continuación se describen los síntomas de cada una de las etapas descritas por Fouré (Figura 1):

ETAPA 1. Solo es observable en el envés de la hoja. Es el primer síntoma visible de la enfermedad, se distingue por la presencia de pequeñas decoloraciones o por puntos con menos de un milímetro de longitud, de color café rojizo, conocidas como pizca.

ETAPA 2. Las pizcas aumentan de tamaño en sentido longitudinal paralelas a la venación, formando estrías de 2 a 3 mm de longitud, de color café rojizo. Se visualizan primero en el envés y luego en el haz.

ETAPA 3. Se distingue por la presencia de estrías o rayas con un tamaño mínimo de 5 mm, pudiendo alcanzar hasta 2 a 3 cm de largo. Las estrías conservan el color rojizo por el envés y toman color negro por el haz.

ETAPA 4. Se caracteriza por la presencia de manchas elípticas u ovals que toman un color café por el envés y negro por el haz.

ETAPA 5. En este estado la mancha elíptica es totalmente negra en ambas caras de la hoja, aparece rodeada por un halo amarillo y presenta una “depresión” en el centro del tejido.

ETAPA 6. La mancha está totalmente desarrollada; el área central hundida, de color gris y un borde de color café oscuro o negro que forma un anillo bien definido alrededor de la mancha. Además, aparece un halo de color amarillo brillante alrededor de la lesión.

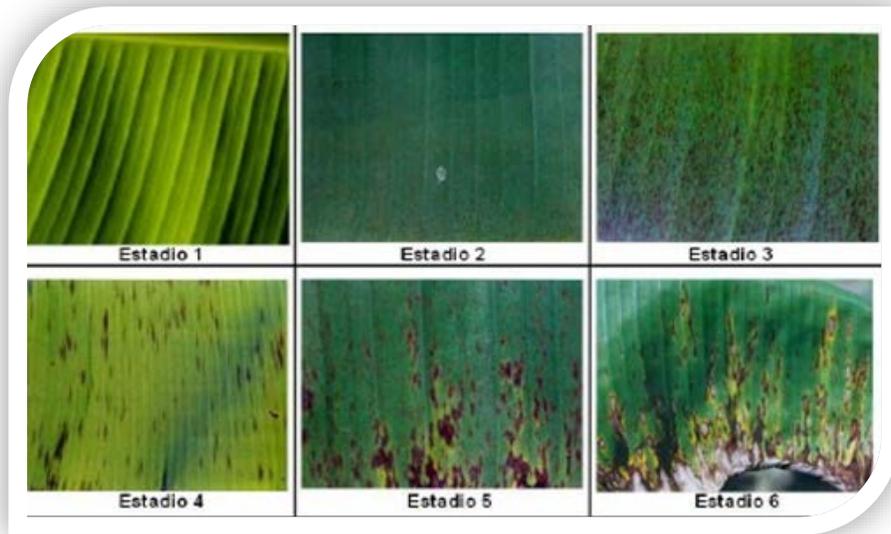


Figura 1 Etapas de la Sigatoka negra de acuerdo a Fouré (Herrera y Naranjo, 2007).

1.3. *Mycosphaerella fijiensis*

El género *Mycosphaerella* comprende más de 1000 especies. Por mencionar algunas se pueden citar a *M. graminícola*, *M. citri* y *M. fragaria* que infectan los cultivos de trigo, cítricos y fresas, respectivamente. Por otro lado están *M. fijiensis* y *M. musicola* que son fitopatógenos que afectan al banano (Crous *et al.*, 2009). En el cuadro 1 se presenta la clasificación taxonómica de *M. fijiensis*, especie de interés en el presente estudio.

Cuadro 1 Clasificación taxonómica de *M. fijiensis*.

REINO:	<i>Fungi</i>
DIVISION:	Eumycota
SUBDIVISION:	Ascomycotina
CLASE:	Loculoascomycetes

ORDEN:	Dothideales
FAMILIA:	Dothideacea
GENERO:	<i>Mycosphaerella</i>
ESPECIE:	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>
NOMBRE COMUN:	Sigatoka negra, raya negra de la hoja, mancha negra

1.3.1. Ciclo de vida de *M. fijiensis*

M. fijiensis puede reproducirse sexual y asexualmente. *M. fijiensis* (Morelet) es el nombre dado a la fase sexual (Teleomorfa) y *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton (anamorfo) es el nombre de la fase asexual (Orozco-Santos *et al.*, 2001).

En la figura 2 se esquematizan las dos fases de reproducción, durante la fase asexual o imperfecta se producen conidios en esporodoquios, los cuales se forman sobre conidióforos individuales o en grupos de 2 o 3 que salen de los estomas, o bien pueden formarse a partir de las células del estroma. En la fase sexual o perfecta se forman los espermagonios y los peritecios. Ambas estructuras se forman en la superficie de la hoja, los espermagonios son la parte masculina y en condiciones húmedas pueden producir grandes cantidades de espermacios. Los peritecios presentan numerosas ascas. Los espermacios producidos en los espermagonios fertilizan los peritecios llenos de ascas, dando como resultado la producción de ascosporas. Conidios y ascosporas son diseminadas a través del viento y en condiciones ideales de temperatura y humedad germinan, penetrando a través de los estomas, colonizando los espacios intracelulares y generando diversas lesiones en la hoja, hasta formar manchas y necrosis, dando lugar a la formación de esporodoquios, espermagonios y peritecios, iniciando nuevamente la producción de conidios y ascosporas (Meredith y Lawrence, 1969).

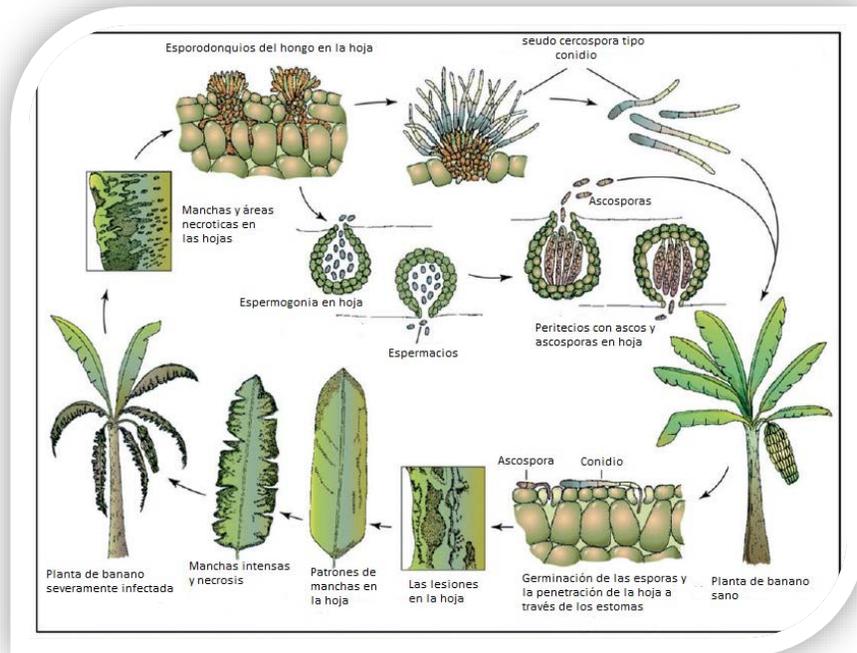


Figura 2 Ciclo de vida de *M. fijiensis* y desarrollo de la enfermedad de la Sigatoka negra en banano (Agrios, 2005)

1.3.2. Proceso de conidiación

El proceso de conidiación comienza cuando los conidióforos aparecen en las etapas 2 y 3 y en manchas maduras de la etapa 5 de de Sigatoka negra. Se desarrollan sobre un pequeño agrupamiento de cuatro a seis células engrosadas que se forman en la cámara subestomática y emergen a través de la apertura de los estomas en fascículos de dos a cuatro conidióforos, sin evidencia de la formación de esporodocios en estas etapas. La presencia de esporodocios es rara en las manchas de las fases 5 y 6, a diferencia de lo que ocurre en la Sigatoka amarilla (*M. musicola*) (Perez-Vicente 2002).

En los cultivos de 8-12 días de edad procedentes de aislamientos de ascosporas, las hifas producen en sus extremos conidióforos hialinos, típicos en los que en su extremo apical van desarrollándose los conidios (Figura 3 A). De acuerdo al crecimiento de los conidióforos, los conidios van quedando en la pared lateral como lo demuestran las cicatrices laterales presentes en estos. Los conidios son obclavados, hialinos a pardo

oliváceos, de 27-110 x 2-5 μ m (media de 66.2 x 3.67 μ m), con 1-10 septos (más frecuentemente 7 septos), con un hilum bien marcado, en contraste con los conidios más cortos y cilíndricos a cilindro-obclavado sin hilum visible de *M. musicola* (Perez-Vicente 2002) (Figura 1. 3 B).

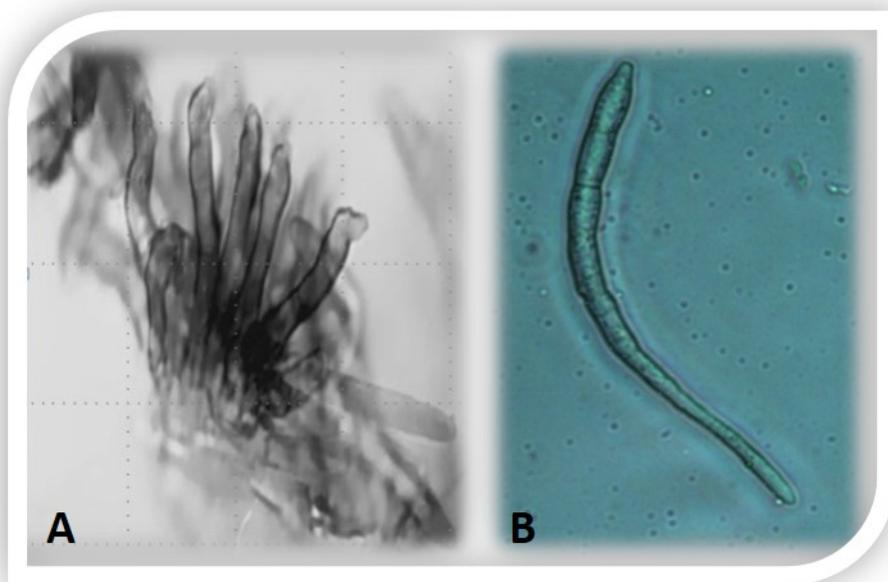


Figura 3 A Conidióforos de *M. fijiensis*. (Arzanlou *et al.*, 2008; Pérez-Vicente 2002). **B** Conidios de *M. fijiensis* (Pech-Balan, 2012).

1.4. Interacción planta-patógeno

Para activar rápidamente las respuestas de defensa, la planta emplea un sistema de vigilancia sofisticada, capaz de distinguir entre las señales propias y las generadas por un patógeno. La respuesta de la planta implica modificar su metabolismo. Esto incluye por ejemplo la activación de genes involucrados en funciones de apertura de canales para el intercambio de iones, la modificación de proteínas y la activación de enzimas preexistentes (de Wit *et al.*, 2009).

Las células de las plantas al sentirse invadidas producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), apertura de canales iónicos, fosforilación/defosforilación de

proteínas, inducción de genes relacionados a defensa, acumulación de ácido benzoico y salicílico, y la producción de etileno. Posteriormente, se dan respuestas locales y alteraciones en las rutas del metabolismo secundario, detención del ciclo celular, síntesis de proteínas relacionadas a patógenos (PRs), respuesta hipersensible (HR) y muerte celular localizada (Boller *et al.*, 2009).

Al mismo tiempo, las células vegetales eliminan las toxinas generadas por el patógeno. Esta serie de respuestas inician la *Resistencia Sistémica Adquirida* (SAR, por sus siglas en inglés), la cual predispone a las células vecinas contra ataques futuros del mismo u otros patógenos. Estas respuestas de defensas se mantienen bajo un ajustado control genético y sólo se activan frente a la presencia del patógeno (Bolton *et al.*, 2008).

Los PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos, por sus siglas en inglés), son componentes esenciales de toda clase de patógenos, como son flagelina en bacterias y quitina en hongos. Son reconocidos por proteínas receptoras llamadas receptores de patrones de reconocimiento (PRRs) en las plantas. Las plantas han evolucionado para detectar los PAMPs de los patógenos, respuesta llamada PTI, y se refiere a la activación de la respuesta inmune del hospedero una vez que detecta al PAMP y es el primer nivel de defensa (Dodds y Rathjen, 2010).

Se ha encontrado que varios genes de las rutas de señalización para la activación de la defensa se encuentran bajo regulación epigenética (Álvarez-Venegas *et al.*, 2007). En *Arabidopsis thaliana* la infección por patógenos induce la expresión de al menos una histona desacetilasa (*HDA19*), lo que sugiere que la acetilación / desacetilación de histonas tiene un papel importante en la respuesta contra los patógenos (Zhou *et al.*, 2005). *HDA19* participa en varios procesos de desarrollo y es inducida por el ácido jasmónico (JA) y por el ácido-1-carboxílico 1-aminociclopropano [ACC, un precursor del etileno (ET)]. La sobreexpresión del gen *HDA19* aumenta la expresión de los genes de quitinasa y glucanasa, así como la resistencia contra el hongo patógeno *Alternaria brassicicola* (Zhou *et al.*, 2005). También se han observado cambios en las metilaciones en las rutas de señalización y en los genes involucrados en defensa. Recientemente, De la Peña *et al.* (2012) encontraron en *A. thaliana* que mutaciones en genes que codifican para la metiltransferasa ASHH2, la cual metila a la H3K9me2, provocaba una rápida respuesta

hipersensible (HR).

1.4.1 Inmunidad activada por efector (ETI)

El segundo nivel de defensa de las plantas después de PTI, está constituida por la inmunidad desencadenada por efector (ETI). La cual se inicia en las plantas mediante el reconocimiento de proteínas efectoras por receptores en la membrana plasmática o intracelular de la clase de NB-LRRs (“nucleotide-binding and leucine rich repeat”), y su reconocimiento puede ser directo o indirecto. A los receptores que reconocen a los efectores también se les conoce como proteínas de resistencia a enfermedades (R). La ETI es una versión amplificada de PTI que a menudo resulta en la inducción de la respuesta de hipersensibilidad (HR) (Stael *et al.*, 2015).

El término efector ha sido ampliamente usado en el campo de las interacciones bióticas-planta, utilizando de una manera neutral, que puede abordar "avirulencia" y "elicitor", suponiendo el hecho de que la misma molécula pueden tener efectos positivos y negativos sobre el patógeno dependiendo del genotipo del hospedero (Chaparro-García *et al.*, 2012, Hogenhout *et al.*, 2009). Un efector puede actuar como un elicitor dando como resultado una respuesta necrotrófica, limitando la infección de un patógeno biótrofo, mientras que podría facilitar la infección de un patógeno necrótrofo, actuando entonces como una toxina para el hospedante. En el caso de patógenos hemibiótrofos como *Phytophthora infestans*, o *M. fijiensis*, el efector puede actuar como elicitor o como toxina, dependiendo del estado biotrófico o necrotrófico de la enfermedad (Kamoun, 2006).

Sin embargo una definición más amplia e inclusiva de efectores es como moléculas que alteran la estructura y función de la célula hospedera. Por ejemplo, en el caso de los efectores con actividades de avirulencia o estimulante, es decir, que activan las respuestas de defensa de la planta. Para revelar información sobre las funciones de un "efector", es preferible utilizar descriptores que reflejen estas actividades específicas (Hogenhout *et al.*, 2009).

Algunos efectores, son enzimas que modifican bioquímicamente las células del huésped, como los efectores T3SS bacterianos, impidiendo su función o eliminándola. Las enzimas son diversas e incluyen actividades de proteasa, hidrolasa, fosfatasa, cinasa, transferasa y

ubiquitina ligasa. Otros efectores actúan uniéndose a proteínas del hospedero para modular sus funciones, e inhiben enzimas vegetales tales como cinasa, proteasas, glucanasas y peroxidases. El grupo de efectores TAL de *Xanthomonas* ha evolucionado para unirse a ácidos nucleicos y modular la expresión génica de su hospedero; se unen directamente en los promotores de genes de la plantas para activar la expresión génica de genes hospedadores que benefician al patógeno (Chaparro-Garcia *et al.*, 2012, Hogenhout *et al.*, 2009).

Los efectores han evolucionado generalmente para permitir el parasitismo, por ejemplo, suprimiendo la respuesta inmune de las plantas o modificando la fisiología de las plantas para apoyar el crecimiento y la propagación del parásito, por lo que un efector es una molécula o proteínas generada por el patógeno que modula la inmunidad innata de su hospedero y permite el desarrollo de la infección. Los efectores pueden ser secretados en el apoplasto y en el citoplasma de las células huésped a través de diferentes sistemas de secreción, donde se dirigen a diferentes compartimentos subcelulares (Stael *et al.*, 2015).

Los efectores se diferencian de los MAMPs (“microbe- associated molecular patterns”, un término más general de los PAMPs), en que los primeros pueden estar ausentes o haber evolucionado sustancialmente en algunas de las cepas del patógeno, mientras que los MAMPs son elicitores de defensa que son estables evolutivamente, siendo componentes tan indispensables para el patógeno que no pueden ser sacrificados o incluso alterados sin afectar seriamente su viabilidad (Bent y Mackey, 2007).

Los primeros efectores identificados se denominaron genes *Avr* (de avirulencia) dado que su actividad, detectada a través de su interacción con los productos proteicos de los denominados genes de resistencia (genes *R*), inducen defensa que bloquea su virulencia (Bent y Mackey, 2007). Se ha propuesto una hipótesis, llamada “gen-gen” según la cual las proteínas *R* son capaces de detectar las perturbaciones que provocan los efectores en sus blancos celulares, activando el correspondiente mecanismo de señalización (van der Biezen y Jones, 1998). Por tanto un efector contribuye a la virulencia mientras pueda evitar el reconocimiento por parte de la proteína *R* respectiva.

1.5 Estudios de expresión de algunos genes avr y ecp

Algunas proteínas de las plantas relacionadas con la resistencia a los patógenos son enzimas líticas que pueden destruir la integridad de la pared celular e inhibir el crecimiento del patógeno. En consecuencia, la función de diversos efectores patogénicos es proteger de manera directa o indirecta contra la hidrólisis, o evitar su detección. Por ejemplo, múltiples efectores de patógenos filamentosos son capaces de inhibir proteasas, como es el caso de Avr2 del patógeno de *Cladosporium fulvum*, la cual es una pequeña proteína efectora rica en cisteína. Ésta se une e inhibe a la papaína CPs Rcr3 PiP1 de tomate. El silenciamiento de Avr2 en *C. fulvum* reduce la virulencia del patógeno en tomate y su expresión en *Arabidopsis thaliana* incrementa la susceptibilidad de la planta a patógenos filamentosos (Toruño *et al.*, 2016).

En la década de 1940, Flor, trabajando con lino (*Linum usitatissimum*) y el hongo patógeno de la roya *Melampsora lini*, estudió la herencia de la resistencia de la planta y de la virulencia del patógeno. Su obra revela el clásico modelo "gen-por-gen" que propone que la resistencia de una planta a un patógeno ocurre cuando la planta posee un gen dominante de resistencia (R) y el patógeno expresa un gen complementario dominante, de avirulencia (Avr). Una pérdida o alteración del gen de la resistencia de la planta (R) o del gen del patógeno de avirulencia (Avr) conduce a la enfermedad (compatibilidad) (Marin *et al.*, 2003).

1. 5. 1 Efector Avr4

La quitina es uno de los componentes de las paredes celulares de los hongos y es la diana de las quitinasas vegetales, producidas como parte de su respuesta de defensa (Grison *et al.*, 1996). Para activar la defensa contra el ataque hidrolítico, patógenos filamentosos pueden también secretar efectores que ofrecen una protección pasiva. El efector de apoplasto Avr4 de *C. fulvum* es una lectina de unión a quitina que posee un módulo de unión a carbohidrato de la familia 14 (CBM14), que específicamente se une a la quitina de las hifas fúngicas (van der Burg *et al.*, 2003, 2004).

Experimentos *in vitro* de la interacción de *C. fulvum* con su hospedero tomate muestran que el efector Avr4 se une específicamente a las paredes celulares del hongo, pero no a las de tomate (Westerink *et al.*, 2002). En estudios *in vitro* para los hongos *Fusarium solani* y *Trichoderma viridae* se encontró que en la planta el Avr4 se une específicamente a quitina

presente en las paredes celulares de los hongos y se sugirió que, a través de esta unión, Avr4 puede proteger las hifas de los hongos de la hidrólisis de quitinasas vegetales (van den Burg *et al.*, 2006). Dicha propuesta se confirmó posteriormente y actualmente se sabe que efectivamente Avr4 protege a los hongos contra la acción de quitinasas (Friesen, 2016, Churchill, 2010, Stergiopoulos *et al.*, 2010, van der Burg *et al.*, 2006,)

1. 5. 2 Efector Ecp2

Las Proteínas Ecp son proteínas extracelulares (Ecp, por sus siglas en inglés). La función intrínseca de la proteína Ecp2 en *C. fulvum* es aún desconocida, pero se ha visto que las mutantes que han perdido su función, pierden virulencia (Lauge, 1997).

C. fulvum es un hongo biotrófico que requiere tejido vivo para su alimentación. Durante la infección de tomate, el patógeno secreta proteínas efectoras dentro del apoplasto que actúan como factores de virulencia que son reconocidos por proteínas de resistencia llamadas cognados (Cf) que inducen una respuesta hipersensible (Stergiopoulos y De Wit, 2009). En el tomate, la capacidad de reconocer Cf-Ecp2 para inducir una HR se origina a partir de la especie silvestre de tomate *Solanum pimpinellifolium* (Haanastra, 1999).

Estudios realizados en *M. fijiensis* demostraron la existencia de tres efectores homólogos de Ecp2 de *C. fulvum* (Stergiopoulos *et al.*, 2010). La función intrínseca de Ecp2 es todavía desconocida, pero es probable que la necrosis que induce Mf-Ecp2 en tomate refleje la función original de su virulencia intrínseca, como propusieron Beveraggi y colaboradores (1995) para el Ecp2 de *C. fulvum*.

Es posible que en la coevolución entre *C. fulvum* y su hospedero (tomate), la perturbación por Cf-Ecp2 es mínima y no induce necrosis, de modo que le permite continuar con su estilo de vida biotrófico. En cambio en *M. fijiensis* al ser hemibiotrófico, Mf-Ecp2 induce una fuerte necrosis, aun en ausencia de su proteína R. Dependiendo de las concentraciones de Mf-Ecp2 y la Cf-Ecp2, la virulencia del patógeno puede variar como resultado de la interacción global con su hospedero. Esta situación muestra que el efector proteico puede actuar como potenciador de la virulencia en anfitriones susceptibles y como inductor de respuestas de defensa del huésped y la resistencia en plantas que contienen genes R afines (Stergiopoulos *et al.*, 2010).

1. 5. 3 Efector ECP6

De Jonge y Thomma (2006), plantearon la hipótesis de que ECP6 contribuye con la virulencia al evitar la activación de la inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI). Estudios realizados en *C. fulvum* por de Jonge y colaboradores (2010) muestran que el efector de proteína ECP6 contiene dominios de LysM que median la virulencia a través de la perturbación de la inmunidad del huésped en respuesta a presencia de quitina. Durante la colonización, los oligosacáridos de quitina procedentes de especies fúngicas actúan como “Patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs) y son percibidos en las células vegetales por receptores en la superficie celular NB-LRR y permite contrarrestar la colonización del tejido por el patógeno. La presencia de dominios LysMs en ECP6 indica que estos efectores pueden competir con los receptores de oligosacáridos de quitina del hospedero. Se cree que ECP6 es secretado por *Cladosporium fulvum* para secuestrar oligosacáridos de quitina e interferir entre el hongo y su hospedero, para evadir la activación de los receptores e impedir la reacción del hospedero.

Esto puede representar una estrategia de supresión inmune del huésped por los hongos patógenos, porque efectores LysM están ampliamente conservados en el reino fúngico.

1. 5. 4 Control epigenético de genes efectores

En 1940 Conrad Waddington definió por primera vez a la epigenética como las interacciones entre genes y el ambiente, que a su vez define el fenotipo de cada ser vivo. La epigenética es la transmisión de un fenotipo o patrones de expresión genética sin un cambio en la secuencia del ADN (Holliday, 2006). Los procesos epigenéticos pueden ser influenciados por factores ambientales; afectan la base molecular de la herencia, por lo que la evaluación es un efecto combinatorio de la variación genética y la epigenética (Skinner, 2015).

La regulación epigenética en hongos ha sido estudiada en modelos no patogénicos, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* y hongos filamentosos como *Neurospora crassa*. Los estudios sobre estos modelos revelaron tres mecanismos epigenéticos prevalentes de regulación, la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y el sistema de silenciamiento de ARN (Aramayo y

Selker, 2013). Sin embargo el rol de la regulación epigenética en la patogenicidad fúngica no ha sido muy explorada (Dubey y Jeon, 2016).

Los informes sobre el papel de la epigenética en la regulación de la virulencia fúngica a través de proteínas efectores son ejemplos de las áreas que merecen investigarse (Dubey y Jeon, 2016).

En *Leptosphaeria maculans*, Soyer y colaboradores (2014) analizaron de qué manera influye el entorno epigenético sobre la expresión génica de transposones y la avirulencia, encontrando que la trimetilación de la lisina 9 en la histona H3 (H3K9me3) estaba implicada en la regulación epigenética de genes efectores en este hongo. Estudiaron al hongo *in vitro* y durante su interacción con tejido foliar de *Brassica napus*, su hospedero. Empleando ARNi para el silenciamiento de HP1 y DIM-5 (genes necesarios para la formación y mantenimiento de heterocromatina) en *L. maculans*, se observó que los cambios en la cromatina regulan la expresión de genes efectores durante la infección de tejido foliar, ya que *L. maculans* abolió el silenciamiento epigenético de los genes relacionados a patogenicidad durante la interacción, en cambio en condiciones axénicas se mantuvieron reprimidos.

1. 6 Epigenética y la estructura de la cromatina

1. 6. 1 Epigenética y cromatina

La epigenética es el estudio de todas las modificaciones que se dan durante el proceso de regulación en la expresión de genes sin que ocurra un cambio en la secuencia del ADN (Ringgs *et al.*, 1996). La actividad de los genes (el “encendido” o “apagado” de su expresión) se relaciona con los cambios en la estructura de la cromatina, como son metilación en el ADN, modificación en las histonas y el ARN de interferencia, de forma estable y heredable en los genomas de los eucariotas superiores (Holliday, 2006)

En los organismos eucariotas, el ADN genómico está asociado con proteínas histonas y proteínas no histonas para formar una estructura compleja conocida como cromatina. Se distinguen dos estados diferentes en la cromatina, la eucromatina, menos condensada, más accesible y generalmente más fácil de transcribir y la heterocromatina, que es más

condensada y menos accesible a la maquinaria de transcripción. La heterocromatina puede ser constitutiva y se encuentra principalmente en centrómeros, sub-telómeros y grupos de ADNr, dando estabilidad e integridad al genoma, y la heterocromatina facultativa está dispersa a través del genoma en ella se dan los cambios que pueden ser reversibles y heredables. Estos cambios son responsables de regular la expresión de genes, y esto es llamado “epigenética” (Soyer *et al.*, 2014). La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma (Figura 4), el cual consiste en aproximadamente dos vueltas de las superhélices de ADN, envueltos en un octámero formado por cuatro especies de histonas: un tetrámero de histonas H3, H4 y el dímero H2A, H2B (Luger *et al.*, 1997).

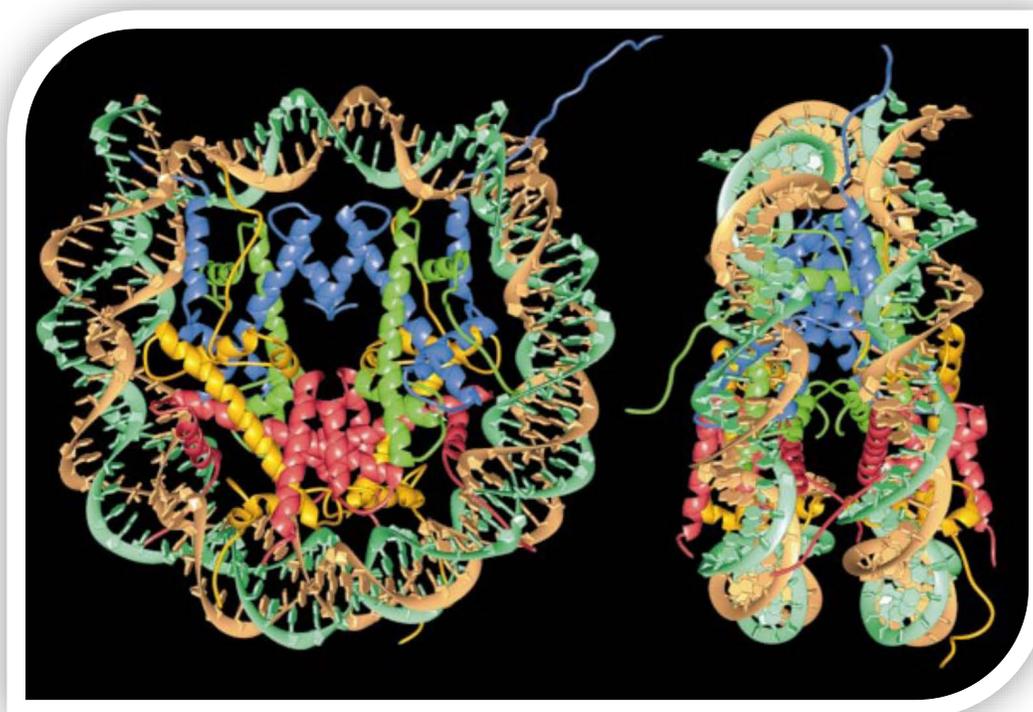


Figura 4 Vista frontal del nucleosoma. El nucleosoma se conforma del octámero de histonas, el cual está conformado por el tetrámero de histonas H3 en azul, H4 en verde, y el dímero H2A en amarillo y H2B en rojo, y extremos amino terminal, conocidas como colas de histona. En marrón y turquesa se muestra el ADN de 146 pares de bases aproximadamente (Luger *et al.*, 1997).

Los diferentes estados de la cromatina (Figura 5) se deben a distintas combinaciones de

modificaciones post-traduccionales de las histonas, lo cual comúnmente es conocido como el "código de histonas", así como al grado de metilación en el ADN (Jenuwein y Allis, 2001).

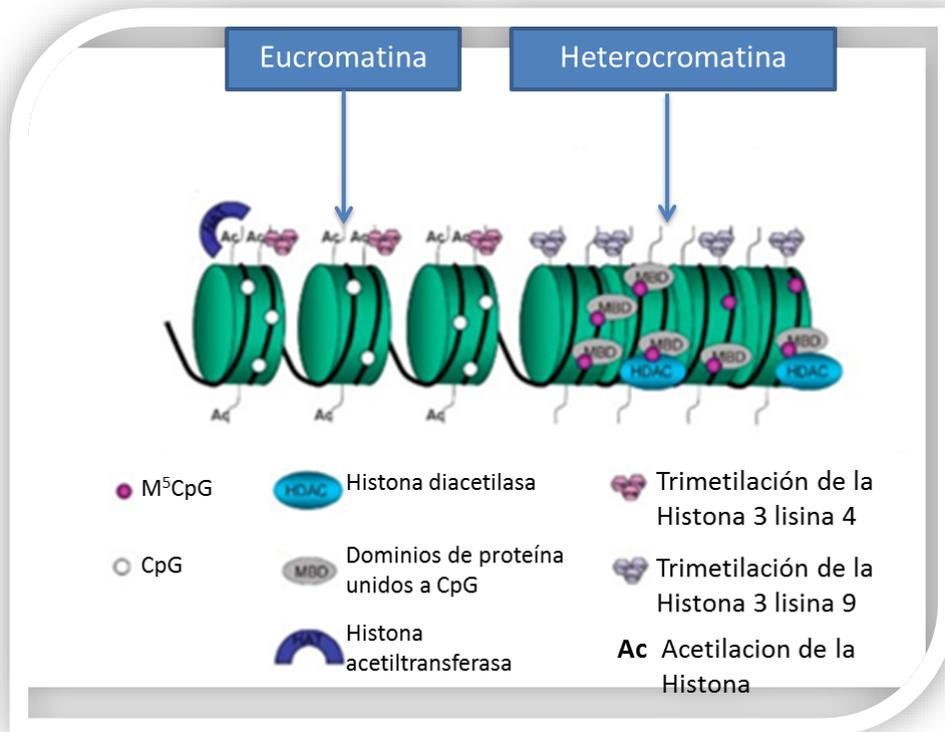


Figura 5 Estructura de la cromatina activa e inactiva. La cromatina activa transcripcionalmente se caracteriza por contener citosinas no metiladas y extremos de histonas acetilados. Cuando las citosinas se metilan se unen a dominios de proteína a su vez unida a CpG (MBDs), que atraen histonas desacetilasas (HDACs). Éstas remueven los grupos acetilos de los extremos de histonas. El ADN se transforma en una estructura de cromatina cerrada llevando la marca de silenciamiento de trimetilación de la lisina 9 en la histona H3 (H3K9me3), (Grønbæk et al. 2007).

1. 6. 2 Histonas

Las histonas son en su mayoría globulares a excepción de su amino terminal o "cola", que son estructuradas. Una característica de las histonas y en particular de la cola, son las modificaciones postraduccionales reversibles. La mayoría de las modificaciones de las

histonas se localizan en los extremos amino y carboxilo terminales, y algunos se localizan en los dominios globulares. Estos extremos aminos pueden ser modificados covalentemente por acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación y ubiquitinación, modificando la estructura de la cromatina, lo que a su vez regula la expresión de los genes involucrados en varios de los procesos biológicos (Berger, 2007, Kousarides, 2007).

Se ha sugerido que la combinación de modificaciones y sus combinaciones (llamado el código de la histona), que regula la estructura de la cromatina (figura 6), modulan la expresión de los genes en respuesta a diversos estímulos exógenos y endógenos, incluyendo el estrés, factores bióticos y abióticos (Casadio *et al.*, 2013). Se ha observado que la acetilación en la lisina 14 (H3K14Ac), la fosforilación en la serina 10 (H3PS10) y la metilación en la lisina 4 (H3K4me) están asociadas con la activación de genes, mientras que la metilación en la lisina 9 y 27 (H3k9me y H3K27me) y la fosforilación en la serina 28 (H3PS28), se relacionan con la represión de genes (Berger, 2007).



Figura 6 Modificaciones en las histonas H3 y H4. Los extremos amino terminal de las histonas pueden metilarse, acetilarse y fosforilarse. La activación de genes se da cuando se acetila la lisina 14, se fosforila la serina 10 y se metila la lisina

-
4. Mientras que la metilación en la lisina 9 y 27 y la fosforilación en la serina 28, se relacionan con la represión de genes (Modificado de Benjamin Lewin, 2009).

1. 6. 3 Metilación del ADN

La modificación epigenética más estudiada es la metilación del ADN y es asociada con el silenciamiento de la expresión de genes (Menendez *et al.*, 2011, Baubec y Schübeler, 2014). En la mayoría de los organismos eucariotas la metilación del ADN implica la adición de un grupo metilo en el anillo pirimídico de la citosina (figura 7), que lleva al reclutamiento de proteínas de unión que reconocen preferencialmente ADN metilado. Esta asociación de proteínas con enzimas y complejos de remodelación de la cromatina genera la estabilidad de la cromatina condensada (Newell-Price *et al.*, 2000).

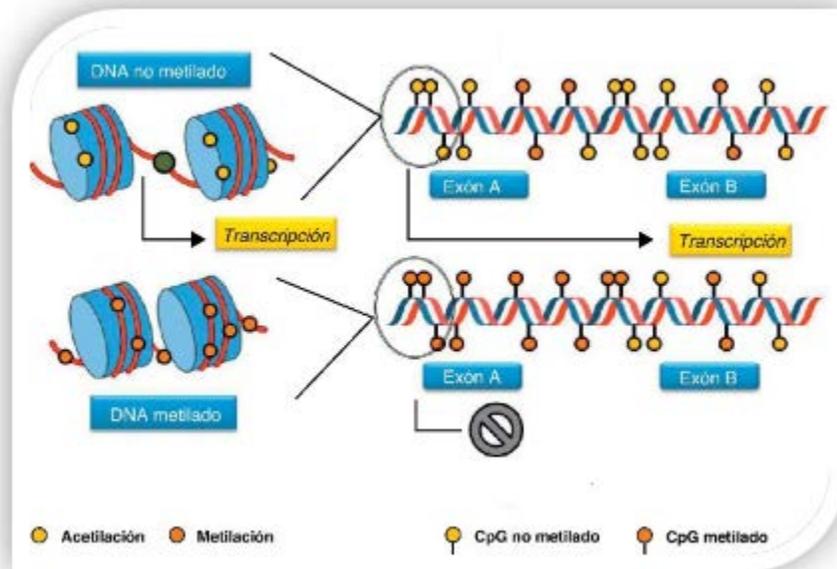


Figura 7 Metilación del ADN y su relación con la transcripción. Los sitios CpG no metilados mantienen la cromatina laxa, permitiendo que los factores de transcripción se unan al ADN y se dé la transcripción. En cambio en las regiones con ADN metilado, la compactación de la cromatina es mayor y por lo tanto la actividad transcripcional se detiene, ya que los factores de transcripción no pueden unirse a secuencias promotoras (Menéndez *et al.*, 2011).

Para entender la función de la metilación del ADN se requiere considerar la distribución de la metilación entre el genoma. Más de la mitad de los genes en los genomas de los vertebrados contienen regiones cortas ricas en CpG (1kb aproximadamente) conocidas como islas CpG (CGIs), y el resto del genoma se agota para CpGs (Jones, 2012). La presencia de la 5´metilcitosina en el promotor o en la secuencia codificante de un gen altera la unión de proteínas específicas reguladoras, modificando así la expresión (Lee *et al.*, 2004).

La metilación del ADN involucra al menos tres grupos de enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs por sus siglas en inglés): metiltransferasa *de novo*, metiltransferasa de mantenimiento y demetilinas. DNMT1 es la enzima involucrada principalmente en el mantenimiento del ADN preferentemente metilado y hemimetilado (Robertson, 2001). Otras metiltransferasas conocidas son DNMT3a y DNMT3b, contribuyen a la metilación *de novo*. Estas enzimas son esenciales para establecer los patrones de metilación del ADN en el desarrollo temprano. El entendimiento de como esto ocurre ha ayudado a la comprensión de que en algunos casos el sustrato para una metiltransferasa *de novo* es el ADN nucleosómico y que las modificaciones en las histonas dentro del nucleosoma influyen profundamente en estas enzimas para inducir la metilación *de novo* (Jones, 2012; Okano *et al.*, 1999).

1. 6. 4 Interacciones entre las modificaciones de histonas y la metilación de ADN

Los procesos de modificación de histonas y la metilación del ADN a menudo implican interacciones dinámicas que pueden reforzar o inhibir los cambios epigenéticos. Por ejemplo, la metilación en la lisina 9 (K9) de la histona H3 puede promover la metilación del ADN, y la metilación de la citosina en el ADN estimula tanto la desacetilación de H3K9 y la metilación de H3K9 (Fuks *et al.*, 2000). La conexión y el diálogo entre las marcas de metilación en el ADN y las histonas y los dominios estructurales que facilitan esta conexión en hongos, plantas y mamíferos es a través de la adición de marcas histonas como son metilación en la K36, K27, K4 y K9 de la histona H3 pueden afectar la metilación en el ADN (Du *et al.*, 2015). Por ejemplo, el dominio N-terminal de DNMT1 favorece la unión de HDAC (histona deacetilasa) y puede suprimir la transcripción de genes (Roundtree *et al.*, 2000).

DNMT3a y DNMT3b también pueden reclutar HDAC y proteínas de heterocromatina para silenciar genes (Bachman *et al.*, 2001). Por lo tanto, los procesos de modificación de las histonas y la metilación del ADN son interdependientes, y ambos contribuyen a la situación general de la cromatina y su control epigenético en la expresión génica (Du *et al.*, 2015).

1. 6. 4.1 H3K9me

La metilación en la histona H3 en la lisina 9 (H3K9) es una modificación altamente conservada, generalmente asociada a heterocromatina y se encuentra en casi todos los eucariotes, excepto en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Krauss, 2008). La enzima de heterocromatina Suvar3-9 en células de mamíferos fue la primera en mostrar que tiene esta actividad *in vitro*, para metilar H3K9, y la modificación de la proteína silenciadora, llamada HP1. Se ha observado que el mecanismo de Suvar39 se utiliza para la represión específica de genes y que parece ser que la metilación H3K9 se opone a una segunda metilación de la lisina del dominio SET (Suppressor of variegation, Enhancer of zeste and Titorax) en la metilación H3K4, y estas modificaciones alternativas marcan maravillosamente las áreas de represión y activación de genes (Rea *et al.*, 2000, Bergel, 2002).

En *Neurospora crassa*, se encontró la primer evidencia directa de metilación en la lisina 9 en la histona H3 y de metilación en el ADN. Durante su ciclo sexual el sistema de defensa conocido como “mutaciones puntuales inducidas por repeticiones” (RIP, por sus siglas en inglés) es activado para “defender” su genoma de la copia y repetición incontrolada de regiones, entre ellas la multiplicación de elementos transponibles. En las repeticiones numerosos cambios de C por T. La metilación del ADN se limita a las C restantes en estas regiones mutadas, aunque se encuentran rastros en otras secuencias, incluso genes (Aramayo y Selker, 2013). Por lo que es más complicado que el del ADN simétricamente metilado. La metilación de mantenimiento no es completamente independiente de la secuencia y la gran mayoría de las metilaciones en el genoma son *de novo* (Du *et al.*, 2015). En *Neuroespora crassa* las modificaciones en la heterocromatina por metilación del ADN dependen de la trimetilación de la lisina 9 en la histona H3 (H3K9me3) por la histona metiltransferasa, DIM-5. La relación entre la metilación en el ADN y la metilación en histonas se ve facilitada por la proteína de heterocromatina 1 (HP1), que sirve como una proteína

adaptadora (Rountree y Selker, 2010). DIM-5 forma parte de un complejo conocido como DCDC, que comprende también DIM-7, DIM-9, CUL4 y DDB1 (DNA binding protein 1). Este complejo reconoce secuencias ricas en AT que resultan de RIP (Du *et al.*, 2015).

1. 6. 4. 2 H3K4me

La metilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4) es una modificación muy conservada y se encuentra presente en los promotores de los genes transcritos activos en células de mamíferos y levaduras, en el que parecen tener un papel en el inicio de la transcripción (Kousarides, 2007). Los estudios en los loci del tipo de apareamiento en la levadura de fisión han demostrado que hay extensiones grandes (20 kb) de heterocromatina silenciosa que contienen histonas metiladas en la lisina 9 pero que están desprovistas de metilación de la lisina 4. Por el contrario, las regiones circundantes de transcripción activa tienen metilada la lisina 4 pero no la lisina 9. La eliminación de un elemento limítrofe da lugar a la difusión de metilación de lisina 9 en el dominio activo, lo que resulta en el agotamiento de la metilación en la lisina 4 (Kousarides, 2002, Kousarides, 2007).

La metilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4) es catalizada en la levadura *S. cerevisiae* por la HMT Set1 que forman parte de un complejo multiproteico conocido como ySet1C/COMPASS con otras siete subunidades (Swd1, Swd3, Bre2, Sdc1, Spp, Swd2 y Shg1) (Dehé y Géli, 2006). La metilación de H3K4 en la levadura requiere antes ubiquitinación en la histona 2B en K123 (H2Bub). Una predicción clara con respecto a los estudios anteriores es que el ySet1C deficiente en Swd2 no será capaz de di- y trimetilar H3K4 eficientemente sobre una plantilla de cromatina. Estudios bioquímicos y análisis genéticos en *S. cerevisiae* por Kim y colaboradores (2013), mostraron que H2Bub estimula directamente mono-, di- y trimetilación de la H3K4 por ySet1C. Las subunidades conservadas Swd1, Swd3, Bre2 y Sdc1 son suficientes para la metilación dependiente de H2Bub de H3K4 nucleosómica por un ySet1C reconstituido que contiene FL Set1, la subunidad Swd2, mientras que es capaz de modular la actividad de ySet1C, no es directamente requerida para la actividad de metilación H3K4 dependiente de H2Bub del complejo. El dominio n-SET dentro de Set1 desempeña un papel regulador crítico en la metilación H3K4 dependiente de H2Bub, y Spp1 también está implicado en la metilación

H3K4 dependiente de H2Bub mediada por n-SET, pero su función puede ser condicional y redundante con la de una región N-terminal de Set1. En conjunto, H3K4 por ySet1C proporcionan una visión mecanicista fundamental en H2Bub. Las marcas de cromatina generalmente asociadas con genes transcritos activamente en regiones eucromáticas, están implicadas en el silenciamiento génico subtelomérico en *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans*. En *A. nidulans*, H3K4me2 y H3K4me3, las marcas de activación de genes juegan un papel en la regulación de clusters de genes del metabolismo secundario (SM) (Pham *et al.*, 20015). La pérdida de función por mutación del gen CclA, un miembro de la metilación H3K4 COMPASS (Complex Proteins Associated with Set1), resultan en una reducción de H3K4me2 y H3K4me3 en genes SM. Sorprendentemente, clusters de genes SM crípticos se activan en la mutante $\Delta cclA$ a pesar de H3K4me2 y H3K4me3 que se considera marcas de activación de genes (Palmer *et al.*, 2013). Aunque generalmente se cree que H3K4 di y trimetilada son marcas epigenéticas para la activación de genes en hongos y otros organismos eucariontes también se ha descrito, la participación de la metilación H3K4 en la represión genética también se ha descrito en hongos y otros organismos. Hasta la fecha, no se sabe con claridad hasta qué punto los genes están regulados hacia arriba o hacia abajo de una manera dependiente de la metilación H3K4, y cuál es el mecanismo subyacente para esta discrepancia (Pham *et al.*, 2015).

La metilación del ADN y la lisina 9 en la histona 3 (H3K9) están correlacionadas con silenciamiento de genes en eucariotes desde hongos hasta humanos. Actualmente no se cuenta con ningún trabajo previo que explore la importancia de la regulación epigenética en el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis*, ni tampoco durante su interacción con el banano. Con base en la información presentada anteriormente, se tiene el interés de realizar el análisis de la regulación epigenética durante el desarrollo *in vitro* del hongo *M. fijiensis* para comprender de qué manera influye la remodelación de la cromatina durante las distintas etapas de desarrollo de vida de *M. fijiensis*.

Objetivos

2. 1. Objetivo general

- Analizar la regulación epigenética durante el desarrollo *in vitro* del hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

2.2. Objetivos específicos

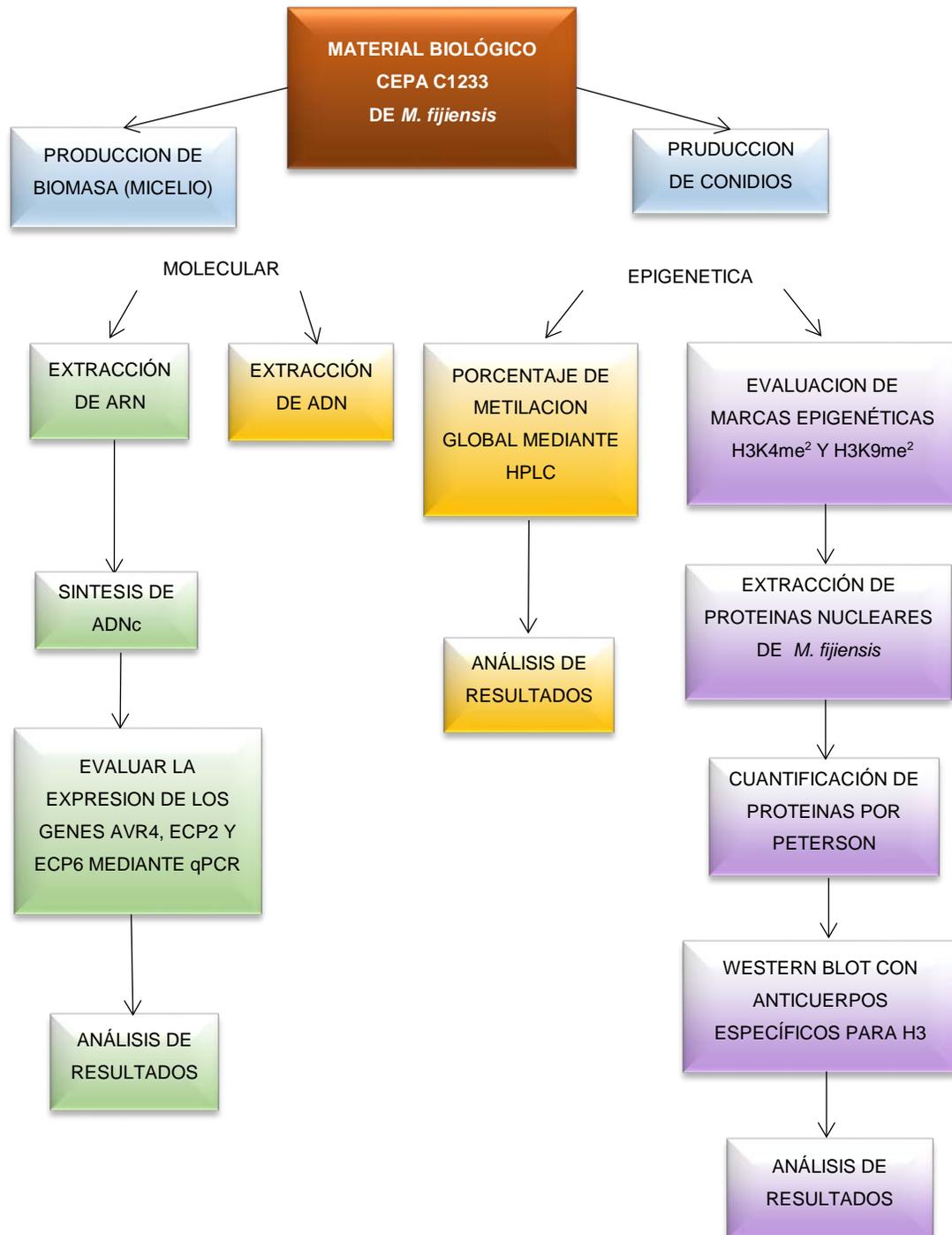
- Evaluar el perfil de metilación global en el ADN del hongo *Mycosphaerella fijiensis* en las diferentes etapas del desarrollo *in vitro* y durante la germinación de los conidios.
- Determinar los niveles de expresión de los efectores Avr4 y Ecp6 en *Mycosphaerella fijiensis*.
- Determinar el nivel y tipo de metilación de la histona H3 en las proteínas nucleares extraídas en las diferentes etapas del desarrollo de *M. fijiensis* cultivado *in vitro*.

2.3. Justificación

La Sigatoka negra ocasionada por el hongo *M. fijiensis* causa severos daños en las plantaciones bananeras por lo que es considerada la enfermedad foliar más limitante y destructiva a nivel mundial, causando la destrucción gradual del área foliar, reduciendo la actividad fotosintética generando grandes pérdidas económicas a los productores. El uso de agroquímicos es el control que se emplea actualmente, sin embargo estos a largo plazo afectan la salud de los humanos y el ambiente.

Estudios recientes han demostrado que mecanismos epigenéticos están involucrado en la defensa de las plantas y el control de enfermedades. Debido a esto, en el presente estudio se caracteriza mediante análisis epigenético genes involucrados en la patogénesis del hongo, para profundizar el conocimiento sobre *M. fijiensis* y su patogénesis.

Estrategia experimental



CAPÍTULO II

Expresión de genes efectores

Introducción

Durante la colonización de la hoja de tomate por *Cladosporium fulvum*, son secretadas al apoplasto proteínas efectoras, toda la comunicación e intercambio de componentes moleculares entre este patógeno y su hospedero ocurren en éste espacio, generándose la interacción gobernada por la relación de gen a gen entre *C. fulvum* y tomate. El cognado de *C. fulvum* (Cf) activa los genes de resistencia, llevando eventualmente a una respuesta hipersensible y a la inmunidad del hospedero (Kruijt *et al.*, 2005).

Van den Ackevaker y colaboradores (1993) estudiando a *Cladosporium fulvum* y su hospedero tomate, observaron que el gen de avirulencia *Avr9* no es expresado en condiciones *in vitro*, pero si es altamente expresado cuando el hongo crece dentro de la hoja de tomate. Posteriormente estos autores demostraron que para poder expresar el gen *Avr9* en condiciones *in vitro* era indispensable tener fuentes de nitrógeno limitado.

Bowen y colaboradores (2009) estudiando genes candidatos a efectores de *Venturia inaequalis* observaron que algunos genes efectores si se expresan en condiciones *in vitro*, sin embargo tienen una mayor expresión durante la interacción con su hospedero.

Los componentes esenciales en la pared celular de todos los hongos es la quitina polímero de N-acetilglucosamina unido mediante enlaces β -(1,4); este polímero no se encuentra en plantas ni vertebrados, sin embargo estos fragmentos de quitina son conocidos por actuar como inductores de la respuesta de defensa en plantas y mamíferos. Ante lo cual los patógenos producen proteínas que les confieren cierta resistencia como es el caso de la proteína efectora *Ecp6* y *Avr4*. Estudios realizados en *C. fulvum* por van den Burg (2006), demostraron que *Avr4* se une a la quitina presente en la pared celular fúngica y que a través de esta unión, *Avr4* puede proteger la pared celular contra la hidrólisis de quitinasas, van Esse y colaboradores (2007) demostraron que *Avr4* incrementaba la virulencia de diferentes patógenos fúngicos, mientras que en bacteria y oomicetos se mantiene inalterable. Stergiopoulos y colaboradores (2010) demostraron que la proteína Mf-*Avr4* es capaz de proteger *in vitro* las hifas de *Trichoderma reesei* contra la hidrólisis por quitinasas, similar a

la función conocida de *Avr4* de *C. fulvum*.

Ecp6 es una proteína efectora que durante la infección secuestra oligosacáridos de quitina que están relacionados a la pared celular de hifas invasivas para prevenir que se active la inmunidad del hospedero. La expresión de estos genes representa una estrategia de supresión de la inmunidad de patógenos fúngicos.

El análisis de expresión de genes requiere sensibilidad, precisión y reproducibilidad al cuantificar secuencias de ARNm específicos, siendo la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, la técnica de cuantificación de moléculas de ADN/ARN más empleada en la actualidad. La habilidad para monitorear la cantidad de moléculas de ADN/ARN presentes en una muestra está basado en un método de detección de fluorescencia. La cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de productos de amplificación generados (Higuchi *et al.*, 1992). Los agentes reporteros más utilizados en los ensayos de tiempo real son SYBR Green, el cual se intercala de entre las bases de ADN, y las sondas TaqMan que son fragmentos de ADN específicos que tienen unida una molécula de fluorocromo y en el otro extremo un apagador. Para el presente trabajo se empleó SYBR green. Al generarse una nueva molécula de ADN, el SYBR green se incorpora inmediatamente a la doble cadena, al intercalarse y ser excitado mediante una fuente luminosa, genera fluorescencia que es detectada por el sistema óptico del equipo de PCR tiempo real.

La expresión génica es un proceso biológico mediante el cual la célula transforma la información codificada en el ADN en ARN mensajero (ARNm). Esta expresión se puede cuantificar de manera relativa la cual es la comparación cuantitativa del ácido nucleico blanco con respecto a una muestra de referencia o calibrador; los resultados se expresan como un cambio en el número de veces que un ARNm se expresa en una muestra con respecto al calibrador. Este cambio puede ser positivo o negativo, ya que el calibrador por definición siempre tiene un valor de 1 o bien 100%. Existen dos métodos para hacer cuantificación relativa, una es utilizando una curva estándar y la otra por el método conocido como $\Delta\Delta Ct$.

En ambos métodos se requiere del uso de dos blancos para analizar la expresión. Uno de

ellos es el blanco experimental (gen de interés), mientras que el segundo es un gen de expresión constitutiva (housekeeping o endógeno) que es el gen de referencia. Los genes endógenos son genes cuya expresión es estable en las células, es decir, no varían su expresión bajo diferentes condiciones fisiológicas o entre tejidos. Muchos de estos genes son indispensables para la supervivencia celular y son utilizados para validar los estudios de expresión relativa.

Materiales y métodos

2.1. Cepa C1233 de *M. fijiensis*

Como material biológico se trabaja con la cepa fúngica *Mycosphaerella fijiensis* C1233, aislada de la zona de Uxmal, la cual fue proporcionada por el Dr. Andrew James, de la Unidad de Biotecnología del CICY.

La cepa es multiplicada en medio de cultivo sólido PDA. A partir de un cultivo madre se toma un inóculo de 2-3 mm² de micelio de *M. fijiensis*, y se coloca en cajas Petri con 25mL de medio PDA (Difco, Le Pont de claux, France). Las cajas se colocan en incubación a temperatura ambiente (aproximadamente 25 ± 1°C) con un fotoperiodo de 12 horas, durante 4 semanas.

Cada uno de los tiempos estudiados fue evaluado mediante pruebas moleculares y epigenéticas, con tres réplicas biológicas cada una y dos réplicas experimentales. Se guardó una muestra de la cepa C1233 en glicerol a -80 °C para usos futuros.

2.2. Extracción de ARN de micelio de *M. fijiensis*

Para la extracción del ARN total se utilizó entre 0.5 g y 1 g de material biológico. El ARN fue obtenido empleando Trizol[®] Reagent, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente al lisado celular se le añadió 1000 µL de Trizol. Se centrifugó el lisado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se le adicionó 0.2 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se dejó en incubación por 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Al sobrenadante recuperado se le adicionó 500µL de isopropanol. Se centrifugó a 12000 x g por 10 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante.

Se lavó la pastilla con 1mL de etanol al 75% y se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos a 4 °C, dos veces. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 30µL de H₂O UP. El ARN se almacenó a -80°C hasta su uso.

Se determinó la concentración y pureza del ARN cuantificándolo por espectrofotometría a 260 y 280nm (Tabla 4.1), y su integridad se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

2.2.1. Digestión de ADNg de *M. fijiensis* presente en el ARN

Con el fin de evitar falsos positivos, al ARN obtenido se trató con ADNasa I (INVITROGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, a 1µg de ARN por muestra, se adicionó 1 µL (10X) de amortiguador de reacción, 1µL de enzima ADNasa I (1U/µL) y agua tratada con DEPC, el volumen final fue de 10 uL. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se inactivó la enzima adicionando 1 µL EDTA 25 mM e incubando en el termociclador por 10 minutos a 65°C.

2.2.2. Síntesis de ADNc

El ARN tratado con ADNasas, se utilizó como templado para la realización de la síntesis de ADNc mediante RT-PCR con la enzima SuperScriptIII RT (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. En 5 µg de ARN se adiciona una mezcla formada por amortiguador 5X, dNTPs (10mM), DTT 0.1M, H₂O UP, RNAasa OUT (40 U/µL), Super script III RT (200 U/µL), se realiza la síntesis en un termociclador, a 50°C durante 50 minutos.

2.3. Diseño de oligonucleótidos para genes efectores

El genoma de *M. fijiensis* se encuentra secuenciado y disponible en el Joint Genome Institute (<http://jgi.doe.gov/>), tiene un tamaño de 74.1 Mb (Clutterbuck 2011). Se realizó la búsqueda de las secuencias de los genes efectores Avr4 (Mf-87167), Ecp2 (Mf-60658) y Ecp6 (Mf-86817). Para el presente trabajo se diseñaron los oligonucleótidos en la región codificante de cada uno de estos genes utilizando la aplicación PrimerQuest Tool, del software de la página IDT por sus siglas en inglés INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (<https://www.idtdna.com/>), seleccionando los tres primeros pares de oligonucleótidos

obtenidos para cada uno de los genes.

Se realizó la estandarización de temperaturas óptimas de alineamiento de los oligonucleótidos, para lo cual se realizó una reacción en cadena de la polimerasa en gradiente, amplificándolos a temperaturas desde 63°C hasta 55°C utilizando ADN genómico como templado.

2.3.1. Expresión de genes β -Tubulina, Avr4 y Ecp6

La amplificación de los genes mediante PCR de tiempo real de los siete tiempos de crecimiento evaluados se llevó a cabo utilizando el SYBR Green de Applied Biosystems, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los componentes de la reacción por cada una de las muestras con volumen final de 15 μ L se emplearon 7.5 μ L de agua ultra pura, 6 μ L de SYBR Green (50X), 0.5 μ L de oligonucleótidos y 1 μ L de templado. El programa utilizado fue de 10 minutos a 95°C para la activación de la enzima, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C de desnaturalización y 1 minuto a 60°C de alineación y extensión. Se empleó como control positivo ADN genómico y como control negativo agua ultrapura.

2.4. Resultados

Durante las primeras tres semanas de crecimiento el micelio aéreo creció de forma algodonosa con una coloración blanca, rosada con forma circular. En la cuarta resiembra la parte aérea del micelio se mostró de coloración grisácea con apariencia aterciopelada, con un crecimiento amorfo y lento. Estudios realizados por Kantun Moreno (2008) reportan que la procedencia de la cepa al igual que el medio de crecimiento y la cantidad de nutrientes influye en la velocidad de crecimiento y en su morfología, A cada una de las muestras colectadas se les denominó tiempo (T) y de acuerdo al número de semanas de cultivo se le asignó una numeración cronológica iniciando con tiempo cero (T0) como inóculo inicial, semana 1 (T1), semana 2 (T2), semana 3 (T3), semana 4 (T4), semana 5 (T5) y semana 6 (T6) (Figura 8)



Figura 8 Crecimiento de micelio de *M. fijiensis* durante 6 semanas. A cada una de las semanas se le denominó “tiempo (T)” numerándolas de manera cronológica, en relación a la semana de colecta.

Los datos registrados muestran el incremento de la biomasa en las primeras cuatro semanas y después de este tiempo el micelio comienza a formar un halo algodonoso alrededor (Figura 9 A); a las siete semanas comienza a compactarse el micelio y el halo algodonoso continúa aumentando de área. El medio comienza a secarse, la falta de nutrientes y de humedad hacen que el micelio se compacte después de diez semanas (Figura 9 B).

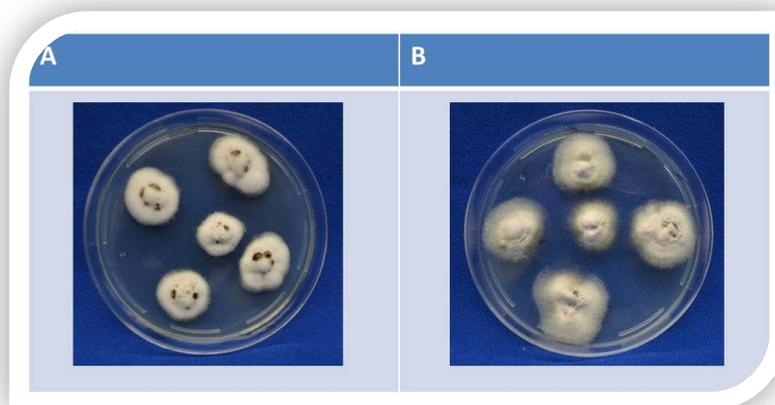


Figura 9 Aspecto del micelio de *M. fijiensis* con 6 y 10 semanas de crecimiento.

A) El micelio con 6 semanas presenta exudados, una apariencia algodonosa y el agar se observa húmedo. B) A las 10 semanas de crecimiento el micelio se aprecia compacto con pérdida de humedad incluso el medio de cultivo se observa ligeramente deshidratado.

Una vez colectadas las muestras de los diferentes tiempos, los tejidos se emplearon para la extracción de ARN. En un NanoDrop 2000 se determinó la concentración del ARN en ng/μL y su pureza (cuadro 2), cuantificándolo por espectrofotometría a 260 y 280nm tomando en consideración la fórmula: $[ARN] \mu g/\mu l = A_{260} * \text{factor de dilución} * 50$. Su integridad se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 10).

Cuadro 2 Concentraciones de los ARN extraídos en las distintas etapas de crecimiento de *M. fijiensis* cuantificadas a 260/280 nm, cada muestra se realizó

Muestra	Concentración	260/280	260/230
	T0-1	210.9 ng/μl	2.1
	T0-2	207.2 ng/μl	2
	T0-3	224.5 ng/μl	2.05
	T1-1	279.1 ng/μl	2.16
	T1-2	194.5 ng/μl	2.06
	T1-3	220.8 ng/μl	2.05
	T2-1	972.5 ng/μl	2.17
	T2-2	1103.2 ng/μl	2.2
	T2-3	739.1 ng/μl	1.82
	T3-1	195.6 ng/μl	2.01
	T3-2	242.7 ng/μl	1.97
	T3-3	184.9 ng/μl	2.03
	T4-1	1041.2 ng/μl	2.21
	T4-2	325.5 ng/μl	2.16
	T4-3	567.7 ng/μl	2.05
	T5-1	251.7 ng/μl	1.92
	T5-2	290.8 ng/μl	1.83
	T5-3	308 ng/μl	1.84
	T6-1	475.3 ng/μl	2.06
	T6-2	602.6 ng/μl	2.03
	T6-3	308 ng/μl	2.07

por triplicado.

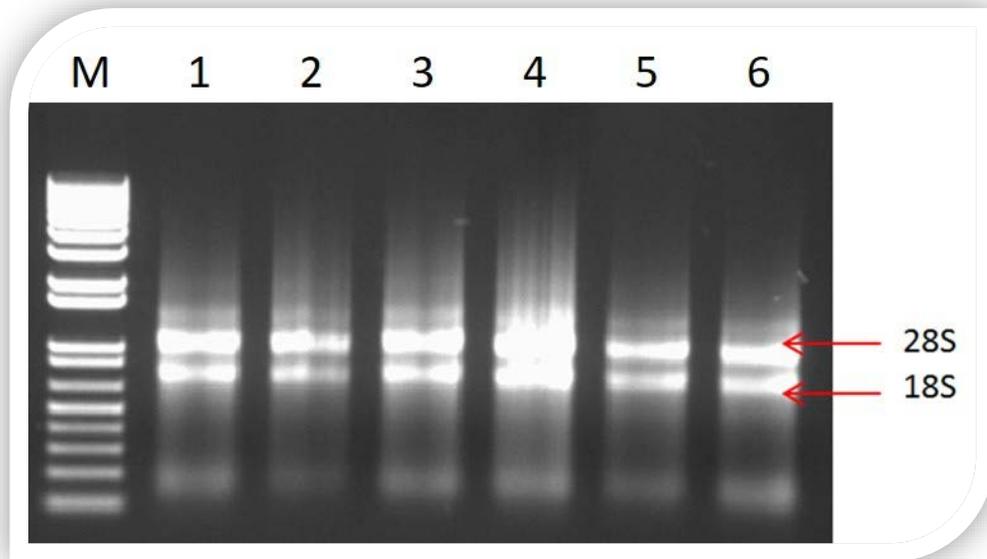


Figura 10 Evaluación de la integridad del ARN extraído de micelio de *M. fijiensis*. Gel representativo de los ARNs obtenidos en agarosa al 1% con TAE 1X con H₂O DEPC. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular M y del carril 1 al 6, ARN extraído de micelio con dos semanas de crecimiento. Se observan bandas ribosomales con un peso de 4.5 kb 28S y 1.9kb para 16S.

Con el ARN libre de ADN_g se procedió a realizar la síntesis de ADN complementario, se cuantificó y guardó a -20°C para su utilización en la cuantificación de expresión mediante PCR en tiempo real con oligonucleótidos diseñados específicamente para los genes efectores estudiados en el presente trabajo.

Cuadro 3 Lista de oligonucleótidos diseñados empleando el programa bioinformático de PRIMERQUEST, en la página www.idt.com/site.

Gen	Secuencia 5'-3'	Tm	%GC	pb
Avr 4	F-GGGACCGAAAGATTGCCTATAC	55	50	22
	R-ACGTTGTGCGCATCCTGTTT	55	47.4	19
	F-TAACACTGCTCGCCACATTC	55	50	20
	R-TGGACGATTCCCCTCGTATAA	55	47.6	21
	F-TTCCTATGCTGGAACGATGC	55	50	20
	R-GGCCAATCACACCCTTCT	55	52.6	19
Ecp 2	F-ACTCGATGCAAGAGCAAGAG	55	50	20
	R-CGCACCGACGTATCCATTAT	55	50	20
	F-GGAGACTCCAGTTTCGTCAAG	55	52.4	21
	R-CCGACGTATCCATTATCCTCAA	55	43.5	23
	F-GCTCTTGGATCAGCGACAT	55	52.6	19
	R-ATACACAGCCACCTGAACAC	55	50	20
Ecp 6	F-TCATCACCAACCAATCTTACTC	55	45.5	22
	R-GTCCAACAGTGGCTTTGTATTT	55	40.9	22
	F-GTTGTCAAGGTCCGTGATGATA	55	45.5	22
	R-GAAGGCACTGTTGGTGTATTG	55	45.5	22
	F-TACGGCTCACCAAATCCATAC	55	47.6	21
	R-CTTGTTGTACGCAGCAATGTC	55	47.6	21

Se realizó una PCR en gradiente para obtener las temperaturas óptimas de cada uno de los genes empleados (cuadro 3), eligiéndose los oligonucleótidos que funcionan a temperaturas de alineamiento más astringentes. Con temperaturas de alineamiento de 55°C y 63° en las reacciones de PCR.

Para cuantificar la expresión de los genes efectores mediante qPCR, fue indispensable validar los oligonucleótidos utilizando el SYBR green, ya que éste es un compuesto intercalante en ácidos nucleicos de doble cadena. Si la reacción no es optimizada se podrían afectar los resultados durante la cuantificación. Este proceso de validación consiste en probar que solo un producto de amplificación se está generando en la reacción empleando una curva de disociación, y que la fluorescencia registrada corresponde a ese producto en particular, y no a productos inespecíficos o dímeros formados por oligonucleótidos. La curva de disociación debe mostrar solo un pico en la gráfica, lo que garantiza la especificidad (Figura 11) (manual del curso teórico práctico de Applied Biosystems).

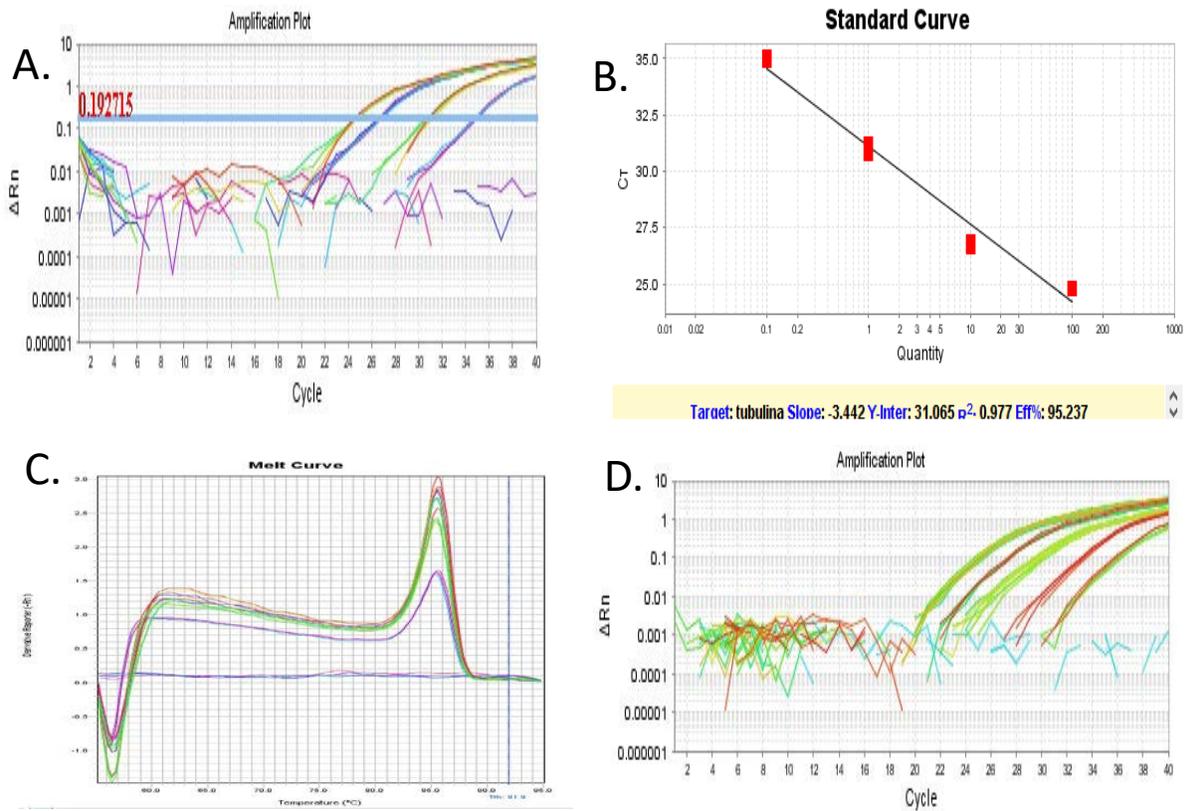


Figura 11 Ejemplo representativo de la estandarización de oligonucleótidos empleando el gen constitutivo β -tubulina. A. Amplificación empleando diluciones seriales 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000 del templado, partiendo de una concentración de 100ng/ μ l. B. Curva estándar de amplificación obtenida empleando las diluciones seriales mencionadas. C. Curva de disociación de los productos de PCR al usar SYBR Green. El pico de la gráfica representa la T_m de producto de PCR. Nótese que se forma un solo pico. D. Amplificación de muestras totales.

En cada muestra se evaluó la expresión del gen blanco (*Avr4* y *Ecp6*) con respecto al control endógeno (β -*Tubulina*). Se calculó el nivel de expresión de los genes efectores *Avr4* y *Ecp6* utilizando como calibrador el valor obtenido en el inóculo inicial el cual nombramos tiempo cero (T_0). Una vez normalizados los valores de los Ct de las muestras, se procedió a

calcular la diferencia en los niveles de expresión del gen blanco (*Avr4* y *Ecp6*) en los diferentes tiempos (T1, T2, T3, T4, T5 y T6) respecto al calibrador (Figuras 12 y 13).

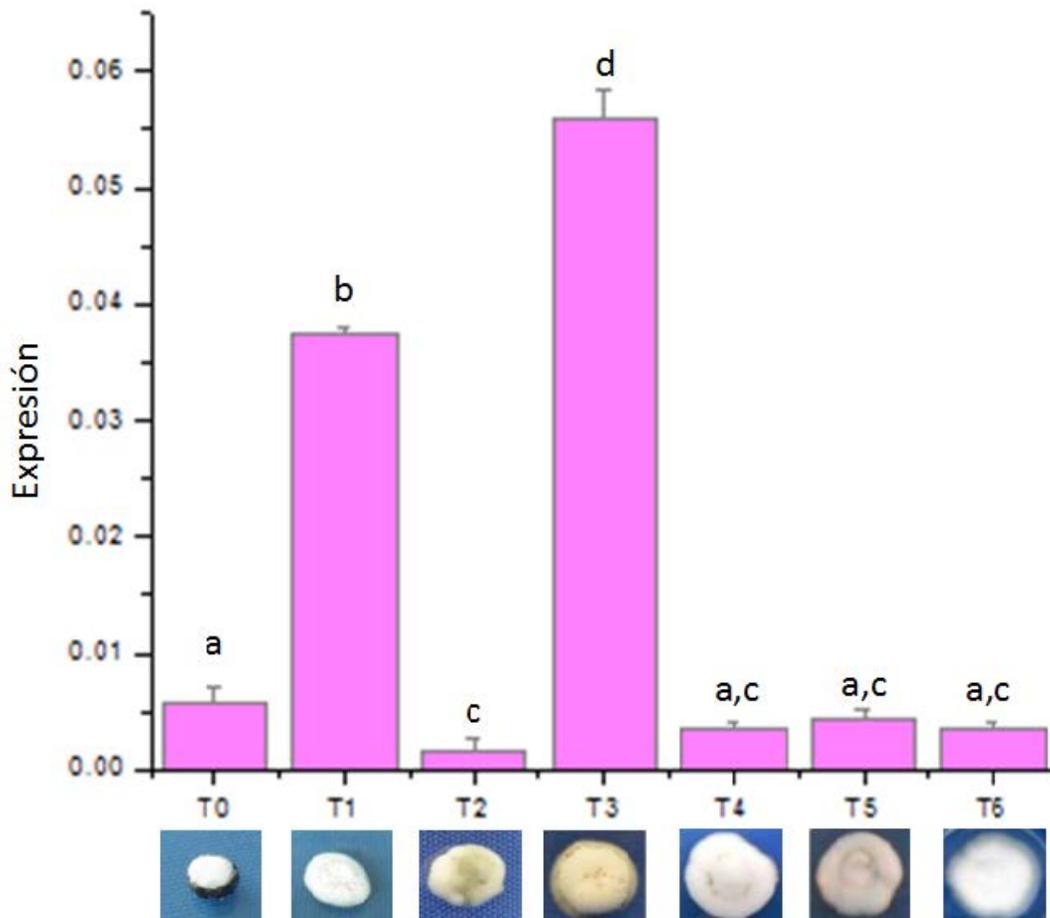


Figura 12 Niveles relativos de transcritos del gen *Avr4* de *Mycosphaerella fijiensis* crecido *in vitro*. Los niveles de transcritos se expresaron en relación al nivel basal de transcritos en el inóculo inicial (T0), utilizando como referencia interna el gen que codifica para β -Tubulina para normalizar la expresión y se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008). Las barras de los siete tiempos evaluados se obtuvieron de tres replicas biológicas con tres replicas experimentales en cada muestra. Las barras con la letra b, c y d muestran diferencias significativas en comparación con el inóculo inicial T0, la misma letra a y c no muestran diferencias significativas entre sí (ANOVA y test de Tukey, $P \leq 0.05$).

Las gráficas muestran una variación en la expresión de Avr4 y Ecp6. En la gráfica de Avr4 se aprecia un incremento en T1 y T3 con un aumento de 7 y 10 veces más en comparación con el calibrador T0. Solo T2 mostro una expresión menor con respecto al calibrador.

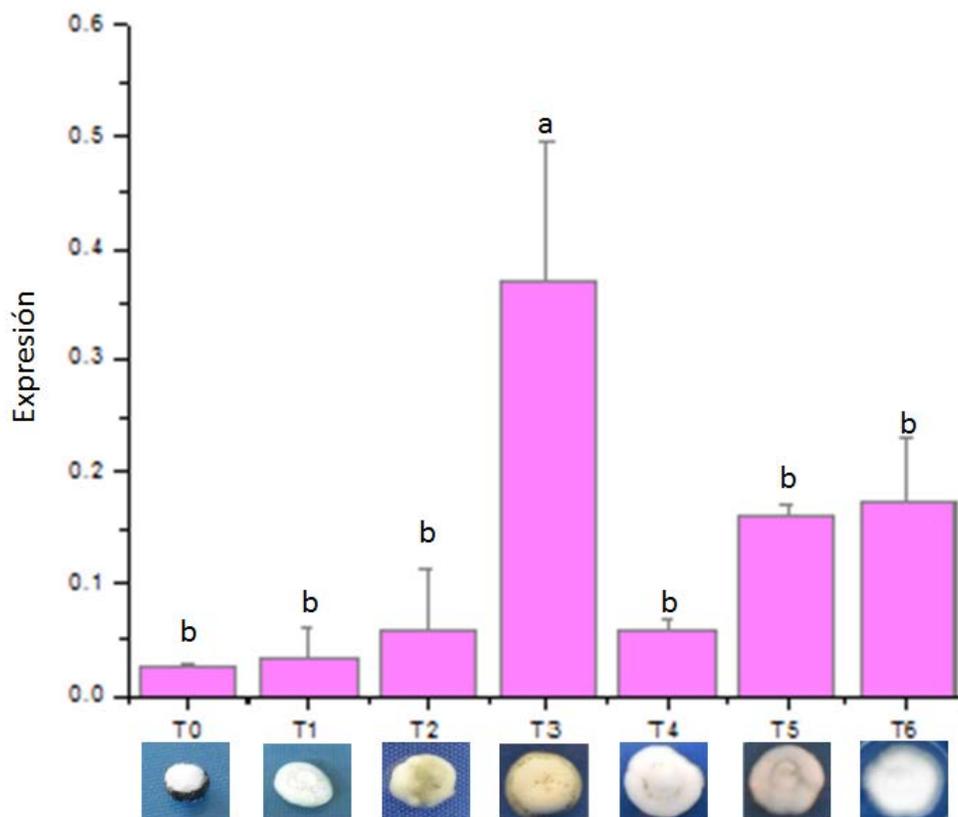


Figura 13 Niveles relativos de transcritos del gen Ecp6 de *Mycosphaerella fijiensis* crecido *in vitro*. Las barras de los siete tiempos evaluados se obtuvieron de tres replicas biológicas con tres replicas experimentales en cada muestra. Los niveles de transcritos se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008) y se expresaron en relación al nivel basal de transcritos en el inóculo inicial (T0), de referencia interna para normalizar la expresión se utilizó el gen que codifica para β -Tubulina. Las barras con la misma letra (a) no muestran diferencias significativas entre sí, solo T3 muestran diferencias significativas en comparación con el inóculo inicial T0 (ANOVA y test de Tukey, $P \leq 0.05$).

En el caso de Ecp6 sólo T3 mostró un incremento significativo de hasta nueve veces más

que el calibrador.

Los niveles relativos de transcrito de los genes Avr4 y Ecp6 se analizaron mediante un ANOVA y un análisis de comparación de medias con el método de Tukey ($P \leq 0.05$), utilizando el programa Origin Pro versión 8.0.

2. 7. Discusión

Para la cuantificación relativa de genes es indispensable que el ARN extraído de cada uno de los siete tiempos sea de buena calidad para garantizar una eficiente síntesis de ADNc y en consecuencia, en la reacción de PCR en tiempo real. Como se puede observar en la Figura 10 en la sección de resultados de éste capítulo el ARN total se encuentra limpio, libre de degradación y aparentemente sin trazas de ADN genómico. Sin embargo para descartar presencia de ADNg en las muestras de ARN que pudiera interferir y dar niveles de expresión sobreestimados, se sometió a un tratamiento de digestión con la enzima ADNasa I (INVITROGEN). Con la finalidad de verificar ausencia total de ADNg, se utilizó el ARN tratado como templado en una PCR convencional, en ausencia de enzima retrotranscriptasa, con oligonucleótidos para un gen de expresión constitutiva (β -Tubulina), empleando Taq polimerasa que sólo reconoce doble cadena de ADN y que de estar ausente no mostraría amplificación. La eliminación del ADN contaminante es indispensable ya que puede ser utilizado como templado en la reacción de PCR en tiempo real el fluorocromo SYBR Green se une a fragmentos de doble cadena, lo que puede sobreestimar la expresión génica, dando falsos positivos (Applied Biosystems).

Un factor a tomar en cuenta es la cantidad exacta de ARN con la que se inicia el análisis de expresión génica. Cantidades diferentes de ARN en cada una de las muestras puede suponer una sobreestimación o subestimación de la cantidad de ARN que podría llevar a resultados incorrectos.

La correcta estandarización de los oligonucleótidos diseñados es un punto crucial para evitar la formación de dímeros. Para lo cual se realizó una PCR en gradiente para los tres pares de oligonucleótidos diseñados para Avr4 y Ecp6 usando ADNg como templado, y se eligieron los de productos únicos que mostraron amplificación a la temperatura de alineamiento más alta, ya que temperaturas menores tienen una mayor posibilidad de

presentar más dimerizaciones que interfieran en la reacción de PCR en tiempo real (Raymaekers M. et al 2009; Mitsuhashi M. 1996).

La gran mayoría de los estudios en genes efectores se han realizado durante la interacción del patógeno con su hospedero. Para poder estudiar el gen de avirulencia *Avr9* de *Cladosporium fulvum*, el cual se expresa durante la interacción con su hospedero tomate, fue necesario crear condiciones *in vitro* con fuentes de nitrógeno limitado (van den Ackeveker *et al.*, 1993). Algunos de los genes efectores se expresan en condiciones *in vitro*, empleando medios de crecimiento ricos en nutrientes como PDB, solo que su expresión es menor que durante la interacción (Rodríguez-García *et al*, 2016). En el presente trabajo los genes efectores *Avr4* y *Ecp6* se evaluaron en micelio crecido en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar). Su nivel de expresión fue menor en comparación a cuando se encuentra interactuando con tejido foliar de banano. El análisis de expresión génica del gen *Avr4*, mostró momentos de mayor expresión durante el T1 y T3 y uno de menor expresión en T2 en comparación con el calibrador T0. En el caso de *Ecp6* solo T3 mostró tener su máxima expresión. Se utilizó T0 como calibrador ya que es el inóculo inicial del cual se realizaron los subcultivos del micelio colectado durante las seis semanas.

Estos niveles de transcripción de genes efectores puede verse influenciada por los cambios que se dan en la estructura de la cromatina, la cual juega un papel importante en la expresión génica, ya que puede permitir, inhibir o evitar totalmente su transcripción. La reorganización de la cromatina cumple los requisitos previos para la iniciación de la transcripción y, además, representa una posibilidad adicional de regular la expresión génica a nivel de transcripción. Una transcripción eficiente requiere de la formación de un complejo de iniciación funcional que es a menudo el paso limitante de la velocidad en la transcripción y está sujeta a una diversidad de mecanismos de regulación dados por la cromatina.

CAPÍTULO III

Metilación global del ADN de *M. fijiensis*

Introducción

La metilación del ADN es una marca epigenética hereditaria, que implica la transferencia covalente de un grupo metilo a la posición 5' de la citosina en secuencias ricas de islas CpG que usualmente contienen regiones promotoras. Es catalizada por enzimas ADN metiltransferasa: metiltransferasa *de novo*, metiltransferasa de mantenimiento y demetilinas (Steller, 2011).

La metilación en el ADN está asociada con el silenciamiento de la expresión de genes. Debido a que el ADN metilado, recluta proteínas que se asocian a desacetilasas y remodelan la estructura de la cromatina, a una forma más condensada. Motivo por el cual la actividad transcripcional se detiene, al no poder acceder a las secuencias promotoras los factores de transcripción (Menéndez *et al.*, 2011).

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es una técnica de separación en la cual los componentes de una mezcla se distribuyen entre una fase estacionaria y otra móvil; la fase estacionaria (soporte cromatográfico) es una columna de acero inoxidable que puede contener un sólido o líquido fijado en un sólido. La fase móvil consiste en un líquido (eluyente cromatográfico) con alto grado de pureza, filtrado y sin gases disueltos, que arrastra la muestra con un flujo constante de presión proporcionada por una bomba. Para este estudio se utilizó la cromatografía de fase reversa, debido a que permite separar moléculas en base a su polaridad; la fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados (C₁₈), permitiendo la separación de aminoácidos y péptidos. Esta característica permite utilizar la técnica para la obtención de los porcentajes de metilación global en las diferentes etapas de desarrollo de *M. fijiensis*, en donde se determinó la 5 metildesoxicitocina (5mdC) presente en el ADN genómico, mediante la separación y cuantificación de nucleótidos en el HPLC.

Materiales y métodos

La evaluación del porcentaje de metilación global se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC); se evaluó el ADN de micelio de *M. fijiensis* crecido en medio PDA, colectado en diferentes semanas de crecimiento como se menciona en el capítulo II figura 8.

3. 1. Extracción de ADN de micelio de *M. fijiensis*

Para evaluar los porcentajes de metilación global se realizó la extracción del ADN de acuerdo al protocolo descrito por Johanson (1995) modificado. Se extrae el ADN del micelio del hongo macerándolo en un mortero con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. Se agregó amortiguador de lisis y se incubó a baño María. A la mezcla se le agregó fenol:cloroformo:isoamílico y se centrifugó. Se transfiere el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y se le agrega 2-propanol, se deja precipitar el ADN a -20°C por 10 minutos. Se centrifuga y desecha el sobrenadante. Se lava la pastilla con etanol. Al final se deja secar la pastilla y se resuspende en 50 µL de H₂O UP. El ADN obtenido se guardó a -20°C hasta su uso.

3.2. Porcentaje de metilación global (HPLC)

Para determinar la cantidad de 5-metildesoxitocidina (5mdC) y nucleósidos presentes en el ADN genómico, se empleó la técnica descrita por Maldonado-Santoyo (2011). Se partió de 5µg de ADN genómico, se adicionó 5 µL de amortiguador 10X (200mM de ácido acético, 200mM de glicina, 50mM de cloruro de magnesio, 5mM de acetato de zinc y 2 mM de cloruro de calcio, pH 5.3), 1 µL (10 U) de ADNasa (D2821-Sigma) y 1 µL (10 U) de Nucleasa P1 (N8630- Sigma). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Al término se centrifugaron y congelaron a -20°C por 20 minutos. Se dio choque térmico a 100°C durante 5 minutos, a cada muestra se le adicionó 5µL de NaOH 10mM y 2 µL (2 U) de fosfatasa alcalina (P4879-Sigma). Las muestras se incubaron 3. 5 horas a 37°C y se le adicionaron 100 µL de H₂O UP grado HPLC y 50 µL de amortiguador de fosfatos pH 4.1. Las muestras se centrifugaron a 18000g por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante con una jeringa y se filtró a través de filtros de 0.22µm colectado en viales utilizados en HPLC.

3.3. Condiciones de la cromatografía

Se inyectan 50 µL de cada una de las muestras previamente tratadas en el HPLC (Agilent series 1200), estas pasan a través de una columna de fase reversa Kromasil C18 (250 x4.6mm y 5µm tamaño de Phenomenex). Para determinar la absorbancia se emplea un detector de diodos a 286nm. La separación de nucleósidos se realizó con una mezcla de cuatro fases móviles: Fase A (agua desionizada), fase B (acetonitrilo), fase C (metanol) y fase D (amortiguador de fosfatos). El gradiente utilizado fue de 0 a 4 minutos, 80% A y 20% D; 4 a 11 minutos 78% A, 2% C y 20% D; 11 a 15 minutos, 77% A, 3% C y 20% D; 15 a 15.8 minutos 35% A, 20% B, 25% C, 15.8% a 16 minutos 30% A, 25% B, 25% C y 20% D, con un flujo total de 1 mL/minuto. El tiempo del programa de gradiente de fases móviles fue de 16 minutos con un tiempo de estabilidad de la columna de 5 minutos en 75% A y 25% D.

Se realizó la cuantificación del porcentaje de metilación total del ADN, en el inóculo inicial llamado T0 y los seis tiempos muestreados semanalmente. El porcentaje de metilación del ADN genómico se calculó tomando en cuenta el área bajo la curva de los cromatogramas obtenidos.

Para calcular el porcentaje de metilación global se empleó la fórmula:

$$\% \text{Metilación global} = \frac{[5mdC]}{[(5mdC+dC)]} \times 100$$

5mdc= mAU*s 5metil, 2- desoxicitocina

dC= mAU*s 2- desoxicitocina

3.4 Resultados

Los análisis se realizaron usando cromatografía líquida de alta eficiencia. Para la obtención del porcentaje de metilación global se cuantificó el ADN genómico de micelio de *M. fijiensis*

crecido en medio PDA durante los siete tiempos evaluados en semanas llamadas T0 al inóculo inicial, semana 1 (T1), semana 2 (T2), semana 3 (T3), semana 4 (T4), semana 5 (T5) y semana 6 (T6).

Es indispensable que el ADN extraído sea de buena calidad sin degradación aparente y sin trazas de ARN. Al igual que es fundamental determinar la concentración y pureza del ADN (Cuadro 4), cuantificándolo por espectrofotometría a 260 y 280nm (260/280nm), y su integridad se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Cuadro 4 Concentraciones de ADN. Cuantificación por espectrofotometría en NanoDrop 2000 de cada uno de los ADN extraídos durante distintas etapas de crecimiento de *M. fijiensis*.

	Muestra	Concentración	260/280	260/230
	T0-1	813.3	ng/μl	1.84
	T0-2	863.7	ng/μl	1.8
	T0-3	888.2	ng/μl	1.72
	T1-1	639.7	ng/μl	2.18
	T1-2	703.2	ng/μl	2.01
	T1-3	526.5	ng/μl	2.04
	T2-1	1617.5	ng/μl	2.19
	T2-2	1610.2	ng/μl	2.09
	T2-3	1219.9	ng/μl	2.09
	T3-1	886.9	ng/μl	1.72
	T3-2	824.9	ng/μl	1.86
	T3-3	911.5	ng/μl	1.7
	T4-1	1654	ng/μl	1.87
	T4-2	1360.8	ng/μl	2.05
	T4-3	1150.2	ng/μl	2.01
	T5-1	2225.4	ng/μl	1.99
	T5-2	706.9	ng/μl	2.03
	T5-3	1646.7	ng/μl	2.03
	T6-1	1169.6	ng/μl	2.02
	T6-2	2031	ng/μl	1.96
	T6-3	1334	ng/μl	1.92

Se obtuvieron los nucleósidos de cada una de las muestras evaluadas y se realizó una curva estándar con las diluciones seriales de 5 metildesoxicitocina (Figura 14 A) y 2 desoxicitocina (Figura 14 B).

En ambas curvas se observa linealidad y una $r^2 > 0.99$ lo cual permite tener la confianza para utilizar estos datos en el cálculo del porcentaje de metilación global en el sistema biológico en estudio. Se realizó la evaluación del perfil de metilación global del ADN de *M. fijiensis* evaluando a diferentes concentraciones (en μg) de ADN, para observar en que concentraciones se pueden detectar las señales de ddc y 5mdc. Se emplearon 3 μg , 4 μg , 5 μg , 6 μg y 7 μg de ADN de *M. fijiensis* ya que en muestras previamente evaluadas con 2 μg no se observó la señal de la 5 mdc en los cromatogramas.

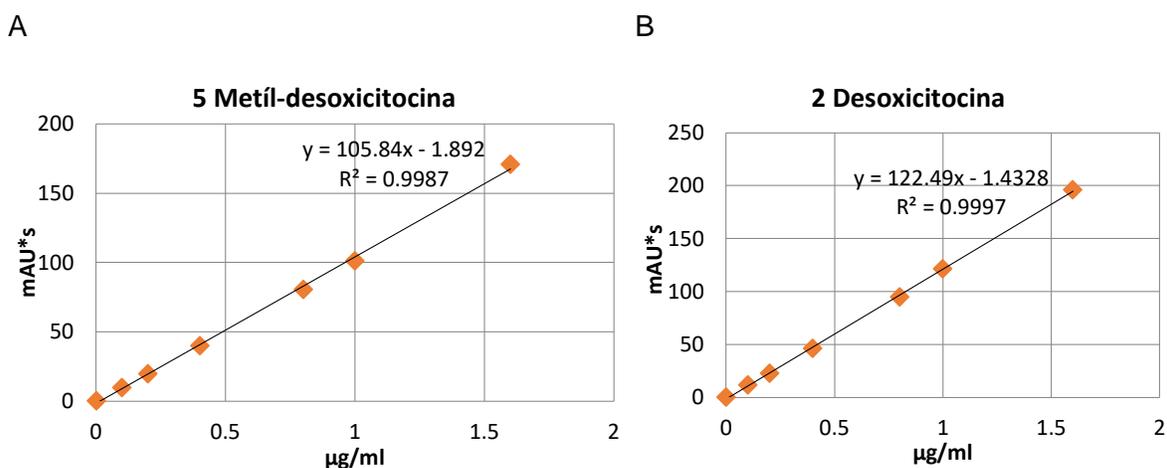


Figura 14 Estandarización de 5 metil-desoxicitocina y 2 desoxicitocina. A) Curvas de calibración de los estándares de 5 metil-desoxicitocina. B) Curvas de calibración de los estándares de 2 desoxicitocina. Ambas tienen una $R^2 = 0.99$.

Los datos obtenidos se graficaron para cada punto y de los valores de la ddc y 5mdc analizados, a los 5 μg se alcanzó su más alto punto de detección. Una vez definida la concentración de ADN requerido para los análisis, las muestras se ajustaron a una misma concentración (5 μg). Se hidrolizó el ADN para la obtención de nucleósidos y los hidrolizados se inyectaron en el equipo de HPLC, al igual que las diluciones seriales de los estándares.

Se realizaron los cálculos de porcentaje de metilación global para cada muestra analizada; para lo cual se calculó el área bajo la curva de los picos correspondientes a 2dC y 5mdc, en cada uno de los tiempos evaluados. Los resultados se muestran en la Figura 15. En las muestras biológicas que corresponden al tiempo cero (inóculo inicial) se obtuvo 9.7% de

metilación global. En las muestras de una, dos y tres semanas de cultivo no mostraron presencia de la 5metil deoxicitocina. La repetición del experimento con nuevas muestras biológicas arrojó el mismo resultado. En las muestras biológicas de cuatro semanas (T4) se obtuvo un porcentaje del 7.7%. Las muestras biológicas con cinco semanas (T5), indicaron un porcentaje de metilación del 9.1%. El último tiempo evaluado de seis semanas (T6), presentó un 9.3%. Los resultados obtenidos se sometieron a análisis de varianza ANOVA y un análisis de comparación de medias con el método de Tukey ($P \leq 0.05$), empleando el programa Origin Pro versión 8.0. Los resultados presentaron una tendencia similar ya que no mostraron diferencias significativas entre ellos como se puede observar en la figura 15.

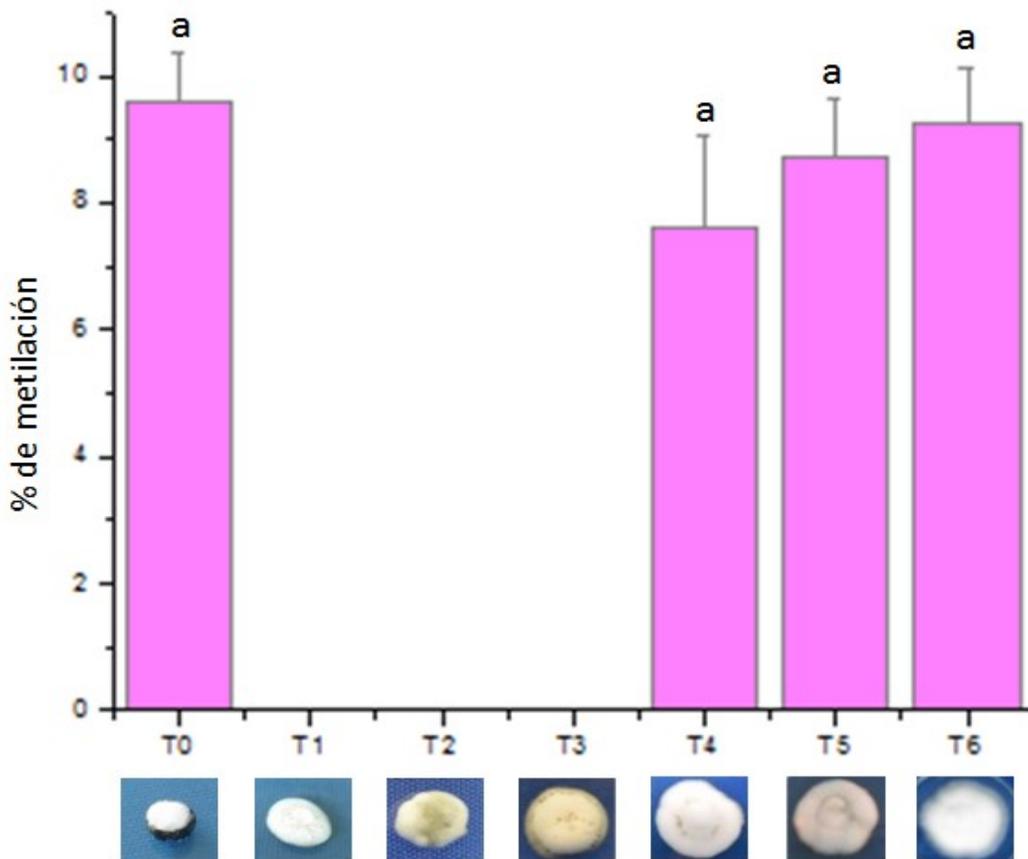


Figura 15 Porcentaje de metilación global de *Mycosphaerella fijiensis* cultivado en PDA. El porcentaje de metilación global se evaluó mediante cromatografía líquida de alta precisión, utilizando dos replicas biológicas con tres replicas experimentales de cada una. T0 inóculo inicial, T1 una semana, T2 dos semanas, T3 tres semana, T4 cuatro semanas, T5 cinco semanas y T6 seis semanas

mostraron los picos relacionados a dC y 5mdC. La letra a en las barras muestran que no hay diferencias significativas en el análisis estadístico (Test de Tukey, $P \leq 0.05$).

3.5. Discusión

Los genomas de varios hongos muestran bajos niveles de metilación del ADN, que van desde imperceptible hasta apenas detectable para metilación de sitios CpG (Antequera *et al.*, 1984; Magill y Magill 1989; Zemach *et al.*, 2010). En *M. fijiensis*, se observó que en las muestras biológicas que corresponden al tiempo cero (inóculo inicial, el cual se cultivó con ocho semanas de crecimiento en PDA) se obtuvo 9.7% de metilación global. En las muestras de una semana, dos semanas y tres semanas de crecimiento *in vitro* no se observó presencia de la 5metil deoxicitocina; probablemente el nivel de metilación es tan bajo que escapa a la detección del equipo. En las muestras biológica de cuatro semanas (T4) se obtuvo un porcentaje del 7.7%. Las muestras biológicas con cinco semanas (T5), indicaron un porcentaje de metilación del 9.1%. El último tiempo evaluado de seis semanas (T6), indicó un 9.3%. Estos porcentajes de metilación son relativamente altos en comparación con otros estudios realizados, por ejemplo: 1.5% en *Neurospora crassa*, 4% en *Agaricus bisporus*, 2.3% *Ustilago maydis*, 4.3% *Armillaria bulbosa*. Mientras que se encontraron <0,1% metilcitosinas en *Schizosaccharomyces pombe* y *Anacystis nidulans* (Binz *et al.*, 2008; Foss *et al.*, 1993; Selker Y Stevens 1987; Antequera *et al.*, 1984). La metilación del ADN puede estar ausente en *Aspergillus flavus*, aunque se especula que puede poseer metilación *de novo* durante la etapa sexual (Liu *et al.*, 2012). Como se puede observar el porcentaje de metilación detectado en *M. fijiensis* en el presente trabajo es más elevado en comparación a los hongos reportados, esto podría deberse a que el tamaño del genoma de cada uno es diferente.

La variación en el grado de metilación del genoma entre los hongos sugiere que el papel de esta regulación no se conserva estrictamente entre diferentes especies de hongos. En *Magnaporthe oryzae*, la metilación del ADN juega un papel en el desarrollo fúngico y también en la “defensa” del genoma en el ciclo de vida asexual (Jeon *et al.*, 2015).

Sin embargo, la distribución y la importancia biológica de la metilación del ADN en los genomas de los hongos aun es poco entendida (Mishra *et al.*, 2011). Este trabajo sentó las bases metodológicas para continuar profundizando en el estudio de este patógeno.

CAPÍTULO IV

Marcas epigenéticas en *M. fijiensis*

INTRODUCCIÓN

La cromatina es el estado en el que el ADN es empacado dentro de la célula. La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma conformado por un octámero de histonas (H3, H4, H2A, H2B) rodeadas por 147 pares de bases de ADN. Las histonas son globulares excepto por su “cola” amino terminal, en la cual se dan numerosas modificaciones como metilación, fosforilación, acetilación, etc. Su presencia en las histonas puede dictar la estructura de la cromatina de orden superior en la que se empaqueta el ADN y puede reclutar complejos enzimáticos para manipular el ADN. La combinación de patrones en el ADN y las modificaciones en las histonas moldean los patrones de expresión génica al permitir o restringir la transcripción de genes. La metilación del ADN se asocia con modificaciones en las histonas, en particular la ausencia de metilación de la histona H3K4me y la presencia de metilación de H3K9me. Las modificaciones en las histonas tienen el potencial de influir en los procesos biológicos y pueden ser heredados.

El western blot es un método utilizado en biología molecular/bioquímica/inmunogenética para la detección de proteínas en una muestra de tejido homogenizado o extracto. El término “blotting” hace referencia a la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y su posterior detección sobre la superficie de la misma. La especificidad de la unión antígeno-anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas y para obtener datos cualitativos y semicuantitativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Extracción de proteínas nucleares

Las proteínas nucleares fueron extraídas de la cepa C1233 de *M. fijiensis* a partir de las muestras colectadas semanalmente durante 6 semanas de crecimiento. Las histonas se aislaron de acuerdo al protocolo descrito por Jackson *et al.*, 2004. Brevemente, en un

mortero con nitrógeno líquido se maceró 1 g de tejido por muestra, se le adicionó 10 ml de amortiguador NIB [PIPES 15mM pH6.8, MgCl₂ 5mM, KCl 60mM, Sacarosa 0.25M, NaCl 15mM, Triton 100 0.8%(v/v), floruro de fenilmetilsulfonilo (PMFS), CaCl₂ 1mM]. Durante 40 minutos repetidamente se agitó con vortex (2 minutos) y se colocó en hielo (5 minutos), Posteriormente se filtró el macerado a través de una gasa con miracloth estéril y se centrifugó a 4°C a 9500 X g durante 20 minutos. Se desechó el sobrenadante y las proteínas nucleares se extrajeron dos veces con H₂SO₄ 0.4M y se precipitaron con 35ml de acetona fría durante toda la noche, incubando a 20°C. Se centrifugó a 10,000 X g por 20 minutos y se desechó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 200µl de urea 4M.

4.2. Cuantificación de proteínas nucleares

Las proteínas se cuantificaron siguiendo el método de Peterson (1987). La curva patrón o estándar fue construida usando albumina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés), con rango de concentraciones de 10 a 100 µg de proteína por mililitro. Cada cuantificación se hizo por duplicado; se utilizó 10 µl de extracto y se ajustó a 1ml con agua ultra pura. A la curva patrón y a cada una de las muestras (llevadas a 1ml) se le adicionó 100µl de desoxicolato de sodio (DOC) al 0.15% (p/v) y se agitaron con vortex. Las muestras se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se les adicionó 100µl de ácido tri-cloroacético (TCA) al 72% (p/v) frío y se agitó con vortex, se dejaron reposar por 40 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugaron a 3,500 X g a 4°C durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar las pastillas; posteriormente se resuspendieron en un mililitro de agua ultra pura. A cada muestra se le adicionó un mililitro del reactivo A (CTC [CuSO₄.5H₂O 0.1% (p/v), NaCO₃ 10% (p/v)], NaOH 0.8N (p/v), SDS 10% (p/v) y H₂O; las muestras se agitaron con vortex y se dejaron en reposo 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 500µl del reactivo B que contiene el reactivo Folin-Ciocalteau 1:5 (v/v), y se agitó con vortex. Las muestras se dejaron en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del color azul. Posteriormente se procedió a cuantificar la concentración de proteína por espectrofotometría, a una absorbancia de 750 nm.

4.3. Western blot de las proteínas nucleares aisladas con anticuerpos específicos para las marcas H3K4me² y H3K9me²

4.3.1. Análisis de proteínas por electroforesis SDS PAGE

Para cada muestra se mezcló 30 µg de cada una de las muestras con 5 µl de amortiguador de carga Laemmli 5X [Tris-HCl a 62.5 mM pH 6.8, glicerol 25% (p/v), SDS 2% (p/v), 5% β-mercaptoetanol y 0.01% (p/v) de azul de bromofenol] y se calentó por 5 minutos a 100°C (Laemmli, 1970). Las proteínas desnaturalizadas se separaron en un gel de poliacrilamida al 12.5%. La electroforesis se realizó a 100 volts durante 90 minutos. Al final el gel obtenido se tiñó con azul de Coomassie [50% MeOH; 45% H₂O; 5% ácido acético; adicionado con 0.05% de azul de Coomassie] (Laemmli, 1970).

4.3.2. Transferencia

Geles desarrollados en paralelo a los descritos en el párrafo anterior, pero sin teñir, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0.45µM (GE Healthcare Life science), empleando como amortiguador de transferencia Tris 25mM, glicina 192mM; metanol al 10%(v/v). Se verificó la transferencia a la membrana tiñendo con rojo de Ponceau al 0.2%(v/v) y lavando con agua hasta que las bandas fueron visibles y se obtuvo buen contraste. Para remover por completo la tinción de Ponceau la membrana se lavó con NaOH 0.1N durante 10 minutos y agitación constante a temperatura ambiente y enseguida se aplicó un lavado con PBS-T 1X [Tris-HCl 20mM pH7.6, NaCl 137mM, Tween-20 0.05%] por 10 minutos.

4.3.3. Inmunodetección

Posterior a la transferencia, las membranas fueron bloqueadas durante dos horas con PBST y 5% de leche descremada, incubando en agitación constante a temperatura ambiente. Después del bloqueo se lavó con PBST1X por 10 minutos a temperatura ambiente (tres veces), en agitación constante. Se emplearon los anticuerpos primarios H3K4me², H3K9me² y H3 que específicamente reconocen histona 3. H3K4me², reconoce la H3 dimetilada en la lisina 4 y H3K9me² la H3 dimetilada en la lisina 9. El anticuerpo H3 reconoce a la histona 3 en todas sus formas. Los anticuerpos primarios fueron utilizados en

las diluciones que muestra el cuadro 5 y se incubó a 4°C en agitación constante durante 12 o 24 horas dependiendo del anticuerpo empleado. Posteriormente se lavó tres veces con PBST 1X durante 10 minutos cada una, en agitación constante a temperatura ambiente, para remover anticuerpo primario pegado inespecíficamente. Se incubó tres horas en agitación constante a 4°C con un anticuerpo secundario de cabra contra conejo (conjugado a peroxidasa de rábano, el anticuerpo se utilizó diluyéndolo 1:20,000). Se lavó tres veces (10 min c/u) con PBST 1X agitando a temperatura ambiente.

Cuadro 5 Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunodetección.

Anticuerpo primario	Número de catálogo (Millipore)	Dilución en PBST/leche descremada 0.5%	Tiempo de incubación
Anti-histona H3	07-690	1:20,000	24 horas
Anti-dimetil-histona H3 (Lys 4)	07-030	1:1000	12 horas
Anti-dimetil-histona H3 (Lys 9)	07-441	1:1000	24 horas
Anticuerpo secundario			
Cabra anti-conejo IgG, conjugado-HRP	12-348	1:20,000	3 horas

4.3.4. Detección por quimioluminiscencia

La membrana fue cubierta con 2 ml de sustrato quimioluminiscente para HRP (kit Immobilon Western de Millipore). La detección de la quimioluminiscencia se realizó en un cuarto oscuro con luz roja. Una vez cubierta la membrana con el volumen de sustrato, la membrana se envolvió en kleen pack, se colocó en un estuche de revelado y se puso en contacto durante un minuto con una película fotosensible, haciendo ligera presión para que la película entre en contacto y se exponga homogéneamente. La película fue revelada en una solución al 50% (v/v) en agua de revelador fotográfico (Kodak-Sigma-Aldrich) el revelado se llevó a cabo durante un minuto, o hasta visualizar las bandas esperadas. La película se lavó en agua para retirar la solución de revelado y enseguida se colocó en una solución fijadora de

50% (v/v) del fijador-aclarador (Kodak- Sigma-Aldrich) hasta que pierde opacidad y las señales se ven sobre un fondo transparente; al final se lavó con agua para retirar la solución reveladora. La película se escurrió y secó a temperatura ambiente.

4. 4. Resultados

Durante seis semanas de crecimiento de *M. fijiensis*, se evaluarón una marca de regulación positiva de la expresión génica (H3K4me2) y una relacionada con la represión de la expresión génica (H3K9me2). Para ello se realizó la extracción de proteínas nucleares, su cuantificación y análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5% (Figura 16, panel A). Se observa el perfil de proteínas separadas en sus distintos tamaños, las más grandes en la parte superior y las más pequeñas hacia la parte inferior del gel. Una vez observada la integridad de las proteínas se preparó otro gel con las mismas muestras y condiciones y se realizó la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa. En la figura 16 panel C se observa la tinción de las proteínas sobre la membrana con rojo de Ponceau; en el panel B corresponde al gel teñido con Coomassie después de la transferencia. Se observa que la transferencia no fue completa. Algunas proteínas observadas en el gel inicial, no se observan en el panel B y C. Estas probablemente si fueron transferidas y por eso dejan de verse en el gel, pero la tinción de Ponceau no es de alta sensibilidad, por lo que solo se observan algunas de las proteínas mayoritarias. Sin embargo es común que la electrotransferencia no sea al 100% y la tinción de Ponceau confirma que si hubo transferencia de proteínas a la membrana, por lo que se continuo con el inmunoreconocimiento y revelado.

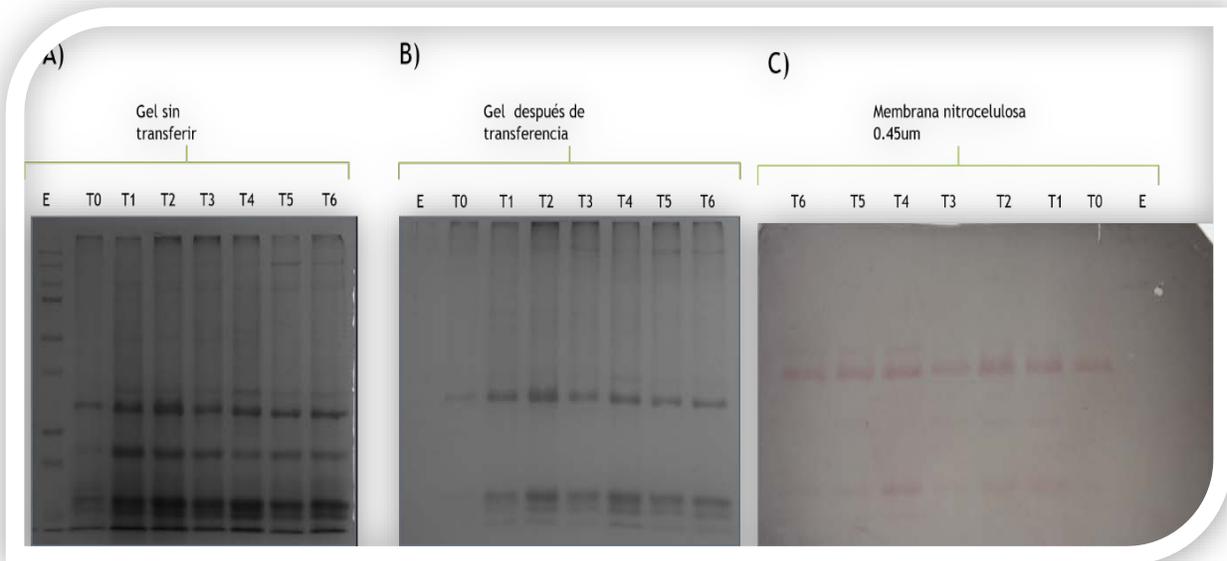


Figura 16 Análisis electroforético de las proteínas nucleares aisladas de *Mycosphaerella fijiensis* (cepa C1233) 30 µg. A) Gel SDS-PAGE al 12.5% de proteínas nucleares de *M. fijiensis* C1233 teñido con azul de Coomassie al 0.05%, B) Gel SDS-PAGE al 12.5% de proteínas nucleares de *M. fijiensis* C1233 teñido con azul de Coomassie al 0.05% después de transferir las proteínas a membrana de nitrocelulosa, C) Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau.

La cantidad de proteína necesaria para realizar los western blots fue estandarizada utilizando el anticuerpo contra la histona H3 (anticuerpo α -H3). Se repitió el experimento con tres replicas biológicas obteniendo el mismo resultado, sin embargo en un cuarto experimento al aumentar la cantidad de muestra para extraer las proteínas nucleares si se pudo observar (datos no mostrados), muy probablemente las proteínas en tiempo cero al ser el inóculo inicial con 8 semanas de crecimiento sus proteínas nucleares se degradan más fácilmente durante la extracción. Por lo que no se puede asegurar que no exista H3 en T0.

Como se puede observar en la Figura 17, la marca H3K4me² que promueve la formación de eucromatina, permitiendo la expresión de genes es abundante y se observa en los 7 tiempos, siendo más abundante en los tiempos 1, 2 y 3 de los siete puntos estudiados. La marca de represión transcripcional H3K9me² es más abundante en los tiempos 4, 5 y 6; en

el caso de H3K9me₂, tampoco se observó esta marca epigenética en el tiempo cero (T0).

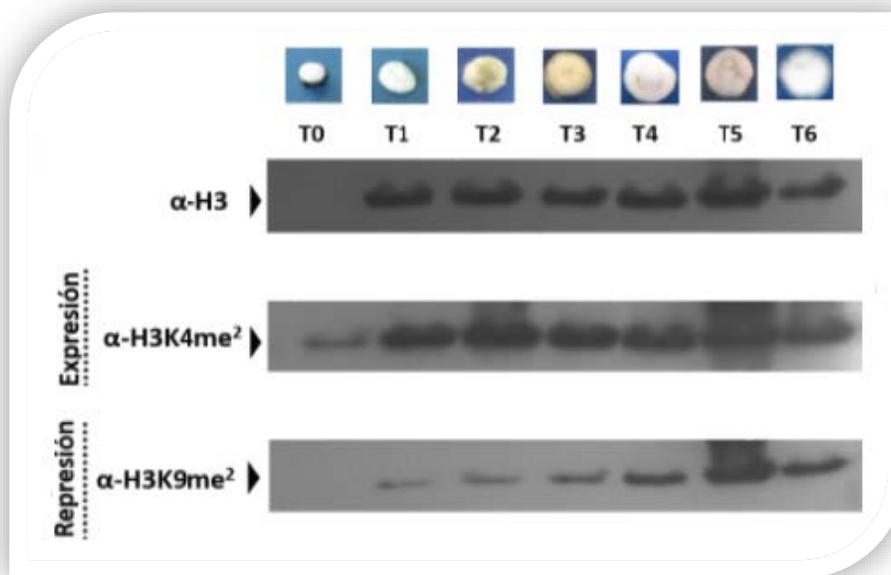


Figura 17 Inmunoblot de las proteínas nucleares aisladas de *Mycosphaerella fijiensis* (cepa C1233). Análisis de western blot de la histona 3 de las marcas epigenéticas de expresión α -H3K4me₂ y de represión α -H3K9me₂ en *M. fijiensis*. Empleando como control positivo α -H3.

Para cada tiempo, se realizó un análisis densitométrico (figura 18) con el programa ImageJ 1.51j8, los resultados de los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a un análisis de comparación de medias con el método de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el programa Origin Pro versión 8.0. El análisis densitométrico del inmunoblot de H3K4me₂ no mostró diferencias significativas. Para H3K9me₂ solo T5 mostro tener una diferencia significativa en comparación con los demás tiempos que mostraron una tendencia similar.

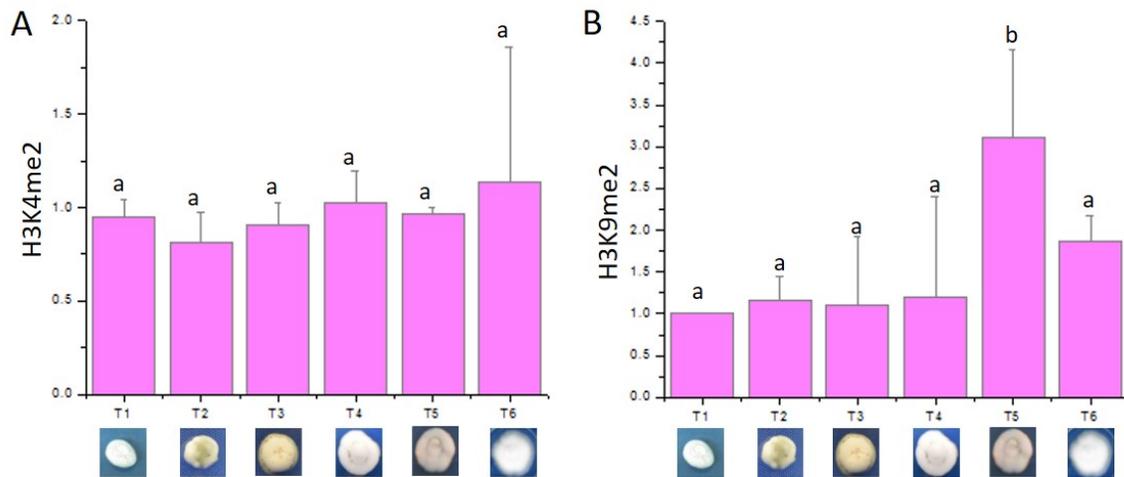


Figura 18 Análisis densitométrico de los inmunoblot de proteínas nucleares aisladas de *Mycosphaerella fijiensis* (cepa C1233). Se realizó el análisis densitométrico con el programa ImageJ 1.51j8, el análisis estadístico ANOVA y un análisis de comparación de medias test de Tukey ($P \leq 0.05$). A) Análisis densitométrico de proteínas nucleares, empleando el anticuerpo H3K4me2, las barras con la misma letra muestran no tener diferencias significativas. B) Análisis densitométrico empleando anticuerpo H3K9me2, T5 muestra diferencias significativas en comparación con las barras con la misma letra que no son significativamente diferentes.

4. 5.Discusión

La dinámica de la estructura de la cromatina es altamente regulada a través de múltiples mecanismos incluyendo las modificaciones de las histonas. La regulación de la expresión genética depende en gran manera de las modificaciones postrascricionales de las histonas.

Durante las 7 semanas de crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis*, no se pudo observar un cambio en el patrón de metilación de las histonas de los tiempos cero, cuatro, cinco y seis, como lo indica el análisis estadístico; para tiempo uno, dos y tres la metilación podría ser demasiado pequeña que escapa al rango de detección del equipo (figura 15). La marca H3K4me² está relacionada con la formación de eucromatina, es decir favoreciendo la transcripción de genes; esta marca se pudo observar en los 7 tiempos estudiados, incluso en tiempo cero, siendo más abundante en los tiempos con 1 a 3 semanas de crecimiento de los siete puntos estudiados. En este periodo se observó un aumento en la biomasa del hongo, por lo que la fuerte señal de H3 K4me² pudiera ser por la necesidad de la alta actividad transcripcional de genes relacionados con el crecimiento.

La marca H3K9me² es dependiente de la metilación en el ADN y está relacionada con la represión transcripcional. Esta marca fue más abundante en el tiempos 5, que corresponde a las semanas en la que el hongo crecía más lento y mostró niveles de metilación global en el ADN de aproximadamente 8.5 %. En *Neurospora crassa*, la metilación del ADN en la heterocromatina es llevada a cabo por la metiltransferasa DIM-5 y depende de H3K9me³. La relación entre estas dos marcas de metilación (ADN-histonas) se ve facilitada por la proteína de heterocromatina 1 (HP1) (Rountree y Selker, 2010; Du *et al.*, 2015). La abundancia de la marca H3K9me² puede estar relacionada con la carencia de nutrientes en el medio de cultivo y/o a que el tejido comenzaba a envejecer, es decir estar influenciada por cambios en el ambiente. Soyer y colaboradores (2014), demostraron que H3K9me³ estaba implicado en la regulación epigenética en la expresión de los genes efectores AvrLm1 y AvrLm4, debido a que su expresión estaba influenciada por el ambiente en el que se encontraran, ya sea en un medio de cultivo para su crecimiento o en el sitio de infección en tejido vegetal, observando cambios en su expresión y al aumentar o disminuir su patogenicidad.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

5.1. CONCLUSIONES

Los genes efectores *Avr4* y *Ecp6* no solo se expresan durante la interacción con su hospedero banano, sino que también se expresan en cultivo *in vitro*, como se pudo observar en este trabajo en el que se empleó medio de cultivo PDA.

El conocimiento que se tiene sobre el papel de la epigenética en la regulación de la virulencia fúngica a través de proteínas efectoras es un ejemplo que destaca una de las áreas inexploradas de la regulación epigenética, que merece una investigación más profunda.

Como un acercamiento para poder observar si existe metilación en el ADN de *M. fijiensis* se evaluó el porcentaje de metilación global para cada muestra analizada en cada uno de los tiempos de crecimiento en semanas (T0, T1, T2, T3, T4, T5 Y T6). Para lo cual se empleó HPLC pudiendo observar la presencia de 2dC y 5mdc en los T0, T4, T5 y T6, con un porcentaje de metilación en T0 de 9.7%, T4 obtuvo 7.7%, T5 indicó 9.1% y T6, indicó un 9.3%. T1, T2 y T3 no mostraron presencia de la 5metil deoxicitocina. El análisis estadístico no mostro diferencias significativas entre los 4 tiempos que presentaron porcentaje de metilación global.

Durante las 7 semanas de crecimiento de *M. fijiensis*, se pudo observar que existe un cambio en la metilación de la marca H3K4me² lo cual pudiera favorecer la transcripción de genes, esta marca mostró ser muy abundante y se pudo observar en los 7 tiempos estudiados. El análisis estadístico no mostró cambios significativos entre los tiempos evaluados.

La marca H3K9 es dependiente de la metilación en el ADN y está relacionada a represión transcripcional, en los resultados obtenidos se pudo observar que la H3K9me² fue más abundante en T5, ya que en los demás tiempos evaluados el análisis estadístico no muestran diferencias significativas.

5.2. PERSPECTIVAS

Entre las preguntas a responder con base en la investigación que se realizó y que serían de gran interés a nivel epigenético y de patogénesis son:

1. ¿Qué genes relacionados a patogénesis de *M. fijiensis* se encuentran regulados por las marcas H3K9me2 y H3K4me2? Esta interrogante se puede responder mediante el análisis de la técnica del ChIP (Inmuno-precipitación de la cromatina) para los genes efectores reportados para *M. fijiensis*.
2. ¿De qué manera puede afectar la ausencia de metilación a nivel del ADN y a nivel de las histonas el crecimiento y desarrollo del hongo? Para abordar este tema es importante estudiar la influencia de inhibidores de metilación a nivel ADN por medio de 5-azacitidina y a nivel de las histonas con tricosantina A.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N. (2005) *Plant Pathology*. Amsterdam: Elsevier Academic. pp. 322.
- Alvarado-Ortiz, A. y Diaz, M. (2007). Guía práctica de plagas y enfermedades en plátano y guineo. Colegio de Ciencias Agrícolas, pp. 1-39.
- Alvarez-Venegas, R., Sadler, M., Tikhonov, A., and Avramova, Z. (2007). Origin of the bacterial SET domain genes: vertical or horizontal. *Mol. Biol. Evol.* 24, pp. 482–497. doi:10.1093/molbev/msl184
- Antequera F, Tamame M, Villanueva JR, Santos T (1984) DNA methylation in the fungi. *J Biol Chem* 259: 8033–8036.
- Applied Biosystems, (2009), Relative Quantification, Applied Biosystems 7300/7500. Real Time PCR System-Getting Started Guide, Applied Biosystems Publication.
- Aramayo R, Selker EU. *Neurospora crassa*, a Model System for Epigenetics Research. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013; 5(10):a017921. doi:10.1101/cshperspect.a017921.
- Arzanlou, M., Groenewald, J.Z., Fullerton, R.A., Abeln, E.C.A., Carlier, J., Zapater, M.-F., Buddenhagen, I.W., Viljoen, A. and Crous, P.W. (2008) Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia*, 20, 19–37.
- Bachman, K. E., Rountree, M. R., and Baylin, S. B. (2001) Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique.
- Baubec T., Schübeler D. (2014). Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 25 85–92. 10.1016/j.gde.2013.11.015
- Bent AF, Mackey D: Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol* 2007, 45:399-436.
- Berger S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription, *Nature*, 447:

407-412, (2007)

Berger Shelley L Histone modifications in transcriptional regulation Current Opinion in Genetics & Development 2002, 12:142–148

Beveraggi, A., Mourichon, X. and Sallé, G. (1995) Étude comparée des premières étapes de l'infection chez des bananiers sensibles et résistants infectés par le *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*) agent responsable de la maladie des raies noires. Can. J. Bot. 73, 1328–1337.

Binz Thomas, D'Mello Nisha, Horgen Paul A. (2008). A comparison of DNA methylation levels in selected isolates of higher fungi. The New York Botanical Garden, Bronx, NY 10458-5126

Boller, T. and He, S.Y. (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. Science 324, 742–744

Bolton MD, Van Esse HP, Vossen JH, De Jonge R, Stergiopoulos I, Stulemeijer IJE, *et al.* (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. Mol. Microbiol. 69:119-136.

Bowen Joanna K., Mesarich Carl H., Rees-George Jonathan, Cui Wei, Fitzgerald Anna, Win Joe, Plummer Kim M., and Templeton Matthew D. (2009), Candidate effector gene identification in the ascomycete fungal phytopathogen *Venturia inaequalis* by expressed sequence tag analysis. Molecular Plant Pathology (2009) 10 (3), 431– 448 DOI: 10.1111/J.1364-3703.2009.00543.X

Canto Canche Blondy Beatriz y Castillo Avila Genny Margarita. (2011) Un mil usos: el plátano. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. Volumen XXIV, número 1. Consulta en línea 10 de septiembre de 2012.

Casadio, F., Lu, X., Pollock, S. B. & LeRoy, G. H3R42me2a is a histone modification with positive transcriptional effects. Proc. Natl Acad. Sci. USA 110, 14894–14899 (2013).

Chaparro-Garcia J. Win A., Belhaj K., Saunders D.G.O., Yoshida K., Dong S., Schornack S.,

-
- Zipfel C., Robatzek S., Hogenhout S.A., and Kamoun S. Effector Biology of Plant-Associated Organisms: Concepts and Perspectives. (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press; all rights reserved; doi: 10.1101/sqb.2012.77.015933
- Churchill Alice C. L. (2010) *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* (2011) 12(4), 307-328
- Clutterbuck AJ (2011) Genomic evidence of repeat-induced point mutation (RIP) in filamentous ascomycetes. *Fungal Genet Biol* 48(3): 306–326. doi:10.1016/j.fgb.2010.09.002
- Conde Ferráez L., Grijalva Arango R., James Kay AC., (2008). A rapid DNA extraction method from mycelium which is suitable for PCR. *Rev latino am Microbiol.* 50:3-4
- Crous, P.W., Schoch, C.L., Hyde, K.D., Wood, A.R., Gueidan, C., de Hoog, G.S. and Groenewald, J.Z. (2009) Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Stud. Mycol.* 64, 17–47.
- de Jonge R, Thomma BPHJ (2009) Fungal LysM effectors: Extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol* 17:151–157.
- de Wit, P.J.G., Rahim Mehrabi, Harrold a. van den Burg and Ioannis Stergiopoulos. Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology* (2009) 10(6), 735–747
- Deighton FC (1976). Studies on *Cercospora* and allied genera. VI. *Pseudocercospora* Speg., *Pantospora* Cif. and *Cercoseptoria* Petr. *Mycological Papers* 140: 1–168.
- De-La-Peña Clelia, Rangel-Cano Alicia and Alvarez-Venegas Raúl (2012). Regulation of disease-responsive genes mediated by epigenetic factors: interaction of *Arabidopsis*–*Pseudomonas*. *Molecular Plant Pathology* 13(4), 388–398
- Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: Towards an integrated view of plant pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11:539–548.

- DOE Joint Genome Institute (<http://jgi.doe.gov/>)
- Du Jiamu, Johnson Lianna M., Jacobsen Steven E. and Patel DinshawJ., DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. 16 Nature Reviews, Molecular Cell Biology, doi:10.1038/nrm4043 (2015)
- Dubey Akanksha and Jeon Junhyun. (2016). Epigenetic regulation of development and pathogenesis in fungal plant Pathogens. 'Accepted Article', doi: 10.1111/mpp.12499
- FAO. (2016). FAOSTAT database collections [Online]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. (Acceso diciembre 2016).
- Flor, HH. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology 9:275-296.
- Foss, H.M., Roberts, C.J., Claeys, K.M., and Selker, E.U. 1993. Abnormal chromosome behavior in *Neurospora* mutants defective in DNA methylation. Science 262: 1737–1741.
- Fouré E. (1985). Black leaf streak disease of banana and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. IRFA, Paris, France.
- Fouré E., Ganry J., A biological forecasting system to control Black Leaf Streak disease of bananas and plantains, Fruits 63 (2008) 311–317.
- Friesen TL (2016) Combating the Sigatoka Disease Complex on Banana. PLoS Genet 12(8): e1006234. doi:10.1371/journal.pgen.1006234.
- Fuks, F., Burgers, W. A., Brehm, A., Hughes-Davis, L., and Kouzarides, T. (2000) DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat. Genet.* **24**, 88–91.
- Genome-wide profiling of DNA methylation provides insights into epigenetic regulation of fungal development in a plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. Scientific reports, 5, 8567.

-
- Gowher H, Ehrlich KC, Jeltsch A (2001) DNA from *Aspergillus flavus* contains 5-methylcytosine. *FEMS Microbiol Lett* 205: 151–155.
- Grison, R., Grezes-Besset, B., Schneider, M., Lucante, N., Olsen, L., Leguay, J. J., and Toppan, A. (1996). Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nat. Biotechnol.* 14:643-646.
- Gronbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007; 115:1039–1059. [PubMed: 18042143]
- Haanstra, J.P.W., Laugé R., Meijer-Dekens, F., Bonnema, G., de Wit, P.J.G.M and Lindhout, P. (1999) The Cf-ECP2 gene, conferring resistance to *Cladosporium fulvum* Cke. Through recognition of the pathogenicity factor ECP2, is linked to, but not part of, the Cf-4/Cf-9 cluster on the short arm of chromosome 1 of tomato. *Mol Gen Genet* 262:839-845
- Hallam D. (1995). The word banana economy. In: Gowen, S.R. (Ed.) *Bananas and plantains. Natural Resource Institute. Department of agriculture, university of reading, UK* Chapman & Hall, London, UK. Pp509-533.
- Herrera-Fonseca, J. y Naranjo-Vllací, M. (2007). Evaluacion del efecto de dos inductores de resistencia sobre el desarrollo de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y el crecimiento de plantas de banano (*Musa AAA*), Proyecto de Graduacion Universidad Eart; pp 67.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *BioTechnology* 10, 413–417.
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RA, Terauchi R, Kamoun S. 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 115–122.
- Holliday R., Epigenetics. A historical Overview, *Epigenetics*, 1: 76-80, (2006)
- Hoss R., Helbig, J. and Bochow, H. (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 hytopathology*, 148:387-394.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (<https://www.idtdna.com/>)

Jackson J. P. Johnson, Z. Jasencakova. X. Zhang, L. Perez-Burgos, P. B. Singh, X. Cheng, I Schubert, T. Jenuwein y S. E. Jacobsen (2004). Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*, *Chromosoma*, 308-315

Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. *Science* 2001, 293:1074-1080.

Jeon, J., Choi, J., Lee, G. W., Park, S. Y., Huh, A., Dean, R. A. and Lee, Y. H. (2015)

Johanson, A., Crowhurst, R.N., Rikkerink, E.H.A., Fullerton, R.A. and Templeton, M.D. (1994) The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. *Plant Pathol.* 43, 701–707.

John Newell-Price, Adrian J.L. Clark and Peter King DNA Methylation and Silencing of Gene Expression (2000) PII: S1043-2760(00)00248-4

Jones, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13, 484–492 (2012).

Kamoun S (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* 44:41–60.

Kantún-Moreno N, Vázquez-Euán R, Tzec-Simá M, Peraza-Echeverría L, Grijalva- Arango R, Rodríguez-García C, James AC, 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 b-1,3- glucanosyltransferases. *Mycologia* 105(2):285–296

Kim Jaehoon, Kim Jung-Ae, McGinty Robert K., Nguyen Uyen T.T., Muir Tom W., Allis C. David, and Roeder Robert G. The n-SET Domain of Set1 Regulates H2B Ubiquitylation-Dependent H3K4 Methylation *Molecular Cell* 49, 1121–1133, 2013

Kouzarides T., *Chromatin Modifications and Their Function*, *Cell*,128:693-705, (2007).

-
- Kouzarides T: Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 2002, 12:198–209.
- Krauss, V., Glimpses of evolution: heterochromatic histone H3K9 methyltransferases left its marks behind, *genetics*, 133:93-106, (2008).
- Kruijt M., De Kock, M.J.D., and de Wit., P.J.G.M. (2005). Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Mol Plant Pathol* 6:85-97
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:681-685.
- Laugé, R., Joosten, M.H.A.J., Haanstra, J.P.W., Goodwin, P.H., Lindhout, P., and de Wit, P.J.G.M. (1998) Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9014–9018.
- Lee DW, Freitag M, Selker UE, Aramayo R. Un homólogo metiltransferasa citosina es esencial para el desarrollo sexual en *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*. 3: e2531, (2008).
- Liu, L., Wylie, R. C., Andrews, L. G., and Tollefsbol, T. O. (2003) Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection. *Mech. Ageing Dev.* 124, 989–998.
- Liu, S.-Y., Lin, J.-P., Wu, H.-L., Wang, C.-C., Huang, S.-J., Luo, Y.-F., Sun J. H., Zhou J. X., Yan S. J., El J. G., Wang J., El Z. M. (2012). Bisulfite Sequencing Reveals That *Aspergillus flavus* Holds a Hollow in DNA Methylation. *PLoS ONE*, 7(1), e30349. doi: 10.1371 / journal.pone.0030349
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(2Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251–260.
- Magill, J. M., and C. W. Magill. 1989. DNA methylation in fungi. *Dev. Genet.* 10:63-69.
- Maldonado-Santoyo M., C. Rodriguez Flores, A. Lopez Torres, K. Wrobel y K. Wrobel (2011).

- Global DNA methylation in earthworms: a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments, *Environ. Pollute*, 159: 2387-2392
- Marín D., Romero R., Guzman M. and Sutton T. (2003). Black Sigatoka an increasing threat to banana cultivation. *Plant disease*, 67(3):208-222.
- Menéndez Pablo, Villarejo Pedro, Padilla David, Menéndez José María y Rodríguez Monte José Antonio. (2011) *Epigenética y cáncer colorrectal*. Elsevier España, S.L. doi:10.1016/j.ciresp.2011.11.006
- Meredith, D. S. and Lawrence, J. S. (1969). Black leaf streak disease (*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.
- Mishra PK, Baum M, Carbon J, 2011. DNA methylation regulates phenotype-dependent transcriptional activity in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 11965e11970.
- Mitsubishi M. Technical report: Part 2. Basic requirements for designing optimal PCR primers. *J Clin Lab Anal* 1996;10:285–293.
- Morelet M.(1969). *Micromycetes du var et d'ailleurs (2ème Note)*. *Annales de la Societe des Sciences Naturelles et d'Archéologie de Toulon et du Var* 21:104–106
- Nakyanzi, M. (2002). *Molecular and pathogenic diversity of isolates of Mycosphaerella fijiensis that cause black Sigatoka disease of banana in East Africa*. Thesis PhD. University of Greenwich. Resource Institute.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., and Li, E. (1999) Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.
- Orozco-Santos M., Farias-Larios J., Manzo-Sanchez G. y Guzman-Gonzalez S. (2001). La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Mexico. *INFOMUSA*, 10 (1):33-37
- Pech Balam Efrén Jesús (2013). *Expresión de genes en conidios de Mycosphaerella fijiensis en*

cultivo invitro. Tesis Profesional licenciatura. ITESCAM. México. Pp. 93

Perez- Vicente L. (2002) Monografía de las especies de *Mycosphaerella* Asociada A Manchas De La Hoja En *Musa*Spp.

Peterson G. L. (1987). A simplification of the protein assay method of lowry et al. Wich is more generally applicable, *Anal. Biochemistry*, 83: 345-356

Pham, K. T., Inoue, Y., Vu, B. V., Nguyen, H. H., Nakayashiki, T., Ikeda, K. and Nakayashiki, H. (2015) MoSET1 (Histone H3K4 Methyltransferase in *Magnaporthe oryzae*) Regulates Global Gene Expression during Infection-Related Morphogenesis. *PLoS genetics*, 11, e1005385.

Ploetz, R. (2000) Black Sigatoka. *Pestic. Outlook*, 11, 19–23.

Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R (2009) Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal* 23(3):145–151

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T: Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 2000, 406:593-599.

Rhodes PL. (1964). A new banana disease in Fiji. *Commonwealth Phytopathological News* 10: 38–41.

Robertson, K. D. (2001) DNA methylation, methyltransferases and cancer. *Oncogene* 20, 3139–3155.

Rodríguez-García, C.M., Canché-Gómez, A.D., Sáenz-Carbonell, Peraza-Echeverria L, Canto-Canche B, Islas-Flores I, Rodriguez-Garcia C (2016). Expression of *MfAvr4* in banana leaf sections with black leaf streak disease caused by *Mycosphaerella fijiensis*: a technical validation *Australasian Plant Pathol.* 45: 481-488. doi:10.1007/s13313-016-0431-6

Roundtree, M. R., Bachman, K. E., and Baylin, S. B. (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat. Genet.* **25**, 269–277.

- Rountree MR, Selker EU: DNA methylation and the formation of heterochromatin in *Neurospora crassa*. *Heredity* 2010, 105:38–44.}
- Schmittgen Thomas D., Zakrajsek Brian A., Mills Alan G., Gorn Vladimir, Singer Michael J., and Reed Michael W. (1999). Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. *Analytical Biochemistry* 285.
- Selker, E.U. and Stevens, J.N. 1987. Signal for DNA methylation associated with tandem duplication in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1032– 1038.
- Shirani-Bidabadi, S., Mahmood, M., Baninasab, B. y Ghobadi, C. (2012). Influence of salicylic acid on morphological and physiological responses of banana (*Musa acuminata* cv. 'Berangan', AAA) shoot tips to in vitro water stress induced by polyethylene glycol. *Plant Omics Journal*, 5, 33-39.
- Skinner, M. K. (2015) Environmental Epigenetics and a Unified Theory of the Molecular Aspects of Evolution: A Neo-Lamarckian Concept that Facilitates Neo-Darwinian Evolution. *Genome biology and evolution*, 7, 1296-302.
- Soyer, J. L., El Ghalid, M., Glaser, N., Ollivier, B., Linglin, J., Grandaubert, J., Balesdent, M. H., Connolly, L. R., Freitag, M., Rouxel, T. and Fudal, I. (2014) Epigenetic Control of Effector Gene Expression in the Plant Pathogenic Fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS genetics*, 10.
- Stael S, Kmiecik P, Willems P, et al. Plant innate immunity – sunny side up? *Trends in plant science*. 2015; 20(1):3-11. doi:10.1016/j.tplants.2014.10.002.
- Stergiopoulos I, de Wit PJ (2009) Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* 47: 233– 263
- Stergiopoulos Ioannis, van den Burg Harrold, Ökmen Bilal, Beenen Henriek G., van Liere Sabine, Kema Gert H. J. and de Wit Pierre J. G. M. (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 107, 7610-7615
- Stover RH, Dickson JD: Banana leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis*

-
- var. *deformis*: a comparison of the first Central American epidemics. *FAO Plant Protection Bulletin* 1976, 24:36–42.
- Toruno TY, Music MS, Simi S, Nicolaisen M, Hogenhout SA. 2010. Phytoplasma PMU1 exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. *Mol Microbiol* 77: 1406–1415.
- van den Ackerveken, G.F.J.M., Dunn R. M., Cozijnsen A. J., Vossen J. P. M. J., van den Broek H. W. J. and de Wit, P.J. G.M. (1993) Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *aw9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol Gen Genet* (1994) 243:277-285
- van den Burg HA, Spronk CA, Boeren S, Kennedy MA, Vissers JPC, Vuister GW, de Wit PJ, Vervoort J (2004) Binding of the AVR4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions: the chitin-binding site of AVR4 represents a novel binding site on the folding scaffold shared between the invertebrate and the plant chitin-binding domain. *J Biol Chem* 279: 16786–16796
- van den Burg, H.A., Harrison, S.J., Joosten, M.H.A.J., Vervoort, J., and de Wit, P.J.G.M. (2006) *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 1420–1430
- van den Burg, H.A., Westerink, N., Francoijs, K.J., Roth, R., Woestenenk, E., Boeren, S., et al. (2003) Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4 mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *J Biol Chem* 278:27340-27346.
- van der Biezen, E. A. and Jones, J. D. G. (1998) Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* 23, 454 – 456.
- van Esse H. Peter , et al. (2007) The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Mol Plant Microbe Interact* 20:1092–1101.
- Vázquez-Castrejón, R., Romero-Cadena, A. Figueroa-Viera, J., Munro-Olmos, D. (2005). Paquetes tecnológicos para cultivos agrícolas, en el Estado de Colima, Paquete

tecnológico para el cultivo del plátano: N°001, pp 72

Waddington C. H., *Organisiers and genes*, Cambridge University Press, Cambridge, (1940)

Westerink, N., Roth, R., van den Burg, H. A., de Wit, P. J. G. M., and Joosten, M. H. A. J. 2002. The AVR4 elicitor protein of *Cladosporium fulvum* binds to fungal components with high affinity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:1219-1227.

Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D (2010) Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 328(5980):916–919. doi:10.1126/science.1186366

Zhou, C., Zhang, L., Duan, J., Miki, B. and Wu, K. 2005. HISTONE DEACETYLASE19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:1196-1204.