



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Silenciamiento mediado por RNA de genes asociados a patogenicidad y crecimiento en *Pseuconospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*)

Flor Yuranny Canacúan Melo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia

2016

Silenciamiento mediado por RNA de genes asociados a patogenicidad y crecimiento en *Pseucercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijensis*)

Flor Yuranny Canacuán Melo

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de: Magister en ciencias - Biotecnología

Director (a):

Ph.D., Rafael Eduardo Arango Isaza

Línea de Investigación:

Patosistema *Mycosphaerella fijiensis* - *Musa*

Grupo de Investigación:

Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias, Escuela de biociencias

Medellín, Colombia

2016

(Dedicatoria)

A Dios por ser mi guía y mi compañía, quien me dio la fortaleza para seguir adelante y no desfallecer ante las dificultades que se presentaban, y la sabiduría necesaria para concluir este logro tan importante en mi camino profesional.

A mis padres por apoyarme en todo momento, por sus consejos y sus palabras de aliento, que me motivan a seguir adelante.

A mis hermanas y sobrina por su gran cariño, por estar siempre presentes, acompañándome en todas las etapas de mi vida.

A Hugo, por su paciencia y amor incondicional.

Agradecimientos

Le agradezco a mi director de tesis, Dr. Rafael Eduardo Arango Isaza por darme la confianza de desarrollar este proyecto, y por sus asesorías y apoyo en esta investigación. A mis compañeros que forman parte del grupo de investigación Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB por colaborar en mi formación investigativa y en las habilidades de los procesos de laboratorio. A la Asociación de Bananeros de Colombia AUGURA y al Centro de investigaciones del banano CENIBANANO, a Vicente Rey Valenzuela y Jaiver Danilo Sánchez Torres, por su apoyo para la realización de este trabajo; a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y a la Corporación para Investigaciones Biológicas CIB por toda su colaboración y facilidad de instalaciones, equipos y asesoría.

Resumen

El uso de secuencias de RNAs de doble cadena (dsRNAs) introducidas en la célula con el objetivo de silenciar la expresión de genes homólogos ha permitido notables avances en el conocimiento de la función génica en diversos organismos. Actualmente en el hongo *Peudocercospora fijiensis*, agente causal de la sigatoka negra que afecta la producción de plátano y banano, no existen métodos adecuados para evaluar la función génica. En este trabajo se comprobó el silenciamiento transitorio de genes en *P. fijiensis* mediante la aplicación directa de secuencias de siRNA homologas a los genes *Fus3* y *CYP51*. El gen *Fus3* codifica para la enzima MAP quinasas (proteínas quinasas activadas por mitógenos), asociada al crecimiento y virulencia en diversos hongos fitopatógenos (Cousin et al., 2006; Xu, 2000) y el gen *CYP51* codifica la enzima citocromo P450 esterol 14 α -demetilasa, esencial para la biosíntesis de ergosterol (Canas-Gutierrez et al., 2009; Ma & Tredway, 2013). Los resultados mostraron que las secuencias de siRNA lograron la represión selectiva de estos genes, mediante la inhibición del crecimiento del tubo germinativo y disminución de las cantidades de mRNA. Este estudio sugiere que los genes analizados pueden ser blancos de control en *P. fijiensis*. Igualmente, el silenciamiento génico mediado por RNA puede ser un método adecuado para la evaluación génica en *P. fijiensis* que permita dilucidar nuevos blancos de control. Además, el RNA interferente puede ser usado como un mecanismo de control en *P. fijiensis*, mediante la generación de plantas transgénicas que expresen secuencias de siRNA homólogas a los genes evaluados en este estudio.

Palabras clave: siRNA, RNAi, *Peudocercospora fijiensis*, *Fus3*, *CYP51*.

Abstract

The use of sequences double-stranded RNAs (dsRNAs), introduced in the cell in order to silence the expression of homologous genes has allowed significant advances in the understanding of gene function in many organisms. Currently, in *Peudocercospora fijiensis*, causal agent of black sigatoka affecting banana and platano production, there are no adequate methods to assess gene function. In this work, the transient gene silencing in *P. fijeinsis* was tested by direct application of siRNA homologous to *Fus3* and *CYP51* genes. *Fus3* encode the MAPK protein (Mitogen-activated protein kinase), associated to growth and virulence in various phytopathogenic fungi (Xu, 2000) and *CYP51* encodes the enzyme sterol 14 α -demethylase, essential in ergosterol biosynthesis. (Canas-Gutierrez et al., 2009; Ma & Tredway, 2013). The results show that siRNA achieved the selective repression of these genes, by inhibition of germ tube growth and decreasing levels of mRNA. This study suggests that the analyzed genes may being targets of control in *P. fijeinsis*. Similarly, gene silencing by RNA may be a suitable method for evaluating gene in *P. fijeinsis* allowing elucidate new targets for control. In addition, RNA interference can be used as a control mechanism in *P. fijeinsis*, by generating transgenic plants expressing siRNA sequences homologous to the genes evaluated in this study.

Keywords: siRNA, RNAi, *Peusdosercospora fijiensis*, *Fus3*, *CYP51*.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XV
Introducción	17
Planteamiento del problema	18
1. Capítulo 1	20
1.1 Hipótesis.....	20
1.2 Objetivos.....	20
1.3 Marco teórico.....	21
1.3.1 Psedocercospora fijiensis.....	21
1.3.2 Psedocercospora fijiensis y Sigatoka negra	22
1.3.3 Mecanismos de estudio génico en hongos.....	23
1.3.4 Silenciamiento de genes mediado por RNA	25
1.3.5 Silenciamiento por RNA (RNAi) en hongos	27
1.3.6 RNAi en genómica funcional en hongos.....	28
1.3.7 Estrategias de RNAi en hongos	30
1.3.8 Fus3.....	31
1.3.9 CYP51	33
1.4 Metodología.....	34
1.4.1 Material fúngico.....	34
1.4.2 Identificación de genes blanco para el silenciamiento	34
1.4.3 Diseño secuencias de siRNA	35
1.4.4 Confirmación del ingreso de las secuencias de siRNA.....	35
1.4.5 Pruebas de sensibilidad a propiconazole	36
1.4.6 Inhibición del crecimiento del tubo germinativo en ascosporas	37
1.4 Aislamientos monoascospóricos.....	38
1.5 Crecimiento miceliar	38
1.6 PCR en tiempo real	39
1.7 Análisis estadístico	40
2. Capítulo 2	42
2.1 Resultados.....	42
2.1.1 Diseño del siRNA	42

2.1.2	Confirmación del ingreso de las secuencias de siRNA	42
2.1.3	Pruebas de sensibilidad a propiconazole	43
2.1.4	Efecto de los siRNAs sobre el crecimiento del tubo germinativo en ascosporas	45
2.1.5	Efecto de los siRNAs sobre el crecimiento de aislamientos monoascospóricos	48
2.1.6	Efecto de los siRNAs sobre el crecimiento miceliar	49
2.1.7	Evaluación del silenciamiento mediante PCR en tiempo real.....	50
2.2	Discusión.....	52
2.2.1	Entrada de siRNA a las células.....	52
2.2.2	Efecto de los siRNAs sobre el crecimiento del tubo germinativo en ascosporas	53
2.2.3	Efecto de los siRNAs sobre el crecimiento de aislamientos monoascospóricos	55
2.2.4	Efecto de los siRNAs sobre el crecimiento miceliar	56
2.2.5	Evaluación del silenciamiento mediante PCR en tiempo real.....	57
3.	Conclusiones y recomendaciones	59
3.1	Conclusiones.....	59
3.2	Recomendaciones.....	60
	Bibliografía	61
	Anexos.....	70

Lista de figuras

Figura 1 , Esquema de silenciamiento por RNAi (Bernards, 2006)	27
Figura 2 , Imágenes de microscopio de fluorescencia de las células transfectadas con siRNA específicas al gen Fus3. A. Micelio no expuesto a las secuencias de siRNA, B. secuencias de siRNA solas. C. Micelio expuesto a las secuencias de siRNA observados en luz normal. D. Micelio expuesto a las secuencias de siRNA observados con filtro de fluorescencia.	43
Figura 3 , Crecimiento micelial de la cepa C139 y 080930 sobre agar PDA con diferentes concentraciones de propiconazole. Se observa que el crecimiento de la cepa sensible es inhibido en todas las concentraciones usadas, mientras que la cepa resistente crece en todas las concentraciones.	44
Figura 4 , Longitud del tubo germinativo de ascosporas de <i>P. fijiensis</i> con presión de selección a fungicidas después de 48 horas de incubación sobre cajas de petri que contenían PDA con diferentes concentraciones de propiconazole.....	45
Figura 5 , Longitud del tubo germinativo \pm DS de ascosporas tratadas con las secuencias de siRNA (RNAi) Fus3, la mezcla de lipofectamina y las secuencias de siRNA (Mezcla), agua tratada con DEPC (control), y Lipofectamina. Medidos después de 48 horas de aplicados los tratamientos. Nivel de significancia del 5%. A. Promedio de la longitud del tubo germinativo a concentraciones de 50nM, 75nM, 100nM y 150nM de siRNA Fus3. Se midieron 30 ascosporas por cada tratamiento. B. Promedio de la longitud del tubo germinativo en 3 experimentos independientes con una concentración de siRNA Fus3 de 100nM. Letras distintas señalan diferencias significativas entre los valores según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).	46
Figura 6 , Longitud del tubo germinativo \pm DS de ascosporas tratadas con las secuencias de siRNA (RNAi), la mezcla de lipofectamina y las secuencias de siRNA (Mezcla), agua tratada con DEPC (control), y Lipofectamina, a una concentración de 100nM de siRNA homólogo al gen CYP51, aplicadas sobre: A. ascosporas descargadas en agar granulado al 2% sin propiconazole y B. con propiconazole a 1mg/L. Se midieron al menos 40 ascosporas por tratamiento, con 3 réplicas en el tiempo, y nivel de significancia del 5%. Letras distintas señalan diferencias significativas entre los valores según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).	48
Figura 7 , Cantidad relativa de los niveles de mRNA medidos por PCR en tiempo real, en micelios a los 5 y 7 días de expuestos con a) siRNA Fus3, b) siRNA CYP51.	51

Lista de tablas

Tabla 1. Secuencias de siRNA usadas	42
Tabla 2. % de inhibición del crecimiento micelial y longitud del tubo germinativo a diferentes concentraciones de propiconazole.	44
Tabla 3. Área de los monoascospóricos por milímetro cuadrado de las colonias formadas por ascosporas tratadas con siRNA homólogos al gen CYP51	49
Tabla 4. Área de los monoascospóricos por milímetro cuadrado de las colonias formadas por ascosporas tratadas con siRNA homólogos al gen Fus3	49
Tabla 5. Crecimiento micelial	50

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
aa	Aminoácidos
Blast	Basic local alignment search tool
cDNA	DNA copia
dsRNA	RNA de doble cadena
mRNA	RNA mensajero
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RISC	Complejo silenciador inducido por RNA
RNAi	RNA interferente
RT-PCR	PCR con transcripción inversa
siRNA	Pequeño RNA interferente
sRNA	RNA pequeño
SRS	Sitio de reconocimiento del sustrato

Introducción

El silenciamiento de genes mediado por RNA ha sido usado exitosamente como una herramienta para estudios de función génica en diversos sistemas de hongos, logrando de manera eficiente la supresión en la expresión de genes endógenos (Schumann, Ayliffe, Kazan, & Wang, 2010). Esta estrategia está basada en el silenciamiento post-transcripcional de genes (PTGS) que fue descubierto de manera independiente como RNA de interferencia (RNAi) en *Caenorhabditis elegans*, co-supresión en plantas y quelling en hongos (Cogoni et al., 1996; Fire et al., 1998; Napoli, Lemieux, & Jorgensen, 1990; van der Krol, Mur, Beld, Mol, & Stuitje, 1990), es un sistema conservado evolutivamente en organismos eucariotas, y juega un papel esencial en la regulación de múltiples procesos celulares (Dang, Yang, Xue, & Liu, 2011). Este mecanismo es activado por un RNA de doble cadena (dsRNA) exógeno o endógeno, el cual es cortado en pequeños RNA (sRNA), de 20–25 pb de longitud, por una enzima tipo RNAsa-III, llamada DICER. El sRNA resultante es entonces incorporado en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) que funciona como molécula guía para la degradación del RNA mensajero blanco (mRNA) (Schumann et al., 2010).

El silenciamiento por RNA se ha aplicado en numerosos hongos patógenos logrando la represión selectiva de genes, asociados principalmente al crecimiento y patogenicidad. Por ejemplo, en *Aspergillus nidulans*, fue silenciado el gen ornitina descarboxilasa (ODC) mediante el uso de siRNAs de doble cadena sintéticos logrando la represión selectiva de este gen y con esto la disminución en la germinación de esporas, la formación de micelio y la biosíntesis de poliaminas (Khatri & Rajam, 2007). El silenciamiento del gen EFG1 que es responsable de codificar EFG1P, un factor esencial para el crecimiento filamentoso en *C. albicans*, fue exitosamente inducido a través de la transfección de siRNA de doble cadena sintéticos relacionados (Moazeni et al., 2012). Por otra parte, en los hongos *P. fijiensis* y *Fusarium oxysporum*, se evaluó la actividad de secuencias de RNA de doble cadena para la adenilato ciclasa, DNA polimerasa subunidad alfa y DNA polimerasa

subunidad delta sobre la germinación de ascosporas. Los dsRNAs sintéticos probados aparentemente indujeron el silenciamiento de los genes blanco y mostraron grados variables de inhibición en la germinación de las esporas de estos dos patógenos de banano (Mumbanza et al., 2013).

En el presente estudio, se usaron siRNA específicos para los genes CYP51 y *Fus3*. El gen CYP51 codifica la citocromo P450 esterol 14 α -demetilasa, una enzima esencial para la biosíntesis de ergosterol, el cual regula la fluidez y la permeabilidad de la membrana celular y es esencial para la supervivencia. La inhibición de esta enzima mediante fungicidas inhibidores de la metilación (DMI) previene la formación de la membrana y crecimiento del hongo (Canas-Gutierrez et al., 2009; Ma & Tredway, 2013). El uso intensivo de los fungicidas DIM impone presiones de selección favoreciendo el desarrollo de cepas resistentes (Canas-Gutierrez et al., 2009). El gen *Fus3* codifica para la enzima MAP quinasa (proteínas quinasa activadas por mitógenos) *fus3*. *Fus3* se ha estudiado en varios organismos y se ha demostrado que es necesario para el crecimiento y la virulencia en diversos hongos fitopatógenos (Cousin et al., 2006; Xu, 2000).

Planteamiento del problema

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis* Morelet, es descrita en el ámbito mundial como la enfermedad más importante del banano y plátano desde el punto de vista económico (Marín, Romero, Guzmán, & Sutton, 2003; Stover, 1980). El banano es la segunda fruta más importante en el mundo en términos de producción y consumo (Manzo & Guzman, 2005). Esta enfermedad causa fuerte reducción del área fotosintética de la hoja, lo que conduce a una disminución del 50% en el rendimiento acompañada de madurez prematura de la fruta (Espinal, Martínez, & Peña, 2005; Rodríguez-Gaviria & Cayón, 2008). En los casos más graves la enfermedad causa pérdida total del cultivo (Rodríguez, 2009).

El control de la enfermedad se realiza principalmente mediante la aplicación extensiva de fungicidas químicos (Churchill, 2011), generalmente a través de fumigación aérea llegando hasta 36 ciclos de aspersión por año en muchas regiones bananeras (Viloria, 2008). Lo

anterior resulta muy costoso, en especial para los pequeños productores (Viloria, 2008). Adicionalmente, el control químico causa un impacto ambiental negativo, tiene consecuencias en la salud humana, y favorece la aparición de cepas resistentes de *P. fijiensis* a algunos grupos de fungicidas (Espinal et al., 2005; Romero & Sutton, 1997). Debido a estas razones, el manejo de la enfermedad requiere de medidas más efectivas y sostenibles. En este sentido, el entendimiento de la biología del agente causal es indispensable para la búsqueda de nuevas alternativas que permitan el control. Actualmente, no existen métodos apropiados para evaluar la función génica en *P. fijiensis* (Escobar-Tovar et al., 2015).

La finalidad de este estudio fue probar la aplicabilidad del silenciamiento génico en el estudio de la función génica en *P. fijiensis*, mediante la introducción directa de secuencias de siRNA homologas a los genes *Fus3* y *CYP51* que pueden estar asociados al crecimiento en este microorganismo, y observar el efecto del silenciamiento mediante pruebas fenotípicas y niveles de expresión génica.

1. Capítulo 1

1.1 Hipótesis

Hipotesis A

Ho: No existen en *P. fijiensis* mecanismos de silenciamiento génico que se pueden inducir mediante RNAi.

Ha: Si existen en *P. fijiensis* mecanismos de silenciamiento génico que se pueden inducir mediante RNAi

Hipotesis B.

Ho: La aplicación de secuencias de silenciamiento de genes asociados con crecimiento en otros hongos fitopatogenos y ortólogos en *P. fijiensis* no afecta el crecimiento de este microorganismo.

Ha: La aplicación de secuencias de silenciamiento de genes asociados con crecimiento en otros hongos fitopatogenos y ortólogos en *P. fijiensis* si afecta el crecimiento de este microorganismo.

1.2 Objetivos

1.2.1. General

Estandarizar un método de silenciamiento mediante RNA de interferencia para el silenciamiento de genes en *P. fijiensis* usando como modelo genes con posible relación con la patogenicidad y el crecimiento.

1.2.2. Específicos

- Seleccionar genes candidatos para silenciamiento.
- Diseñar secuencias para la interferencia de genes candidatos a patogenicidad y crecimiento en *P. fijiensis*.
- Evaluar el efecto del silenciamiento de estos genes en *P. fijiensis*, de acuerdo a la posible función que desempeñan.

- Evaluar la expresión de estos genes mediante PCR en tiempo real.

1.3 Marco teórico

1.3.1 *Pseudocercospora fijiensis*

P. fijiensis fue identificado por primera vez en la Isla Viti Levu, en el archipiélago Fiji en 1963. La primera aparición fuera de Asia fue en Honduras en 1972 y en Zambia en 1973 (Mourichon, Carlier, & Fouré, 1997; Rhodes, 1964; Stover, 1980).

P. fijiensis, presenta en su ciclo de vida, un estado perfecto que es la fase ascógena o sexual y un estado imperfecto que es la fase conídica o asexual. En el estado sexual, pertenece a la clase Ascomycete y en el estado asexual, se conoce como *Pseudocercospora fijiensis* y pertenece a la clase hyphomycetae (Manzo & Guzman, 2005).

El estado sexual se caracteriza por la formación de peritecios, espermagonios y ascosporas. El peritecio y espermagonio ocurren en proporciones variables durante los estados 2 y 3 de desarrollo de los síntomas. Los espermagonios son más abundantes en el envés de la hoja y frecuentemente se desarrollan en la cámara subestomática: constituyen la parte masculina y en estado maduro contienen espermátida en forma de bastoncitos o varillas hialinas que actúan como gametos que fertilizan a los peritecios que aparecen en los estados 5 y 6 de la enfermedad (Meredith & Lawrence, 1969). Los peritecios se presentan más frecuentemente en el envés de las hojas y en su estado maduro contienen numerosas ascas bitunicadas que contienen ocho ascosporas cada una, como resultado del proceso sexual (Meredith & Lawrence, 1969). Las ascosporas son hialinas, fusiformes, biseriadas, septadas con una constricción leve al nivel del septo, germinan en ambos lados y penetran al tejido del hospedero a través de los estomas (Marín et al., 2003; Stover, 1980). Las ascosporas son la fuente principal de inóculo de la enfermedad, puesto que son diseminadas por el viento y depositadas principalmente en la hoja "cigarro" y en las cuatro hojas más jóvenes de la planta (Mulder & Stover, 1976).

En el estado asexual, la morfología de *P. fijiensis*, conocida como *Pseudocercospora fijiensis*, los conidióforos pueden emerger directamente por el estoma de manera individual o en grupos, o bien pueden formarse a partir de células del estoma de color oscuro y son

fácilmente vistos en el estado 2 de la enfermedad (Mulder & Stover, 1976). Los conidióforos, resultado de la reproducción asexual, son septados de 0 a 5 compartimientos. De un solo conidióforo pueden formarse cuatro conidios maduros (Meredith & Lawrence, 1969).

1.3.2 *Pseudocercospora fijiensis* y Sigatoka negra

La sigatoka negra es la enfermedad más limitante para el cultivo de plátano y banano en todo el mundo, es considerada una enfermedad policíclica por la característica que tiene el hongo de reproducirse repetitivamente durante el curso de la epidemia, es decir, por presentar una secuencia sin fin de infección, colonización, esporulación y dispersión. *P. fijiensis* causa una infección ramificada ya que produce dos tipos de esporas diferentes, aunque ellas no ocurran necesariamente en forma alterna o equitativa (Belalcázar, 1991; Lorenzo, Consuegra, Nobmann de B, Merchán, & Hernández, 2002 ; Patiño & Mejía, 1999).

El ciclo de vida de *P. fijiensis* se inicia con la deposición de las esporas, ya sean ascosporas o conidios, sobre las hojas libres de la enfermedad o sobre las ya afectadas. Los procesos de germinación y penetración del inóculo solo ocurren cuando hay condiciones favorables con humedad relativa de 90 a 100%, temperaturas de 26 a 28°C y, sobre todo, presencia de agua libre sobre las hojas. Bajo tales condiciones, las esporas germinan en un período de 2 a 6 horas, formando tubos germinativos que se extienden y ramifican en busca de los estomas. De este modo, se inicia el proceso de penetración que tarda de 2 a 3 días si las condiciones de humedad relativa, temperatura y mojadura foliar son las adecuadas (Belalcázar, 1991; Merchán, 2000; Patiño & Mejía, 1999; Ploetz, 2007). Las ascosporas o esporas de origen sexual se desarrollan en el interior de cuerpos fructíferos conocidos como ascócarpos o seudotecios y se desprenden de las lesiones en estadio 5 y 6, según la escala de Fouré, mientras que las conidias o esporas de origen asexual se producen sobre los conidióforos y se desprenden desde el estadio 2 hasta el 6, según la escala de Fouré. Las conidias se desprenden del conidióforo, por acción de agentes ambientales como el agua y el viento (Merchán, 2000).

En banano, el ciclo total de la enfermedad puede tomar de 23 a 70 días; sin embargo, lo normal es que se cumpla en un lapso de 35 a 50 días después de la infección (Sierra, 1993).

La duración del ciclo de la enfermedad está estrechamente ligado a las condiciones ambientales, a la variabilidad del patógeno y al estado fisiológico y grado de nutrición de la planta; sin embargo, la virulencia del patógeno unida a la concentración de ascosporas y de conidios son determinantes tanto para la intensidad de la infección como para la evolución de cada uno de los estados de la enfermedad (Patiño & Bustamante, 2002)

La Sigatoka Negra se caracteriza por presentar, durante el año, diferentes grados de severidad lo que está en función de las condiciones ambientales, pudiendo alcanzar niveles epidémicos que ocasionan graves daños sobre las plantas y pérdidas sobre el rendimiento e incluso llegar a causar la muerte de las plantas afectadas (Patiño & Bustamante, 2002).

Como resultado de la acción patogénica de *P. fijiensis* en las hojas de las plantas afectadas se manifiesta una serie de síntomas que van desde puntos y rayas hasta manchas necróticas, pasando por diferentes estados, que de acuerdo a la escala de Fouré, 1985, se han definido en seis etapas: etapa 1 manchas cafés pequeñas de 0,25 mm de diámetro que aparecen sobre el envés de la hoja; etapa 2, las manchas se elongan a rayas de 1 mm de ancho por 2 mm de largo; etapa 3, las rayas se vuelven más largas, oscuras en el envés y visibles en la superficie superior como rayas amarillas; etapa 4, sobre la superficie superior, las rayas cafés oscuras aparecen rodeadas por una zona amarillenta pálida; etapa 5, los centros negros de las manchas comienzan a destruirse mientras el tejido que lo rodea forma una aureola amarilla; etapa 6, los centros de las manchas se secan formando una mancha gris rodeada por un anillo negro bien definido que es a su vez rodeado por una aureola amarilla (Sallé, Pichard, & Mourichon, 1990).

1.3.3 Mecanismos de estudio génico en hongos

Tradicionalmente, los análisis de función génica se han realizado mediante revisión de cambios fenotípicos o bioquímicos de organismos que tienen una mutación en el gen de interés (Nakayashiki et al., 2005). La estrategia utilizada es a través de técnicas de mutación génica dirigida, mediante el reemplazo del gen diana dependiente de la recombinación homóloga (D. Jiang et al., 2013). Existen varios protocolos que utilizan diferentes metodologías para realizar la transformación génica, por ejemplo, el método de protoplastos/polietilenglicol, electrotransformación, transformación mediada por *Agrobacterium*, y partículas de bombardeo. El éxito de estos métodos depende de la

producción de transformantes estables. Sin embargo, una limitación experimental importante para el análisis funcional de genes en hongos patógenos ha sido las pobres tasas de recombinación homóloga entre las secuencias de DNA exógeno y los genomas receptores (Cairns, Studholme, Talbot, & Haynes, 2016).

Una solución para este problema es la técnica de edición de genomas que es un tipo de ingeniería genética en la que el DNA se inserta, se sustituye o se elimina de un genoma utilizando nucleasas artificiales, o "tijeras moleculares". Es una herramienta útil para elucidar la función y el efecto de un gen o proteína en una secuencia de manera específica (R. Liu, Chen, Jiang, Zhou, & Zou, 2015).

La herramienta recientemente utilizada para la edición del genoma, es la tecnología CRISPR (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas asociado a (cas), tipo II. Un único multidominio Cas9 cataliza una rotura de doble hebra en el DNA diana compuesto por una secuencia de 20 pb que coincide con el protoespaciador del RNA guía (gRNA) y una secuencia de nucleótidos 5' - NGG - 3' adyacente corriente abajo (denominada como Motivo- Protoespaciador Adyacente (PAM)) (R. Liu et al., 2015). Estas roturas en el DNA diana pueden ser reparadas por unión no homóloga o reparación dirigida por homología, generando así modificaciones sitio-específicas y permanentes en el genoma. Al cambiar la secuencia de unión del DNA diana dentro del RNA guía, cas9 puede ser programado para cortar prácticamente cualquier sitio en el DNA (F. Jiang & Doudna, 2015).

Otra herramienta, usada actualmente para el estudio génico es el silenciamiento génico inducido por RNA (RNAi), el cual se ha convertido en una herramienta ideal para estudiar las funciones de los genes diana de forma transitoria cuando la manipulación génica / knockout son inviables en hongos (Gaur, 2011). Además, elimina el problema potencial para el análisis genético que es la naturaleza multinucleada de los hongos filamentosos. Las dificultades para producir transformantes homocarióticos a partir de tejido multinucleado pueden evitarse utilizando técnicas que no están comprometidas por la presencia del gen de tipo silvestre. Si se conoce la secuencia génica diana, es posible utilizar estrategias de knockdown de la expresión génica, tales como RNAi (Weld, Plummer, Carpenter, & Ridgway, 2006).

La técnica también tiene la aplicación potencial de inducir silenciamiento dirigido a las diferentes etapas de desarrollo del ciclo de vida fúngico. Sin embargo, la desventaja del silenciamiento en la expresión génica inducido por RNAi en hongos, es que se ha encontrado que el silenciamiento es incompleto en la mayoría de los casos (D. Jiang et al., 2013). Se han descrito tres métodos para desencadenar el silenciamiento de genes en hongos inducidos por RNAi. La primera es la expresión de una horquilla de RNA a partir de un transgén (hpRNA), en segundo lugar, la generación de dsRNA por transcripción convergente a partir de un transgén y, finalmente, la introducción de siRNA o dsRNA directamente en la célula de hongos (Gaur, 2011).

1.3.4 Silenciamiento de genes mediado por RNA

El silenciamiento de RNA es un mecanismo conservado evolutivamente en organismos eucariotas, es inducido por RNA no codificantes de doble cadena (dsRNA), estos RNA juegan un papel esencial en la regulación de procesos celulares como procesamiento y estabilidad del RNA, defensa del huésped, la segregación de cromosomas y la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional y postranscripcional (Dang et al., 2011). El silenciamiento por RNA a nivel postranscripcional se da a través de la degradación de secuencias específicas de RNA (mRNA) homologas a los dsRNAs inhibiendo la traducción, y a nivel transcripcional se realiza a través de la metilación del DNA y/o formación de heterocromatina que es exclusivo de las plantas (Schumann et al., 2010).

El RNA de doble cadena (dsRNA) que media el silenciamiento postranscripcional de genes (PTGS) fue descubierto de manera independiente como RNA de interferencia (RNAi) en *Caenorhabditis elegans*, co-supresión en plantas y quelling en hongos (Cogoni et al., 1996; Fire et al., 1998; Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990). En este mecanismo de silenciamiento, un dsRNA exógeno o endógeno es la molécula de activación, que es posteriormente escindida en pequeños RNA (sRNA), típicamente de 20–25 pb de longitud, por una enzima tipo RNAsa-III, llamada DICER; el sRNA resultante es entonces incorporado en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) para funcionar como molécula guía para la degradación del RNA mensajero blanco (mRNA) (**Figura 1**) (Schumann et al., 2010). Los efectos de silenciamiento mediado por sRNAs en diferentes rutas requieren una proteína Argonauta/ Piwi como el componente central del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) que cortan la hebra de mRNA diana complementaria al sRNA que está asociado a RISC (Dang et al., 2011).

Los sRNA eucariotas están generalmente categorizados en tres clases principalmente: RNA pequeños de interferencia (siRNAs), microRNAs (miRNAs), y RNAs asociados a Piwi (piRNAs). Estos difieren en la fuente del precursor del RNA guía (fase biogénesis) y en el mecanismo de acción (fase efectora) (Dang et al., 2011; Ipsaro & Joshua-Tor, 2015). Los siRNAs son derivados de dsRNA exógenos, por ejemplo, de RNA viral, o de transcritos endógenos de secuencias repetitivas por ejemplo elementos transponibles, o de transcritos que pueden formar horquillas largas. En muchos organismos, el silenciamiento inducido por siRNA requiere de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRPs) para generar dsRNA a partir de la cadena sencilla de RNA (ssRNA) o para amplificar señales de sRNA. miRNAs, son producidos a partir de genes codificantes de miRNA que generan ssRNA que forman estructuras de horquilla. Los siRNAs normalmente coinciden completamente con su mRNA blanco y funcionan generalmente como mecanismo de defensa del genoma. En contraste los miRNA pueden dirigirse a mRNAs que no son totalmente complementarios y causar su degradación y la represión de traducción. Los piRNAs adquirieron su nombre debido a la asociación de estos sRNAs con proteínas del clade Piwi de las proteínas Argonautas (AGO) animales; estos piRNA no se han identificado en organismos fuera del reino animal, se derivan principalmente de elementos repetitivos, transposones y grandes grupos piRNA en células germinales. Los piRNAs parecen ser procesados a partir de precursores de cadena sencilla y se pueden amplificar a través de un mecanismo de "ping-pong" mediado por diferentes proteínas de la familia de Piwi. Los piRNAs juegan un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad del genoma celular, aunque las funciones de muchos piRNAs son aún desconocidas (Dang et al., 2011).

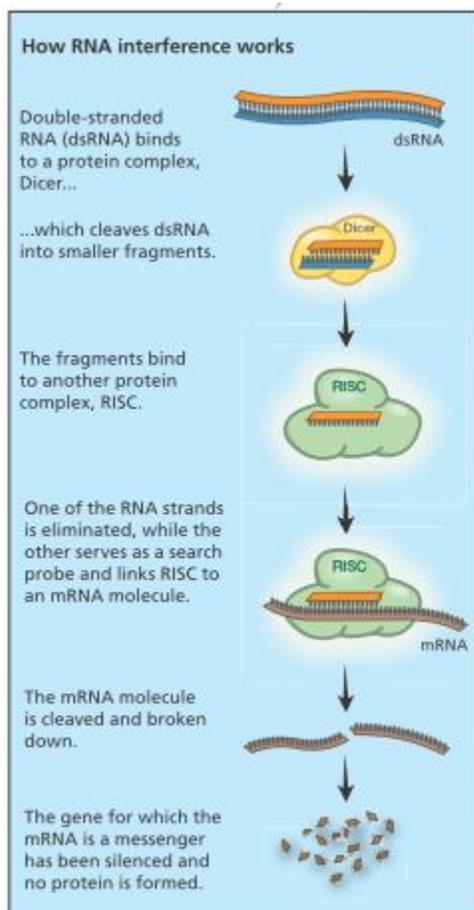


Figura 1, Esquema de silenciamiento por RNAi (Bernards, 2006)

1.3.5 Silenciamiento por RNA (RNAi) en hongos

Poco después del descubrimiento de co-supresión en las plantas (Napoli et al., 1990), Romano y Macino (Romano & Macino, 1992) descubrieron un fenómeno similar de silenciamiento de genes inducido por transgén en *Neurospora crassa*, llamado Quelling. Quelling fue descubierto al transformar *Neurospora* con DNA que contenía los genes albino-1 o albino-3, los cuales están involucrados en la biosíntesis de carotenoides. Después de la transformación, se obtuvieron transformantes blanco/amarillo pálidos con niveles reducidos de mRNA, indicando el silenciamiento de los genes endógenos por los transgenes (Carattoli, Cogoni, Morelli, & Macino, 1994; Cogoni et al., 1996; Fulci & Macino, 2007). Un alto número de copias de los transgenes se correlacionaba con la eficiencia de Quelling, lo que sugiere que la presencia de transgenes repetitivos causa silenciamiento. Además, los transformantes silenciados volvieron de forma espontánea y progresivamente

al tipo salvaje o fenotipos intermedios cuando se redujeron el número de copias del transgén y el silenciamiento no afectó los niveles de precursores de mRNA, lo que indicó que Quelling es un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) (Cogoni et al., 1996). Estudios sobre mutantes quelling-deficientes (*qde*) de *N. crassa* (Cogoni & Macino, 1997) han revelado la participación de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) y de la proteína argonauta en la ruta de silenciamiento, proporcionando evidencia molecular que Quelling pertenece a una amplia categoría de silenciamiento génico post-transcripcional mediado por RNA, tipificado como RNAi.

La participación de componentes típicos de RNAi como la proteína Dicer se reveló en *A. nidulans*, *Magnaporthe oryzae* (*M. grisea*) y *N. crassa* (Cogoni & Macino, 1999; Hammond & Keller, 2005), y la biogénesis de siRNA se detectó en *A. nidulans*, *M. oryzae*, *Mucor circinelloides*, *N. crassa*, y *Schizosaccharomyces pombe* (Catalanotto, Azzalin, Macino, & Cogoni, 2002; Hammond & Keller, 2005; Kadotani, Nakayashiki, Tosa, & Mayama, 2003; Nicolas, Torres-Martinez, & Ruiz-Vazquez, 2003) y diversas clases de RNAs pequeños han sido descritos en los últimos años. RNA *like*-micro RNAs (miRNA), qiRNAs y disiRNAs se han descubierto en *N. crassa* (Lee et al., 2010), RNAs pequeños endógenos (esRNAs) han sido descubiertos en *Mucor circinelloides*, y LTR retrotransposon-siRNAs (LTR-siRNAs) y tRF en *Magnaporthe oryzae* y *Aspergillus fumigatus* (Jochl et al., 2008; Nicolas et al., 2010; Nunes et al., 2011).

Dado que los componentes centrales de RNAi (RDRP, Dicer, y Argonauta) se han encontrado en especies de diferentes phylum, se cree que el antepasado común de los hongos poseía un mecanismo funcional de RNAi. Sin embargo, esta vía ancestral ha experimentado diversas adaptaciones durante la evolución de hongos. Por ejemplo, en levaduras, la RdRP parece estar universalmente perdida (Drinnenberg et al., 2009; Nakayashiki, Kadotani, & Mayama, 2006): las levaduras tienen rutas no canónicas de RNAi o no tienen ninguna ruta de RNAi. Por otro lado, el RNAi se ha conservado en gran medida en todos los hongos filamentosos examinados, pero con diversas funciones. En *Neurospora crassa*, los siRNAs y miRNAs participan en la defensa del genoma y la regulación génica (Fulci & Macino, 2007).

1.3.6 RNAi en genómica funcional en hongos

La inhibición artificial de la expresión de genes mediante RNAi es conocido como “silenciamiento” o “knocking down” debido a que la pérdida no es total, a diferencia del

“knocking out” donde el gen es eliminado completamente del genoma. Debido a los recientes avances en las tecnologías de secuenciación, el número de genomas de hongos secuenciados ha aumentado notablemente. En la era post-genómica, el silenciamiento de RNA (RNAi) puede servir como una poderosa herramienta genética para identificar la función de genes. Existen tres ventajas principales de RNAi en la investigación genómica funcional. En primer lugar, RNAi puede ser aplicado al análisis funcional de una múltiple familia de genes, ya que induce la supresión de genes en una secuencia específica pero no en un locus específico. La redundancia funcional es el principal obstáculo en la genómica funcional por knockout, ya que puede enmascarar el efecto de las mutaciones deletéreas. En segundo lugar, el RNAi puede ser utilizado para el estudio de genes letales, ya que no apaga completamente la expresión génica (Quoc & Nakayashiki, 2015).

Las funciones de genes esenciales siguen siendo en gran parte desconocidas debido a los enfoques genéticos clásicos, como el screening de mutantes o disrupción de genes que no son adecuados debido a la letalidad. El silenciamiento no completo con niveles reducidos de expresión génica podría arrojar una luz sobre los roles inesperados de genes esenciales en fenómenos biológicos fundamentales. En tercer lugar, el RNAi se puede utilizar en especies de hongos con baja eficiencia de recombinación homóloga. La eficiencia de la recombinación homóloga varía considerablemente entre especies fúngicas. Varias estrategias de RNAi están disponibles, y ninguna de ellas requiere la integración de un vector de RNAi dirigido. Por lo tanto, el RNAi ofrece una herramienta genética conveniente en especies de hongos donde la eficiencia de gene targeting es baja (Quoc & Nakayashiki, 2015).

Estudios donde el silenciamiento de RNA ha sido experimentalmente demostrado y se ha utilizado como una herramienta de genómica funcional incluyen una variedad de especies de hongos abarcando grandes grupos como *Ascomycota* (Fitzgerald, Van Kan, & Plummer, 2004; Hammond & Keller, 2005; Kadotani et al., 2003; Mouyna, Henry, Doering, & Latge, 2004; Rappleye, Engle, & Goldman, 2004), *Basidiomycota* (de Jong, Deelstra, Wosten, & Lugones, 2006; H. Liu, Cottrell, Pierini, Goldman, & Doering, 2002; Namekawa et al., 2005), y *Zygomycota* (Nicolas et al., 2003; Takeno et al., 2005), así como pseudohongos como *Oomycota* (Latijnhouwers, Ligterink, Vleeshouwers, van West, & Govers, 2004; van West, Kamoun, van 't Klooster, & Govers, 1999) y *Myxomycete* (Martens et al., 2002).

1.3.7 Estrategias de RNAi en hongos

Se conocen tres métodos que pueden desencadenar el silenciamiento de genes mediado por RNAi en hongos: el uso de RNAs con estructuras horquilla expresados en un transgén, generación de dsRNA por transcripción convergente a partir de un transgén, y la introducción de RNA de cadena simple o RNA de doble cadena directamente en la célula fúngica, los dos primeros son los más utilizados (Dang et al., 2011).

A pesar de que la transferencia directa de siRNA sintético a células en cultivos celulares es un método común para introducir RNAi en sistemas de mamíferos, hasta la fecha, este tipo de aplicaciones han sido raramente reportados en hongos. En *Aspergillus nidulans*, ornitina descarboxilasa (ODC), un gen clave en la biosíntesis de poliaminas, fue silenciado específicamente mediante el tratamiento con siRNA dúplex sintético de 23 nt con overhangs de 2 nucleótidos en el extremo 3'-terminal en esporas germinadas (Khatri & Rajam, 2007). El tratamiento de las esporas con 5-25 nM de ODC siRNA duplex en medio de cultivo causó una reducción significativa en la germinación de esporas y en el crecimiento del tubo germinal junto con niveles de mRNA bajos después de 18 y hasta 48 horas de incubación. Estos resultados indicaron que siRNA duplex podría ser absorbido del medio de cultivo por las esporas germinadas, proporcionando un método rápido y conveniente para inducir RNAi en células de hongos (Khatri & Rajam, 2007).

La aplicación directa de dos siRNA duplex de 21nt en ausencia de agentes de lipotransfección en *A. fumigatus* resultó en el knockdown de los mRNAs blancos correspondientes, *odcA* y *pyrG* (Jochl, Loh, Ploner, Haas, & Huttenhofer, 2009).

El gen EFG1 que es responsable de codificar Efg1p, un factor esencial para el crecimiento filamentoso en *C. albicans*, fue exitosamente silenciado con siRNA dúplex sintéticos de 19 nt con overhangs de 2 nt en el extremo 3'. La transfección fue realizada usando el método de polietilenglicol/LiAc con algunas modificaciones (Moazeni et al., 2012).

Otro estudio de transfección de siRNA mediado por lipofectamina en protoplastos se realizó en *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, para determinar el efecto de secuencias de siRNA para el silenciamiento de los genes *afID*, y *afIR* que participan en la vía de producción de aflotoxinas. El estudio mostro una reducción del mRNA *afID* y *afIR* comparado con el control en estos microorganismos (Abdel-Hadi, Caley, Carter, & Magan, 2011).

Además, se ha reportado un método para la transferencia directa de dsRNA de tamaño largo en protoplastos de *Phytophthora infestans* que pertenece a los Oomycetes. Un gen marcador, GFP, y dos genes de *P. infestans*, *inf1* y *cdc14* fueron transitoriamente silenciados por transfección de protoplastos mediada por lipofectamina con dsRNAs sintéticos marcadas con Cy3 (150 a 300 pb de tamaño). En el caso del gen marcador GFP, el silenciamiento del gen fue inducido en los protoplastos en regeneración hasta por cuatro días después de la exposición a los dsRNA GFP. A partir de entonces, la fluorescencia de GFP se recuperó parcialmente, pero se mantuvo a un nivel reducido de manera significativa (7-67% de los controles) durante 17 días después de la transfección. Cuando el gen *inf1* que es altamente expresado fue blanco para RNAi, se detectó a los 12-15 días después de la transfección una reducción significativa en la expresión de mRNA *inf1* (Whisson, Avrova, P, & Jones, 2005).

1.3.8 *Fus3*

Los hongos, como todos los demás organismos vivos, son capaces de percibir los cambios en el medio ambiente y ajustar sus actividades intracelulares. En las células eucariotas, una familia de proteínas quinasas serina/treonina conocidas como proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAP) están implicadas en la transducción de una variedad de señales extracelulares y la regulación de procesos de crecimiento y diferenciación (Xu, 2000).

En *Saccharomyces cerevisiae*, varias cascadas MAPK han sido ampliamente estudiadas, este conocimiento ha sido fundamental para la comprensión de las MAP quinasas en otros eucariotas, particularmente en otros hongos, debido a que están altamente conservados incluso en hongos muy alejados filogenéticamente como son los hongos fitopatógenos. *Fus3* es una MAPK que en *S. cerevisiae* regula la respuesta a feromonas de apareamiento sexual. Homólogos de *Fus3/kss1* han sido identificados en varios hongos fitopatógenos, y se encontró que son importantes para la formación de apresorios, crecimiento invasivo de las hifas, y la patogénesis. Esta vía de la MAP quinasa también controla diversos procesos de crecimiento o de diferenciación, incluyendo la formación de conidios, la germinación de conidias, y la fertilidad (Xu, 2000).

La mayoría de los hongos filamentosos tienen sólo una única MAPK homóloga a *Fus3* y *Kss1*. (Xu & Hamer, 1996) fueron los primeros en caracterizar una MAPK homóloga a *Fus3*

de *S. cerevisiae* en el patógeno del arroz *Magnaporthe oryzae*. Esta MAPK resultó ser esencial para la virulencia y se denominó *Pmk1* (del inglés, pathogenenicity MAP kinase). En la actualidad se han realizado varios estudios de MAPKs ortólogas a *fus3/kss1*, por ejemplo, el hongo patógeno de humanos *Candida albicans* tiene dos ortólogos de *Fus3/Kss1*, *Cek1* y *Cek2*, respectivamente. *Cek1* regula la fusión de hifas y la fusión sexual (Bennett & Johnson, 2005; Csank et al., 1998; Monge, Roman, Nombela, & Pla, 2006). *Cek2* es redundante a *Cek1* pero sólo en la fusión sexual (Chen, Lane, & Liu, 2002). En *Colletotrichum lagenarium* el gene *Cmk1* ortólogo a *Fus3/Kss1*, regula funciones relacionadas con la formación de apresorios, germinación de esporas y patogenicidad (Takano et al., 2000). En *Ustilago maydis*, hongo patógeno del maíz que infecta mediante la formación de apresorio, hay descritas dos MAPKs homólogas a *Fus3/Kss1*, *Kpp2* y *Kpp6*. Ambas tienen funciones en la fusión sexual y en la infección de la planta. *Kpp2* está relacionada con los primeros pasos de la formación del apresorio (Muller, Weinzierl, Brachmann, Feldbrugge, & Kahmann, 2003) mientras que *Kpp6* realiza pasos más tardíos de madurez del apresorio (Brachmann, Schirawski, Muller, & Kahmann, 2003). Mutaciones en ortólogos de *Fus3/Kss1* en otros hongos patógenos de plantas que no forman apresorios, como *F. graminearum*, *F. oxysporum* o el hongo patogénico necrófito *Botrytis cinérea* también anulan la capacidad de infectar al huésped (Di Pietro, Garcia-MacEira, Meglecz, & Roncero, 2001; Jenczmionka, Maier, Losch, & Schafer, 2003; Zheng, Campbell, Murphy, Lam, & Xu, 2000). Los mutantes de *C. heterostrophus* y *C. lagenarium*, muestran defectos en la conidiación (Lev, Sharon, Hadar, Ma, & Horwitz, 1999; Takano et al., 2000), mientras que los de *B. cinérea* tienen el crecimiento vegetativo reducido. En *Mycosphaerella graminícola* mutantes de *Mg fus3* que es ortólogo a *Fus3 S. cerevisiae* no produjeron melanina, mostraron polarización alterada en el crecimiento y fueron incapaces de producir micelio aéreo. Los mutantes no fueron patógenos, y análisis microscópicos detallados revelaron que no pudieron colonizar el tejido mesófilo debido a la inhabilidad de penetrar los estomas, además, a diferencia de las cepas de tipo silvestre, los mutantes fueron incapaces de producir picnidios, de esta manera aparte de regular la penetración también está involucrado en la fructificación asexual en este hongo (Cousin et al., 2006).

1.3.9 CYP51

El gen CYP51 codifica la citocromo P450 esteroide 14 α -demetilasa, una enzima esencial para la biosíntesis de ergosterol. La inhibición de esta enzima mediante fungicidas DMI previene la formación de la membrana y crecimiento del hongo (Ma & Tredway, 2013).

Los fungicidas DMI que se usan en el cultivo de banano son: Bitertanol, Difenconazole, Epoxiconazole, Fenbuconazole, Myclobutanil, Propiconazole, Tebuconazole, Tetraconazole, Triadimenol (FRAC, 2014). El uso intensivo de estos fungicidas impone presiones de selección en la población de los organismos fitopatógenos los cuales presentan normalmente una gran variabilidad y adaptabilidad lo que les permite producir genotipos capaces de vivir en presencia de estos productos. En el caso de los fungicidas inhibidores de ergosterol, es común la presencia de un tipo de selección denominado selección direccional, en el cual hay una amplia gama de niveles de sensibilidad del patógeno, y la disminución de la sensibilidad de la población con respecto al uso de fungicidas es gradual. El aumento de dosis del fungicida permite su uso por un tiempo mayor hasta que la enfermedad salga de control (Arauz, 1998).

La aparición de cepas resistentes ha sido observada en varias especies de hongos. En el caso de *P. fijiensis*, varios estudios han mostrado que después del uso continuo de propiconazole, hay una disminución en la sensibilidad (Canas-Gutierrez et al., 2009; Romero & Sutton, 1997).

Se han descrito los mecanismos que influyen la sensibilidad a estos fungicidas: mutaciones puntuales en el gen CYP51 que confieren resistencia a los DMI han sido descritos en varios hongos fitopatógenos tales como *Uninula necator*, *Blumeria graminis*, *Puccinia triticina* y *M. graminicola*. En *P. fijiensis*, un estudio realizado en cepas resistentes a propiconazole encontraron 6 mutaciones en el gen CYP51: Y136F, A313G, Y461D, Y463D, Y463H y Y463N, relacionadas con la pérdida de sensibilidad a este fungicida (Canas-Gutierrez et al., 2009). Estas mutaciones en este gen resultan en una reducción de la afinidad de la proteína hacia los inhibidores, la cual ha sido asociada con un cambio en la hidrofobicidad del sitio activo: fenilalanina tiene una cadena lateral no polar mientras que la tirosina tiene una polar (Canas-Gutierrez et al., 2009).

La sobreexpresión constitutiva del gen CYP51 debido a elementos repetitivos e inserciones en la región promotora es responsable del desarrollo de resistencia en *Penicillium*

digitatum, *Venturia inaequalis*, *Monilinia fructicola*, *M. graminicola* y *Blumeriella jappii*. (Ma & Tredway, 2013). En *P. fijiensis* se ha demostrado que es un mecanismo importante de resistencia (Díaz C et al., 2016)

1.4 Metodología

1.4.1 Material fúngico

Los ensayos sobre germinación se realizaron utilizando ascosporas de *P. fijiensis*, obtenidas a partir de hojas de banano en estadio 5 y 6 según escala de Fouré. La obtención de ascosporas se desarrolló mediante el método de descarga descrito por Stover (1976) con algunas modificaciones. Después de la descarga bajo condiciones asépticas y con la ayuda del microscopio, las ascosporas fueron identificadas por su morfología y sus dimensiones señalando los puntos de descarga.

Para pruebas de crecimiento miceliar se utilizó la cepa 080930 de *P. fijiensis* proveniente de Urabá, Antioquia previamente aislada en la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) y caracterizada por presentar alta agresividad y resistencia al fungicida propiconazole. Como control se usó la cepa C139 que presenta sensibilidad al propiconazole. Las cepas fueron crecidas en agar PDA (Becton Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France) a 25 ± 2 °C en luz roja durante 15 días.

1.4.2 Identificación de genes blanco para el silenciamiento

Se identificaron genes candidatos a determinantes de patogenicidad y crecimiento en *P. fijiensis* mediante revisión bibliográfica de estudios reportados en otros hongos fitopatógenos y teniendo como base el genoma secuenciado de *P. fijiensis* reportado en la base de datos del DOE Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov>). Se seleccionaron dos genes blanco, el gen *Fus3* y el gen *CYP51*. El gen *FUS3* codifica para enzimas MAP quinasas (proteínas quinasas activadas por mitógenos), las cuales, son proteínas que actúan en el ciclo celular estimulando la división celular y se ha demostrado que son necesarias para la virulencia en diversos hongos fitopatógenos (Xu, 2000), el

silenciamiento de este gen en *Mycosphaerella graminicola* reprimió la fase asexual, la melanización y la formación de micelio aéreo de este hongo y se observó no penetración de estomas (cousin et al., 2006).

El gen CYP51 (citocromo P450 14 α -esterol desmetilasa) codifica enzimas que participan en procesos biosintéticos como la producción de esteroides, alcaloides, y biosíntesis de terpenoides. Al ser clave en la síntesis de esteroles ha sido blanco para el diseño de drogas anti fúngicas; sin embargo, no ha logrado un éxito completo debido a la resistencia intrínseca de algunos hongos o a la mutación de cepas inicialmente sensibles (Podust, Poulos, & Waterman, 2001).

1.4.3 Diseño secuencias de siRNA

Para la inducción del silenciamiento, se utilizaron secuencias de RNA dúplex sintéticos de 19 nucleótidos denominados siRNA. Las secuencias de siRNA fueron diseñadas utilizando el programa Rational siRNA Design reportado por (Reynolds et al., 2004) de acuerdo con el protocolo descrito por (Birmingham et al., 2007) y sintetizados químicamente por Bioneer Oligo Synthesis. El siRNA para el gen *Fus3* se realizó con base en la secuencia del gen *Fus3* de *P. fijiensis*, encontrada mediante un blastp en la página del DOE Joint Genome Institute (JGI) (<http://genome.jgi.doe.gov/Mycfi2/Mycfi2.home.html>) usando la base de datos de proteínas de este microorganismo con la secuencia del gen *Fus3* de *S. cerevisiae* publicada en la página del National Center for Biotechnology Information NCBI (nombre de acceso: NP_009537). Después, se identificó la secuencia de nucleótidos de la proteína de *P. fijiensis* con la que tuvo alto porcentaje de identidad en el blastp usando los transcritos y CDS del JGI. El siRNA para el gen CYP51, se diseñó a partir de la secuencia del gen CYP51A de *P. fijiensis* reportada por (Canas-Gutierrez et al., 2009).

1.4.4 Confirmación del ingreso de las secuencias de siRNA

Para verificar que se logró el ingreso del siRNA a las células, se diseñó y sintetizó un siRNA de 25 pares de bases homólogo al gen *Fus3* en *P. fijiensis*, con la secuencia sentido: 5'GAAUGAAUUGUUGCGCUACUUCA y secuencia antisentido: 5'UGAAGUAGCGCAACAAUUUCAUUUC marcadas en el extremo 5' con fluoresceína. La secuencia fue sintetizada por Bioneer Oligo Synthesis. Fragmentos de micelio fueron expuestos durante 5 horas a las secuencias de siRNA marcadas y posteriormente, se

realizaron dos lavados con agua estéril tipo III. Los fragmentos miceliarios que ingresaron las secuencias de siRNA fueron detectados mediante microscopía de fluorescencia usando un microscopio Nikon eclipse 80, en objetivo de 40x, con el filtro de fluorescencia adecuado y se estimó el número de células transfectadas.

1.4.5 Pruebas de sensibilidad a propiconazole

Se realizaron pruebas de sensibilidad para determinar la concentración de propiconazole que se usará en los ensayos de silenciamiento sobre el gen CYP51. Los ensayos de sensibilidad de micelio se realizaron mediante evaluación de crecimiento sobre cajas de petri que contenían PDA más propiconazole, y en placas de 96 pozos para medición del crecimiento en espectrofotómetro. Se preparó una solución de 200 mg/L de propiconazole que se usó para ser aplicada en medio PDA a concentraciones finales de 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 mg/L y una solución de 100 mg/L de propiconazole para preparar las soluciones de 0.75, 1.5, 3, 6 y 9 mg/L para aplicarlas en los microplatos.

Se realizó un inóculo de la cepa 0800930 y un inóculo de la cepa C139, usando pinceles y agua estéril tipo III. El micelio de cada cepa se filtró con filtro de etamina estéril, se midió la concentración en cámara de Neubauer (1/10 mm deep, bright line - Boeco, Germany) y se ajustó a 6.8×10^4 fragmentos miceliarios/ml. Se tomó 400 μ l de cada inóculo y se plató sobre cajas de petri que contenían el medio PDA con propiconazole. Los platos se incubaron a 27 °C, en luz roja durante 15 días para observar el crecimiento. Para la prueba de sensibilidad en microplaca, se llenó cada pozo con 50 μ l de medio líquido Sabouraud (BBLTM Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), 50 μ l de inóculo y 50 μ l de propiconazole a las diferentes concentraciones. Como controles se agregó 100 μ l de medio Sabouraud y 50 μ l de H₂O para control de contaminación, y 50 μ l de medio Sabouraud, 50 μ l de inóculo y 50 μ l de H₂O para control de crecimiento. Los microplatos fueron incubados durante 11 días a 27°C. El crecimiento micelial fue medido mediante espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición usando la fórmula: $1 - (\text{promedio de la absorbancia del micelio crecido con fungicida} / \text{promedio de la absorbancia del micelio control}) \times 100$.

Los ensayos de sensibilidad en ascosporas se realizaron mediante evaluación de crecimiento de tubo germinativo de ascosporas descargadas sobre cajas de petri que contenían agar granulado al 2% más propiconazole. Para esto, se realizó una solución de

200 mg/L de propiconazole que se usó para preparar agar granulado al 2% a concentraciones finales de 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 mg/L de propiconazole. Luego, se permitió la descarga de ascosporas de hojas infectadas con sigatoka negra sometidas a presión con fungicidas, sobre las cajas de petri que contenían el agar granulado con las diferentes concentraciones de propiconazole. Se incubó durante 48 horas, y finalmente se observó en microscopio óptico. Se tomaron fotografías para medición de la longitud del tubo germinal con el software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland). Se calculó el porcentaje de inhibición usando la fórmula: $1 - (\text{promedio de la longitud del tubo germinativo de las ascosporas descargadas sobre agar con el fungicida} / \text{promedio de la longitud del tubo germinativo de las ascosporas control}) \times 100$.

1.4.6 Inhibición del crecimiento del tubo germinativo en ascosporas

La actividad de las secuencias de siRNA para los genes *Fus3* y *CYP51* sobre la inhibición de la longitud del tubo germinal en ascosporas de *P. fijiensis* fue probada mediante cuatro tratamientos. Los tratamientos consistían, en las secuencias de siRNA para los dos genes resuspendidas en agua tratada con DEPC, las secuencias de siRNA mezcladas con un volumen igual de lipofectamina (Invitrogen Life Technologies), lipofectamina, y como control agua tratada con DEPC. Para determinar la concentración de siRNA más efectiva, se ensayaron cuatro concentraciones: 50nM, 75nM, 100nM y 150nM con las secuencias de siRNA para *Fus3*. Se usó una modificación de un método para la evaluación del efecto de péptidos antimicrobianos sobre la germinación de ascosporas de *P. fijiensis*, desarrollado en el grupo de investigación de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB (Vásquez, Guzmán, Patarroyo, & Arango, 2009). Se tomó 20 µl de cada tratamiento y se agregó sobre ascosporas provenientes de hojas libres de fungicida descargadas en cajas de Petri con agar granulado al 2%. Se incubó por 48 horas y se tomaron fotografías para medición de la longitud del tubo germinal con el software ImageJ. Los datos se analizaron con el software estadístico R. La concentración de siRNA que logró una mayor inhibición fue repetida por triplicado con dos replicas en cada experimento. Del mismo modo, se realizó el silenciamiento para el gen *CYP51*, aplicando 20 µl de los cuatro tratamientos con una concentración de siRNA de 100nM sobre ascosporas sometidas a presión con fungicidas descargadas en agar granulado al 2% con propiconazole a 1 mg/l y sin propiconazole. Con los resultados obtenidos, se realizó el cálculo del porcentaje de

inhibición en el desarrollo del tubo germinal de las ascosporas sometidas a las secuencias siRNA de los dos genes evaluados usando la fórmula: $1 - (\text{promedio de la longitud de las ascosporas tratadas con siRNA} / \text{promedio de la longitud de las ascosporas control}) \times 100$.

1.4 Aislamientos monoascospóricos

Se descargaron ascosporas en agar granulado al 2% y se les agregó 20 μl de siRNA a una concentración de 100nM, siRNA mezclado con lipofectamina, agua tratada con DEPC, y lipofectamina. Las muestras se incubaron durante 6 horas y fueron observadas al microscopio de luz, luego con la ayuda de un capilar se extrajeron individualmente y fueron transferidas a cajas de petri que contenía medio PDA (Papa, Dextrosa, Agar) (Difco™-BD. Le point de Claix, France). Las ascosporas sometidas a los tratamientos con las secuencias de siRNA homologas al gen CYP51, fueron transferidas a cajas de petri que contenían medio PDA con propiconazole a 0.5 mg/L y sin propiconazole. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente bajo luz roja, para la medición del área del monoascospórico a los 30 días de crecimiento. Este procedimiento se realizó para las dos secuencias de siRNA. Se midieron al menos tres monoascospóricos por cada tratamiento.

1.5 Crecimiento miceliar

La evaluación del efecto de las secuencias de siRNA sobre el crecimiento miceliar de *P. fijiensis* se realizó basados en el método de microplaca estandarizado en el grupo de investigación de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB para la medición de actividad de componentes antifúngicos contra *P. fijiensis* (Peláez Montoya et al., 2006). Se preparó una suspensión de fragmentos miceliares de la de la cepa 080930 de *P. fijiensis* crecida en PDA realizando un raspado con pincel y agua destilada estériles. Se filtró a través de tela etamina, luego se midió la concentración miceliar en cámara de Neubauer. (1/10 mm deep, bright line - Boeco, Germany) y se ajustó la concentración a 1×10^6 fragmentos miceliares/ml. En tubos estériles de 15 ml se tomó 1ml de esta suspensión y se mezcló con 2ml de la solución de siRNA a una concentración de 100nM. Como control se tomó 1ml de suspensión más 2ml de agua tratada con DEPC. Se incubo a 27 °C durante 24 horas. Se agregó a cada tubo 7ml de agua destilada estéril y finalmente, las muestras fueron inoculadas en placas de 96 pozos. Este procedimiento se realizó para cada gen evaluado. Para el análisis del gen Fus3, cada pozo fue llenado con 100 μl de medio liquido Sabouraud (BBL™ Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) y 50 μl del micelio tratado. Para

análisis del gen CYP51, se agregó en cada pozo 50 μ l de medio líquido Sabouraud, 50 μ l del inóculo tratado y 50 μ l de propiconazole a 0.5 mg/l y a 0 mg/l. Como control de contaminación se agregó 100 μ l de medio Sabouraud y 50 μ l de H₂O. Los microplatos fueron incubados durante 11 días a 27°C. El crecimiento micelial fue medido mediante espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm.

1.6 PCR en tiempo real

La cuantificación de los niveles de expresión de los genes evaluados en los micelios expuestos a las secuencias de siRNA y los micelios control se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real. Se utilizó esta técnica porque está reportado que es sensible para la cuantificación y requiere de poco material de RNA (Whisson et al., 2005). Se tomó 500 μ l de la suspensión micelial que se usó para la prueba de crecimiento micelial (1×10^5 fragmentos miceliales/ml), tratada con las secuencias de siRNA a una concentración de 100nM y se dispuso en tubos de 1.5ml que contenían 1ml de medio líquido Sabouraud y se incubó a 27°C. Como control se utilizó micelios tratados con agua con DEPC. Se tomó la biomasa del micelio a los 3, 5 y 7 días de crecimiento para extracción de RNA. La extracción de RNA se realizó siguiendo el protocolo para extracción de RNA de *P. fijiensis*, estandarizado en la unidad de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB, utilizando el reactivo comercial Concert Plant RNA de Invitrogen. El RNA fue cuantificado por espectrofotometría (260/280 nm) con el NanoDrop ND-2000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA), y posteriormente, visualizados en gel de agarosa al 1% y tinción con Gelred para determinar la calidad e integridad del RNA total. La contaminación de DNA de las muestras fue removida usando el kit de digestión DNase I, RNase-free (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se sintetizó cDNA a partir de 100 ng de RNA total libre de DNA utilizando el Maxima First Strand cDNA Synthesis Kits for RT-QPCR, siguiendo las condiciones del fabricante. Los resultados de las amplificaciones se examinaron por análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.

El cDNA se cuantificó mediante una PCR en tiempo real con el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, siguiendo las condiciones del fabricante, usando primers específicos para el gen *Fus3* (primer Forward 5'ATCCACCGAGTCATCCGCACT 3' y primer Reverse 5'TCGGTGGAGGACATTGGCGGA 3'), y para el gen CYP51 (primer Forward 5'CGCCAGTATTCGGCACAGATGTGCG3' y primer Reverse 5'

TAACGTAGGACTGGAGGGCGGA 3'). El gen actina (primer Forwar: 5'TCCGTCCTTGGTCTCGAATCTGGT3' y primer Reverse: 5'TGCATACGGTCGGAGATACCTGGA 3') expresado constitutivamente fue usado como control endógeno en todas las reacciones. Los valores de expresión fueron calculados mediante cuantificación relativa utilizando el método $\Delta\Delta$ ct (Livak & Schmittgen, 2001).

1.7 Análisis estadístico

Para investigar si el silenciamiento de los genes *Fus3* y *CYP51* resultaron en diferencias significativas entre el control y el silenciamiento, los datos fueron analizados usando el programa estadístico R. En el primer ensayo sobre ascosporas, los datos obtenidos del tubo germinativo para las cuatro concentraciones de siRNA evaluadas (50nM, 75nM, 100nM, Y 150nM), fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias entre los tratamientos en cada uno de los experimentos. Se realizaron pruebas de shapiro-wilk para determinar normalidad y prueba de levene para homogeneidad de varianza, los datos que no cumplieron con los criterios para el análisis de varianza se les realizó transformación logarítmica. Finalmente, los datos de los ensayos a 75nM no cumplieron los criterios de homogeneidad de varianza, así que el análisis fue realizado usando la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando hubo diferencias entre tratamientos se realizó prueba de prueba de Tukey ($P>0.05$) para comparación de medias.

Cada una de las repeticiones del silenciamiento de los genes *Fus3* y *CYP51* sobre ascosporas a una concentración de siRNA fueron promediados y analizados por un diseño de bloques, respectivamente, y se realizó prueba de ANOVA para determinar diferencias entre tratamientos. De la misma manera, el área de los aislamientos monoascospóricos fue analizada mediante un ANOVA y se realizó pruebas de shapiro-wilk y de levene para determinar normalidad y homogeneidad de varianzas, respectivamente. Cuando hubo diferencias entre tratamientos se realizó prueba de prueba de Tukey ($P>0.05$) para comparación de medias.

Las diferencias entre tratamientos en micelio fueron identificadas mediante análisis de t-student, realizando prueba de normalidad y homogeneidad de varianza. Los datos que no cumplieron con los criterios fueron analizados usando la prueba de Wilcoxon. Los datos de qPCR calculados mediante cuantificación relativa fueron analizados usando la prueba de Wilcoxon.

2. Capítulo 2

2.1 Resultados

2.1.1 Diseño del siRNA

Se diseñó y sintetizó un siRNA de 19 nucleótidos basado en el gen CYP51 y un siRNA de 19 nucleótidos basado en el gen *FUS3* de *P. fijiensis* (**Tabla 1**).

Tabla 1. Secuencias de siRNA usadas

Nombre	Secuencia
CYP51A	Cadena sentido: 5'CGUCAACGCAGAUGGAUCA (dTdT) 3'
CYP51A	Cadena antisentido: 5'UGAUCCAUCUGCGUUGACG (dTdT) 3'
CIB-JM2	Cadena sentido: 5'AGAUUAUGCUUACGUUCAA (dTdT) 3'
CIB-JM2	Cadena antisentido: 5'UUGAACGUAAGCAUAAUCU (dTdT) 3'

2.1.2 Confirmación del ingreso de las secuencias de siRNA

La microscopia de fluorescencia se usó para corroborar la entrada de las secuencias de siRNA a las células. Los micelios expuestos a las secuencias de siRNA marcadas fueron fluorescentes, mientras que el control no mostró fluorescencia (**Figura 2**). El porcentaje de micelios que mostraron fluorescencia fue de aproximadamente $45.59 \pm 3.98\%$. Este resultado sugiere que las secuencias de siRNA diseñadas para el silenciamiento de los genes *Fus3* y CYP51 fueron efectivamente ingresadas a las células, sin embargo, hay un porcentaje de células en donde aparentemente no hay ingreso de las secuencias.

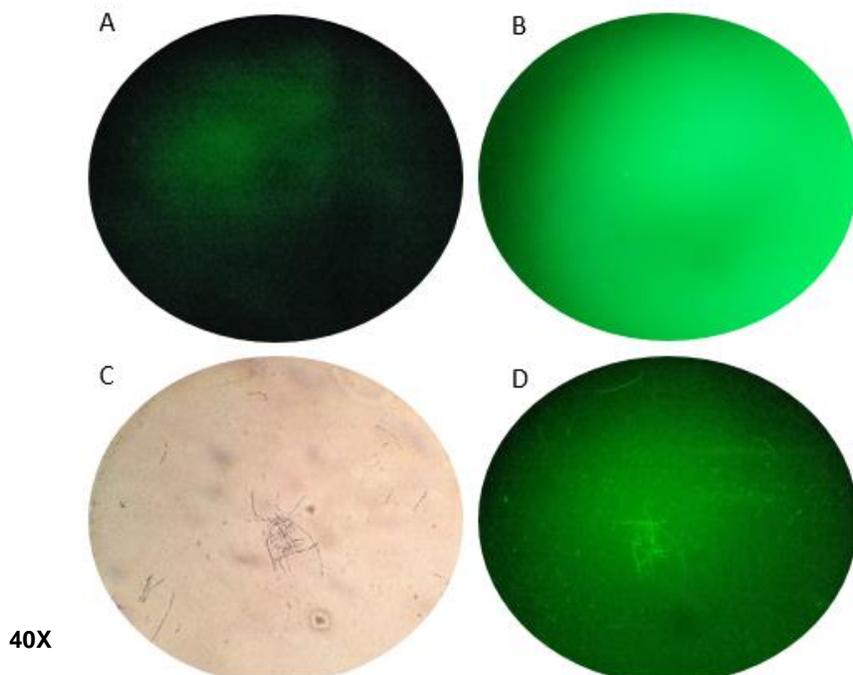


Figura 2, Imágenes de microscopio de fluorescencia de las células transfectadas con siRNA específicas al gen *Fus3*. **A.** Micelio no expuesto a las secuencias de siRNA, **B.** secuencias de siRNA solas. **C.** Micelio expuesto a las secuencias de siRNA observados en luz normal. **D.** Micelio expuesto a las secuencias de siRNA observados con filtro de fluorescencia.

2.1.3 Pruebas de sensibilidad a propiconazole

Antes de iniciar las pruebas de silenciamiento se realizó una evaluación de la sensibilidad de las cepas de *P. fijiensis* al propiconazole con el fin de establecer la concentración adecuada para realizar experimentos posteriores. La concentración de propiconazole a partir de la cual se observó inhibición en el crecimiento micelial sobre las cajas de petri con agar PDA de la cepa resistente a propiconazole, fue 1 mg/L. En la cepa control se observó inhibición del crecimiento bajo todas las concentraciones probadas (**Figura 3**). De igual manera, las lecturas de absorbancia de los micelios sometidos a las concentraciones de propiconazole, mostraron una mayor inhibición del crecimiento a 2 mg/L de propiconazole. La cepa control fue sensible bajo todas las concentraciones del fungicida (**Tabla 2**). Se decidió usar la concentración de 0.5 mg/L de propiconazole para los ensayos de silenciamiento sobre el gen CYP51. Si el silenciamiento es inducido por las secuencias de siRNA, la cepa será sensible y se observará una inhibición del crecimiento.

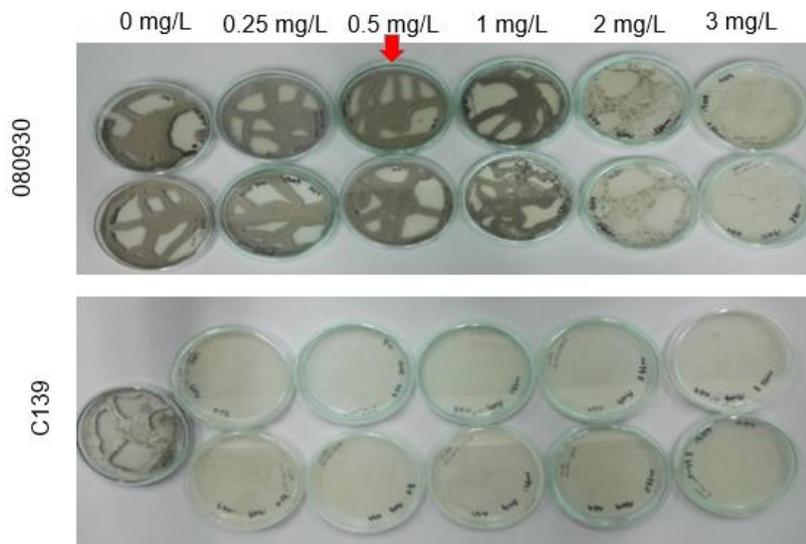


Figura 3. Crecimiento micelial de la cepa C139 y 080930 sobre agar PDA con diferentes concentraciones de propiconazole. Se observa que el crecimiento de la cepa sensible es inhibido en todas las concentraciones usadas, mientras que la cepa resistente crece en todas las concentraciones.

Tabla 2. % de inhibición del crecimiento micelial y longitud del tubo germinativo a diferentes concentraciones de propiconazole.

Concentración de propiconazole (mg/L)	% Inhibición		
	080930	C139	Ascosporas
0.25	-4.5	47.08	6.61
0.5	4.09	52.59	12.96
1	4.6	55.94	36.73
2	17.08	57.4	58.98
3	44.19	59.61	72.89

El propiconazole inhibió el crecimiento del tubo germinativo en todas las concentraciones (**Tabla 2**), sin embargo, la concentración a partir de la cual se observa una inhibición más evidente es 1 mg/L (**Figura 4**) por lo tanto, esta fue la concentración que se eligió para realizar los ensayos de silenciamiento del gen CYP51 en ascosporas. Si el silenciamiento del gen CYP51 es inducido por las secuencias de siRNA en las ascosporas, se espera observar una mayor inhibición en el crecimiento del tubo germinal.

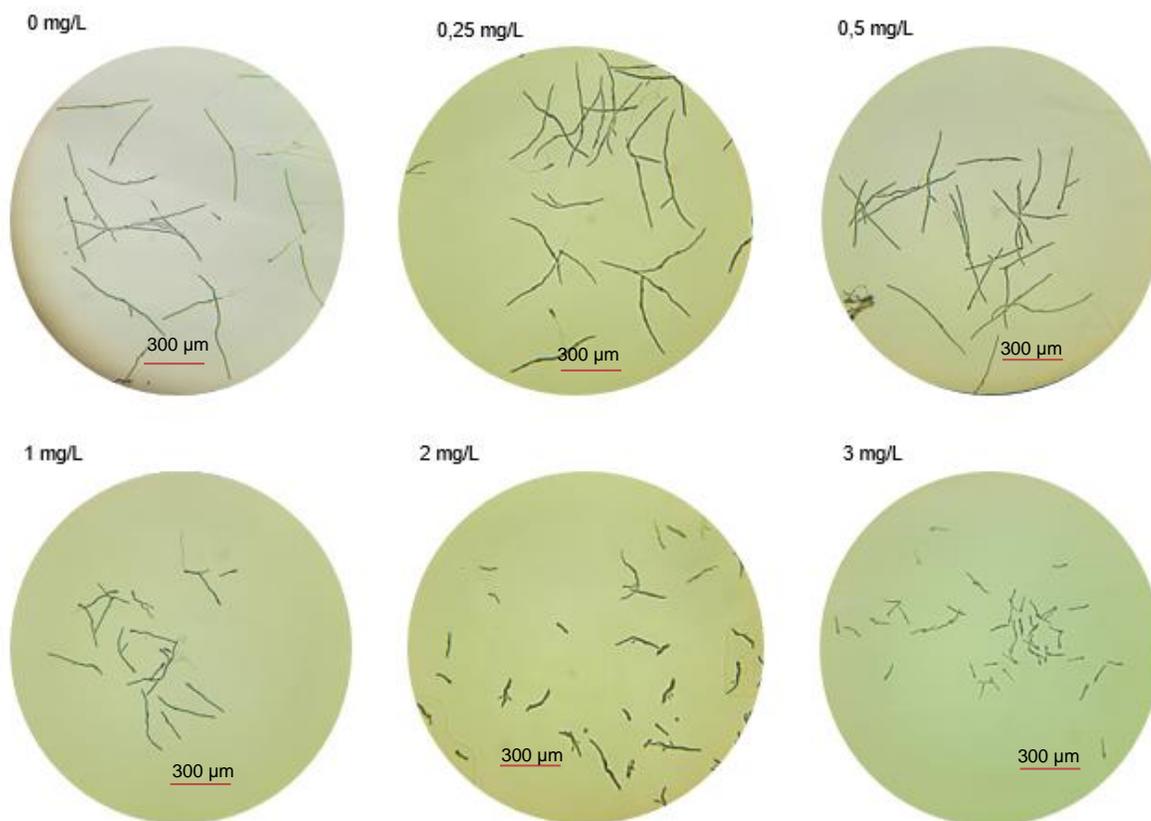
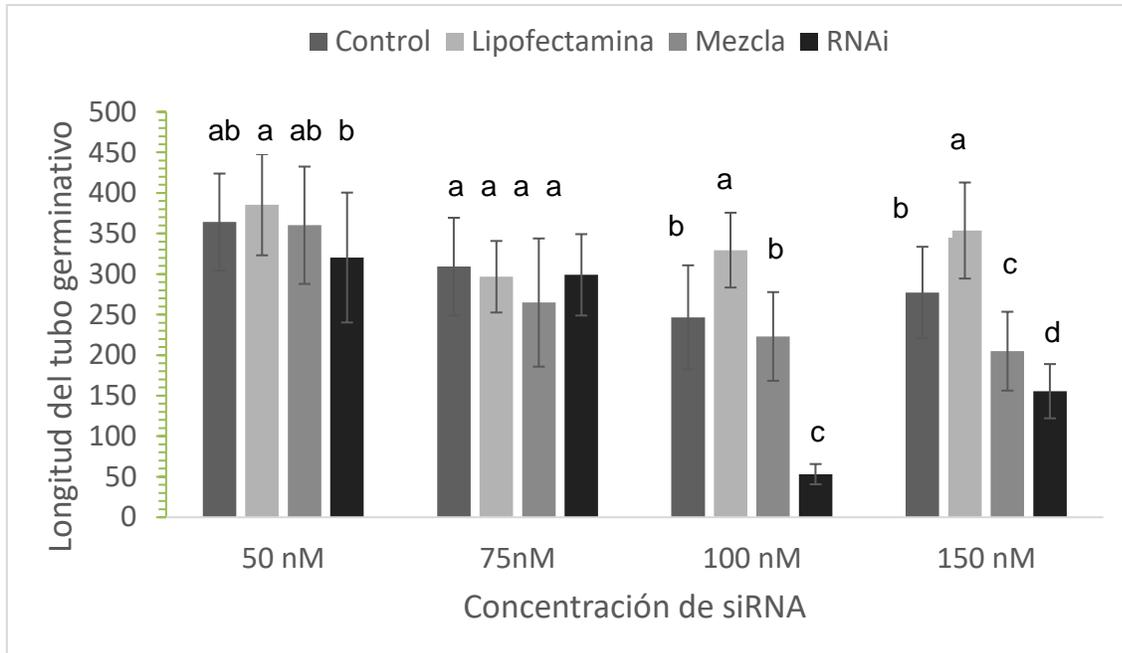


Figura 4, Longitud del tubo germinativo de ascosporas de *P. fijiensis* con presión de selección a fungicidas después de 48 horas de incubación sobre cajas de petri que contenían PDA con diferentes concentraciones de propiconazole.

2.1.4 Efecto de los siRNAs sobre el crecimiento del tubo germinativo en ascosporas

Las concentraciones de siRNA de 100 y 150 nM para el gen *Fus3* mostraron una inhibición en la longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *P. fijiensis* en comparación con las ascosporas control, siendo la concentración de 100 nM la que manifestó mayor inhibición (**Anexo 1**). Cuando las ascosporas fueron tratadas con estas concentraciones, pero mezcladas con lipofectamina dio lugar únicamente a una pequeña disminución en la germinación de las ascosporas comparada con la germinación de las ascosporas control. Por otra parte, las ascosporas tratadas con lipofectamina sola, mostraron una mayor longitud del tubo germinativo comparado con las ascosporas control, pero las diferencias no fueron significativas. No hubo diferencias significativas en la longitud del tubo germinativo entre las ascosporas control y las tratadas con las secuencias de siRNA a concentraciones de 50nM y 75nM (**Figura 5**).

A.



B.

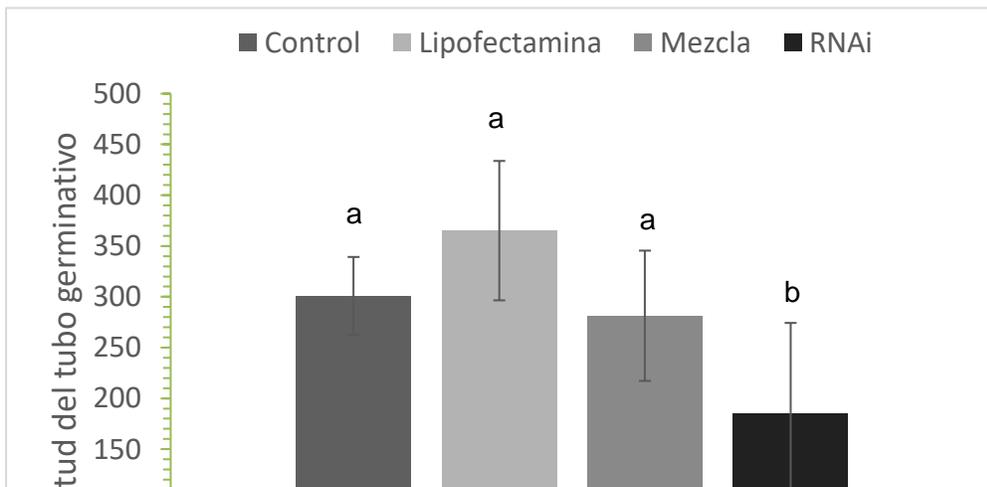
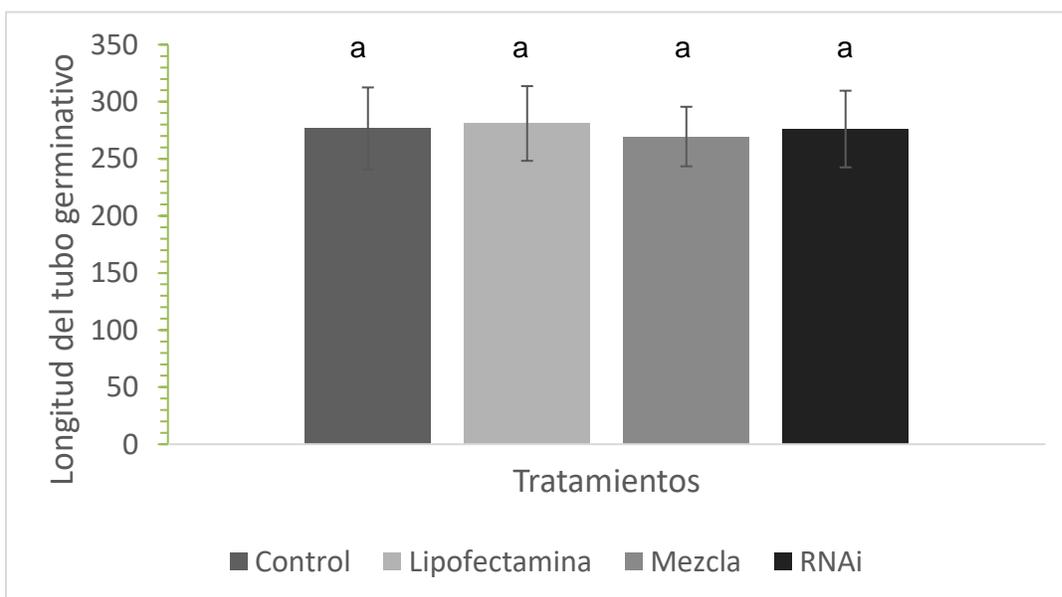


Figura 5, Longitud del tubo germinativo \pm DS de ascosporas tratadas con las secuencias de siRNA (RNAi) *Fus3*, la mezcla de lipofectamina y las secuencias de siRNA (Mezcla), agua tratada con DEPC (control), y Lipofectamina. Medidos después de 48 horas de aplicados los tratamientos. Nivel de significancia del 5%. A. Promedio de la longitud del tubo germinativo a concentraciones de 50nM, 75nM, 100nM y 150nM de siRNA *Fus3*. Se midieron 30 ascosporas por cada tratamiento. B. Promedio de la longitud del tubo germinativo en 3 experimentos independientes con una concentración de siRNA *Fus3* de 100nM. Letras distintas señalan diferencias significativas entre los valores según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Las secuencias de siRNA homologas al gen CYP51 a una concentración de 100nM lograron una disminución en la longitud del tubo germinal en las ascosporas descargadas en agar granulado mas propiconazole, comparado con las ascosporas control (**Anexo 2**) (**Figura 6. B**). Mientras que, en las ascosporas descargadas sobre agar granulado sin propiconazole no hubo diferencias significativas en la longitud del tubo germinal entre tratamientos (**Anexo 3**) (**Figura 6. A**). La aplicación de lipofectamina, y la mezcla de lipofectamina y siRNA sobre ascosporas descargadas en agar granulado con propiconazole no mostraron diferencias significativas en la germinación de las ascosporas con respecto a las ascosporas control. (**Figura 6. B**).

A

B

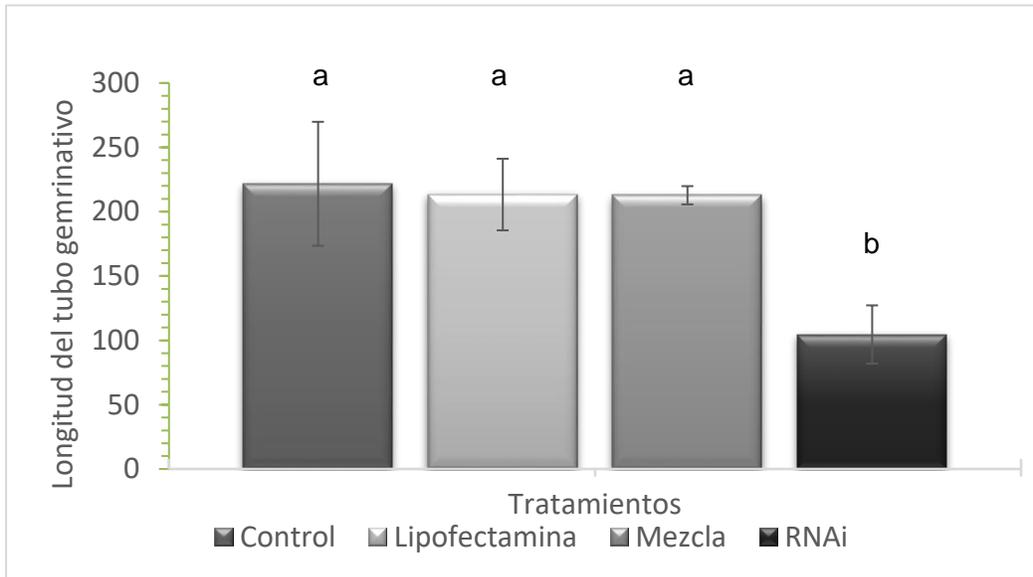


Figura 6, Longitud del tubo germinativo \pm DS de ascosporas tratadas con las secuencias de siRNA (RNAi), la mezcla de lipofectamina y las secuencias de siRNA (Mezcla), agua tratada con DEPC (control), y Lipofectamina, a una concentración de 100nM de siRNA homologo al gen CYP51, aplicadas sobre: A. ascosporas descargadas en agar granulado al 2% sin propiconazole y B. con propiconazole a 1mg/L. Se midieron al menos 40 ascosporas por tratamiento, con 3 réplicas en el tiempo, y nivel de significancia del 5%. Letras distintas señalan diferencias significativas entre los valores según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Ei

porcentaje de inhibición en la longitud del tubo germinativo fue mayor en las ascosporas tratadas con las secuencias de siRNA homólogas al gen *Fus3* (78%) en comparación a las ascosporas tratadas con las secuencias de siRNA homólogas al gen CYP51 (52%), sin embargo, cuando se repitió por triplicado el experimento para el gen *Fus3*, se encontró una variación entre replicas, y en promedio, el porcentaje de inhibición fue de 40.6%.

2.1.5 Efecto de los siRNAs sobre el crecimiento de aislamientos monoascospóricos

En general, el área de los monoascospóricos de ascosporas de *P. fijiensis* tratadas con siRNA y con siRNA mezclado con lipofectamina fue menor con respecto al control, no obstante, las diferencias no fueron significativas para ninguna de las secuencias de siRNA. Las desviaciones estándar fueron altas, lo que indica un crecimiento muy variable entre ascosporas sometidas a un mismo tratamiento (**Tabla 3** y **Tabla 4**).

Tabla 3. Área de los monoascospóricos por milímetro cuadrado de las colonias formadas por ascosporas tratadas con siRNA homólogos al gen CYP51

Tratamiento	Área del monoascospórico sin presencia de propiconazole (mm ²)	Área del monoascospórico con presencia de propiconazole a 1mg/L (mm ²)
Control ^a	136.26 ± 27.3	124.6 ± 29.07
Lipofectamina ^b	130.53± 8.46	121.01± 24.63
Mezcla ^c	126.93 ± 25.33	114.98 ± 18.98
RNAi ^d	115.18 ± 33.76	117.55 ± 23.02

^a. Agua con DEPC, ^b. Lipofectamina RNAiMAX, ^c. siRNA CYP51 100 nM mezclado con lipofectamina, ^d. siRNA CYP51 100nM.

Tabla 4. Área de los monoascospóricos por milímetro cuadrado de las colonias formadas por ascosporas tratadas con siRNA homólogos al gen *Fus3*

Tratamiento	Área del monoascospórico (mm ²)
Control ^a	219.03 ± 68.37
Lipofectamina ^b	165.52 ± 15.17
Mezcla ^c	140.35 ± 40.55
RNAi ^d	148.35 ± 30.09

^a. Agua con DEPC, ^b. Lipofectamina RNAiMAX, ^c. siRNA CYP51 100 nM mezclado con lipofectamina, ^d. siRNA CYP51 100nM.

2.1.6 Efecto de los siRNAs sobre el crecimiento miceliar

La lectura de las absorbancias de los micelios después de 11 días de expuestos a las secuencias de siRNA de los genes *Fus3* y CYP51 no mostraron diferencias significativas en el crecimiento en comparación a los controles sin tratar (**Tabla 5**).

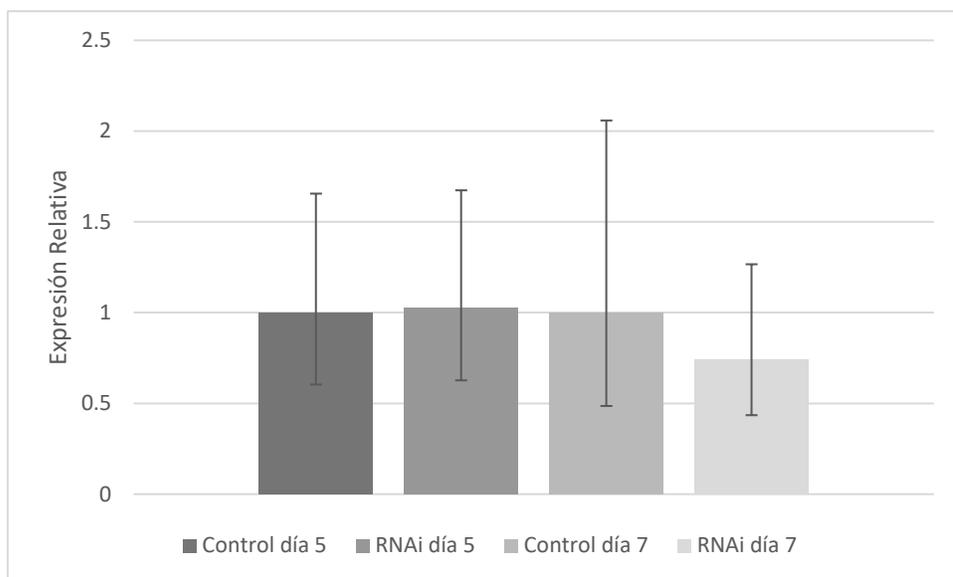
Tabla 5. Crecimiento miceliar

Tratamiento siRNA (100 nM)	Absorbancia a 595 nm
Control (<i>Fus3</i>)	0.59 ± 0.060
siRNA (<i>Fus3</i>)	0.56 ± 0.051
Control (CYP51 con propiconazole a 1mg/L)	0.47 ± 0.072
siRNA (CYP51 con propiconazole a 1mg/L)	0.47 ± 0.089
Control (CYP51 sin propiconazole)	0.51 ± 0.08
siRNA (CYP51 sin propiconazole)	0.52 ± 0.09

2.1.7 Evaluación del silenciamiento mediante PCR en tiempo real

Se realizó PCR en tiempo real para comparar los niveles de mRNA de los genes *Fus3* y CYP51 en muestras tratadas con las secuencias de siRNA a 100nM y en muestras no tratadas (controles), a los días 3, 5 y 7 de crecimiento. Los resultados indican que hubo una disminución en los niveles de mRNA al día 7 de exposición de los micelios tratados con las secuencias de siRNA homólogas al gen CYP51 y *Fus3* en comparación con los controles no tratados, sin embargo, en el gen *Fus3* las diferencias no fueron significativas. En el día 5, los niveles de mRNA del gen CYP51 fueron menores en los micelios tratados con las secuencias de siRNA en comparación al control sin tratar, en contraste no se observó disminución en los niveles de mRNA del gen *Fus3* en los micelios tratados con las secuencias de siRNA en comparación a los controles (**Figura 7**). Al día 3 de crecimiento los niveles de mRNA de los dos genes fueron variables (datos no mostrados).

a)



b)

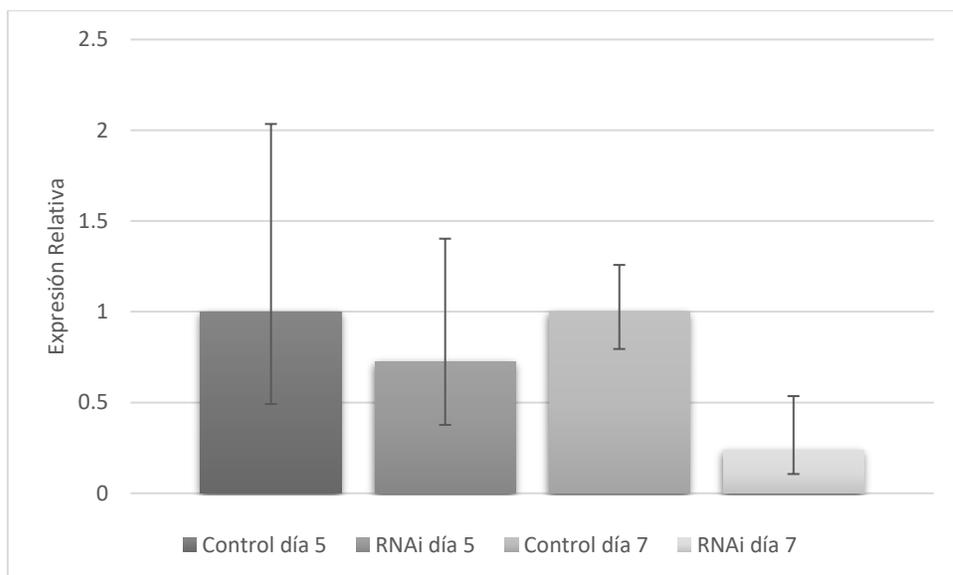


Figura 7, Cantidad relativa de los niveles de mRNA medidos por PCR en tiempo real, en micelios a los 5 y 7 días de expuestos con a) siRNA *Fus3*, b) siRNA *CYP51*.

2.2 Discusión

Las herramientas moleculares disponibles para estudiar la función de genes en hongos son limitadas, debido particularmente a que la recombinación dependiente de homología en estudios de knockout de genes es técnicamente difícil de lograr. Por lo tanto, el silenciamiento de RNA se ha convertido en una alternativa importante, especialmente en los casos en que un completo knockout de un gen causa un fenotipo letal (Schumann et al., 2010). El silenciamiento génico ha sido probado en diversos hongos patógenos. En el presente estudio se demostró que la aplicación directa de secuencias de siRNA es capaz de inducir el silenciamiento de genes en *P. fijiensis*, por lo tanto, esta metodología podría ser utilizada como una herramienta para el estudio de la función de genes en este fitopatógeno. Lo anterior posibilitaría la búsqueda de nuevos blancos de control.

El silenciamiento génico post transcripcional en *P. fijiensis* ha sido previamente reportado (Mumbanza et al., 2013). En dicho estudio evaluaron la actividad antifúngica de un set de dsRNA sobre la germinación de esporas de *P. fijiensis*. La germinación fue determinada por el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Al parecer, la aplicación directa de las secuencias de dsRNA inhibió el crecimiento de UFC en las esporas tratadas en comparación a las esporas control. Aunque los resultados de ese trabajo fueron favorables, no se confirmó que el efecto en la inhibición en la formación de UFC fuera por la inducción del silenciamiento y no por otras circunstancias como el número de células viables, la variabilidad en el tiempo de crecimiento de cada espora o a la cantidad de esporas plateadas.

2.2.1 Entrada de siRNA a las células

Los resultados de la microscopia de fluorescencia confirmaron la entrada de las secuencias de siRNA a las células. Sin embargo, la fluorescencia no se observó en todos los micelios, el porcentaje de micelios transfectados fue de $45.59 \pm 3.98\%$. Este fenómeno se ha observado también en otros hongos, por ejemplo, en *Candida albicans*, la eficiencia del ingreso de las secuencias de siRNA en esta levadura fue de $67.24 \pm 7.2\%$ usando un método modificado con polietilenglicol (PEG/LiAc), que infectó aproximadamente tres veces más células de levadura que mediante la entrega directa de las secuencias de siRNA a partir del medio de cultivo (Moazeni et al., 2012). Los resultados en el presente estudio mostraron que la eficiencia de ingreso directo de las secuencias de siRNA en *P. fijiensis*

fue mayor a la reportada en *Candida albicans*. Sin embargo, en *C. albicans* aumentaron el número de células transfectadas con el uso del método de polietilenglicol. La aplicación de este método para la transfección de las secuencias de siRNA en *P. fijiensis* probablemente podría aumentar el porcentaje de ingreso a las células.

Las diferencias en el ingreso de los siRNA pueden ser debido a características de cada célula que podrían favorecer o no la entrada de dichas moléculas, por ejemplo, la carga, la permeabilidad, y/o roturas de la membrana celular. En hongos filamentosos, la pared celular es el principal obstáculo para una transformación génica exitosa. Se ha demostrado que protoplastos provenientes de hifas jóvenes son adecuados para la transformación. Sin embargo, la baja tasa de regeneración de protoplastos limita su aplicación, especialmente para algunas especies, debido al bajo rendimiento de protoplastos que pueden ser producidos. La permeabilidad de la membrana se ha incrementado a ciertas concentraciones de Li⁺ y permite la entrada de DNA exógeno a la pared celular, incrementando la eficiencia de transformación (D. Jiang et al., 2013).

2.2.2 Efecto de los siRNAs sobre el crecimiento del tubo germinativo en ascosporas

Los resultados obtenidos de las pruebas de germinación sobre ascosporas de *P. fijiensis* mediante el uso de secuencias de RNA de interferencia homólogas al gen *Fus3*, mostraron que este gen es importante para el crecimiento del tubo germinal en este fitopatógeno. Este hallazgo, es acorde al papel que se ha reportado de esta familia de proteínas serina quinasa/treonina conocida como proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs) en otros hongos filamentosos, en los que se ha encontrado que este gen es esencial para el crecimiento y patogenicidad (Cousin et al., 2006; Xu, 2000). Este es el primer reporte que se realiza en *P. fijiensis*.

Por otra parte, las secuencias de siRNA homologas al gen CYP51 lograron inhibir la longitud del tubo germinal de las ascosporas descargadas sobre agar granuloso con propiconazole, y no produjo ningún efecto sobre ascosporas descargadas sobre agar granuloso sin propiconazole. Estas diferencias pueden ser debido a que la inhibición de la síntesis de la enzima codificada por este gen mediante el uso de las secuencias de siRNA

homólogas sumado a la acción directa del fungicida sobre esta enzima, logró la inhibición en el crecimiento del tubo germinativo. Las secuencias por si solas no tuvieron este efecto, posiblemente por el grado de resistencia de las ascosporas.

Estudios previos en *P. fijiensis* han descrito los mecanismos de resistencia a fungicidas inhibidores de la 14 α - demetilasa DMI en este microorganismo: mutaciones en el gen codificante CYP51 que resultan en una disminución de la afinidad de la proteína a los inhibidores y sobreexpresión del gen CYP51 causada frecuentemente por inserciones en la región promotora (Cañas et al., 2009; Chong et al., 2010; Chong et al., 2016; Díaz et al., 2016). Las mutaciones puntuales en la región codificante del gen CYP51 resultan en cambios en aminoácidos (aa) dentro del sitio de reconocimiento del sustrato (SRS). Las sustituciones más comunes se presentan en las posiciones Y136, A313, Y461 y Y463 (Cañas et al., 2009; Chong et al., 2010). Por otra parte, aislamientos de *P. fijiensis* de Costa Rica con un número acumulado de mutaciones en el gen CYP51 también contenían inserciones compuestas de elementos repetitivos en la región promotora (Díaz et al., 2016). El análisis mostró que estas repeticiones solas son responsables de aumentar los valores de EC50 (Díaz et al., 2016). Adicionalmente, en otro estudio, encontraron una correlación positiva entre el incremento de aplicaciones de fungicidas DMI, la presencia de modificaciones específicas en la region promotora y mutaciones específicas en la región codificante del CYP51 y reducida sensibilidad a estos fungicidas (Chong et al., 2016).

Los resultados en la germinación de ascosporas descargadas en agar sin propiconazole tratadas con las secuencias de siRNA homólogas al gen CYP51, apoyan la teoría de que la vía por la cual se está generando la resistencia en *P. fijiensis* va más allá de las mutaciones en el gen CYP51, y puede estar relacionado con la sobreexpresión de CYP51. Estos mecanismos pueden estar presentes al mismo tiempo y los niveles de resistencia están a menudo determinados por combinaciones de alteraciones en los aminoácidos de CYP51 y sobreexpresión de CYP51 (Cools, Hawkins, & Fraaije, 2013).

Las tecnologías basadas en RNAi podrían ser utilizadas para el manejo de resistencia para el control de *P. fijiensis* mediante el silenciamiento génico inducido por hospedero con la generación de plantas transgénicas que expresen las secuencias de siRNA homólogas a los genes *Fus3* y CYP51. Esta alternativa se ha investigado en *Fusarium graminearum* mediante la generación de plantas transgénicas de Arabidopsis y cebada que expresaron

las secuencias de dsRNA contra el gen CYP51 en este patógeno, logrando la disminución significativa de los síntomas de la enfermedad en estas plantas (Koch et al., 2013).

La lipofectamina se ha usado con éxito en la transferencia de siRNA sintéticos en células de mamíferos (Dalby et al., 2004). Sin embargo, en hongos el uso de lipofectamina como sistema de transfección ha sido raramente reportado. Existen únicamente dos reportes en los que usaron lipofectamina para mediar la transfección de secuencias de RNA de doble cadena a las células, en *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Abdel-Hadi et al., 2011), y en el fungoide *Phytophthora infestas* (Whisson et al., 2005). En estos estudios se demostró que la lipofectamina logró con éxito el ingreso de las secuencias de siRNA en protoplastos. Por otra parte, el ingreso directo de secuencias de siRNA ha sido reportado en *Aspergillus fumigatus* (Jochl et al., 2009) (Mouyna et al., 2004) y *Aspergillus nidulans* (Khatri & Rajam, 2007). En *P. fijiensis*, la lipofectamina no tuvo el efecto esperado, las secuencias de siRNA tanto del gen CYP51 como *Fus3*, tuvieron una mayor eficiencia en el silenciamiento solas, que mezcladas con lipofectamina. Adicionalmente, las ascosporas en contacto con lipofectamina tuvieron un mayor crecimiento que los controles, pero las diferencias no fueron significativas. Una explicación a este resultado puede ser que *P. fijiensis* metabolice la lipofectamina y esto favorezca su crecimiento. Como consecuencia, el efecto de las secuencias de siRNA es enmascarado por la acción de la lipofectamina, cuando es usada como agente de transfección. Por otra parte, en el presente estudio no se realizaron protoplastos, por consiguiente, para que la lipofectamina medie el ingreso de las secuencias de siRNA a las células probablemente es necesario quitar previamente la pared celular.

2.2.3 Efecto de los siRNAs sobre el crecimiento de aislamientos monoascospóricos

El área de cultivos monoascospóricos de ascosporas tratadas con las secuencias de siRNA homólogas al gen *Fus3* no fue significativamente menor en relación al control. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el área de los monoascospóricos de ascosporas tratadas con las secuencias de siRNA homólogas al gen CYP51 y los controles. Estos resultados, pueden deberse a que las ascosporas se capturan al azar, por lo tanto, algunas de las ascosporas tomadas pudieron haber ingresado o no las secuencias. En este estudio se observó que la eficiencia en la entrada de siRNA a las

células no es del 100%. También, puede ser que el silenciamiento sea pasajero, por lo tanto, a los 30 días de crecimiento no se encuentren diferencias.

Otra explicación puede ser la variabilidad intrínseca de las ascosporas. Cada ascospora es un individuo, por lo tanto, pueden tener características fenotípicas diferentes, como color, morfología y tamaño. Estudios de caracterización morfológica en aislados de *P. fijiensis*, han encontrado diversidad en el crecimiento entre aislados. En un estudio realizado en la Región Pacífico-Centro de México en aislados de *P. fijiensis*, encontraron que el diámetro de las colonias a los 14 días de crecimiento en agar PDA variaba entre 1.1 a 6.3 mm (Manzo, Orozco, & Guzman, 2001). En otro estudio, el diámetro de las colonias de los monoascospóricos a los 35 días de crecimiento en medio de cultivo PDA fue desde 9,50 hasta 16,33 mm (Quintero, Cabrera, & Zapata, 2011). Estos datos, evidencian que aislados provenientes de una misma zona pueden presentar características de crecimiento diferentes.

2.2.4 Efecto de los siRNAs sobre el crecimiento miceliar

El análisis de crecimiento miceliar de la cepa 080930 de *P. fijiensis*, fue realizado por medición de absorbancia en espectrofotómetro. Los resultados, no arrojaron diferencias significativas en el crecimiento, en los micelios tratados con las secuencias de siRNA homólogas a los genes *Fus3* y *CYP51* comparados con los controles. Estos resultados pueden ser debido al método empleado para el silenciamiento. La entrega directa de las secuencias de RNA en las células puede activar el mecanismo de silenciamiento, sin embargo, puede ser que en *P. fijiensis* la señal no se amplifique por un periodo prolongado de tiempo, por lo tanto, al día 30 de crecimiento ya no se observen diferencias en el crecimiento. Una forma de prolongar la señal de silenciamiento, y que es la manera más usada para inducir el silenciamiento mediado por RNA en hongos, puede ser vía expresión de long hairpin RNA (hpRNA) (Quoc & Nakayashiki, 2015). Esta estrategia induce el silenciamiento de manera altamente eficiente y estable (Nakayashiki & Nguyen, 2008). La expresión de hpRNA específica para el gen de interés requiere la construcción de plásmidos bajo el control de un promotor. La expresión de las repeticiones invertidas asegura la formación de un hpRNA largo que es eficientemente reconocido y procesado por DICER (Dang et al., 2011). Otra vía, es el uso de vectores con promotores duales. En este sistema, el gen de interés se flanquea por dos promotores que impulsan la

transcripción en direcciones opuestas. Por lo tanto, la cadena sentido y antisentido de RNA se transcriben simultáneamente, y se da la formación de los dsRNA (Dang et al., 2011).

En otro orden de ideas, puede ser que el silenciamiento no se esté dando en todos los micelios, por lo tanto, el efecto en el crecimiento no es evidente. También puede ser que los micelios no tuvieran el mismo tamaño, esto puede favorecer el crecimiento de los que fueran más largos. Además, puede que el silenciamiento de estos genes en *P. fijiensis* no afecte el crecimiento miceliar, o tenga poco efecto de tal manera que no se evidencia con esta técnica de microplaca.

2.2.5 Evaluación del silenciamiento mediante PCR en tiempo real

Los niveles de mRNA bajos se relacionan con el efecto en la disminución de la longitud de tubo germinativo en las ascosporas tratadas con las secuencias de siRNA. Sin embargo, el silenciamiento fue más eficiente en el gen CYP51 que en el gen *Fus3*. Se esperaba que cada secuencia individualmente, generara el mismo efecto en la disminución de los niveles de mRNA, pero, la cantidad de mRNA fue menor en el gen CYP51. La eficiencia está influenciada por varios factores: la secuencia de siRNA, proteínas de unión al mRNA, la localización celular y la estructura del gen blanco (Chen & Zhang, 2012). Se han reportado reglas sobre las características de la secuencia de siRNA dúplex para que sean eficientes: bajo contenido de G/C, ausencia de regiones palíndromas internas, preferencias de base en la hebra sentido en las posiciones 3, 10, 13 y 19, alto contenido de A/U en el extremo 5' de la cadena antisentido (Reynolds et al., 2004). Sin embargo, la secuencia de siRNA no puede captar completamente las características del RNAi, así como, RNAi complementarios a diferentes sitios del mRNA no tienen la misma eficiencia de silenciamiento (Chen & Zhang, 2012).

Los niveles de mRNA disminuyeron al día 7 de expuestos con las secuencias de siRNA. En el gen *Fus3*, solamente se observó disminución en los niveles de mRNA al día 7 de expuestos con las secuencias, pero las diferencias no fueron significativas. Se ha descrito en varios hongos que el efecto de silenciamiento con siRNA, se activa a las pocas horas del ingreso de las secuencias a la célula y este persiste por algunos días. En *Aspergillus niger*, bajos niveles de mRNA del gen *uidA* se observaron después de 48 horas de tratados con las secuencias de siRNA contra este gen (Barnes, Alcocer, & Archer, 2008). En

Aspergillus nidulans, el silenciamiento del gen *ODC* con secuencias de siRNA causó disminución de los niveles de mRNA después de 18 horas de expuestos a las secuencias de siRNA, comparadas con los controles sin tratamiento, y a medida que avanzó el tiempo de incubación hubo un aumento gradual de los niveles de mRNA durante 24, 36 y 48 horas, y después de 72 horas los niveles de mRNA no fueron muy diferentes en el control y las muestras tratadas (Khatri & Rajam, 2007). En *Aspergillus fumigatus* el uso de secuencias de siRNA contra los genes *odcA* y *pyrG* resultó en una disminución de los niveles de mRNA en el 30–60% respectivamente después de 16 horas de expuestos al tratamiento, en comparación con los controles no tratados (Jochl et al., 2009). Por otra parte, en *P. infestans*, el silenciamiento con secuencias de dsRNA específicas para los genes *gfp*, *inf 1* y *cdc 14*, produjo disminución en los niveles mRNA de estos genes entre 12 y 15 días después de la exposición a dsRNA (17 días para *gfp*). En el gen *inf 1* se observó algo de silenciamiento en 1-2 días después de la exposición a dsRNA, y en el gen *cdc 14* después de 4 días (Whisson et al., 2005). Estos estudios indican que el silenciamiento es activado en diferentes tiempos, probablemente depende del tipo de organismo o los niveles de expresión de los genes silenciados. En *P. fijiensis*, se observó una disminución en los niveles de mRNA a partir del día 5 de expuestos a las secuencias de siRNA.

3. Conclusiones y recomendaciones

3.1 Conclusiones

En conclusión, se encontró que el uso directo de secuencias de siRNA induce silenciamiento de genes asociados a crecimiento en *P. fijiensis*, sin embargo, la eficiencia es variable. Por otra parte, se observó un efecto mayor en la inhibición del tubo germinativo con el uso de las secuencias de siRNA solas que mezcladas con lipofectamina.

La aplicación de secuencias de siRNA homólogas al gen *Fus3* causó una disminución en el crecimiento del tubo germinativo, lo que indica que al igual que estudios realizados en otros hongos fitopatógenos, el gen *Fus3* en *P. fijiensis* está relacionado con el crecimiento.

La aplicación de secuencias de siRNA contra el gen CYP51 sobre ascosporas sometidas a presión con fungicidas causó una inhibición en el crecimiento del tubo germinativo cuando estaba en presencia de propiconazole, demostrando que se logró la represión del gen.

En contraste, el área de los monoascospóricos provenientes de esporas tratadas con secuencias de siRNA homólogas a los genes *Fus3* y CYP51, fue menor con respecto a los controles, sin embargo, las diferencias no fueron significativas. Tampoco se encontró diferencias en el crecimiento micelial de los micelios tratados con respecto a los controles.

Los resultados de la PCR en tiempo real, corroboraron que las secuencias causaron una disminución en la cantidad de mRNA en los dos genes puesto que los niveles de expresión fueron bajos en las muestras tratadas con las secuencias de siRNA con respecto a las muestras control. Los niveles fueron bajos en los días 5 y 7 después de expuestas con las secuencias para el gen CYP51 y para el gen *Fus3* los niveles fueron bajos al día 7, en el día 3, los niveles fueron variables.

3.2 Recomendaciones

Dado que el gen *Fus3* está reportado como importante en la patogénesis de varios hongos fitopatógenos, sería interesante realizar ensayos en planta, para conocer su papel en la patogenicidad de *P. fijiensis*. Adicionalmente, la eficiencia del silenciamiento de este gen podría ser aumentada con el uso de múltiples secuencias de siRNA que permitan lograr un mayor efecto.

El uso de otro método de transfección como el polietilenglicol podría aumentar la eficiencia en la entrada de las secuencias de siRNA a las células de *P. fijiensis*, logrando mayores resultados en el silenciamiento micelial, en cuanto a inhibición en el crecimiento medido por espectrofotómetro y cantidad de mRNA. Adicionalmente, en los ensayos relacionados con el gen CYP51 en micelio se podría aumentar la concentración de propiconazole, para evaluar si hay una mayor inhibición en el crecimiento.

El empleo de otra vía de inducción del silenciamiento mediado por RNA, como la expresión de long hairpin RNA (hpRNA), mediante el diseño de vectores que contengan la secuencia sentido seguida de un espaciador y luego la secuencia antisentido del gen blanco puede ser utilizada para lograr una inducción del silenciamiento más eficiente y estable en cepas de *P. fijiensis*.

Bibliografía

- Abdel-Hadi, A. M., Caley, D. P., Carter, D. R., & Magan, N. (2011). Control of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* using RNA silencing technology by targeting aflD (nor-1) gene. *Toxins (Basel)*, 3(6), 647-659. doi:10.3390/toxins3060647
- Arauz, L. (1998). Fitopatología un enfoque agroecológico. *Editorial de la Universidad de Costa Rica*.
- Barnes, S. E., Alcocer, M. J., & Archer, D. B. (2008). siRNA as a molecular tool for use in *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett*, 30(5), 885-890. doi:10.1007/s10529-007-9614-0
- Belalcázar, S. (1991). El Cultivo del Plátano en el trópico. *Manual de Asistencia Técnica N° 50. Instituto Colombiano Agropecuario*
- ICA. Armenia.*
- Bennett, R. J., & Johnson, A. D. (2005). Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol*, 59, 233-255. doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121310
- Bernards, R. (2006). [The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2006 for the discovery of RNA interference]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 150(52), 2849-2853. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319214>
- Birmingham, A., Anderson, E., Sullivan, K., Reynolds, A., Boese, Q., Leake, D., . . . Khvorova, A. (2007). A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. *Nat Protoc*, 2(9), 2068-2078. doi:10.1038/nprot.2007.278
- Brachmann, A., Schirawski, J., Muller, P., & Kahmann, R. (2003). An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J*, 22(9), 2199-2210. doi:10.1093/emboj/cdg198
- Cairns, T. C., Studholme, D. J., Talbot, N. J., & Haynes, K. (2016). New and Improved Techniques for the Study of Pathogenic Fungi. *Trends Microbiol*, 24(1), 35-50. doi:10.1016/j.tim.2015.09.008
- Canas-Gutierrez, G. P., Angarita-Velasquez, M. J., Restrepo-Florez, J. M., Rodriguez, P., Moreno, C. X., & Arango, R. (2009). Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Manag Sci*, 65(8), 892-899. doi:10.1002/ps.1770
- Cañas, G. P., Velasquez, M. J. A., Florez, J. M. R., Rodríguez, P., Moreno, C. X., & Arango, R. (2009). Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Manag Sci*, 65(8), 892-899. doi:10.1002/ps.1770
- Carattoli, A., Cogoni, C., Morelli, G., & Macino, G. (1994). Molecular characterization of upstream regulatory sequences controlling the photoinduced expression of the albino-3 gene of *Neurospora crassa*. *Mol*

- Microbiol*, 13(5), 787-795. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7815938>
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G., & Cogoni, C. (2002). Involvement of small RNAs and role of the *qde* genes in the gene silencing pathway in *Neurospora*. *Genes Dev*, 16(7), 790-795. doi:10.1101/gad.222402
- Cogoni, C., Irelan, J. T., Schumacher, M., Schmidhauser, T. J., Selker, E. U., & Macino, G. (1996). Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J*, 15(12), 3153-3163. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8670816>
- Cogoni, C., & Macino, G. (1997). Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(19), 10233-10238. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9294193>
- Cogoni, C., & Macino, G. (1999). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, 399(6732), 166-169. doi:10.1038/20215
- Cools, H. J., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2013). Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathology*, 62(S1), 36-42.
- Cousin, A., Mehrabi, R., Guilleroux, M., Dufresne, M., T, V. D. L., Waalwijk, C., . . . Kema, G. H. (2006). The MAP kinase-encoding gene *MgFus3* of the non-appressorium phytopathogen *Mycosphaerella graminicola* is required for penetration and in vitro pycnidia formation. *Mol Plant Pathol*, 7(4), 269-278. doi:10.1111/j.1364-3703.2006.00337.x
- Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., . . . Whiteway, M. (1998). Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, *Cek1p*, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun*, 66(6), 2713-2721. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9596738>
- Chen, J., Lane, S., & Liu, H. (2002). A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 46(5), 1335-1344. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453219>
- Chen, J., & Zhang, W. (2012). Kinetic analysis of the effects of target structure on siRNA efficiency. *J Chem Phys*, 137(22), 225102. doi:10.1063/1.4769821
- Chong, P., Arango, R., Stergiopoulos, I., Guzmán, M., Crous, P., Silva, G. d., . . . Kema, G. (2010). *Analysis of azole fungicide resistance in Mycosphaerella fijiensis, causal agent of black Sigatoka*. Paper presented at the Proceedings of the 16th International Reinhardtbrunn Symposium on Modern Fungicides and Antifungal Compounds
- Chong, P., Essoh, J., Arango, R., Keizer, L. C., Stergiopoulos, I., Seidl, M., . . . Kema, G. H. (2016). Global analysis of reduced sensitivity to azole fungicides in the banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. *Submitted to PLoS One*.
- Churchill, A. C. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection,

- disease development, and the challenges of control. *Mol Plant Pathol*, 12(4), 307-328. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x
- Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E. C., Tilkins, M. L., Price, P. J., & Ciccarone, V. C. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*, 33(2), 95-103. doi:10.1016/j.ymeth.2003.11.023
- Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., & Liu, Y. (2011). RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryot Cell*, 10(9), 1148-1155. doi:10.1128/EC.05109-11
- de Jong, J. F., Deelstra, H. J., Wosten, H. A., & Lugones, L. G. (2006). RNA-mediated gene silencing in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Appl Environ Microbiol*, 72(2), 1267-1269. doi:10.1128/AEM.72.2.1267-1269.2006
- Di Pietro, A., Garcia-MacEira, F. I., Meglec, E., & Roncero, M. I. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol*, 39(5), 1140-1152. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251832>
- Díaz C, Chong P, Cunha VCD, Guzman M, Wit PJGMD, & Stergiopoulos I. (2016). A new resistance mechanism to azole fungicides in the fungal banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* is driven by increased expression of *Pfcyp51* through multiple promotor repeats. *Submitted to Molecular Plant Pathology*.
- Díaz, C., Chong, P., Cunha, V. C. D., Guzman, M., Wit, P. J. G. M. D., Stergiopoulos, I., . . . Kema, G. H. J. (2016). A new resistance mechanism to azole fungicides in the fungal banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* is driven by increased expression of *Pfcyp51* through multiple promotor repeats. *Submitted to Molecular Plant Pathology*
- Drinnenberg, I. A., Weinberg, D. E., Xie, K. T., Mower, J. P., Wolfe, K. H., Fink, G. R., & Bartel, D. P. (2009). RNAi in budding yeast. *Science*, 326(5952), 544-550. doi:10.1126/science.1176945
- Escobar-Tovar, L., Magana-Ortiz, D., Fernandez, F., Guzman-Quesada, M., Sandoval-Fernandez, J. A., Ortiz-Vazquez, E., . . . Gomez-Lim, M. A. (2015). Efficient transformation of *Mycosphaerella fijiensis* by underwater shock waves. *J Microbiol Methods*, 119, 98-105. doi:10.1016/j.mimet.2015.10.006
- Espinal, C., Martínez, H., & Peña, Y. (2005). La cadena del banano en Colombia : una mirada global de su estructura y dinamica 1991-2005. *AGRONET*.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811. doi:10.1038/35888
- Fitzgerald, A., Van Kan, J. A., & Plummer, K. M. (2004). Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genet Biol*, 41(10), 963-971. doi:10.1016/j.fgb.2004.06.006

- Fulci, V., & Macino, G. (2007). Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. *Curr Opin Microbiol*, *10*(2), 199-203. doi:10.1016/j.mib.2007.03.016
- Gaur, R. K. (2011). *RNAi technology* (1st ed.). Enfield, N.H.: CRC Press.
- Hammond, T. M., & Keller, N. P. (2005). RNA silencing in *Aspergillus nidulans* is independent of RNA-dependent RNA polymerases. *Genetics*, *169*(2), 607-617. doi:10.1534/genetics.104.035964
- Ipsaro, J. J., & Joshua-Tor, L. (2015). From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat Struct Mol Biol*, *22*(1), 20-28. doi:10.1038/nsmb.2931
- Jenczmionka, N. J., Maier, F. J., Losch, A. P., & Schafer, W. (2003). Mating, conidiation and pathogenicity of *Fusarium graminearum*, the main causal agent of the head-blight disease of wheat, are regulated by the MAP kinase *gpmk1*. *Curr Genet*, *43*(2), 87-95. doi:10.1007/s00294-003-0379-2
- Jiang, D., Zhu, W., Wang, Y., Sun, C., Zhang, K. Q., & Yang, J. (2013). Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies. *Biotechnol Adv*, *31*(8), 1562-1574. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.08.005
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2015). The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Struct Biol*, *30*, 100-111. doi:10.1016/j.sbi.2015.02.002
- Jochl, C., Loh, E., Ploner, A., Haas, H., & Huttenhofer, A. (2009). Development-dependent scavenging of nucleic acids in the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *RNA Biol*, *6*(2), 179-186. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246986>
- Jochl, C., Rederstorff, M., Hertel, J., Stadler, P. F., Hofacker, I. L., Schrettl, M., . . . Huttenhofer, A. (2008). Small ncRNA transcriptome analysis from *Aspergillus fumigatus* suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis. *Nucleic Acids Res*, *36*(8), 2677-2689. doi:10.1093/nar/gkn123
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y., & Mayama, S. (2003). RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact*, *16*(9), 769-776. doi:10.1094/MPMI.2003.16.9.769
- Khatri, M., & Rajam, M. V. (2007). Targeting polyamines of *Aspergillus nidulans* by siRNA specific to fungal ornithine decarboxylase gene. *Med Mycol*, *45*(3), 211-220. doi:10.1080/13693780601158779
- Koch, A., Kumar, N., Weber, L., Keller, H., Imani, J., & Kogel, K. H. (2013). Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14alpha-demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(48), 19324-19329. doi:10.1073/pnas.1306373110
- Latijnhouwers, M., Ligterink, W., Vleeshouwers, V. G., van West, P., & Govers, F. (2004). A Galpha subunit controls zoospore motility and virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Microbiol*, *51*(4), 925-936. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14763970>
- Lee, H. C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S. K., Pertsemliadis, A., . . . Liu, Y. (2010). Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-

- independent small interfering RNAs in fungi. *Mol Cell*, 38(6), 803-814. doi:10.1016/j.molcel.2010.04.005
- Lev, S., Sharon, A., Hadar, R., Ma, H., & Horwitz, B. A. (1999). A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(23), 13542-13547. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10557357>
- Liu, H., Cottrell, T. R., Pierini, L. M., Goldman, W. E., & Doering, T. L. (2002). RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*, 160(2), 463-470. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861553>
- Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zhou, Z., & Zou, G. (2015). Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discov*, 1, 15007. doi:10.1038/celldisc.2015.7
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lorenzo, I., Consuegra, G., Nobmann de B, V. M., Merchán, A., & Hernández, A. (2002). Comportamiento de la Sigatoka negra en seis genotipos de musáceas en el distrito de Sevilla, zona bananera del Magdalena. *En: XV Reunión Internacional ACORBAT, Cartagena de Indias, Colombia, 27 oct – 2 nov.*, 241.
- Ma, B., & Tredway, L. P. (2013). Induced overexpression of cytochrome P450 sterol 14alpha-demethylase gene (CYP51) correlates with sensitivity to demethylation inhibitors (DMIs) in *Sclerotinia homoeocarpa*. *Pest Manag Sci*, 69(12), 1369-1378. doi:10.1002/ps.3513
- Manzo, G., & Guzman, S. (2005). Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa spp.* *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(001).
- Manzo, G., Orozco, M., & Guzman, S. (2001). Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región pacífico-centro de México y su desarrollo en medios líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(001), 66-71.
- Marín, D. H., Romero, R. A., Guzmán, M., & Sutton, T. B. (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87, 208-222.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T. L., Postlethwait, P., & Nellen, W. (2002). RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol Biol Cell*, 13(2), 445-453. doi:10.1091/mbc.01-04-0211
- Merchán, V. M. (2000). Prevención y manejo de la Sigatoka negra. *Boletín informativo ICA Ed. N°2, Manizales - Caldas*, 30
- Meredith, D. S., & Lawrence, J. S. (1969). Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 52, 459-476.

- Moazeni, M., Khoramizadeh, M. R., Kordbacheh, P., Sepehrizadeh, Z., Zeraati, H., Noorbakhsh, F., . . . Rezaie, S. (2012). RNA-mediated gene silencing in *Candida albicans*: inhibition of hyphae formation by use of RNAi technology. *Mycopathologia*, *174*(3), 177-185. doi:10.1007/s11046-012-9539-6
- Monge, R. A., Roman, E., Nombela, C., & Pla, J. (2006). The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology*, *152*(Pt 4), 905-912. doi:10.1099/mic.0.28616-0
- Mourichon, X., Carlier, J., & Fouré, E. (1997). Enfermedades de Sigatoka. *INIBAP, Parc Scientifique Agropolis II*, *8*.
- Mouyna, I., Henry, C., Doering, T. L., & Latge, J. P. (2004). Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett*, *237*(2), 317-324. doi:10.1016/j.femsle.2004.06.048
- Mulder, J. L., & Stover, R. H. (1976). *Mycosphaerella* species causing banan leaf spot. *Transactions of British Mycological Society*, *67*, 77-82.
- Muller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrugge, M., & Kahmann, R. (2003). Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell*, *2*(6), 1187-1199. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665454>
- Mumbanza, F. M., Kiggundu, A., Tusiime, G., Tushemereirwe, W. K., Niblett, C., & Bailey, A. (2013). In vitro antifungal activity of synthetic dsRNA molecules against two pathogens of banana, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Manag Sci*, *69*(10), 1155-1162. doi:10.1002/ps.3480
- Nakayashiki, H., Hanada, S., Nguyen, B. Q., Kadotani, N., Tosa, Y., & Mayama, S. (2005). RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genet Biol*, *42*(4), 275-283. doi:10.1016/j.fgb.2005.01.002
- Nakayashiki, H., Kadotani, N., & Mayama, S. (2006). Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. *J Mol Evol*, *63*(1), 127-135. doi:10.1007/s00239-005-0257-2
- Nakayashiki, H., & Nguyen, Q. B. (2008). RNA interference: roles in fungal biology. *Curr Opin Microbiol*, *11*(6), 494-502. doi:10.1016/j.mib.2008.10.001
- Namekawa, S. H., Iwabata, K., Sugawara, H., Hamada, F. N., Koshiyama, A., Chiku, H., . . . Sakaguchi, K. (2005). Knockdown of LIM15/DMC1 in the mushroom *Coprinus cinereus* by double-stranded RNA-mediated gene silencing. *Microbiology*, *151*(Pt 11), 3669-3678. doi:10.1099/mic.0.28209-0
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, *2*(4), 279-289. doi:10.1105/tpc.2.4.279
- Nicolas, F. E., Moxon, S., de Haro, J. P., Calo, S., Grigoriev, I. V., Torres-Martinez, S., . . . Dalmay, T. (2010). Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic Acids Res*, *38*(16), 5535-5541. doi:10.1093/nar/gkq301

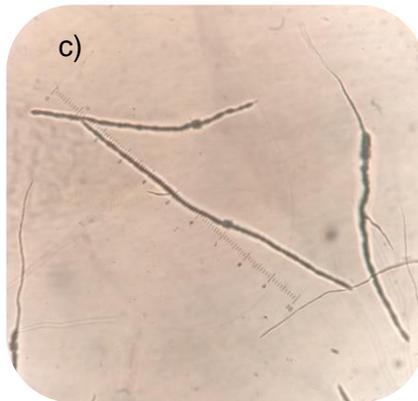
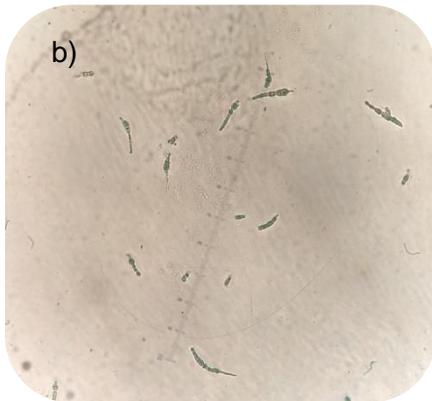
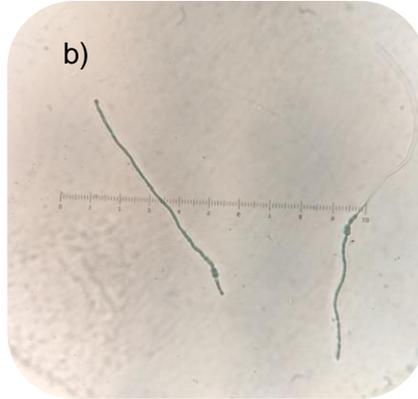
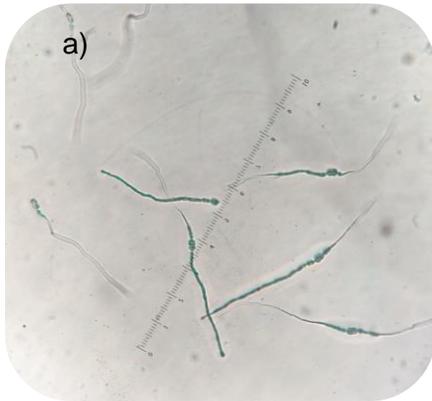
- Nicolas, F. E., Torres-Martinez, S., & Ruiz-Vazquez, R. M. (2003). Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO J*, 22(15), 3983-3991. doi:10.1093/emboj/cdg384
- Nunes, C. C., Gowda, M., Sailsbery, J., Xue, M., Chen, F., Brown, D. E., . . . Dean, R. A. (2011). Diverse and tissue-enriched small RNAs in the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genomics*, 12, 288. doi:10.1186/1471-2164-12-288
- Patiño, L., & Bustamante, E. (2002). Efecto de tres inductores de resistencia y un sustrato foliar sobre *Sigatoka negra* en banano. *XXIII Congreso ASCOLFI Nuevas tendencias en Fitopatología Ciencia y técnica cada vez más cerca. Bogotá*, 98.
- Patiño, L., & Mejía, M. G. (1999). La dinámica climatológica y su relación con el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. En: Foro *Sigatoka negra*, situación actual y perspectivas para el año 2000, en la zona bananera del Magdalena. *AUGURA – CENIBANANO. CALIMA. Santa Marta*, 7.
- Patiño, L., & Mejía, M. G. (1999). La dinámica climatológica y su relación con el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. En: Foro *Sigatoka negra*, situación actual y perspectivas para el año 2000, en la zona bananera del Magdalena. *AUGURA – CENIBANANO. CALIMA. Santa Marta*, 7.
- Peláez Montoya, J. E., David, V., Estella, L., Díaz Brito, T. J., Castañeda Sánchez, D. A., Rodríguez Beltrán, E., & Arango Isaza, R. E. (2006). Use of a micro tittle plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella Fijiensis*, MORELET. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 59(2), 3425-3433.
- Ploetz, R. C. (2007). Diseases of Tropical Perennial Crops: Challenging Problems in Diverse Environments. *Plan Disease*, 91 N°6.
- Podust, L. M., Poulos, T. L., & Waterman, M. R. (2001). Crystal structure of cytochrome P450 14alpha -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(6), 3068-3073. doi:10.1073/pnas.061562898
- Quintero, A. C., Cabrera, E. Á., & Zapata, J. C. (2011). Evaluación de Resistencia de Genotipos de Plátano y Banano a la *Sigatoka Negra* (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet.). *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 64(1), 5853-5865.
- Quoc, N. B., & Nakayashiki, H. (2015). RNA Silencing in Filamentous Fungi: From Basics to Applications. In *Genetic Transformation Systems in Fungi. Springer International Publishing*, 2, 107-124.
- Rappleye, C. A., Engle, J. T., & Goldman, W. E. (2004). RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol Microbiol*, 53(1), 153-165. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04131.x
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., & Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 22(3), 326-330. doi:10.1038/nbt936

- Rhodes, P. L. (1964). A new banana disease in Fiji. *Communications Phytopathology, News* 10, p.38 – 40.
- Rodríguez-Gaviria, A., & Cayón, G. (2008). Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Agronomía Colombiana*, 26(2), 256-265.
- Rodríguez, H. (2009). Análisis del gen Fenilalanina Amonio-Liasa (PAL) durante la interacción con *Mycosphaerella fijiensis* en los cultivares Calcuta 4 (resistente) y Williams (susceptible). *Universidad del Tolima*, 88.
- Romano, N., & Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*, 6(22), 3343-3353. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1484489>
- Romero, R. A., & Sutton, T. B. (1997). Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, Causal Agent of Black Sigatoka of Banana, to Propiconazole. *Phytopathology*, 87(1), 96-100. doi:10.1094/PHYTO.1997.87.1.96
- Sallé, G., Pichard, V., & Mourichon, X. (1990). Cytological study of the interaction between *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and three cultivars of *Musa* presenting different levels of resistance. In *International Workshop on Sigatoka Leaf Spot Diseases of Bananas, San Jose (Costa Rica)*. INIBAP, 180-190.
- Schumann, U., Ayliffe, M., Kazan, K., & Wang, M. B. (2010). RNA silencing in fungi. *Frontiers in Biology*, 5(6), 478-494.
- Sierra, S. L. (1993). El cultivo del banano. Producción y Comercio.
- Stover, R. (1980). Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant Disease*, 64, 750-756.
- Takano, Y., Kikuchi, T., Kubo, Y., Hamer, J. E., Mise, K., & Furusawa, I. (2000). The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene CMK1 regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact*, 13(4), 374-383. doi:10.1094/MPMI.2000.13.4.374
- Takeno, S., Sakuradani, E., Tomi, A., Inohara-Ochiai, M., Kawashima, H., Ashikari, T., & Shimizu, S. (2005). Improvement of the fatty acid composition of an oil-producing filamentous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, through RNA interference with delta12-desaturase gene expression. *Appl Environ Microbiol*, 71(9), 5124-5128. doi:10.1128/AEM.71.9.5124-5128.2005
- van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N., & Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 2(4), 291-299. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2152117>
- van West, P., Kamoun, S., van 't Klooster, J. W., & Govers, F. (1999). Internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Mol Cell*, 3(3), 339-348. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10198636>
- Vásquez, L. E., Guzmán, F., Patarroyo, M. E., & Arango, R. (2009). In Vitro evaluation of antimicrobial peptides against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and their interaction with some chemical fungicides. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 62(2), 5063-5069.

-
- Viloria, J. (2008). Banano y revaluación en el departamento del Magdalena, 1997-2007 *Banco de la república, banco central de Colombia*.
- Weld, R. J., Plummer, K. M., Carpenter, M. A., & Ridgway, H. J. (2006). Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Res*, 16(1), 31-44. doi:10.1038/sj.cr.7310006
- Whisson, S. C., Avrova, A. O., P, V. A. N. W., & Jones, J. T. (2005). A method for double-stranded RNA-mediated transient gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Pathol*, 6(2), 153-163. doi:10.1111/j.1364-3703.2005.00272.x
- Xu, J. R. (2000). Map kinases in fungal pathogens. *Fungal Genet Biol*, 31(3), 137-152. doi:10.1006/fgbi.2000.1237
- Xu, J. R., & Hamer, J. E. (1996). MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev*, 10(21), 2696-2706. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8946911>
- Zheng, L., Campbell, M., Murphy, J., Lam, S., & Xu, J. R. (2000). The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact*, 13(7), 724-732. doi:10.1094/MPMI.2000.13.7.724

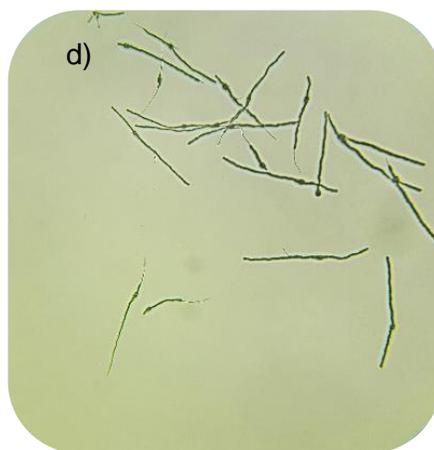
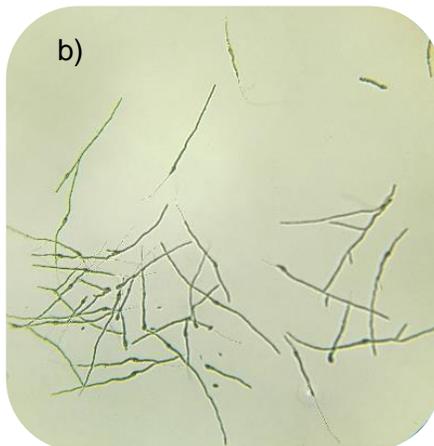
Anexos

Anexo 1: Efecto del siRNA homólogos al gen *Fus3*. Imágenes de ascosporas sometidas a los tratamientos, a) Control, b) Lipofectamina, c) RNAi, d) Mezcla.



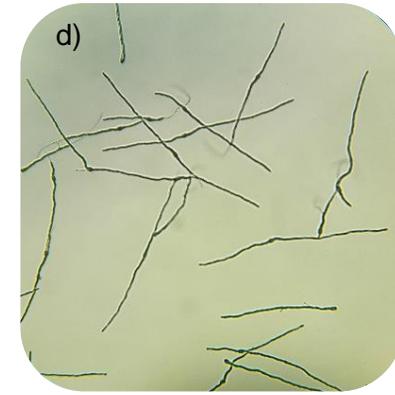
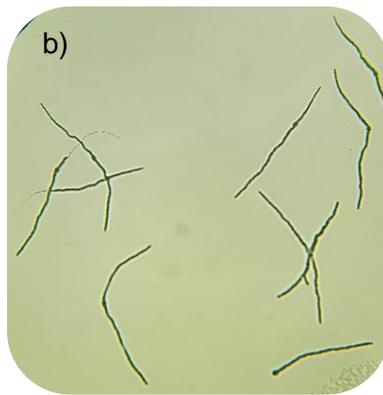
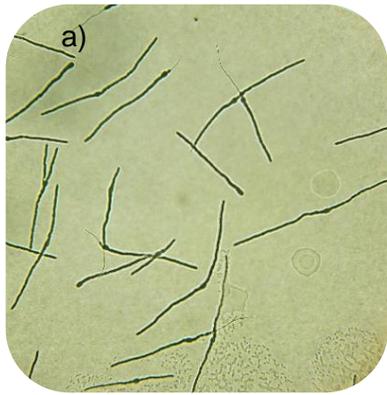
10x

Anexo 2: Efecto del siRNA homólogos al gen CYP51. Imágenes de ascosporas sometidas a los tratamientos en medio con Propiconazol a 1ppm a) Control, b) Lipofectamina, c) RNAi, 100nM d) RNAi + Lipofectamina.



10x

Anexo 3: Efecto del siRNA homólogos al gen CYP51. Imágenes de ascosporas sometidas a los tratamientos en medio sin Propiconazol, a) Control, b) Lipofectamina, c) RNAi 100nM d) RNAi + Lipofectamina.



10x