



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS CON DEFENSA EN EL  
MODELO PALMA DE ACEITE -*Thielaviopsis paradoxa* (de seynes) höhn**

**SANDRA LILIANA GAITAN CHAPARRO**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Programa de Biotecnología  
Bogotá, Colombia  
2021



# **SANDRA LILIANA GAITAN CHAPARRO**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:  
**Ph.D. Biotecnología**

**Director: Prof. Dr. Hernán Mauricio Romero Angulo**  
Profesor Asociado, Departamento de Biología  
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia

**Codirector: Prof. Dr. Diego Mauricio Riaño Pachón**  
Dr. rer. nat. Plant Molecular Biology.  
Centro de Energía Nuclear en la Agricultura  
Universidad de São Paulo  
Brasil

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Doctorado en Biotecnología  
Bogotá, Colombia  
2021

## DEDICATORIA

*Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mis amadas hijas por ser fuente de motivación e inspiración para ser mejor cada día.*

*A mis padres y esposo quienes me apoyaron incondicionalmente y con sus palabras de aliento no me dejaban decaer y me impulsaban a ser perseverante.*

# Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Sandra Liliana Gaitán C.

Fecha 17 abril de 2021

## **AGRADECIMIENTOS**

Al concluir una etapa importante de mi vida, quiero extender un profundo agradecimiento a quienes hicieron posible este sueño, aquellos que en todo momento fueron apoyo, inspiración y fortaleza y me impulsaron a seguir adelante a pesar de las dificultades.

Quiero agradecer de manera especial y sincera a Mauricio Romero y Diego Riaño por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección y codirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solo en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Les agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Gracias al Doctorado en Biotecnología, por su apoyo, atención y amabilidad en todo lo referente a mi vida como estudiante de doctorado.

Y finalmente, quiero agradecer desde mi corazón a mi familia, por su apoyo incondicional y motivación para culminar mi doctorado.

## LISTA DE ABREVIACIONES

APX: Ascorbato peroxidasa, Ascorbate Peroxidase

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño, Damage-Associated Molecular Patterns.

DEG: Genes Diferencialmente Expresados, Differentially Expressed Genes

EST: Etiqueta de Secuencia Expresada, Expressed Sequence Tags

ET: Etileno, Ethylene

ETI: Inmunidad Inducida por Efectore, Effector-Triggered Immunity

FPKM: Fragments Per Kilobase of Transcripts per Million Mapped Fragments

GST: Glutathión S-Transferasa, Glutathione S-Transferase

JA: Ácido Jasmónico, Jasmonic Acid

HPI: Horas pos inoculación

Log2FC: Log2 Fold Change

MAMP: Patrones Moleculares asociados a microorganismos, Microbe-associated molecular patterns

MAPK: Proteína Kinasa Activada Por Mitógenos, Mitogen Activated Protein Kinase

NGS: Secuenciación De Próxima Generación, Next Generation Sequencing

PCR: Reacción En Cadena De La Polimerasa, Polymerase Chain Reaction

POX: Peroxidasa, Peroxidase

PRRs: Receptores De Reconocimiento De Patrones, Pattern Recognition Receptors

PTI: Inmunidad Inducida Por MAMP, PAMP-Triggered Immunity

RLK: Receptores Similares A Cinasas, Receptor Like Kinase

RNA-Seq: Secuenciación De RNA, RNA Sequencing

SRA: Archivo De Secuencias De Nucleótidos, Sequence Nucleotide Archive

PPR: Proteínas relacionadas con patogénesis, pathogenesis related protein

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Resumen de las comparaciones por pares para los diferentes métodos de inoculación	Página 42
<b>Tabla 2.</b> Codificación de los híbridos y cruzamiento	Página 54
<b>Tabla 3.</b> Presentación resumida por muestra de cantidad de reads procesados por Trinity y el número de contigs obtenidos	Página 64
<b>Tabla 4.</b> Resultados del porcentaje de reads alineados con Bowtie	Página 65
<b>Tabla 5.</b> Resumen de los resultados de Trinity y TGICL	Página 71
<b>Tabla 6.</b> Número de genes diferencialmente expresados en la comparación de las muestras 517 y 485 de acuerdo a los términos GO	Página 78
<b>Tabla 7.</b> Contigs seleccionados para su evaluación por PCR en tiempo real	Página 83
<b>Tabla 8.</b> Cambios en la expresión de los genes putativos seleccionados a nivel del transcriptoma y RT-PCR	Página 86
<b>Tabla 9.</b> Resumen del alineamiento contra genoma de referencia de <i>E. guineensis</i>	Página 88



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de los cultivos de palma de aceite en Colombia	Página 5
<b>Figura 2.</b> Posible linaje de las poblaciones de Deli <i>dura</i> .	Página 11
<b>Figura 3.</b> Distribución de <i>T. Paradoxa</i>	Página 36
<b>Figura 4.</b> Características microscópicas de <i>T. paradoxa</i>	Página 40
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de tejido afectado del híbrido de palma de aceite inoculado con <i>T. paradoxa</i>	Página 41
<b>Figura 6.</b> Severidad de la enfermedad en plántulas de palma de aceite inoculados con suspensiones de <i>T. paradoxa</i>	Página 42
<b>Figura 7.</b> Registro de la progresión de la enfermedad	Página 44
<b>Figura 8.</b> Proceso de infección de <i>T. paradoxa</i> en plántulas de palma de aceite	Página 45
<b>Figura 9.</b> Distribución al azar de las plántulas de 16 materiales en el invernadero	Página 56
<b>Figura 10.</b> Inoculación de conidias en plántulas de los diferentes materiales de híbridos	Página 56
<b>Figura 11.</b> Gráficas de calidad del RNA extraído para la construcción de librerías	Página 61
<b>Figura 12.</b> Gráficas de calidad de las librerías construidas	Página 61
<b>Figura 13.</b> Control de calidad de los reads obtenidos de cada muestra, FastQC	Página 63
<b>Figura 14.</b> Control de calidad después de limpiar las secuencias de reads con el programa FastQ	Página 64
<b>Figura 15.</b> Ejemplo de la visualización por contig de los reads alineados y de la cobertura, con el programa IGV	Página 65
<b>Figura 16.</b> Ejemplo de la salida de RSEM su respectiva frecuencia	Página 66
<b>Figura 17.</b> Análisis de calidad de las secuencias después de limpiarlas de las muestras 485 y 517	Página 66
<b>Figura 18.</b> Gráfica del tamaño de los contigs obtenidos con el programa Trinity, y su respectiva frecuencia	Página 68
<b>Figura 19.</b> Elaboración de las matrices de ESTScan	Página 69
<b>Figura 20.</b> Distribución de distancias entre los sitios de inicio predichos y	

---

anotados para plantas	Página 70
<b>Figura 21.</b> Sensibilidad y especificidad del modelo para UTR y CDS de plantas (derecha) y de hongos (izquierda)	Página 70
<b>Figura 22.</b> Distribución de distancias entre los sitios de inicio predichos y anotados para hongos. La posición cero es el sitio de inicio predicho	Página 70
<b>Figura 23.</b> Distribución de los principales hits de especies con los clusters de palma ensamblados de novo	Página 72
<b>Figura 24.</b> Diagrama de las categorías donde se encontraron la mayoría de las enzimas anotadas del transcriptoma de palma	Página 72
<b>Figura 25.</b> Ruta del metabolismo del ácido alfa-linoléico	Página 74
<b>Figura 26.</b> Diagrama de Venn de los clusters de ortólogos obtenidos con OrthoMCL con 5 genomas	Página 75
<b>Figura 27.</b> Noiseq generó una gráfica para observar la saturación global de las tres muestras	Página 76
<b>Figura 28.</b> Diagrama de Venn mostrando los genes con perfiles de expresión para cada uno comparaciones entre los genotipos infectados y no infectados	Página 77
<b>Figura 29.</b> Distribución de los transcritos en las familias de PANTHER	Página 78
<b>Figura 30.</b> Imagen obtenida con el programa REVIGO	Página 79
<b>Figura 31.</b> Fuente de las bases de datos a los cuales mapean los reads y la distribución de las especies con las que se hizo alineamiento para el material 517	Página 80
<b>Figura 32.</b> Términos enriquecidos de procesos biológicos del Gene Ontology para el material 517 y 485	Página 81
<b>Figura 33.</b> Gráfica de la saturación de los empalmes	Página 82
<b>Figura 34.</b> Gráfica de las curvas de amplificación de los genes normalizadores	Página 84
<b>Figura 35.</b> Evaluación por qRT-PCR de los perfiles de expresión de algunos de los genes identificados por análisis de RNASeq	Página 85
<b>Figura 36.</b> Análisis de correlación entre los datos de expresión de genes por RNASeq y qRT-PCR	Página 87
<b>Figura 37.</b> Resultados del alineamiento contra genoma de referencia y anotación	Página 88
<b>Figura 38.</b> Análisis de los SNPs por localización en cada cromosoma	Página 89
<b>Figura 39.</b> Análisis de los SNPs en el material 517	Página 90

<b>Figura 40.</b> Análisis de los SNPs en el material 485	Página 91
<b>Figura 41.</b> Términos GO asignados a los 117 unigenes	Página 92
<b>Figura 42.</b> Gráfica de fuentes de bases de datos y de distribución de especies contra las cuales se anotó los componentes obtenidos durante el ensamblaje con Trinity	Página 102
<b>Figura 43.</b> Distribución de los términos GO de las anotaciones de los ensamblajes de <i>T. paradoxa</i> y porcentaje de genes que codifican enzimas de las subcategorías del Proceso Biológico que fueron inducidas durante la infección por <i>T. paradoxa</i>	Página 104
<b>Figura 44.</b> Distribución de los términos GO de las anotaciones de los ensamblajes de <i>T. paradoxa</i>	Página 105
<b>Figura 45.</b> Distribución de los códigos de enzima y familias de proteínas por dominios en InterProScan de las anotaciones de los ensamblajes de <i>T. paradoxa</i>	Página 107
<b>Figura 46.</b> Modelo propuesto de la respuesta de defensa del híbrido OxG	Página 120

## RESUMEN

### ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS CON DEFENSA EN EL MODELO PALMA DE ACEITE -*Thielaviopsis paradoxa* (de seynes) höhn

La enfermedad de la pudrición de flecha en la palma de aceite, es causada por el hongo patógeno *Thielaviopsis paradoxa*. El híbrido OxG proporciona un valioso recurso genético para seleccionar el germoplasma resistente y establecer los genes asociados con resistencia a este patógeno. En este estudio, el híbrido OxG con código 517 fue identificado como un genotipo resistente que limitó la colonización de *T. paradoxa*, mientras que otro híbrido OxG con código 485 mostró alta susceptibilidad. Para comprender la respuesta transcripcional del híbrido a la infección por *T. paradoxa*, estos dos materiales del híbrido OxG se inocularon con este patógeno y se comparó su perfil transcripcional mediante secuenciación de ARN en seis puntos de tiempo (0, 24, 48, 72, 96 y 120 hpi). Para establecer los puntos de tiempo se realizó una caracterización del desarrollo de la enfermedad y se estableció una escala de severidad. Se detectaron 1798 genes expresados diferencialmente (DEG), incluidos 454 genes sobreexpresados y 86 subexpresados, en el híbrido 517, en comparación con el híbrido 485. Los perfiles de transcripción de veinte genes putativos relacionados con la defensa de la palma de aceite se midieron mediante transcripción inversa y PCR cuantitativa en la hoja de los híbridos de palma de aceite. Los genes están involucrados en los procesos de percepción y señales de transducción, generación y depuración de ROS, vía relacionada con fenilpropanoide, inhibidores proteasa serina, factores de transcripción, biosíntesis de fitohormonas (AJ y ET) y proteínas relacionadas con patogénesis. Los resultados mostraron un aumento en la expresión de estos genes dentro de las primeras 24 hpi en el híbrido 517 y que esta sobreexpresión se mantenía en el tiempo evaluado. Esta sobreexpresión en fases tempranas de la infección podría contribuir a mediar la resistencia a *T. paradoxa*. En conclusión, los resultados proporcionaron información sobre el proceso de defensa dinámico del híbrido OxG y sugieren que los materiales del híbrido de palma de aceite responden de manera diferente en términos de expresión de la vía fenilpropanoide y proteínas relacionadas con patogénesis para conferir defensa y resistencia a esta enfermedad.

**Palabras clave:** Híbrido OxG de palma de aceite, pudrición de flecha, *T. paradoxa*, RNASeq, respuesta de defensa.

## SUMMARY

### EXPRESSION ANALYSIS OF GENES ASSOCIATED WITH DEFENSE IN THE MODEL OIL PALM -*Thielaviopsis paradoxa* (de seynes) höhn

Spear rot disease in oil palm, is caused by the pathogenic fungus *Thielaviopsis paradoxa*. The OxG hybrid provides a valuable genetic resource for selecting resistant germplasm and for establish resistance-associated genes to this pathogen. In this study, an OxG hybrid coded 517 was identified as a resistant genotype that limited the colonization of *T. paradoxa*, while another OxG hybrid coded 485 showed high susceptibility. To understand the OxG hybrid transcriptional response to *T. paradoxa* infection, these two OxG hybrid materials were inoculated with this pathogen and its transcriptional profile was compared by RNA sequencing at six time points (0, 24, 48, 72, 96 and 120 hpi). To establish the time points, a characterization of the development of the disease was performed and a severity scale was established. 1798 differentially expressed genes (DEG), including 454 up-regulated genes and 86 downregulated genes, were detected in hybrid 517, compared to hybrid 485. The transcription profiles of twenty putative genes related to oil palm defense were measured by reverse transcription and quantitative PCR at the leaves of oil palm hybrids. Genes are involved in the processes of signal perception and transduction, generation and purification of ROS, a pathway related to phenylpropanoid, serine protease inhibitors, transcription factors, phytohormone biosynthesis (AJ and ET) and pathogenesis related proteins. These results show an increase in the expression of these genes within the first 24 hpi in hybrid 517 and that this overexpression was maintained over the evaluated time. This overexpression in the early stages of infection could contribute to mediate resistance to *T. paradoxa*. In conclusion, the results provided information on the dynamic defense process of the OxG hybrid and suggested that the oil palm hybrid materials respond differently in terms of expression of the phenylpropanoid pathway and pathogenesis-related proteins to confer defense and resistance to this disease.

**Key words:** Oil palm OxG hybrid, spear-arrow rot, *T. paradoxa*, RNASeq, defense response.

# CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	IV
LISTA DE ABREVIACIONES.....	V
LISTA DE FIGURAS .....	VII
RESUMEN .....	X
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 GENERALIDADES DE LA PALMA DE ACEITE .....	1
1.2 ORIGEN, EVOLUCIÓN Y DISTRIBUCIÓN EN COLOMBIA DE LA PALMA DE ACEITE .....	2
1.3 USOS DEL ACEITE DE PALMA .....	6
1.4 LIMITACIONES EN LA PRODUCCION DE LA PALMA DE ACEITE .....	6
1.5 MEJORAMIENTO DE LA PALMA.....	9
1.6 BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO.....	12
1.6.1 SEÑALIZACION EN LA DEFENSA DE LAS PLANTAS.....	13
<i>Señalización dependiente de ET y AJ</i> .....	15
<i>Señalización dependiente de AS</i> .....	17
<i>Ácidos grasos como señales en la defensa de las plantas</i> .....	19
1.6.2 RESISTENCIA GEN A GEN .....	21
<i>Reconocimiento de efectores por proteínas R</i> .....	22
1.6.3 RELEVANCIA DE LA REGULACION DEL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS PARA LAS INTERACCIONES PLANTA PATOGENO .....	24
1.6.4 INTERACCION PALMA - <i>THIELAVIOPSIS PARADOXA</i> .....	25
1.7 OBJETIVOS .....	27
<i>OBJETIVO GENERAL</i> .....	27
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i> .....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28
<b>CAPÍTULO 2. ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE INFECCIÓN DE <i>T. PARADOXA</i> EN PALMA PARA EL ESTUDIO DE LAS RELACIONES PLANTA-PATÓGENO.....</b>	<b>34</b>
INTRODUCCIÓN.....	34
2.1 TAXONOMIA Y MORFOLOGIA DE <i>THIELAVIOPSIS PARADOXA</i> .....	35
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
2.3 RESULTADOS.....	39
2.3.1 <i>Caracterización morfológica de Thielaviopsis sp.</i> .....	39
2.3.2 <i>Comparación de los Métodos de inoculación</i> .....	40
2.3.3 <i>Caracterización de la infección</i> .....	43
2.4 DISCUSIÓN .....	45

BIBLIOGRAFÍA.....	49
<b>CAPÍTULO 3: PERFILES DE EXPRESIÓN EN EL HÍBRIDO INTERESPECÍFICO OXG (<i>E. OLEIFERA</i> X <i>E. GUINEENSIS</i>) Y EN <i>T. PARADOXA</i> DURANTE LA INTERACCIÓN .....</b>	<b>51</b>
INTRODUCCIÓN .....	51
3.1 MATERIALES Y METODOLOGÍA .....	53
3.2 RESULTADOS.....	60
3.2.1 <i>Secuenciación de Illumina y control de calidad</i> .....	60
3.2.2 <i>Ensamblaje De novo</i> .....	62
3.2.3 <i>Alineamientos</i> .....	67
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL HÍBRIDO OXG .....	71
3.2.4 <i>Anotación Funcional</i> .....	71
<i>Análisis de Enriquecimiento GO</i> .....	79
<i>Profundidad de la Secuenciación</i> .....	80
3.2.6 <i>Selección de Genes para los Análisis por PCR en Tiempo Real</i> .....	82
3.2.7 <i>Alineamiento contra genoma de referencia y análisis de SNPs</i> .....	87
3.2.8 <i>Discusión de los resultados del transcriptoma de los materiales del híbrido OxG</i> .....	92
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE <i>THIELAVIOPSIS PARADOXA</i> .....	101
3.2.9 <i>Anotación Funcional</i> .....	101
3.2.10 <i>Discusión de los resultados del transcriptoma de Thielaviopsis paradoxa</i> .....	108
BIBLIOGRAFÍA.....	113
<b>4. CONSIDERACIONES FINALES .....</b>	<b>119</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>122</b>
5.1 COROLARIO .....	122
5.2 CONCLUSIONES .....	123
5.3 RECOMENDACIONES .....	125
BIBLIOGRAFÍA.....	126





# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1 GENERALIDADES DE LA PALMA DE ACEITE

En el género *Elaeis* se encuentran las palmas nativas de África, i.e., *Elaeis guineensis*, y las palmas nativas de América, i.e., *Elaeis oleifera*. La palma de aceite pertenece a la división Magnoliophyta, clase Liliopsida, subclase Commelinidae, Familia Arecaceae, subfamilia Arecoideae, tribu Cocoeceae, subtribu Elaeidinae y género *Elaeis*. Es una especie monocotiledónea, perenne, monoica, alógama (Corley et al., 2008; Meerow et al., 2012). La palma de aceite es diploide y su genoma está empaquetado en 16 pares de cromosomas, su contenido de ADN nuclear ha sido estimado en  $2C = 3.76$  pg por citometría de flujo (Rival et al., 1997) con un tamaño de genoma haploide de 1700 Mpb (Meerow et al., 2012; Ithnin et al., 2020).

En los países tropicales, la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq) representa un cultivo alternativo con excelentes perspectivas de crecimiento para el futuro. La palma de aceite es la oleaginosa más productiva del planeta; una hectárea sembrada produce entre 6 y 10 veces más aceite que otros cultivos como la soya, colza o girasol entre otros. Colombia es el cuarto productor de aceite de palma en el mundo y el primero en América (Forster et al., 2017). El cultivo de palma produce importantes aceites (1) aceite de palma, el que es blando y se utiliza extensamente en oleomargarina, manteca y grasas para la cocina y en la fabricación industrial de muchos otros productos para la alimentación humana, y (2), aceite de almendra de palma (palmiste), que posee un alto contenido de ácido láurico, a partir del cual se producen jabones, biocarburantes, grasas lubricantes y biocombustibles. A partir del fraccionamiento de cualquier de estos aceites, se obtiene la oleína, que es la fracción líquida y la estearina, que es la fracción sólida (Lai et al., 2015). La palma africana de aceite tiene requerimientos ecológicos especiales, particularmente condiciones de clima y suelo. Para lograr altas producciones requiere temperaturas que oscilan entre 26 °C y 28 °C, precipitaciones entre 1800 mm y 2300 mm al año y dado que es una planta heliófila, requiere 1500 horas de luz al año (Corley et al., 2008). Los suelos óptimos son los de textura franco-arcillosa. En algunas zonas de países latinoamericanos se han establecido plantaciones de palma africana de aceite, sin considerar estas condiciones. Como consecuencia, se han presentado problemas de plagas, de patógenos, de condiciones adversas de clima (luminosidad, precipitación, temperatura, humedad ambiental) y de suelo (características físicas y químicas), que han ocasionado por sí mismas disturbios fisiológicos o

crean condiciones favorables para el desarrollo de plagas y enfermedades (De Franqueville, 2003; Martínez, 2010). A medida que el área plantada en palma africana de aceite se ha ido extendiendo en los países latinoamericanos, han surgido problemas de enfermedades no registradas previamente en regiones tradicionales de este cultivo: Malasia, Indonesia o regiones de África. Ciertas enfermedades se presentan sólo en determinadas fases del cultivo: semillas en germinación, plántulas de vivero, palmas jóvenes y palmas adultas. Algunas afectan un órgano determinado, como raíces, tronco, hojas, o frutos. Otras, al afectar los tejidos conductores de agua, nutrientes y savia elaborada, tienen efecto sistémico. Algunas de estas enfermedades han ocasionado pérdidas cuantiosas en plantaciones de Colombia, por ejemplo: pudrición del cogollo, pudrición de flecha, marchitez sorpresiva, marchitez letal, añublo foliar o secamiento de las hojas, anillo marrón y mancha anular entre otras (Fontanilla et al., 2014; Montoya et al., 2017; Ruiz et al., 2020).

## **1.2 ORIGEN, EVOLUCIÓN Y DISTRIBUCIÓN EN COLOMBIA DE LA PALMA DE ACEITE**

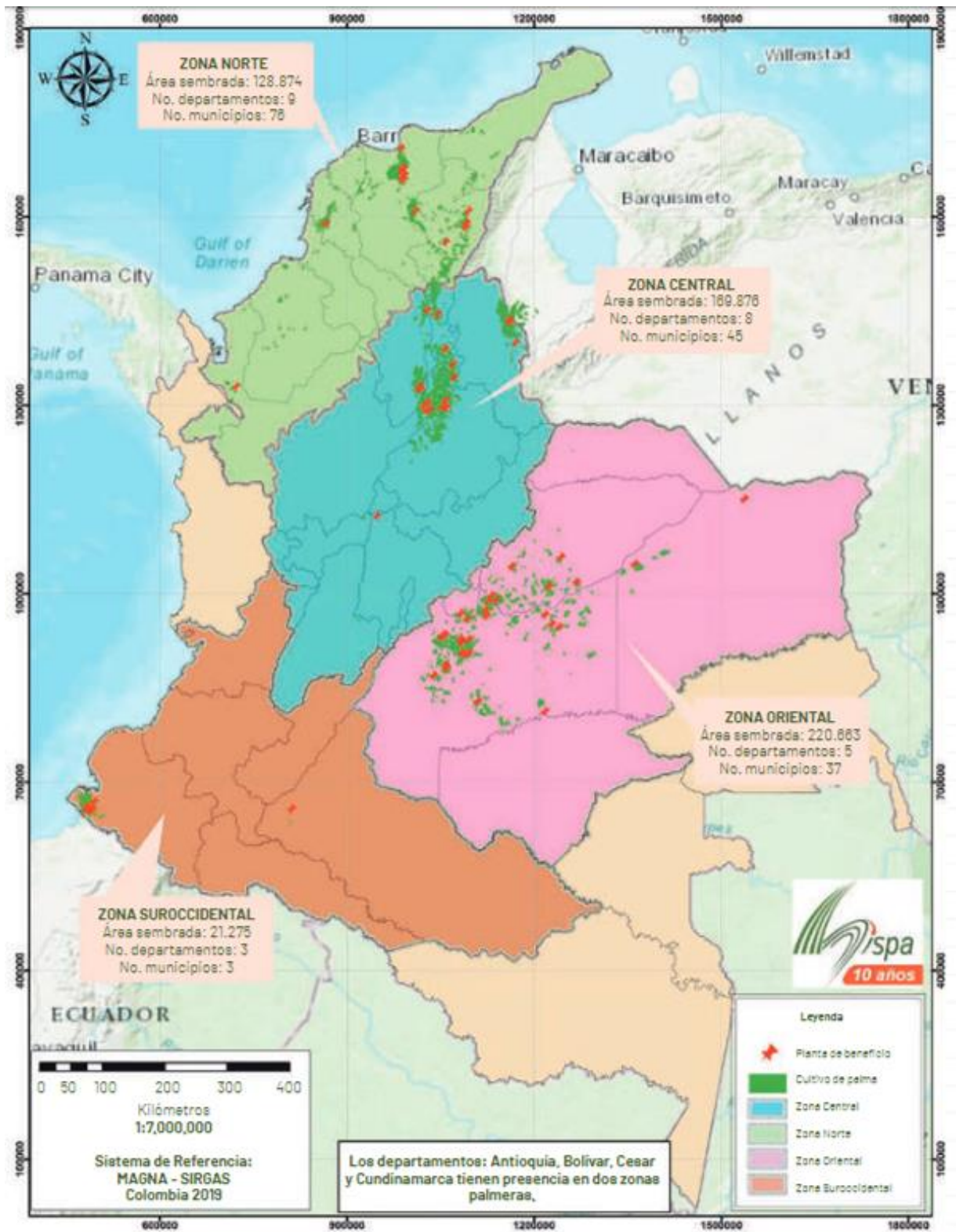
La palma de aceite (*E. guineensis* Jacq.) tiene como centro de origen África occidental, donde crece en estado silvestre y constituye un cultivo agrícola. Fue introducida en Malasia por los británicos a principios de 1870 como planta ornamental (Nambiappan et al., 2018). Su introducción a América se atribuye a los colonizadores y comerciantes de esclavos portugueses, que en el siglo XVI utilizaron los frutos de la palma en los viajes transatlánticos, como parte de la dieta alimenticia a que estaban habituados los esclavos que traían al Brasil (Corley et al., 2008; Henders et al., 2017). En el año 1848, la palma de aceite entra a Asia por Java, y se dio comienzo a la más grande expansión por el mundo. En 1917, la primera siembra comercial tuvo lugar en Tennamaram Estate en Selangor, sentando las bases de las vastas plantaciones de palma de aceite y la industria del aceite de palma en Malasia (Nambiappan et al., 2018). En el Año 1932, Florentino Claes, introdujo la palma africana de aceite a Colombia y fueron sembradas con fines ornamentales. En el año 1945, se establece el primer cultivo comercial en Colombia, por la United Fruit Company, en la zona bananera del departamento del Magdalena. El cultivo de palma de aceite en Colombia, aumentó a un ritmo acelerado a principios de la década de 1960, en el marco del programa de diversificación agrícola del gobierno, que se introdujo para reducir la dependencia económica del país del caucho y el estaño. Más tarde, en la

década de 1970, el gobierno introdujo planes de asentamiento de tierras para la plantación de palma de aceite como un medio para erradicar la pobreza de los agricultores y pequeños agricultores sin tierra (Franqueville, 2001).

El desarrollo de la palma se estableció con organizaciones de investigación y colecciones de germoplasma con materiales de las regiones vecinas, el cual se convierte en la base genética para los programas de mejoramiento del mundo. En Malasia, la mayoría de material plantado derivaba desde cuatro palmas plantadas en los Jardines Botánicos Bogor en 1848. Estas palmas “Bogor” formaron la existencia de lo que es conocido como población Deli dura en el mejoramiento de la palma. Subsecuentemente, un número limitado de tenera y pisifera fueron introducidas a Malasia desde África. Con el objetivo de ampliar la base genética de la palma de aceite, varias expediciones se llevaron a cabo en diferentes sitios, por ejemplo, entre 1961 y 1965, los mejoradores del Instituto Nigeriano para la Investigación de Palma de Aceite (NIFOR, por sus siglas en inglés), colectaron material genético en mercados locales y a través de jefes de aldeas, así este material fue establecido en NIFOR. Investigadores del Instituto de Investigaciones de Aceites y Oleoginosas (IRHO, por sus siglas en francés), seleccionaron 38 palmas en Pobé en Dahomey y cuatro en Bingerville en la Costa de Marfil y esto formó la base ténera. Dado que el acervo genético de los materiales de plantación de palma aceitera era muy limitado, el Comité de Palma de Aceite de Malasia (MPOB, por sus siglas en inglés), anteriormente conocido como Instituto de Investigación de Aceite de Palma de Malasia (PORIM, por sus siglas en inglés), inició búsquedas para recolectar materiales genéticos de palma aceitera en su centro de origen: África, para ampliar la base genética de los materiales de reproducción de la palma aceitera. La mayoría de los países de África en los que se puede encontrar la palma aceitera, incluidos Nigeria, Camerún, la República Democrática del Congo, Tanzania, Madagascar, Angola, Senegal, Gambia, Sierra Leona, Guinea y Ghana, fueron explorados en busca de poblaciones de palma aceitera (Rajanaidu y Jalani 1994). Uno de los factores que incrementó significativamente la expansión de la palma fue el descubrimiento de un mejor potencial de producción entre los cruces de origen Africano x Deli (desarrollado en el sureste de Asia). Otro de los factores, fue la introducción del insecto polizador *Elaeidobius kamerunicus* desde África en las regiones productoras de palma aceitera de Asia y el Pacífico a principios de la década de 1980 (Caudwell, 2001; Yousefi et al., 2020) y en las plantaciones de palma aceitera de la India durante 1985 (Ponnamma et al., 2006). La introducción de *E. kamerunicus* en Malasia aumentó la polinización y la producción de frutos (Teo, 2015). Posteriormente, se implementaron los programas de selección usando solamente

recursos genéticos locales, logrando así una ganancia genética rápida. Desde entonces, todos los programas de mejoramiento genético de palma de aceite se han basado en los esquemas de selección recurrente recíproca (SRR) de poblaciones naturales de palma de aceite (*E. guineensis* Jacq.) procedentes de Angola o selección de familias individuales (SFI), en los cuales se han realizado cruces Deli x orígenes africanos (principalmente La Mé o Congo). Muy pocas palmas fundadoras forman la base genética de estos cruces: cuatro Deli, tres para La Mé y alrededor de 10 para Congo. De esta manera, la base genética eficiente es muy estrecha (Cochard et al., 2009).

En Colombia, la palma de aceite es uno de los cultivos de mayor potencial económico ya que actualmente es el primer productor de aceite de palma en América y el cuarto en el mundo después de Indonesia, Malasia y Tailandia (USDA, 2020). De acuerdo con la Matriz de Edades del Sistema de Información Estadística del Sector Palmero (Sispa) que consolida las siembras de palma de aceite en Colombia, durante el 2019 el área sembrada en palma de aceite fue de 559.582 hectáreas. Del total de hectáreas, el 41 % corresponde a la Zona Oriental, 31 % a la Central, 24 % a la zona Norte y 4 % a la zona Suroccidental, que abarcan 161 municipios en 25 departamentos alrededor del país (Figura 1). La producción de aceite de palma crudo alcanzó 1.630.413 toneladas al terminar el 2020 (MADR, 2020). El sector palmero colombiano genera alrededor de 170.794 puestos de trabajo entre directos e indirectos, siendo uno de los líderes en la generación de empleo formal y de calidad (Fedepalma, 2020).



**Figura 1.** Mapa de los cultivos de palma de aceite en Colombia 2018. Tomado de Anuario Estadístico 2020 (Fedepalma, 2020)

### **1.3 USOS DEL ACEITE DE PALMA**

El procesamiento del fruto de la palma de aceite se realiza en la planta de beneficio o planta extractora, en donde se separa de la parte carnosa el aceite crudo de palma y de la almendra el aceite de palmiste y la torta de palmiste. Los tres productos comerciales que se obtienen de la palma oleaginosa son el aceite de palma, el aceite de palmiste y la torta de palmiste. Al fraccionar el aceite de palma se obtienen dos productos: la oleína que es líquida y sirve para mezclar con aceites de semillas oleaginosas, y la estearina que es más sólida y sirve para producir margarinas y jabones (Lai et al., 2015; Purnama et al., 2020). El aceite de palma es el segundo aceite más consumido en el mundo y se emplea como aceite de cocina, por su resistencia a altas temperatura y porque no tiene olores desagradables. También se usa en la elaboración de productos de panadería, pastelería, confitería, heladería, sopas instantáneas, salsas, diversos platos congelados y deshidratados, cremas no lácteas para mezclar con el café, y en los sustitutos de la grasa de la leche empleados para la producción de leche condensada y leche en polvo. El aceite de palmiste tiene aplicación en la industria alimenticia como aceite láurico, en particular para la preparación de productos de confitería y panadería (Dian et al., 2017). La torta de palmiste sirve como alimento concentrado de animales, por su naturaleza granulosa y fibrosa con bajo nivel de lisina. Los aceites de palma y de palmiste también tienen usos no comestibles, por ejemplo: se utilizan en la fabricación de jabones, detergentes biodegradables, velas, cosméticos, grasas para moldes y equipos de fabricación de pan, grasas para la protección de tanques, tubería o similares que operan al descubierto, biodisel, barro de perforación, aceite de palma epoxidado útil como plastificante y esterilizador en la industria plástica en especial para PVC, jabones metálicos para la fabricación de grasas lubricantes, secadores metálicos destinados a la producción de pintura, barnices y tintas, y ácidos para lubricar fibras en la industria textil, entre otros (Khatiwada et al., 2018; Zahan et al., 2018). En la actualidad, alrededor del 70% de la producción mundial total de aceite de palma se utiliza para alimentos y el 30% para fines industriales no alimentarios. De las cantidades industriales, alrededor de dos tercios se utilizan para producir biodiésel (USDA, 2020).

### **1.4 LIMITACIONES EN LA PRODUCCIÓN DE LA PALMA DE ACEITE**

Los factores más importantes que determinan el rendimiento de las plantaciones son la calidad del suelo, la disponibilidad de agua y el clima. Los mejores suelos son los volcánicos y arcillas

aluviales y marinas, de zonas bajas (por debajo de 500 metros sobre el nivel del mar), de buena permeabilidad y bien drenados. Requieren de precipitaciones de 2.000 mm o más, distribuidos a lo largo del año, esto es, sin estaciones secas muy pronunciadas; clima cálido de temperatura media máxima del orden de 29 °C a 33 °C y mínima de 22 °C a 24 °C; luz solar constante entre cinco y siete horas diarias durante todo el año (Hormaza et al., 2012; Forster et al., 2017; Malike et al., 2019).

La palma de aceite es un cultivo de largo plazo, de los cuales los tres primeros años las plantas son improductivas y requieren de un manejo agronómico y control de las malezas. La palma de aceite comienza a producir racimos a partir del mes 18 después de su siembra en sitio definitivo y alcanza su máxima producción entre el octavo y décimo año de su vida. En estos años la asistencia técnica debe ser permanente, oportuna y capaz de anticipar y prevenir cualquier problema fisiológico de las palmas. A partir del décimo año y hasta el final de su etapa económicamente productiva, los cuidados de las plantaciones serán los mismos, pero cambiarán las periodicidades y los programas fitosanitarios por la ocurrencia de enfermedades propias de las palmas seniles (Lai et al., 2015).

La calidad de la semilla es un factor importante en el cultivo de la palma de aceite, por ser una explotación perenne, por lo tanto, la semilla certificada es una condición para garantizar óptimos rendimientos. Los palmicultores colombianos pueden comprar semillas tanto en el mercado externo como en el nacional, dependiendo de sus preferencias. A nivel internacional, se puede adquirir en Malasia, Nueva Guinea, Costa de Marfil, Costa Rica, y otras regiones del África (Malike et al., 2019); y en Colombia producen semillas Agrosavia, Hacienda Las Flores en Codazzi (Cesar), Unipalma S.A y Hacienda la Cabaña (llanos orientales), Indupalma (zona central).

La capacidad de la palma de aceite para sobrevivir en condiciones abióticas adversas (como déficit hídrico y altas temperaturas) la convierte en un importante cultivo en crecimiento en regiones cálidas y secas. En países de Suramérica (Ecuador, Brasil, Perú y Venezuela) y Centroamérica (Costa Rica), la palmicultura tiene como principal barrera el ataque de plagas y patógenos, daños que pueden llegar a representar hasta un 30% de los costos de producción (Torres et al., 2016; Sundram et al., 2017; Woittiez et al., 2017). Las enfermedades y plagas han limitado la expansión de la palma de aceite en varias regiones de América tropical (Martínez, 2010; Ruiz et al., 2020; Woittiez et al., 2017). Algunas de las plagas incluyen gusanos defoliadores: Gusano cabrito (*Opsiphanes cassina* F.), Gusano túnel (*Stenoma cecropia* M.), Gusano Monturita (*Sibine spp.*) y Gusano canasta (*Oiketicus kirbyi*); *Rhynchophorus palmarum* (taladran y destruyen los tejidos internos en el tallo y el cogollo) y

*Strategus aloeus* (devora bulbo basal) entre otros (Pardey, 2019). Dentro de las enfermedades más comunes de la palma están las ocasionadas por patógenos como: *Colletotrichum* spp.; *Botryodiplodia* spp.; *Pestalotiopsis* spp.; *Bursaphelenchus cocophilus* (anillo rojo) *Ganoderma* spp. (Pudrición basal), *Phytophthora palmivora* (pudrición de cogollo) fitoplasmas (marchitez letal) y *Thielaviopsis paradoxa* (Pudrición de flecha) (De Assis Costa et al., 2018; Li et al., 2018; Martínez, 2010; Tan et al., 2015; Torres et al., 2016)

La pudrición de la flecha es una de las enfermedades que ocasiona problemas en palmas jóvenes en las plantaciones de palma de aceite en América Latina. En Colombia se reportaron los primeros casos en 1964 con sus devastadores efectos en la plantación «La Arenosa» en Turbo, Antioquia (De Franqueville, 2003). Desde entonces, la enfermedad se ha reportado en Ecuador, Perú, Panamá, Brasil, Surinam y Centroamérica. Este problema fitopatológico afecta la última hoja emergida y genera una consistencia húmeda, normalmente acompañada de olores fuertes. Generalmente la enfermedad no avanza hacia tejidos internos y se circunscribe a los folíolos no expandidos de palmas jóvenes. A medida que otras hojas jóvenes se abren, también son afectadas, así que la palma frecuentemente presenta varias hojas curvadas alrededor de la flecha central. El secamiento descendente de las flechas conduce al quiebre en su tercio inferior. Finalmente, la necrosis y pudrición de las flechas desciende al cogollo, a medida que avanza, puede alcanzar el meristemo y provocar la caída prematura de las hojas. Las palmas así afectadas normalmente se recuperan 'espontáneamente' después de algunas semanas o meses (a veces años) de mostrar síntomas. Una secuencia común de síntomas en palmas jóvenes es:

1. Acortamiento de las hojas jóvenes.
2. Pudrición limitada a algunas porciones de los folíolos en algunas de las flechas.
3. Doblamiento de algunos de los raquis y quebradura en algunos.
4. Porciones de las flechas y de las hojas nuevas muestran secamientos y pudriciones.
5. Producción por algún tiempo de hojas jóvenes más cortas durante la fase de recuperación.

Las pudriciones en palmas afectadas normalmente no progresan hacia el meristemo, lo cual facilita la recuperación de las plantas. Sin embargo, en otras formas de pudriciones de flecha, la pudrición de tejidos puede ser bastante extensiva y alcanzar el meristemo apical, en cuyo caso la palma muere (Chinchilla, 2008).



De manera adicional al mejoramiento de las prácticas agrícolas como medio de prevenir o atenuar los efectos de las enfermedades y con el objetivo de mejorar las características agronómicas, se han adelantado históricamente programas de mejoramiento de la palma (Malike et al., 2019).

## **1.5 MEJORAMIENTO DE LA PALMA**

La historia del proceso de mejoramiento del cultivo de la palma de aceite, es descrita por Corley (2016) en capítulo 6 (selección y mejoramiento), donde el autor presenta de manera general el origen de cultivares que han sido usados por diferentes instituciones en los programas de mejoramiento.

En primera medida es importante entender que el objetivo principal de los programas de mejoramiento está encaminado a la consecución de maximizar el aceite de palma logrando un mayor rendimiento del cultivo que se traduce en una mejor rentabilidad del negocio. Para lograr esto, los mejoradores inician normalmente con poblaciones de palmas en las que se puede encontrar una variabilidad genética para rendimiento, de la cual pueden (mediante cruzamientos) seleccionar las mejores palmas.

Para el cultivo de palma de aceite, se cree que la historia del proceso de mejoramiento comenzó a principios del siglo XX posteriormente el desarrollo continuó rápidamente. De acuerdo con Corley (2016), la primera información en el sudeste asiático relacionada con palma de aceite fue la reportada en 1848 sobre cuatro plántulas plantadas en los jardines botánicos de Buitenzorg (ahora Bogor). De estas palmas se sabe que dos provenían de los jardines botánicos de Ámsterdam y los dos restantes eran de 'Bourbon o Mauricio' en el Océano Índico. Y es de estas palmas originales de las que se desprende la mayoría de programas de mejoramiento de palma de aceite en el mundo (figura 2) encabezadas por diferentes centros de investigación, por ejemplo en el Congo, estuvo encargado el Instituto Nacional de Estudios Agronómicos del Congo Belga (INEAC por sus siglas en Francés), y para Indonesia y Malasia, el trabajo estuvo a cargo de la Asociación General de Plantadores de Caucho de la Costa Este de Sumatra (AVROS por sus siglas en holandés) además del Departamento de Agricultura, Malaya.

Al tener esta variación genética debido al material silvestre disponible en estas dos regiones (África y Asia), se presentaron enfoques diferentes en los programas de mejoramiento. En África, los frutos tipo dura (considerados de mala calidad) y sumado a la disponibilidad natural de palmas ténera llevaron a esta región a focalizar la producción de material ténera de alta calidad liderado con el

programa Deli del Instituto Nigeriano para la Investigación de la Palma de Aceite (**NIFOR** - por sus siglas en inglés) y por el INEAC. Por otro lado, en el Lejano Oriente, con unas duras relativamente buenas provenientes de Deli y con menos opciones que la región de África, el trabajo se concentró en la población de Deli duras liderado por AVROS.

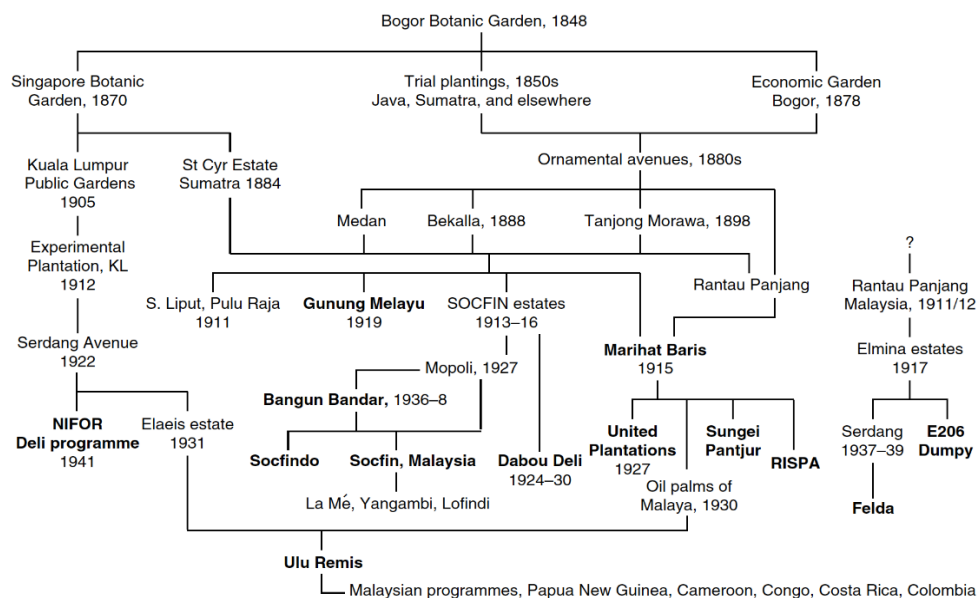
Ahora bien, de manera paralela al desarrollo que estaba llevando a cabo el INEAC, la empresa de plantaciones de Unilever tenía un programa de mejoramiento donde se incluyó material seleccionado de las fincas de Pindi y Brabanta en el sur del Congo (**Congo mix**), igual que Mayumbé (al oeste de Kinshasa) y **Mongana** (del distrito alrededor de Lisala, y caracterizadas por alto aceite a racimo), sumado al famoso **Djongo** (que significa la mejor palma de África) que estaba en la “Palmeraie de la Rive” en Yangambi. Posteriormente, Unilever llegaría a Colombia (Unipalma) con un buen grupo de palmas seleccionadas de su programa de mejoramiento para iniciar un proceso de selección para las condiciones edafoclimáticas del País, sumado a nuevos cruzamientos que pudiesen ser evaluados y comercializados en Colombia.

Si bien, con esta breve reseña es posible visualizar el linaje de los parentales usados en este trabajo, la información disponible de las características y las evaluaciones usadas para la selección de las mejores palmas de cada generación o progenie han sido material de reserva corporativa, lo que dificulta describir de manera precisa las características de los padres de los híbridos evaluados en este estudio.

A partir de estos padres se han realizado cruces interespecíficos con el objetivo de mejorar características agronómicas de interés para el cultivo y con mayor resistencia a enfermedades. El uso de híbridos interespecíficos OxG (*E. oleifera* x *E. guineensis*) se ha considerado una parte fundamental para el manejo de enfermedades.

En lo que concierne a la evaluación de la respuesta a enfermedades, se ha logrado verificar con datos experimentales que los híbridos interespecíficos OxG son los que presentan la mejor respuesta a la PC. Por tal razón la producción y evaluación de híbridos con resistencia, pero con características agronómicas y de adaptación son necesarios para una palmicultura sostenible. Sin embargo, la resistencia de los híbridos OxG a las enfermedades no es completa, como sucede con la pudrición del cogollo (PC), donde distintos cruces con madres *oleifera* de las regiones de Amazonia y América Central han mostrado un grado de incidencia variable (0-81%), entre el quinto y el décimo año de edad en el campo (Barba et al., 2010). A pesar de la resistencia basal a la enfermedad de algunos

híbridos OxG a la PC, no existe aún una variedad consolidada como alternativa a las variedades *E. guineensis*, principalmente por causa de su menor tasa de extracción de aceite, crecimiento vigoroso y deficiente polinización natural.



**Figura 2.** Posible linaje de las poblaciones de Deli *dura*. Tomado de Corley, 2016

En algunas regiones de Colombia, donde la siembra de cultivares tradicionales de palma de aceite (*E. guineensis*) está limitada por la presencia enfermedades como la pudrición de cogollo, se ha intensificado el uso de cultivares de híbridos OxG. Aproximadamente 70.000 hectáreas han sido sembradas con híbridos OxG en Colombia y la mayor parte de esta área está ocupada por híbridos de madre oleífera de Brasil. De igual manera ha ocurrido en las plantaciones con híbridos OxG en América del Sur donde fueron desarrolladas usando palmas oleíferas de Brasil y Ecuador, las cuales son denominadas por su origen: Coarí (la de uso más frecuente), Manicoré, Tefé, Manaos y Taisha (Ecuador). La mayor diferencia entre los híbridos OxG es la fuente de polen usada; por ejemplo, en los híbridos Coarí y Manicoré se usa padres ‘La Mé’, en los híbridos de origen Taisha se usa la línea AVROS, y en el caso de Amazonas se usan madres *oleíferas* de origen Manaos y una población exclusiva de ASD como fuente de polen (Mujica, 2010; Bayona-Rodríguez et al., 2016).

Estudios previos de interacciones entre palma y hongos fitopatógenos se han centrado en la sintomatología de la enfermedad (De Franqueville, 2003; Chinchilla, 2008), la fisiología y el proceso

de colonización fúngica en palma de aceite (Hafizi et al., 2013; Torres et al., 2016; de Assis Costa et al., 2018) y estudios a nivel celular, proteómico y transcripcional (Al-Obaidi et al., 2017; Dhillon et al., 2021; Ochoa et al., 2019). Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios moleculares que permitan establecer la respuesta del híbrido OxG a la infección por *T. paradoxa*. En este estudio se evaluó la susceptibilidad relativa de dos materiales promisorios del híbrido OxG por medio del monitoreo de los síntomas de la enfermedad después de la inoculación de *T. paradoxa* y midiendo los cambios en la expresión de los transcritos relacionados con las respuestas de defensa. Esta información mejorará la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la interacción híbrido OxG - *T. paradoxa*.

## 1.6 BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Los patógenos han desarrollado diferentes estrategias para invadir una planta, así como para alimentarse y reproducirse en ella. Los patógenos biotróficos necesitan tejido vivo para crecer y reproducirse; en muchas interacciones el tejido morirá en los estados tardíos de la infección. En contraste a los patógenos necrotróficos quienes matan el tejido hospedero al inicio de la infección y se alimentan del tejido muerto, mientras que los patógenos hemibiotróficos a menudo cambian su estilo de vida durante el desarrollo desde una etapa biotrófica temprana a una necrotrófica posterior (Geeta et al., 2018). La vía más importante involucrada en la defensa de las plantas contra hongos biotróficos y hemibiotróficos es la respuesta dependiente del ácido salicílico mientras que la defensa contra patógenos necrotróficos es la vía del jasmonato-etileno (Spanu et al., 2017).

Una vez los patógenos, acceden al interior de la planta, se inicia la penetración de la pared celular que expone la membrana plasmática del hospedero al microorganismo, donde este encuentra receptores de superficie extracelulares que reconocen patrones moleculares asociados a microbios (MAMP, del inglés Microbe-associated molecular patterns) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés damage-associated molecular patterns). Estos receptores son los PRRs (del inglés, pattern recognition receptors) que inician una respuesta de defensa activa, llamada inmunidad basal en plantas, ahora definida como PTI (del inglés, PAMP-triggered immunity), que mantiene restringidos a los patógenos no adaptados. En conclusión, PTI está basada en el reconocimiento mediado por PRR de MAMPs y DAMPs, los llamados elicitores (Cesari, 2018; Imran et al., 2020).

Sin embargo, los microorganismos patogénicos han evolucionado suprimiendo PTI, al interferir con el reconocimiento generado a nivel de la membrana plasmática o con componentes del citoplasma de la planta mediante la secreción de proteínas efectoras que probablemente alteran la señalización de respuestas de resistencia. Una vez los patógenos adquieren la capacidad de suprimir las defensas primarias, las plantas desarrollan un mecanismo más especializado para detectar los microorganismos, inmunidad desencadenada por efectores (ETI, del inglés effector-triggered immunity). ETI esta basada en la interacción específica directa o indirecta de efectores del patógeno y los productos de los genes R de acuerdo con la teoría gen a gen. Este reconocimiento conduce a la reacción de defensa llamada respuesta hipersensible (RH), caracterizada por la rápida muerte celular apoptótica y necrosis local (Cui, 2015; Cesari, 2018)

En PTI, después del contacto con los patógenos o elicitores, el flujo de iones, las proteínas de fosforilación/defosforilación y moléculas de señalización tales como ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ), etileno (ET) y especies de oxígeno reactivas (ERO) son producidas. Esto conduce a la regulación de la expresión de genes y la inducción de respuestas de defensa, por ejemplo, fortalecimiento de la pared celular y la acumulación de fitoalexinas y proteínas relacionadas con patogénesis (PR) (Bigeard, 2015)

### **1.6.1 Señalización en la defensa de las plantas**

Después del contacto con los patógenos empiezan las respuestas fisiológicas a MAMPs y DAMPs con un flujo de iones a través de la membrana plasmática. Estos cambios incluyen la entrada de  $H^+$  y  $Ca^{2+}$  y una simultánea salida de  $K^+$  y aniones en particular nitrato. Este flujo de iones conduce a la despolarización de la membrana como ha sido registrado en estudios electrofisiológicos con células de soya (Mithöfer et al., 2007). Hasta la fecha es poco lo que se sabe acerca de los canales de iones o transportadores involucrados en este flujo de iones, pero si sabe que el reconocimiento de los MAMPs estimula la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el apoplasto y que su incremento en las concentraciones citoplasmáticas podría servir como un segundo mensajero que promueve la apertura de otros canales de la membrana o para activar proteínas kinasas dependientes de calcio (Kudla et al., 2018; Wang et al., 2020).

Otras respuestas incluyen:

-Explosión oxidativa que modula la expresión de varios genes relacionados con la defensa de la planta y además a través de las reacciones de lignificación participa en el reforzamiento de la pared celular. Las EROs, son moléculas de oxígeno reducido altamente reactivas, como superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ). Se producen intracelularmente durante ciertas reacciones redox en las membranas celulares, el citoplasma, núcleo, mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas y el retículo endoplásmico. Los estallidos primarios de ROS después de la percepción de patógenos ocurren en los apoplastos (Shen et al., 2017). La generación de ROS inducida por patógenos en los cloroplastos juega un papel crucial en la señalización y / o ejecución de la muerte celular de respuesta hipersensible (HR) en plantas (Segal et al., 2018b). La generación de ROS extracelulares, incluido el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , requiere las actividades extracelulares de las peroxidasas de la pared celular y las oxidasas NADPH de la membrana plasmática en las células vegetales (Baxter et al., 2014). La transducción de señales de ROS activa los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática y puede ser un paso central en muchos procesos mediados por ROS que regulan la fisiología de las células vegetales. También se ha propuesto que los canales de biomembrana (acuaporinas) median el transporte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de las membranas biológicas para controlar la señalización de ROS en las células vegetales (Ali et al., 2018).

-Activación de cascadas de MAPK (Mitogen activated protein kinase), una respuesta temprana a señales de MAMP es la activación de cascadas de MAPK que culmina con la activación de factores de transcripción (Meng et al., 2013; Devendrakumar et al., 2018; Zhang et al., 2018).

-Activación de genes: MAMPs como quitina fúngica y elicitores endógenos (fragmentos de pared celular liberados por enzimas microbianas) como oligogalacturónidos inducen la activación de receptores del tipo RLK (receptores similares a kinasa), cuyos genes son sobre-expresados. Los RLKs son proteínas de señalización que presentan un dominio extracelular conectado a través de un dominio transmembrana a una cinasa citoplásmica. Diversos dominios extracelulares de los RLKs ayudan en la percepción de los estímulos, como MAMPs inducen la respuesta inmune (Tang et al., 2017). Esta arquitectura indica que los RLK perciben señales externas y las transducen al interior de la célula. En ausencia de estímulos los dominios cinasa citosólicos de los RLKs están unidos a cinasas citoplasmáticas similares a receptores (RLCKs), manteniéndolos inactivos por interacciones intramoleculares o por fosfatasa u otras proteínas reguladoras como E3 ligasas, cinasas dependientes de calcio o proteína-G). Después de la percepción, se disocian para permitir la estimulación de RLCK vía fosforilación (Jose et al., 2020). Los RLCKs and proteínas-G inducen la expresión de genes

mediante vías intermedias como ROS, canales de calcio, proteína cinasas dependientes de calcio (CPDK), MAP cinasas y factores de transcripción (Dievart et al., 2020).

### **Señalización dependiente de ET y AJ**

Señalización dependiente de etileno: la vía biosintética ET, también conocida como ciclo Yang, comienza con el aminoácido metionina. La ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintasa (ACS) es una enzima que limita la velocidad de la biosíntesis de ET, que convierte la S-adenosil metionina (SAM) en ACC (Zhou et al., 2020). La regulación de la actividad de ACS confiere un control estricto de la producción de ET. Después de la acumulación, el ET es percibido por los receptores localizados en el retículo endoplásmico, que actúan como reguladores negativos de la vía de señalización del ET (Mattoo et al., 2018). Tras la unión del ET, el EIN2 localizado en el retículo endoplasmático, se desfosforila debido a la inactivación de la quinasa de tipo Raf CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1) asociada con los receptores. EIN2 desfosforilado libera su dominio C-terminal (CEND), que entra en el núcleo y transmite señales al factor de transcripción EIN3. EIN3 activa directamente la expresión de una serie de factores de transcripción que responden a ET como el *FACTOR DE RESPUESTA DE ETILENO 1 (ERF1)* y *ARABIDOPSIS AP2 / ERF 59 (ORA59) RESPONSIVO A OCTADECANOID*, que magnifican y provocan la respuesta del ET (Pattyn et al., 2021). El ET también estabiliza la proteína EIN3 mediante la eliminación de dos proteínas F-box, EIN3 BINDING F-BOX PROTEIN 1 (EBF1) y EBF2, que se dirigen a EIN3 para la degradación proteasomal en ausencia de ET. La expresión de EBF1 y EBF2 es inducida por EIN3, proporcionando un bucle de retroalimentación negativa para la vía de señalización del ET (Pattyn et al., 2021; Zhou et al., 2020). La biosíntesis de etileno es activada en muchas plantas amenazadas por patógenos y esta producción aumentada de etileno induce una cascada de señalización que conduce a la expresión de genes que codifican para compuestos implicados en el fortalecimiento de la pared celular (Dey et al., 2015; Pattyn et al., 2021). Esto se ha observado en plantas tratadas con etileno en donde la pared celular acumula proteínas ricas en hidroxiprolina y cuya presencia ha sido asociada con la fortificación de la pared. Además, se ha demostrado que el etileno es requerido en la respuesta de oclusión del xilema que ocurre en las plantas para contrarrestar la diseminación de patógenos como *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, a través del sistema vascular de la planta (Müller et al., 2015; Binder et al., 2018). El papel del etileno en la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos inducidos por

patógenos parece ser dependiente del tipo de fitoalexina y la vía metabólica involucrada, pero en general las fitoalexinas derivadas de la vía fenilpropanoide son inducibles por etileno en diferentes especies de plantas. El etileno se ha asociado con la producción de algunas proteínas relacionadas con patogénesis (PR), y los estudios realizados han identificado 17 clases de PR, de las cuales la mayoría han demostrado que ejercen actividad antimicrobiana directa contra especies fúngicas (Phukan et al., 2017; Boller, 2018).

La realización de estudios de plantas tratadas con etileno ha demostrado un aumento de la susceptibilidad o resistencia, dependiendo de la interacción planta-patógeno (Dey et al., 2015; Mousavi-Derazmahalleh et al., 2019).

Señalización dependiente de AJ: se produce en respuesta al ataque de un patógeno y consecuente incremento en la expresión de genes de defensa como por ejemplo *PDF1.2* (plant defensin 1.2) La señalización del AJ es también importante en la fertilidad y respuesta a heridas. Algunos genes regulados por AJ lo son también por ET (Robert-Seilaniantz et al., 2011; Zhou et al., 2020).

El gen *JAR 1* (jasmonato resistente 1) de *Arabidopsis* es un regulador positivo de la señalización del AJ. *JAR 1* codifica una AJ-amino sintasa que puede conjugar el AJ a varios aminoácidos y se ha sugerido que AJ-Isoleucina (AJ-Ile) es la forma activa del AJ (Zdyb et al., 2018). La coronatina insensitive 1 (COI1), es una fitotoxina relacionada estructural y biológicamente con el Ja-Ile. *COI1* codifica para una proteína tipo F-box lo que sugiere que la respuesta a los jasmonatos implicaría la degradación de un grupo de represores de los jasmonatos conocidos como JAZ que poseen el dominio ZIM dependiente de SCFCOI1 (Ahmad et al., 2016). El complejo proteico SCF pertenece al tipo E3 ubiquitina ligasa que media la ubiquitinación de proteínas para su degradación por el proteosoma 26S. Dicho complejo contiene varias proteínas F-box que se unen directamente con el blanco de la ubiquitinación. COI1 se une a las proteínas JAZ, que actúan como reguladores negativos de la transcripción de genes de respuesta a jasmonatos, las cuales interactúan con el factor de transcripción MYC2 interfiriendo con la función de este activador transcripcional (Yang et al., 2019). Algunos genes *JAZ* son auto regulados en respuesta a jasmonatos, indicando un mecanismo de retroalimentación negativa. Análisis bioquímicos han mostrado que la coronatina se une al complejo COI1-JAZ con alta afinidad, donde el JA-Ile es la molécula activa. Por lo tanto, el complejo SCFCOI1 sirve como receptor para el JA-Ile para estabilizar la interacción entre la proteína tipo F-box y su sustrato, lo cual permite la degradación del represor JAZ y la liberación



del factor de transcripción MYC2, ocurriendo entonces la activación de los genes de respuesta a jasmonatos (Ahmad et al., 2016; Checker et al., 2018; Zdyb et al., 2018).

En *Arabidopsis*, los factores de transcripción ERF1, RAP2.6 y JIN1 son inducibles por AJ. ERF1 integra señales desde AJ y ET, su sobreexpresión resulta en la activación de muchos genes relacionados con defensa. JIN1 y ERF1 regulan distintos grupos de genes inducibles por AJ. Así los genes que son inducidos por ERF1 son represados por JIN1 y viceversa. RAP 2.6 juega un papel en la regulación de genes asociados en la biosíntesis de glucosinolato, demostrándose el control de la expresión de genes inducibles por AJ (Hickman et al., 2017).

Las señales derivadas de ácidos grasos afectan la expresión de genes inducibles por AJ (Checker et al., 2018). Recientemente se ha demostrado que el ácido 12-oxo-fitotodienoico (OPDA, del inglés 12-oxo-phytodienoic acid), un precursor biosintético del ácido jasmónico, puede inducir la expresión de genes que codifican señales de transducción (quinasas, componentes de señalización dependientes de Ca), factores de transcripción, proteínas relacionadas con respuesta al estrés, proteínas de choque térmico, hormonas, proteínas de metabolismo secundario y sistemas de transporte de iones y metales. Además, los resultados de este estudio demostraron que la vía de señalización de OPDA funciona independientemente de la señalización de AJ y su derivado Metil-AJ (Zdyb et al., 2018). Lo anterior sugiere que OPDA funciona por sí mismo como una molécula de señalización. La estructura carbonil  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado y la longitud de la cadena de carbonos con el grupo carboxil en OPDA parecen ser importantes para su función de señalización. Las diferencias en la localización celular de OPDA y AJ puede también influenciar sus funciones de señalización. OPDA es sintetizado en cloroplastos y es convertido a AJ por la acción de OPR3 y  $\beta$ -oxidación en peroxisomas (Checker et al., 2018; Zdyb et al., 2018).

### **Señalización dependiente de AS**

El ácido salicílico es una hormona vegetal importante que es mejor conocida por mediar las respuestas del huésped ante la infección por patógenos. Su papel en la activación de las defensas de las plantas está bien establecido, pero su biosíntesis en las plantas no se comprende completamente. Se considera que SA se deriva de dos posibles vías; la vía ICS y PAL, ambas partiendo del corismate (Vlot et al., 2009; Lefevere et al., 2020). Sin embargo, no todas las enzimas que catalizan estas vías se han identificado en plantas. La importancia de estas vías para la biosíntesis de SA varía en diferentes especies de plantas. En *Arabidopsis*, la vía ICS es la más importante, mientras que la vía PAL parece

ser más importante para la acumulación de SA en el arroz. También es posible que ambas vías contribuyan por igual, como es el caso de la soya. Además, la regulación de la biosíntesis de SA puede incluso ser diferente dentro de la planta (Zhang et al., 2019).

También cumple otras funciones fisiológicas como germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre estomático, expresión de genes asociados a senescencia, respuestas a estrés abiótico, termotolerancia basal y nodulación en leguminosas (Huang et al., 2019; Zhang et al., 2019). El AS juega un papel importante en la resistencia basal (PTI), ETI y RSA (Resistencia Sistémica Adquirida) (Baruah et al., 2020). El ataque por ciertos patógenos provoca la activación de señalización dependiente de AS. Los niveles de AS se elevan activando varios genes de defensa, incluyendo PR-1. Dos genes, PAD4 y EDS1 en Arabidopsis son requeridos para la inducción de AS. Estos genes codifican proteínas similares a triacilglicerol lipasas que interactúan con los productos de otros genes para inducir su expresión, como por ejemplo SID2 (codifica la proteína Isochorismate synthase) y EDS5 (codifica un transportador de la familia MATE, que transporta intermediarios de la biosíntesis de AS), genes necesarios para la biosíntesis de AS (Caarls et al., 2015; Lefevere et al., 2020; Yang et al., 2019).

El AS es requerido para la expresión de genes de defensa como PR-1 y para la RSA. En esta ruta de señalización NPR1 actúa corriente abajo del AS y cuando los niveles de AS son bajos, NPR1 está en una forma oligomérica en el citoplasma. Cuando los niveles incrementan, los oligómeros NPR1 se disocian en monómeros debido a la reducción de enlaces disulfuro que mantienen los monómeros unidos. Los monómeros entran al núcleo, donde interactúan con factores de transcripción tipo TGA, que son requeridos para la expresión de PR-1. La transcripción de WRKY70 también es requerida para la completa expresión de PR-1. La expresión de WRKY70 es inducible por AS y dependiente de NPR1, pero la interacción directa de WRKY70 y NPR1 no ha sido reportada (Lui et al., 2017; Y. Zhang et al., 2019). La organización de los eventos en la señalización de AS es complicada por el hecho de que la vía incluye varias retroalimentaciones. Por ejemplo, la muerte celular promueve la producción de AS, pero la producción de AS también promueve la muerte celular. PAD4 y EDS1 son requeridos para la producción de AS y la expresión de estos genes es aumentada por AS (Lefevere et al., 2020).

La señal de defensa del AS es potenciada por retroalimentación positiva del AS con óxido nítrico, ERO y los productos del gen EDS1 y PAD4. La señalización del AS está regulada por procesos independientes y dependientes de NPR1. La señal de AS interactúa con otras vías de señalización de

hormonas, antagoniza con AJ, ABA y auxina, mientras que el AJ y ABA reprimen la señalización del AS (Huang et al., 2019; Yang et al., 2019).

Varios estudios han demostrado el papel importante del  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina (CaM) en la regulación de la acumulación y señalización de AS. La unión de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM al factor de transcripción SR1 de *Arabidopsis* reprime la expresión de EDS1 y suprime la acumulación y defensa de AS (Lefevere et al., 2020; Wang et al., 2020). Otras vías de señalización que regulan la síntesis y acumulación de AS, involucra interacciones AS-proteína, proteína-proteína así como interacciones genéticas.

En el caso de los biotróficos la resistencia es mediada por genes *R* y señalización del AS. La respuesta hipersensible priva a estos patógenos de una fuente de alimento. Sin embargo, en el caso de los necrotrofos, parece que la muerte celular programada en el hospedero podría hacerles la vida más fácil. Esta idea está soportada por experimentos realizados en mutantes de *Arabidopsis*, en genes involucrados en las vías de señalización del AJ y AS donde se evidenció que hubo un efecto negativo en la resistencia a varios patógenos. La mutación *npr1* y el transgene NahG (Expresión del gen bacteriano *nahG*, que codifica la enzima metabolizante de AS, la salicilato hidrolasa, lo cual hace que estas plantas después de la infección con el patógeno, sean incapaces de acumular altos niveles de ácido salicílico y fallen para desarrollar RSA o expresar genes PR, además muestran una elevada susceptibilidad a patógenos virulentos y avirulentos), el cual bloquea la señalización de AS, generó pérdida de resistencia al oomycete biotrófico *Peronospora parasitica*, pero no tuvo un efecto sobre los hongos necrotrofos *Botrytis cinerea* o *Alternaria brassicicola* (Glazebrook, 2005; Vlot et al., 2009; Y. Zhang et al., 2019). Inversamente, la mutación *coi1*, la cual bloquea la señalización del ácido jasmónico, compromete severamente la resistencia a *A. brassicicola* o *B. cinerea*, pero no tiene efecto sobre la resistencia a *P. parasitica*. Estas observaciones condujeron a sugerir que las respuestas de la planta dependen del patógeno atacante, con defensas dependientes de AS actuando contra biotrofos y respuestas dependientes de AJ y ET actuando contra necrotrofos (Geeta et al., 2018; Jawhar et al., 2018).

### **Ácidos grasos como señales en la defensa de las plantas**

Los principales mediadores de vías de señalización de defensa de la planta son las fitohormonas ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno, ácido abscísico (ABA) y auxina, las cuales no solamente inducen individualmente respuestas de defensa, sino que interactúan sinérgica o antagónicamente para

promover la señalización. Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* muestran complicadas redes de señalización que involucran varias de estas fitohormonas (Genva et al., 2019). La evidencia reciente demuestra que el metabolismo de los ácidos grasos (AG) y carbohidratos juega un papel importante en la defensa de la planta y están involucrados con fitohormonas como AS, AJ y ABA. Los ácidos grasos son precursores de componentes de la cutícula o de la fitohormona ácido jasmónico y por esto se les han asignado papeles pasivos en la defensa contra patógenos. Sin embargo, recientes descubrimientos han demostrado papeles más directos de los ácidos grasos y sus productos de degradación en la inducción de diferentes respuestas de defensa. Así los ácidos grasos y sus derivados son importantes para la inmunidad basal y resistencia mediada por genes *R* en plantas. Por ejemplo, niveles reducidos de ácido oléico inducen resistencia de amplio espectro contra patógenos biotróficos al inducir la transcripción de múltiples genes *R* (Kachroo et al., 2009; Lim et al., 2017). Las plantas deficientes en ácido linoléico también lo son para la generación de ROS y subsecuente señalización durante la resistencia mediada por genes *R*.

La degradación de ácidos grasos ocurre principalmente en los peroxisomas y resulta en la producción de oxilipinas, las cuales participan en la señalización para inducir respuestas de defensa o como compuestos antimicrobianos. Las oxilipinas también forman parte de la cutina, el mayor componente de la cutícula de la planta. Los fitopatógenos inducen la actividad fosfolipasa de la planta, resultando en la liberación de ácidos grasos libres esenciales para la biosíntesis de oxilipinas. Una oxilipina bien estudiada es la fitohormona AJ y su éster volátil Metil-AJ. La planta acumula AJ y Me-AJ en respuesta a patógenos o elicitores derivados de patógenos. La aplicación exógena de AJ induce la expresión de genes relacionados con defensa y la acumulación de metabolitos secundarios antimicrobianos (Kachroo et al., 2009; Lim et al., 2017).

La identificación de componentes de señalización de las vías inducidas por AJ demostró el papel de las oxilipinas en la defensa de la planta. Mutaciones en el gen *coi1* volvieron a las plantas insensibles a la aplicación exógena de AJ y una intensa susceptibilidad a patógenos necrotróficos e insectos herbívoros. Interesantemente, la mutación *coi1* también intensificó la resistencia a patógenos biotróficos (Kachroo & Kachroo, 2009; Genva et al., 2019)

Otras oxilipinas como el AG cetodienólico sirve como molécula de señalización para inducir la expresión de genes RP y restringir el crecimiento del patógeno al inducir la muerte de las células infectadas. También cumplen una función fitoprotectiva durante la defensa de la planta, por ejemplo

los derivados oxidativos del AG trienólico protegen contra la muerte celular relacionada con ROS en *Arabidopsis* (Zhao, 2015; Genva et al., 2019).

En adición a las fito-oxilipinas, las oxilipinas derivadas del patógeno también sirven como elicitores de la defensa de la planta. Por ejemplo, los productos del rompimiento de AG originados del patógeno, como ácido araquidónico o ácido eicosapentanoico, estimulan la acumulación de compuestos antifúngicos y la actividad de enzimas asociadas a defensas en papa (Genva et al., 2019).

### **1.6.2 Resistencia gen a gen**

La resistencia específica está basada en el reconocimiento de la actividad de moléculas efectoras por proteínas de resistencia de la planta. En estas interacciones incompatibles la planta es resistente y puede exitosamente prevenir la colonización del patógeno (Aoun, 2017; Andersen et al., 2018).

Varios genes de resistencia que codifican proteínas similares a receptores han sido aislados desde una gran variedad de plantas, y los correspondientes genes de avirulencia *Avr* que son los efectores han sido caracterizados en varios casos (Bezerra-Neto et al., 2019; Shao et al., 2019). La información acerca de las vías de señalización activadas por la interacción de las proteínas R-*Avr* ha sido estudiada en diferentes patosistemas (Terauchi et al., 2019). La respuesta de la planta en interacciones susceptibles y resistentes puede incluir la generación de ROS y el incremento de los niveles de calcio intracelular y fosforilación de proteínas (Cui, 2015; Wang et al., 2020). Sin embargo, el tiempo y duración de estos eventos pueden diferir entre las dos clases de respuesta. En adición los genes relacionados con patogénesis están regulados positivamente no solamente en respuesta susceptible y resistente a patógenos, sino también en algunas relaciones simbióticas, sugiriendo que los elementos de las vías de señalización podrían ser comunes y que una red de comunicación dinámica debe ser establecida entre planta y microorganismo, así los diferentes resultados de cada interacción reflejan sus respectivas habilidades para adaptarse o evadir ataques o estrategias de defensa. Un paso inicial clave para descifrar las interacciones planta-microorganismo está en definir los componentes involucrados y los cambios transcripcionales que ocurren en ambas interacciones (Andersen et al., 2018; Bezerra-Neto et al., 2019; Huang et al., 2020).

Los análisis funcionales indican que en algunos casos las proteínas efectoras constituyen verdaderos factores de patogenicidad que son requeridos para la completa virulencia de los patógenos sobre sus plantas hospederas. Por ejemplo, los genes *Six1*, *Six2* y *Six3* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se

agrupan en una región genómica que confiere virulencia en plantas de tomate (Geeta et al., 2018; Shen et al., 2017). Otros efectores parecen trabajar en concierto y su contribución individual a la virulencia es frecuentemente menor, indetectable o redundante, así su delección no tiene efectos aparentes sobre la adaptabilidad o la virulencia (Terauchi et al., 2019)

Algunos efectores también tienen actividades de traslapar como el caso de los efectores Avr4 y Ecp6 de *C. fulvum* en el que ambos se unen a la quitina protegiendo potencialmente al hongo contra quitinasas de la planta y/o suprimiendo la PTI por remoción de los fragmentos de quitina liberados desde la pared celular fúngica en el apoplasto durante la infección. Finalmente, algunos efectores pueden jugar un papel más general en la virulencia, mientras que otros efectores que carecen de un papel claro en la virulencia parecen interferir con vías de señalización de defensa que son inducidos por otros efectores/factores Avr con un importante papel en la virulencia (Geeta et al., 2018; Shen et al., 2017).

La respuesta de defensa de la proteína NBS-LRR es una estrategia sofisticada que induce la inmunidad activada por efectores (ETI). Las proteínas NBS-LRR comprenden un dominio variable amino-terminal, un sitio central de unión a nucleótidos (NBS) y un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR) carboxi-terminal. Los dominios LRR, NBS, Kinasa y TIR de los productos del gen *R* son encontrados en numerosas proteínas eucarióticas que participan en cascadas de señales de transducción. Estos dominios son indispensables para la función del gen *R*. Aunque la función primaria de LRR es como la proteína de reconocimiento de la proteína Avr, también participa en la señalización corriente abajo. Los LRR se han encontrado en una variedad de proteínas que difieren en su función y localización en la célula y están implicados en interacciones proteína-proteína, adhesión celular y asociación a membrana (Bezerra-Neto et al., 2019). El dominio NBS se une e hidroliza ATP y funciona principalmente como un interruptor de transducción de señales después del reconocimiento de patógenos. Los LRR son dominios estructurales altamente adaptables que están involucrados en interacciones proteína-proteína, y estos LRR también pueden desarrollar especificidades de unión muy diferentes (Shao et al., 2019).

### **Reconocimiento de efectores por proteínas R**

Hasta la fecha, muchos genes *R* han sido clonados desde diferentes especies de plantas y los productos de estos genes muestran gran diversidad en sus propiedades estructurales (Pilet-Nayel et al., 2017; Terauchi et al., 2019). El reconocimiento de los factores de avirulencia del patógeno, por parte de las

proteínas R durante la infección, constituye uno de los mecanismos más sofisticados que las plantas desarrollaron para enfrentar el ataque patogénico. Dado que la relación que se establece, generalmente, entre el gen *R* y el gen de avirulencia (*Avr*) es uno a uno (gen por gen), en los últimos años se caracterizaron múltiples combinaciones gen *R*-gen *Avr*. La caracterización de los pares *R*-*Avr* confirmó la hipótesis de la relación gen por gen. Inicialmente, se afirmó que las proteínas R actuaban como receptores que interactuaban directamente con los productos de los genes *Avr*. El modelo más simple de percepción propuesto está basado en la interacción directa entre la proteína R y el efector. Este modelo es referido como receptor-ligando como se ha demostrado entre *Avr*-Pita de *Magnaporthe oryzae* y la proteína R Pi-ta de arroz, donde análisis mutacionales mostraron que una sola sustitución de aminoácido en el dominio LRR de esta proteína o en *Avr*-Pita puede romper la interacción física y eliminar las respuestas de defensa mediadas por Pi-ta (Terauchi et al., 2019). Esto implicaría que las plantas deberían tener muchas proteínas R que fueran capaces de reconocer todos los efectores y sus variantes alélicas. Por lo que en los últimos años se propusieron dos modelos para explicar cómo ocurre la percepción de los efectores, basados en evidencias obtenidas durante el estudio de las interacciones planta-patógeno: el modelo del guardián (*GuardModel*) y el modelo del señuelo (*DecoyModel*). El modelo guardián, permite la detección de múltiples efectores que interactúan con el mismo blanco del hospedero protegido por una sola proteína R. Un ejemplo de este modelo es la interacción entre *Avr2* y *Cf-2*, mediada por *Rcr3* en *C. fulvum*-tomate (Geeta et al., 2018). Por lo tanto, el reconocimiento indirecto le permite a las plantas monitorear múltiples efectores por un número relativamente pequeño de proteínas R, mientras la redundancia en guardianes permite el monitoreo de un blanco por diferentes proteínas R, como parece ser el caso para *Rlm4* y *Rlm7*, los cuales parecen cuidar el mismo blanco de virulencia de *AvrLm4-7* (Petit et al., 2017). El modelo del señuelo propuesto por Van der Hoorn y Kamoun (Van Der Hoorn et al., 2008), plantea que las moléculas en el hospedero, que se monitorean por la proteína R, son señuelos que imitan o simulan a las moléculas "*target*" del efector en el hospedero. Por tanto, el señuelo solo funciona en el mecanismo de percepción, sin contribuir a la función de virulencia del efector en la ausencia de la correspondiente proteína R; sin embargo, resulta necesario para la función de la misma. El señuelo no tiene función en la defensa del hospedero (Kourelis et al., 2020).

### **1.6.3 Relevancia de la regulación del metabolismo de carbohidratos para las interacciones planta patógeno**

Debido a la alta demanda de carbohidratos durante la infección, las plantas desarrollaron estrategias para modular su disponibilidad de carbohidratos y desencadenar respuestas de defensa. La acumulación de hexosas conduce a una inducción de los genes relacionados con patogénesis, una regulación a la baja de la fotosíntesis y el establecimiento de barreras químicas y físicas (Ikeda et al., 2019; Kanwar et al., 2018). Durante la infección, los patógenos reasignan los azúcares de las plantas para sus propias necesidades, lo que obliga a las plantas a modificar su contenido de azúcar y desencadena sus respuestas de defensa. Entre las enzimas que hidrolizan la sacarosa y alteran la distribución de carbohidratos, se ha informado que las invertasas se ven afectadas durante las interacciones planta-patógeno. Esta enzima extracelular hidroliza la sacarosa en el apoplasto en glucosa y fructosa. Las hexosas son transportadas a la célula, por lo tanto, las invertasas son importantes descargando el floema apoplástico y enzimas claves en la determinación en la intensidad de daño (Kanwar et al., 2018). Aún cuando la represión de la fotosíntesis y la inducción en la depresión del metabolismo parece ser una respuesta general a la infección del patógeno, el efecto sobre los niveles de azúcares varía considerablemente entre diferentes interacciones planta-patógeno (Andersen et al., 2018). Los azúcares no son solamente nutrientes necesarios para el crecimiento, respiración y la acumulación de compuestos de almacenamiento, sino que además los azúcares son señales las cuales pueden regular la expresión de genes. Varias enzimas relacionadas con el azúcar, transportadores y moléculas de señalización que se inducen durante la invasión de patógenos pueden regular los procesos de defensa de las plantas (Kanwar et al., 2018; Ikeda et al., 2019).

Cuando el patógeno biotrófo ataca inicia una serie de cambios rápidos que resultan en una disminución de la fotosíntesis e incremento de la respiración, foto-respiración y actividad de la enzima invertasa. La oxilipina 12-oxo-fitodienoico, es un compuesto que ha demostrado acumularse después de la infección del patógeno y conduce a una disminución en la fotosíntesis poco después de su aplicación, sugiriendo que este podría estar involucrada en la disminución de este proceso (Genva et al., 2019). Las hexosas liberadas por acción de la actividad incrementada de las invertasas actúan como moléculas de señalización y reprimen los genes fotosintéticos. Esta regulación de los genes fotosintéticos a su vez de nuevo disminuye la tasa neta de fotosíntesis. Aunque la mayoría de las interacciones planta-hongo fitopatógeno se ajustan a este modelo general, hay algunos ejemplos que



difieren en distintos puntos. Por ejemplo, la acumulación de hexosas y la represión de genes fotosintéticos no siempre ha sido observada, lo cual apoya la complejidad de las interacciones, la cual está basada fundamentalmente en la diversidad de plantas como de microorganismos (Kanwar et al., 2018).

Existen varios factores que contribuyen a la complejidad de la relación mutua entre nivel de carbohidratos y desarrollo de enfermedad o de generación de resistencia. Primero, el nivel de carbohidratos afecta la defensa, como el metabolismo general de la planta. Segundo, los azúcares no son solo nutrientes y señales para la planta sino también para el microorganismo. Por lo tanto, los cambios en los niveles de asimilados pueden influir en la diseminación del patógeno y regular la expresión de genes de este. Tercero, ciertos patógenos también poseen enzimas sucrolíticas extracelulares, como invertasas, fructoexohidrolasas y levanosucrosas. Con la expresión de estas enzimas el patógeno podría ser capaz de alterar los niveles de hexosa y sucrosa en el apoplasto de la planta (Geeta et al., 2018; Kanwar et al., 2018).

#### **1.6.4 Interacción palma - *Thielaviopsis paradoxa***

En el presente documento abordaremos una enfermedad en palma de aceite que se presenta en palmas jóvenes que son afectadas por un patógeno que genera marchitamiento y necrosis de la flecha, que se caracteriza por una podredumbre marrón que se extiende desde la superficie hacia adentro. El tejido cultivado permitió el aislamiento de un hongo que tenía características morfológicas que coincidieron con las descripciones de *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn (Suleman et al., 2001; Abbas et al., 2003; Warwick et al., 2009;). Los experimentos de inoculación del patógeno y reisolamiento, permitieron demostrar los postulados de Koch y reproducir los síntomas de pudrición similares a los encontrados en campo. Por lo tanto, establecer los genes involucrados en la respuesta a la infección por *T. paradoxa* en la palma ayudará a entender los mecanismos de defensa durante la interacción hospedero-patógeno. Esta investigación se centró en el análisis del transcriptoma a través de la secuenciación de segunda generación (Illumina - RNASeq), de tejidos de palma (estípites) desafiados con *T. paradoxa*, con el objetivo de analizar la respuesta global de la planta a la infección. El análisis bioinformático integrado con la validación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real permitió la identificación de genes regulados por la infección de *T. paradoxa*. Los nuevos

genes identificados en respuesta a la infección por hongos y el transcriptoma de referencia desarrollado servirán como un recurso importante para el establecimiento de estrategias para el control de este patógeno, que debido a su amplio rango de hospedadores le está dando el potencial para convertirse en un patógeno de plantas económicamente importantes.

RNA-Seq sirve como una herramienta poderosa para identificar nuevos genes y variantes de empalme, transcritos de baja abundancia y marcadores moleculares funcionales. RNA-Seq se ha convertido en el método de elección sobre las tecnologías tradicionales de secuenciación y microarrays de Sanger en un par de años debido a su rápido descenso en los costos y la alta profundidad de secuenciación. El análisis de los datos de RNA-Seq implica múltiples pasos desde el filtrado de las lecturas sin procesar hasta la identificación de genes regulados diferencialmente y transcritos novedosas en una muestra determinada. Hay muchos métodos y herramientas disponibles para analizar los enormes puntos de datos generados por el método RNA-Seq (Harismendy et al., 2009; Henschel et al., 2012; Langmead et al., 2012; Nelson et al., 2017).

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son los mecanismos moleculares que difieren entre los materiales resistentes y susceptibles a *Thielaviopsis paradoxa*?

## **HIPÓTESIS**

Los perfiles de expresión de los genes relacionados con defensa variarán de acuerdo a la susceptibilidad de los cultivares.

### **1.7 OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la expresión de genes durante la interacción palma de aceite - *Thielaviopsis paradoxa* (agente causal de la pudrición de la flecha).

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar diferentes métodos de inoculación de *T. paradoxa* en plántulas de palma de aceite y caracterizar microscópicamente la interacción planta-patógeno.
- Evaluar el perfil transcripcional de un genotipo susceptible y uno resistente del híbrido OxG de palma de aceite para caracterizar la interacción palma - *T. paradoxa*.
- Identificar los principales genes expresados por *T. paradoxa* durante la interacción con híbridos OxG de palma de aceite.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, E. H., & Abdulla, A. S. (2003). First report of neck bending disease on date palm in Qatar. *Plant Pathology*, 52(6), 790. doi: 10.1111/j.1365-3059.2003.00899.x
- Ahmad, P., Rasool, S., Gul, A., Sheikh, S. A., Akram, N. A., Ashraf, M., Kazi, A. M., & Guzel, S. (2016). Jasmonates: Multifunctional roles in stress tolerance. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Issue JUNE2016). Frontiers Research Foundation. doi: 10.3389/fpls.2016.00813
- Al-Obaidi, J. R., Hussin, S. N. I. S., Saidi, N. B., Rahmad, N., & Idris, A. S. (2017). Comparative proteomic analysis of *Ganoderma* species during in vitro interaction with oil palm root. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 99, 16–24. doi: 10.1016/J.PMPP.2017.02.001
- Ali, M., Cheng, Z., Ahmad, H., & Hayat, S. (2018). Reactive oxygen species (ROS) as defenses against a broad range of plant fungal infections and case study on ros employed by crops against verticillium dahlia wilts. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 353–363. doi: 10.1080/17429145.2018.1484188
- Andersen, E. J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., & Nepal, M. P. (2018). Disease resistance mechanisms in plants. In *Genes* (Vol. 9, Issue 7, p. 339). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. doi: 10.3390/genes9070339
- Aoun, M. (2017). Host defense mechanisms during fungal pathogenesis and how these are overcome in susceptible plants: A review. In *International Journal of Botany* (Vol. 13, Issue 2, pp. 82–102). doi: 10.3923/ijb.2017.82.102
- Barba, J., Orellana, F., Vallejo, G., & Manzano, R. (2010). Evaluación agronómica de híbridos interespecíficos de palma de aceite O x G (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*) provenientes de diversos orígenes americanos y su tolerancia a la pudrición del cogollo. *Palma (Ecuador)*, 11–15. Retrieved from <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/6/6>
- Baruah, I., Baldodiya, G. M., Sahu, J., & Baruah, G. (2020). Dissecting the Role of Promoters of Pathogen-sensitive Genes in Plant Defense. *Current Genomics*, 21(7), 491–503. doi: 10.2174/1389202921999200727213500
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1229–1240. doi: 10.1093/JXB/ERT375
- Bayona-Rodríguez, C. J., Ochoa-Cadavid, I., & Romero, H. M. (2016). Impacts of the dry season on the gas exchange of oil palm (*Elaeis guineensis*) and interspecific hybrid (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*) progenies under field conditions in eastern Colombia. *Agronomía Colombiana*, 34(3), 329–335. doi: 10.15446/AGRON.COLOMB.V34N3.55565
- Bezerra-Neto, J. P., Araújo, F. C., Ferreira-Neto, J. R. C., Silva, R. L. O., Borges, A. N. C., Matos, M. K. S., Silva, J. B., Silva, M. D., Kido, E. A., & Benko-Iseppon, A. M. (2019). NBS-LRR genes-Plant health sentinels: Structure, roles, evolution and biotechnological applications. In *Applied Plant Biotechnology for Improving Resistance to Biotic Stress* (pp. 63–120). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-816030-5.00004-5
- Binder, B. M., Chang, C., & Schaller, G. E. (2018). Perception of Ethylene by Plants - Ethylene Receptors. In *Annual Plant Reviews online* (pp. 117–145). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/9781119312994.apr0477
- Boller, T. (2018). Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In *The Plant Hormone Ethylene* (pp. 293–314). doi: 10.1201/9781351075763
- Caarls, L., Pieterse, C. M. J., & Van Wees, S. C. M. (2015). How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Frontiers in Plant Science*, 6(MAR). doi: 10.3389/fpls.2015.00170
- Caudwell, R. W. (2001). Insect pollination of oil palm-time to evaluate the long-term viability and sustainability of *Elaeidiobius kamerunicus*? In *Planter* (Vol. 77, Issue 901, pp. 181–190). Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013107000>
- Cesari, S. (2018). Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytologist*, 219(1), 17–24. doi: 10.1111/nph.14877
- Checker, V. G., Kushwaha, H. R., Kumari, P., & Yadav, S. (2018). Role of phytohormones in plant defense: Signaling and cross talk. In *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (pp. 159–184). Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-7371-7\_7
- Chinchilla, C. (2008). Las pudriciones del cogollo en palma aceitera : La complejidad del desorden y una guía de convivencia. *ASD Oil Palm Papers*, 32, 11–23. Retrieved from [http://www.asd-cr.com/images/PDFs/OilPalmPapers/Muchas\\_caras\\_de\\_PC\\_32\\_2008.pdf](http://www.asd-cr.com/images/PDFs/OilPalmPapers/Muchas_caras_de_PC_32_2008.pdf)
- Cochard, B., Adon, B., Rekima, S., Billotte, N., De Chenon, R. D., Koutou, A., Nouy, B., Omoré, A., Purba, A. R., Glazsmann, J. C., & Noyer, J. L. (2009). Geographic and genetic structure of African oil palm diversity suggests new approaches to breeding. *Tree Genetics and Genomes*, 5(3), 493–504. doi: 10.1007/s11295-009-0203-3

- Corley, R., & Tinker, P. (2008). *The oil palm*. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=NtCo1TdXuQkC&oi=fnd&pg=PR5&dq=introduction+of+oil+palm+in+america&ots=CDvHgJ2iKI&sig=CYTqjFIIBsFnsGVVnAfKhDBLiRs>
- De Assis Costa, O. Y., Tupinambá, D. D., Bergmann, J. C., Barreto, C. C., & Quirino, B. F. (2018). Fungal diversity in oil palm leaves showing symptoms of Fatal Yellowing disease. *PLoS ONE*, *13*(1). doi: 10.1371/journal.pone.0191884
- De Franqueville, H. (2003). Oil palm bud rot in Latin America. In *Experimental Agriculture* (Vol. 39, Issue 3, pp. 225–240). Cambridge University Press. doi: 10.1017/S0014479703001315
- Devendrakumar, K. T., Li, X., & Zhang, Y. (2018). MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences* *2018* *75:16*, 75(16), 2981–2989. doi: 10.1007/S00018-018-2839-3
- Dey, S., & Corina Vlot, A. (2015). Ethylene responsive factors in the orchestration of stress responses in monocotyledonous plants. *Frontiers in Plant Science*, *6*(AUG), 28. doi: 10.3389/fpls.2015.00640
- Dhillon, B., Hamelin, R. C., & Rollins, J. A. (2021). Transcriptional profile of oil palm pathogen, *Ganoderma boninense*, reveals activation of lignin degradation machinery and possible evasion of host immune response. *BMC Genomics*, *22*(1). doi: 10.1186/S12864-021-07644-9
- Dian, N. L. H. M., Hamid, R. A., Kanagaratnam, S., Isa, W. R. A., Hassim, N. A. M., Ismail, N. H., Omar, Z., & Sahri, M. M. (2017). Palm oil and palm kernel oil: Versatile ingredients for food applications. *Journal of Oil Palm Research*, *29*(4), 487–511. doi: 10.21894/jopr.2017.00014
- Dievart, A., Gottin, C., Périn, C., Ranwez, V., & Chantret, N. (2020). Origin and Diversity of Plant Receptor-Like Kinases. *Annual Review of Plant Biology*, *71*(1). doi: 10.1146/annurev-arplant-073019-025927
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology*, *42*(1), 185–209. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421
- Fedepalma. (2020). *Anuario estadístico 2020. Principales cifras de la agroindustria de la palma de aceite en Colombia y en el mundo*. 238. Retrieved from <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/anuario/article/view/13235/13024>
- Fontanilla, C. A., Montoya, M. M., Ruiz, E., Sánchez, A. C., Arias, N., Guerrero, J. M., Castro, W., & Penagos, Y. (2014). Estimación de costos de manejo de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite. *Revista Palmas*, *35*(2), 23–37. Retrieved from <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/10977>
- Forster, B. P., Sitepu, B., Setiawati, U., Kelanaputra, E. S., Nur, F., Rusfiandi, H., Rahmah, S., Ciomas, J., Anwar, Y., Bahri, S., & Caligari, P. D. S. (2017). Oil palm (*Elaeis Guineensis*). In *Genetic Improvement of Tropical Crops* (pp. 241–290). Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-59819-2\_8
- Franqueville, H. De. (2001). *Oil palm bud rot in Latin America: preliminary review of established facts and achievements*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2019158941>
- Geeta, & Mishra, R. (2018). Fungal and bacterial biotrophy and necrotrophy. In *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (pp. 21–42). Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-7371-7\_2
- Genva, M., Obounou Akong, F., Andersson, M. X., Deleu, M., Lins, L., & Fauconnier, M. L. (2019). New insights into the biosynthesis of esterified oxylipins and their involvement in plant defense and developmental mechanisms. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 18, Issue 1, pp. 343–358). Springer Netherlands. doi: 10.1007/s11101-018-9595-8
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *43*(1), 205–227. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923
- H Cui, K. T. J. P. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annu Rev Plant Biol*, *66*, 487–511. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040012
- Hafizi, R., Salleh, B., & Latiffah, Z. (2013). Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(3), 959–968. doi: 10.1590/S1517-83822013000300047
- Harismendy, O., Ng, P. C., Strausberg, R. L., Wang, X., Stockwell, T. B., Beeson, K. Y., Schork, N. J., Murray, S. S., Topol, E. J., Levy, S., & Frazer, K. A. (2009). Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biology*, *10*(3). doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r32
- Henders, S., Martin Persson, U., Kastner, T., Meyfroidt, P., Carlson, K. M., Fagan, M. E., al, Richard Furumo, P., & Mitchell Aide, T. (2017). Characterizing commercial oil palm expansion in Latin America: land use change and trade Related content Trading forests: land-use change and carbon emissions embodied in production and exports of forest-risk commodities Multiple pathways of commodity crop expansion in tropical forest landscapes Characterizing commercial oil palm expansion in Latin America: land use change and trade. *Iopscience.Iop.Org*. doi: 10.1088/1748-9326/aa5892

- Henschel, R., Nista, P. M., Lieber, M., Haas, B. J., Wu, L. S., & Leduc, R. D. (2012). Trinity RNA-Seq assembler performance optimization. *ACM International Conference Proceeding Series*. doi: 10.1145/2335755.2335842
- Hickman, R., Van Verk, M. C., Van Dijken, A. J. H., Mendes, M. P., Vroegop-Vos, I. A., Caarls, L., Steenbergen, M., Van der Nagel, I., Wesselink, G. J., Jironkin, A., Talbot, A., Rhodes, J., De Vries, M., Schuurink, R. C., Denby, K., Pieterse, C. M. J., & Van Wees, S. C. M. (2017). Architecture and dynamics of the jasmonic acid gene regulatory network. *Plant Cell*, 29(9), 2086–2105. doi: 10.1105/tpc.16.00958
- Hormaza, P., Fuquen, E. M., & Romero, H. M. (2012). Phenology of the oil palm interspecific hybrid *Elaeis oleifera* × *Elaeis guineensis*. In *Scientia Agricola* (Vol. 69, Issue 4, pp. 275–280). doi: 10.1590/S0103-90162012000400007
- Huang, W., Wang, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2019). Biosynthesis and Regulation of Salicylic Acid and N-Hydroxy-pipecolic Acid in Plant Immunity. *Molecular Plant*. doi: 10.1016/J.MOLP.2019.12.008
- Huang, X. F., Bi, C. Y., Shi, Y. Y., Hu, Y. Z., Zhou, L. X., Liang, C. X., Huang, B. F., Xu, M., Lin, S. Q., & Chen, X. Y. (2020). Discovery and analysis of NBS-LRR gene family in sweet potato genome. *Acta Agronomica Sinica(China)*, 46(8), 1195–1207. doi: 10.3724/SP.J.1006.2020.94163
- Ikeda, K., Park, P., & Nakayashiki, H. (2019). Cell biology in phytopathogenic fungi during host infection: commonalities and differences. In *Journal of General Plant Pathology* (Vol. 85, Issue 3, pp. 163–173). Springer Tokyo. doi: 10.1007/s10327-019-00846-w
- Imran, Q., Biotechnology, B. Y.-J. of C. S. and, & 2020, undefined. (2020). Pathogen-induced Defense Strategies in Plants. *Springer*, 23(2), 97–105. doi: 10.1007/s12892-019-0352-0
- Ithnin, M., & Kushairi, A. (2020). *The Oil Palm Genome* (M. Ithnin & A. Kushairi (eds.)). Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-030-22549-0
- J Bigeard, J. C. H. H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol Plant*, 8(4), 521–539. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.022
- Jawhar, M., Al-daoude, A., Shoaib, A., Mycopath, E. A.-S.-, & 2018, U. (2018). Differential gene behavior in barley plants challenged with biotrophic and necrotrophic pathogens. *MYCOPATH*, 15(1). Retrieved from <http://111.68.103.26/journals/index.php/mycopath/article/view/1308>
- Jose, J., Ghantasala, S., & Choudhury, S. R. (2020). Arabidopsis transmembrane receptor-like kinases (RLKS): A bridge between extracellular signal and intracellular regulatory machinery. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 11, pp. 1–29). doi: 10.3390/ijms21114000
- Kachroo, A., & Kachroo, P. (2009). Fatty acid-derived signals in plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 153–176. doi: 10.1146/ANNUREV-PHYTO-080508-081820
- Kanwar, P., & Jha, G. (2018). Alterations in plant sugar metabolism: signatory of pathogen attack. *Planta 2018 249:2*, 249(2), 305–318. doi: 10.1007/S00425-018-3018-3
- Khatiwada, D., Palmén, C., Silveira, S., & Palm, C. (2018). Evaluating the palm oil demand in Indonesia: production trends, yields, and emerging issues. *Taylor & Francis*, 12(2), 135–147. doi: 10.1080/17597269.2018.1461520
- Kourelis, J., Malik, S., Mattinson, O., Krauter, S., Kahlon, P. S., Paulus, J. K., & Hoorn, R. A. L. van der. (2020). Evolution of a guarded decoy protease and its receptor in solanaceous plants. *Nature Communications 2020 11:1*, 11(1), 1–15. doi: 10.1038/s41467-020-18069-5
- Kudla, J., Becker, D., Grill, E., Hedrich, R., Hippler, M., Kummer, U., Parniske, M., Romeis, T., & Schumacher, K. (2018). Advances and current challenges in calcium signaling. In *New Phytologist* (Vol. 218, Issue 2, pp. 414–431). Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1111/nph.14966
- Lai, O., Tan, C., & Akoh, C. (2015a). *Palm oil: production, processing, characterization, and uses*. Retrieved from [https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=6uRxCGAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=oil+palm+uses&ots=Xy2AKT\\_47t&sig=FEBqshXU3fG4GCTRQQbJXIXkBP4](https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=6uRxCGAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=oil+palm+uses&ots=Xy2AKT_47t&sig=FEBqshXU3fG4GCTRQQbJXIXkBP4)
- Lai, O., Tan, C., & Akoh, C. (2015b). *Palm oil: production, processing, characterization, and uses*. Retrieved from [https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=6uRxCGAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=introduction+of+oil+palm+in+malaysia&ots=XzWCGY-beo&sig=Z-k-9r\\_u1YVli0ejoItFdWptDxo](https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=6uRxCGAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=introduction+of+oil+palm+in+malaysia&ots=XzWCGY-beo&sig=Z-k-9r_u1YVli0ejoItFdWptDxo)
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
- Lefevre, H., Bauters, L., & Gheysen, G. (2020). Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 338. doi: 10.3389/FPLS.2020.00338
- Li, F. H., Sun, X. D., Niu, X. Q., Cao, H. X., & Yu, F. Y. (2018). First report of basal stem rot on oil palm caused by *thielaviopsis Paradoxa* in Hainan, China. *Plant Disease*, 102(10), 2029. doi: 10.1094/PDIS-01-18-0009-PDN
- Lim, G. H., Singhal, R., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2017). Fatty Acid- and Lipid-Mediated Signaling in Plant Defense. In *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 55, pp. 505–536). Annu Rev Phytopathol. doi:

- 10.1146/annurev-phyto-080516-035406
- Lui, S., Luo, C., Zhu, L., Sha, R., Qu, S., Cai, B., & Wang, S. (2017). Identification and expression analysis of WRKY transcription factor genes in response to fungal pathogen and hormone treatments in apple (*Malus domestica*). *Journal of Plant Biology*, *60*(2), 215–230. doi: 10.1007/s12374-016-0577-3
- MADR. (2020). Cadena de palma de aceite, indicadores e instrumentos. *Lecturas de Economía*, 1–25. Retrieved from [https://sioc.minagricultura.gov.co/Palma/Documentos/2020-03-30 Cifras Sectoriales.pdf](https://sioc.minagricultura.gov.co/Palma/Documentos/2020-03-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf)
- Malike, F. A., Amiruddin, M. D., Yaakub, Z., Marjuni, M., Abdullah, N., Abu Bakar, N. A., Mustaffa, S., Mohamad, M. M., Hassan, M. Y., Abdullah, M. O., Ghulam Kadir, A. P., & Din, A. K. (2019). Oil palm (*Elaeis spp.*) breeding in Malaysia. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops* (Vol. 6, pp. 489–535). Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-030-23265-8\_13
- Martínez, G. (2010). Pudrición del cogollo, Marchitez sorpresiva, Anillo rojo y Marchitez letal en la palma de aceite en América. In *PALMAS* (Vol. 31, Issue 1). Retrieved from <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1471>
- Mattoo, A. K., & White, W. B. (2018). Regulation of Ethylene Biosynthesis. *The Plant Hormone Ethylene*, 21–42. doi: 10.1201/9781351075763-2/REGULATION-ETHYLENE-BIOSYNTHESIS-AUTAR-MATTOO-BRUCE-WHITE
- Meerow, A. W., Krueger, R. R., Singh, R., Low, E. T. L., Ithnin, M., & Ooi, L. C. L. (2012). Coconut, date, and oil palm genomics. In *Genomics of Tree Crops* (Vol. 9781461409205, pp. 299–351). Springer New York. doi: 10.1007/978-1-4614-0920-5\_10
- Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual Review of Phytopathology*, *51*(1), 245–266. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102314
- Mithöfer, A., Ebel, J., & Felle, H. H. (2007). Cation Fluxes Cause Plasma Membrane Depolarization Involved in  $\beta$ -Glucan Elicitor-Signaling in Soybean Roots. <http://Dx.Doi.Org/10.1094/MPMI-18-0983>, *18*(9), 983–990. doi: 10.1094/MPMI-18-0983
- Montoya, M. M., Díaz, C. A. F., Zúñiga, E., Escobar, G., Cadena, Y., León, N., & Velasco, C. (2017). Una experiencia de coordinación de acciones para enfrentar la Pudrición del cogollo: costos asociados a su manejo curativo. *Revista Palmas*, *38*(2), 51–62. Retrieved from <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/12124>
- Mousavi-Derazmahalleh, M., Chang, S., Thomas, G., Derbyshire, M., Bayer, P. E., Edwards, D., Nelson, M. N., Erskine, W., Lopez-Ruiz, F. J., Clements, J., & Hane, J. K. (2019). Prediction of pathogenicity genes involved in adaptation to a lupin host in the fungal pathogens *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* via comparative genomics. *BMC Genomics*, *20*(1). doi: 10.1186/s12864-019-5774-2
- MUJICA GRANADOS, C. (2010). *EVOLUCIÓN DEL SECTOR PALMICULTOR CAROLINA MUJICA GRANADOS BUCARAMANGA 2010 CONTENIDO*.
- Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2015). Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiology*, *169*(1), 32–41. doi: 10.1104/pp.15.00677
- Nambiappan, B., Ismail, A., Hashim, N., Ismail, N., Shahari, D. N., Idris, N. A. N., Omar, N., Salleh, K. M., Hassan, N. A. M., & Kushairi, A. (2018). Malaysia: 100 years of resilient palm oil economic performance. In *Journal of Oil Palm Research* (Vol. 30, Issue 1, pp. 13–25). doi: 10.21894/jopr.2018.0014
- Nelson, J. W., Sklenar, J., Barnes, A. P., & Minnier, J. (2017). The START App: A web-based RNAseq analysis and visualization resource. *Bioinformatics*, *33*(3), 447–449. doi: 10.1093/bioinformatics/btw624
- Ochoa, J. C., Herrera, M., Navia, M., & Romero, H. M. (2019). Visualization of *Phytophthora palmivora* Infection in Oil Palm Leaflets with Fluorescent Proteins and Cell Viability Markers. *The Plant Pathology Journal*, *35*(1), 19. doi: 10.5423/PPJ.OA.02.2018.0034
- Pardey, Á. E. B. (2019). Impact of Defoliating Insects on Oil Palm Production in Colombia. In *Revista Palmas* (Vol. 40, Issue 4). Retrieved from <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/12948>
- Pattyn, J., Vaughan-Hirsch, J., Phytologist, B. V. de P.-N., & 2021, undefined. (2021). The regulation of ethylene biosynthesis: A complex multilevel control circuitry. *Wiley Online Library*, *229*(2), 770–782. doi: 10.1111/nph.16873
- Petit, Y., Blaise, F., Plissonneau, C., Rouxel, T., Balesdent, M.-H., Blondeau, K., Noureddine, L., Gallay, I., Moigne, T. Le, Tilbeurgh, H. van, & Fudal, I. (2017). *Structural and functional characterization of Leptosphaeria maculans effectors: the example of AvrLm4-7*. P;231. Retrieved from <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01530816>
- Phukan, U. J., Jeena, G. S., Tripathi, V., & Shukla, R. K. (2017). Regulation of Apetala2/Ethylene response factors in plants. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 150. doi: 10.3389/fpls.2017.00150
- Pilet-Nayel, M. L., Moury, B., Caffier, V., Montarry, J., Kerlan, M. C., Fournet, S., Durel, C. E., & Delourme, R.

- (2017). Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8, p. 27). Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fpls.2017.01838
- Ponnamma, K., Sajeebkhan, A., & Vijayan, A. (2006). Adverse factors affecting the population of pollinating weevil, *Elaeidobius kamerunicus* F. and fruit set on oil palm in India. *Planter*, 82, 555–557. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20063220849>
- Purnama, K. O., Setyaningsih, D., Hambali, E., & Taniwiryo, D. (2020). Processing, Characteristics, and Potential Application of Red Palm Oil-a review. *International Journal of Oil Palm*, 3(2), 40–55. doi: 10.35876/ijop.v3i2.47
- R.N. Warwick, D., & E.M. Passos, E. (2009). Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 34(3), 175–177. doi: 10.1590/s1982-56762009000300007
- Rival, A., Beule, T., Barre, P., Hamon, S., Duval, Y., & Noirot, M. (1997). Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* jacq) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell Reports*, 16(12), 884–887. doi: 10.1007/s002990050339
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. G. (2011). Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 317–343. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114447
- Ruiz, E., Tovar, J. P., Ospina, C., Rojas, L., Hernández, D., Rosero, G., Hernández, M., Rubiano, M., Suesca, F., Verdugo, J., & Mosquera, M. (2020). Costos de control de la Marchitez letal en plantaciones colombianas localizadas en la región del Bajo Upía. *Palmas*, 41(3), 38–52. Retrieved from <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/13230>
- Segal, L. M., & Wilson, R. A. (2018). Reactive oxygen species metabolism and plant-fungal interactions. In *Fungal Genetics and Biology* (Vol. 110, pp. 1–9). Academic Press Inc. doi: 10.1016/j.fgb.2017.12.003
- Shao, Z. Q., Xue, J. Y., Wang, Q., Wang, B., & Chen, J. Q. (2019). Revisiting the Origin of Plant NBS-LRR Genes. In *Trends in Plant Science* (Vol. 24, Issue 1, pp. 9–12). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.tplants.2018.10.015
- Shen, Y., Liu, N., Li, C., Wang, X., Xu, X., Chen, W., Xing, G., & Zheng, W. (2017). The early response during the interaction of fungal phytopathogen and host plant. In *Open Biology* (Vol. 7, Issue 5). Royal Society of London. doi: 10.1098/rsob.170057
- Silva, C. da, Macambira, L., ... É. M.-R. B., & 2016, undefined. (n.d.). Spatial distribution red ring (*Bursaphelenchus cocophilus*) and resinose (*Thielaviopsis paradoxa*) in coconut plantations. *Cabdirect.Org*. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173164943>
- Spanu, P. D., & Panstruga, R. (2017). Editorial: Biotrophic plant-microbe interactions. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8). Frontiers Research Foundation. doi: 10.3389/fpls.2017.00192
- Suleman, P., Al-Musallam, A., & Menezes, C. A. (2001). Incidence and severity of black scorch on date palms in Kuwait. *Kuwait Journal of Science and Engineering*, 28(1), 160–169. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/294761747\\_Incidence\\_and\\_severity\\_of\\_black\\_scorch\\_on\\_date\\_palm\\_s\\_in\\_Kuwait](https://www.researchgate.net/publication/294761747_Incidence_and_severity_of_black_scorch_on_date_palm_s_in_Kuwait)
- Sundram, S., & Intan-Nur, A. M. A. (2017). South American Bud rot: A biosecurity threat to South East Asian oil palm. In *Crop Protection* (Vol. 101, pp. 58–67). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.cropro.2017.07.010
- Tameling, W. I. L., & Joosten, M. H. a. J. (2007). The diverse roles of NB-LRR proteins in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(4–6), 126–134. doi: 10.1016/j.pmpp.2007.12.006
- Tan, Y.-C., Wong, M.-Y., & Ho, C.-L. (2015). Expression profiles of defence related cDNAs in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) inoculated with mycorrhizae and *Trichoderma harzianum* Rifai T32. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 96, 296–300. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.08.014
- Tang, D., Wang, G., & Zhou, J. M. (2017). Receptor kinases in plant-pathogen interactions: More than pattern recognition. *Plant Cell*, 29(4), 618–637. doi: 10.1105/TPC.16.00891
- Teo, T. (2015). *Effectiveness of the oil palm pollinating weevil, Elaeidobius kamerunicus, in Malaysia*. Retrieved from [http://eprints.utar.edu.my/1987/1/Effectiveness\\_of\\_the\\_oil\\_palm\\_pollinating\\_weevil,\\_Elaeidobius\\_kamerunicus,\\_in\\_Malaysia\\_-\\_T.M.\\_Teo.pdf](http://eprints.utar.edu.my/1987/1/Effectiveness_of_the_oil_palm_pollinating_weevil,_Elaeidobius_kamerunicus,_in_Malaysia_-_T.M._Teo.pdf)
- Terauchi, R., Fujisaki, K., Shimizu, M., Oikawa, K., Takeda, T., Takagi, H., Abe, A., Okuyama, Y., Yoshida, K., & Saitoh, H. (2019). Using genomics tools to understand plant resistance against pathogens: A case study of Magnaporthe-rice interactions. In *Applied Plant Biotechnology for Improving Resistance to Biotic Stress* (pp. 181–188). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-816030-5.00008-2
- Torres, G. A., Sarria, G. A., Martinez, G., Varon, F., Drenth, A., & Guest, D. I. (2016). Bud Rot Caused by *Phytophthora palmivora*: A Destructive Emerging Disease of Oil Palm. *Am Phytopath Society*, 106(4), 320–329. doi: 10.1094/PHYTO-09-15-0243-RVW
- USDA. (2020). *Palm Oil Explorer*. Palm Oil 2020: Ranked by Production. Retrieved from



- <https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=4243000>
- Van Der Hoorn, R. A. L., & Kamoun, S. (2008). From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*, *20*(8), 2009–2017. doi: 10.1105/tpc.108.060194
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, *47*(1), 177–206. doi: 10.1146/annurev.phyto.050908.135202
- Wang, W., Feng, B., Zhou, J. M., & Tang, D. (2020). Plant immune signaling: Advancing on two frontiers. In *Journal of Integrative Plant Biology* (Vol. 62, Issue 1, pp. 2–24). Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1111/jipb.12898
- Woittiez, L. S., van Wijk, M. T., Slingerland, M., van Noordwijk, M., & Giller, K. E. (2017). Yield gaps in oil palm: A quantitative review of contributing factors. In *European Journal of Agronomy* (Vol. 83, pp. 57–77). Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.eja.2016.11.002
- Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., & Wang, C. (2019). The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10, p. 1349). Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fpls.2019.01349
- Yousefi, M., Mohd Rafie, A. S., Abd Aziz, S., Azrad, S., & ABD Razak, A. binti. (2020). Introduction of current pollination techniques and factors affecting pollination effectiveness by *Elaeidobius kamerunicus* in oil palm plantations on regional and global scale: A review. *South African Journal of Botany*, *132*, 171–179. doi: 10.1016/J.SAJB.2020.04.017
- Zahan, K., & Kano, M. (2018). Biodiesel Production from Palm Oil, Its By-Products, and Mill Effluent: A Review. *Energies*, *11*(8), 2132. doi: 10.3390/en11082132
- Zdyb, A., Salgado, M. G., Demchenko, K. N., Brenner, W. G., Płaszczycza, M., Stumpe, M., Herrfurth, C., Feussner, I., & Pawlowski, K. (2018). Allene oxide synthase, allene oxide cyclase and jasmonic acid levels in *Lotus japonicus* nodules. *PLoS ONE*, *13*(1), e0190884. doi: 10.1371/journal.pone.0190884
- Zhang, M., Su, J., Zhang, Y., Xu, J., & Zhang, S. (2018). Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 45, pp. 1–10). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.pbi.2018.04.012
- Zhang, Y., & Li, X. (2019). Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *50*, 29–36. doi: 10.1016/J.PBI.2019.02.004
- Zhao, J. (2015). Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: from protein–protein and lipid–protein interactions to hormone signalling. *Journal of Experimental Botany*, *66*(7), 1721–1736. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eru540>
- Zhou, Y., Xiong, Q., Yin, C. C., Ma, B., Chen, S. Y., & Zhang, J. S. (2020). Ethylene Biosynthesis, Signaling, and Crosstalk with Other Hormones in Rice. *Small Methods*, *4*(8). doi: 10.1002/SMTD.201900278

## **CAPÍTULO 2. ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE INFECCIÓN DE *T. PARADOXA* EN PALMA PARA EL ESTUDIO DE LAS RELACIONES PLANTA-PATÓGENO.**

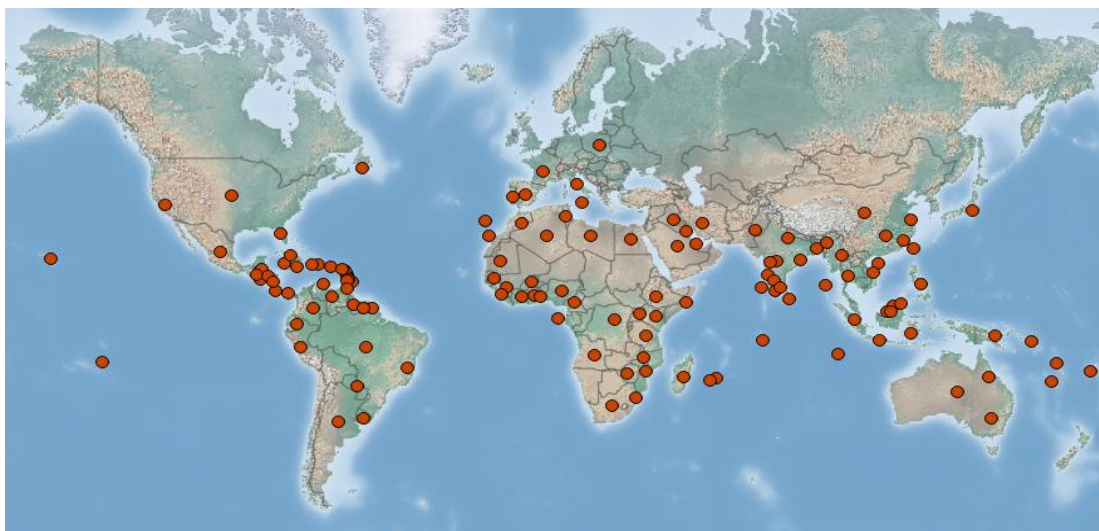
### **INTRODUCCIÓN**

*Thielaviopsis paradoxa*, es un patógeno que tiene un amplio rango de hospederos en diferentes especies de palma. Es capaz de infectar cualquier parte de la palma, lo que causa un rango variado de síntomas. Las enfermedades causadas por *T. paradoxa* tienen un elevado potencial destructivo para plantaciones de palma e incluye una variedad de nombres en la literatura (exudación del tallo, quemadura negra, pudrición de flecha y pudrición del cogollo) (Karampour et al., 2007; Polizzi et al., 2007; El-Deeb et al., 2007; Elliott, 2009; Garofalo et al., 2004; Hewajulige et al., 2014). Todos estos nombres describen síntomas que pueden o no ser expresados en un caso dado, por lo tanto, refleja una sintomatología particular sobre taxones específicos de palmas. Este hongo se ha reportado como el agente causal de pudriciones en *Cocos nucifera* (Warwick et al., 2009), *Butia capitata* (Tang et al., 2014), *Neodopsis decaryi* (Yu et al., 2016) y en Italia fue reportado como agente causal de la pudrición del tronco en *Phoenix dactylifera* (Abdullah et al., 2009; Polizzi et al., 2006) y en *Howeia forsteriana* (Polizzi et al., 2007). También se ha reportado como agente causal del desorden de decoloración del racimo que afecta a la mayoría de los países productores de palma datilera como Arabia Saudita (Al-Rokibah et al., 1998; Molan et al., 2004; Al-Onazi et al., 2011), Iraq, Kuwait (Suleman et al., 2001), Qatar (Abbas et al., 2003) y Egipto (El-Deeb et al., 2007). A nivel mundial, la enfermedad ha aumentado en importancia con la expansión del cultivo de palma datilera (Hewajulige et al., 2014). En *Hyophorbe lagenicaulis* (Palma botella) en Tailandia (Soytong et al., 2001) y en otras especies de palma como *Areca catechu*, *Elaeis guineensis*, *Hyophorbe lagenicaulis*, *Phoenix africanus*, *Rhapis* sp., *Roystonea elata*, *Sabal palmetto*, *Syagus romanzoffiana* y *Washingtonia filifera* se ha reportado como agente causal de la pudrición de cogollo (Ayala et al., 2000; Garofalo et al., 2004; Elliott, 2009; Suwandi et al., 2012). Dado su amplio rango de hospedantes, *T. paradoxa* tiene un gran potencial para convertirse en un patógeno de plantas económicamente importantes.

## 2.1 TAXONOMIA Y MORFOLOGIA DE *THIELAVIOPSIS PARADOXA*

*Thielaviopsis paradoxa* pertenece a la división Ascomycota, subdivisión Pezizomycotina, clase Sordariomycete, Orden Microascales, Familia Ceratocystidaceae y Género *Thielaviopsis* (Sánchez et al., 2007; Mycobank, 2021). El estado sexual de la especie es *Ceratocystis paradoxa*, el cual gracias a un estudio detallado de la evaluación filogenética y taxonómica del patógeno se confirmó como género *Thielaviopsis* (Paulin-Mahady et al., 2002).

El hongo *T. paradoxa* se aisló por primera vez de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en 1886 en Francia por De Seynes. Desde entonces, el hongo ha sido reportado en una variedad de cultivos (Dade, 1928; Hewajulige et al., 2014; Li et al., 2018; Warwick et al., 2009). El patógeno se presenta principalmente en los trópicos (Ploetz, 2003) y se ha reportado en más de 40 países, (figura 3). *T. paradoxa* es un patógeno que tiene acceso a través de heridas y que puede afectar muchas partes de la planta. En piña, *T. paradoxa* causa tres distintas enfermedades, mancha foliar, podredumbre basal y podredumbre de la fruta, esta enfermedad de importancia económica está presente en todos los países productores de piña en el mundo (Broadley et al., 1993). En el coco (*Cocos nucifera*), produce la enfermedad de sangrado del tallo que ha sido notificada en países en crecimiento como India, Jamaica, Sri Lanka, Malasia, Mauricio, Filipinas, Puerto Rico y Estados Unidos. El hongo no solo produce la enfermedad del sangrado del tallo sino también otras que incluyen podredumbre de yemas, manchas foliares, podredumbre del corazón y desintegración de la raíz. En la palma datilera, los síntomas generalmente se expresan en cuatro formas distintas, tales como quemaduras negras en las hojas, tizón de inflorescencia, podredumbre del corazón o tronco y pudrición de la yema en palmas de todas las edades. El decaimiento es más grave cuando el hongo ataca el brote terminal y corazón o cogollo, llevando a la muerte de la palma. Por desarrollo de yemas laterales de partes no lesionadas de tejidos meristemáticos, algunas palmas se recuperan de esta enfermedad (Zaid et al., 2002). En Colombia, este patógeno es el agente causal de la pudrición de la flecha, enfermedad importante en el neotrópico que afecta a palmas jóvenes y se caracteriza por la aparición de pequeñas áreas necróticas en la flecha en los estadios iniciales, que se extienden hasta el colapso de la misma. En algunos casos, esta pudrición es limitada por la palma y como resultado se genera la emisión de nuevas flechas las cuales son pequeñas y deformadas, pero posteriormente hay emisión de flechas normales, llevando a una remisión total (Ayala et al., 2000; Chinchilla, 2008). También se ha asociado con la pudrición del cogollo como agente oportunista de acuerdo a las investigaciones realizadas por Cenipalma (Torres et al., 2016).



**Figura 3.** Distribución de *T. Paradoxa*. Tomado de CABI (Centre for Agricultural Bioscience International). <http://www.cabi.org/isc/datasheet/12157>

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Plántulas del híbrido interespecífico de palma OxG (Oleifera x Avros-Djongo) de cuatro meses fueron usadas para la inoculación con *T. paradoxa*, en este estudio. Las plántulas fueron crecidas en vivero en la plantación de Unipalma en Cumaral, Meta (las coordenadas geográficas son latitud: 4,271°, longitud: -73,487°, y elevación: 412 m). Esta zona, presenta una precipitación media anual de 2800 mm, con una humedad relativa del 80%, una luminosidad de 1.482 horas, temperatura media de 27 °C, con una mínima de 20 °C y una máxima de 32 °C.

**Inóculo del hongo.** El aislamiento fúngico usado en este estudio pertenece a una colección de cepas de *T. paradoxa* de Cenipalma.

Durante estudios previos realizados por Cenipalma, los aislamientos fueron caracterizados a nivel molecular y patogénico. Durante la caracterización molecular se usaron las secuencias de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) que se amplificaron utilizando el par de cebadores ITS1/ITS4, confirmando la identificación morfológica de las cepas (Rodríguez et al., 2009). Para la evaluación de la patogenicidad de las cepas, se usaron bloques de agar papa desxtrosa con micelio a partir de cultivos monosporicos de *T. paradoxa* sobre fragmentos de tejido de palma. El grado de virulencia fue expresado como la relación del tiempo de colonización y el tiempo para invadir el tejido externo e interno, esto permitió clasificar la cepa seleccionada para este estudio como de altamente virulento

(Informe Cenipalma, datos no publicados).

Esta metodología usada en los estudios anteriores fue útil para determinar el grado de virulencia de cada cepa, pero no puede ser usada para hacer inferencias de la respuesta de la planta al patógeno, razón por la cual en este trabajo se evaluaron dos tipos de inóculo y cuatro métodos de inoculación.

#### Preparación de inóculo:

Los dos tipos de inóculo fueron preparados con aislamientos monospóricos: bloque de agar y suspensión de conidias.

1. Bloque de agar: Después de obtener el micelio de *T. paradoxa* sobre agar papa dextrosa (APD) y crecido a temperatura ambiente (22 to 24°C), bloques de agar (cuadrados de 0.5 cm) fueron cortados desde la parte externa de un cultivo de 7 días.
2. Suspensión de conidias: fue hecha por adición de 10 ml de tween 80 (al 0.03% en agua destilada) al cultivo esporulado (10 días) y las conidias fueron colectadas por filtrado con fibra de vidrio; tres concentraciones  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  conidias mL<sup>-1</sup> fueron establecidas por conteo en cámara de Neubauer.

#### Determinación de la Metodología de Inoculación

Las palmas fueron inoculadas con *T. paradoxa* por cuatro métodos, goteo, infiltración, corte y contacto directo con discos de agar cultivados. Las palmas fueron mantenidas por 15 días a temperatura y humedad monitoreadas por un termohigrómetro dataloger. La humedad fue mantenida entre 80-100% y la temperatura entre 26-28°C desde el momento de la inoculación.

- Inoculación con discos de agar con micelio: los discos de agar con micelio fueron colocados sobre la base de la tercera hoja previamente herida superficialmente con una punta plástica de micropipeta y cubiertos con parafilm para garantizar las condiciones de humedad. Como control, discos de agar estéril fueron usados.
- Infiltración local: con una jeringa hipodérmica se realizó la infiltración de 0.1 mililitros de suspensión de conidias (de las tres concentraciones) en la base de la tercera hoja. Como control se infiltró tween 80 (al 0.03%).
- Corte de la hoja: El ápice de la tercera hoja fue cortado con tijeras que previo al corte se sumergieron en la suspensión de conidias (esto se realizo con cada una de las tres concentraciones). Como control se sumergieron las tijeras en tween 80 (al 0.03%).

- Inoculación por goteo: Un mililitro de suspensión de conidias (de las tres concentraciones) fue colocado por goteo en la base de la tercera hoja previamente herida superficialmente. Como control se realizó goteo con tween 80 (al 0.03%).

Cada plántula fue considerada como una repetición, con 3 repeticiones por tratamiento. En el ensayo dosis-respuesta, la enfermedad fue evaluada 15 días después de la inoculación con el hongo a  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  conidias mL<sup>-1</sup>. En el ensayo tiempo-enfermedad, el desarrollo de los síntomas fue evaluado a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 240 y 360 horas post inoculación. La prueba de comparaciones múltiples de Tukey fue usada para evaluar la interacción método-concentración de inóculo.

#### Caracterización de la severidad de la enfermedad

En las diferentes horas por inoculación, el área de la lesión en las palmas inoculadas fue medida y el grado de severidad de la enfermedad en cada palma fue registrado.

La severidad de la enfermedad fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Severidad de la enfermedad} = \frac{\text{Media del área de tejido afectado}}{\text{Media del área total de la flecha}} \times 100$$

Los grados de severidad fueron asignados de acuerdo a:

Grado 0: Sin lesión

Grado 1: aparición de lesiones húmedas

Grado 2: aparición de lesiones necróticas

Grado 3: la hoja presenta necrosis en menos del 50%

Grado 4: la hoja presenta necrosis entre 50 -70%

Grado 5: necrosis > 70% de la hoja, lo cual lleva a su muerte

El efecto de cada tratamiento sobre la severidad de la enfermedad o la relación dosis-tiempo se analizó por el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) usando el software XLSTAT (versión 2015.5). Las diferencias entre los métodos fueron analizadas usando el test de diferencia significativa mínima de Fisher.

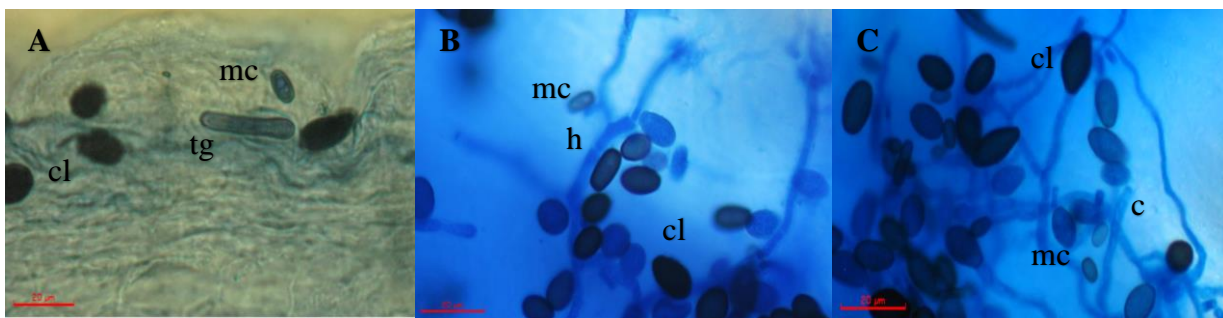
### Evaluación del proceso de infección

Una vez determinado el método de inoculación y dosis que permitía reproducir los síntomas observados en campo y con el objetivo de caracterizar el proceso de infección, 30 palmas fueron inoculadas. Tres palmas para los 10 tiempos de evaluación (6, 12, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 240 y 360 hpi) fueron usadas con muestreo destructivo para tomar tejido, los cuales fueron tratados con KOH al 10% a 90°C por 15 minutos para eliminar el contenido citoplasmático, conservando las paredes celulares y poder observar mejor al microscopio las estructuras del hongo, por medio de tinción con tinta china (Mendoza-Rodríguez et al., 2005). Adicionalmente, desde las zonas de avance de la enfermedad de 10 palmas se realizaron 3 cortes pequeños del tejido (1-2 cm de largo), los cuales fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 10% durante 1 minuto, seguido de un lavado con agua destilada estéril y transferido a un medio de aislamiento APD y se incubó a temperatura ambiente (22 to 24°C).

## **2.3 RESULTADOS**

### 2.3.1 Caracterización morfológica de *Thielaviopsis* sp.

El hongo *Thielaviopsis* sp. fue re-aislado desde los márgenes del tejido de plántulas sintomáticas y fue caracterizado morfológicamente. *T. paradoxa* forma clamidosporas que al germinar producen esporas o conidias asexuales infecciosas. A partir de las conidias de pared gruesa a partir de las cuales se da la formación del tubo germinativo y desde allí la formación de hifas primarias y secundarias. En las preparaciones en fresco a partir de cultivo y tejido infectado se observaron dos tipos de conidios; el primer tipo fueron microconidias de color hialino a marrón pálido, cilíndricas y pequeñas de  $6.3-10.7 \times 2.3-4.1 \mu\text{m}$  de tamaño. El segundo tipo fue notablemente más grande ( $11.8-16.2 \times 5.9-8.6 \mu\text{m}$ ), de color marrón, de forma ovalada (Clamidosporas), responsable del color negro en la etapa final del desarrollo de la enfermedad. Los conidióforos observados eran generalmente rectos, de color hialino con conidios se forman en cadenas (Figura 4). Las características morfológicas coinciden con las descripciones previas de *T. paradoxa* (De Seynes) Höhn (Hewajulige et al., 2014).



**Figura 4.** Características microscópicas de *T. paradoxa*. La fotografía A, correspondiente a una preparación en fresco desde el cultivo de 36 horas, se observa la presencia de clamidosporas (cl) y el tubo germinativo (tg) a partir de una conidia. En las fotografías B y C, obtenidas desde cortes del tejido infectado a las 36 hpi y teñidas con tinta china, se observan hifas hialinas septadas (h), microconidias (mc), clamidosporas (cl) y conidióforos (c).

### 2.3.2 Comparación de los Métodos de inoculación

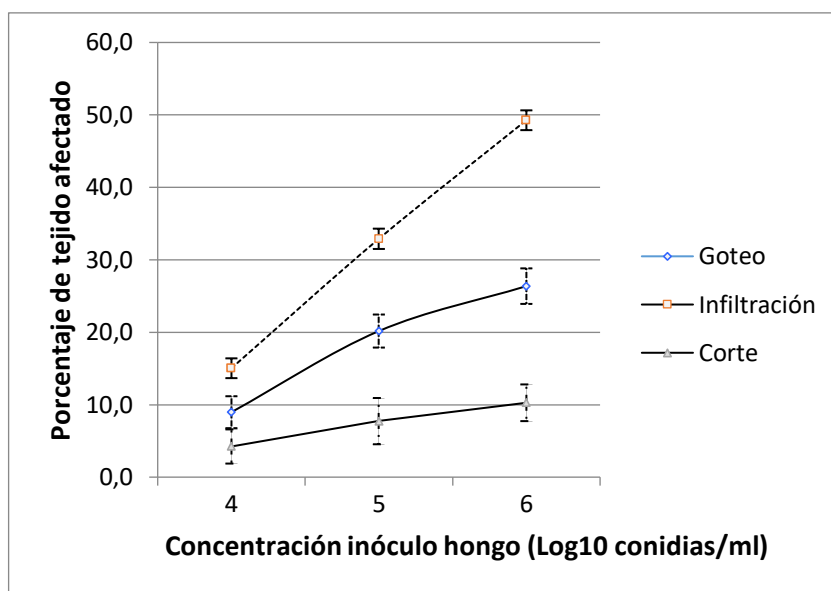
Con los cuatro métodos de inoculación se logró la infección de *T. paradoxa* sobre el tejido de las plántulas y el desarrollo de síntomas en palmas mantenidas por 15 días bajo condiciones controladas. Aunque todas las plántulas desarrollaron síntomas progresivos de la enfermedad, la severidad de las lesiones varió de acuerdo al método de inoculación usado. En las palmas inoculadas por corte y discos de micelio, la necrosis comenzó en la herida y progresó lentamente hacia los folíolos. En los métodos por infiltración local y goteo de la suspensión de conidias se desarrollaron lesiones necróticas húmedas alrededor del punto de inoculación, que progresaron a través del raquis hacia la flecha.

La progresión de la enfermedad en el tiempo depende de la dosis de inóculo y el método de inoculación. La infiltración resultó en los períodos de incubación más cortos y también en las tasas más altas de progreso de la enfermedad. La inoculación con discos y cortes tuvo períodos de incubación más largos y las más bajas tasas de progreso de enfermedad. El método de goteo tuvo períodos de incubación cortos y la tasa de progreso de la enfermedad fue intermedia. Sin embargo, en los últimos tres métodos se observó que después del décimo día ya no había un comportamiento exponencial en el progreso de las lesiones.

El efecto de la concentración del inóculo sobre la severidad de la enfermedad fue estudiado para cada método de inoculación, evidenciándose progreso de las lesiones en las concentraciones de  $10^5$  y  $10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 5). El análisis de varianza para porcentaje de área afectada en la evaluación mostró diferencias significativas para método de infiltración ( $p=0,003$ ). Las diferencias estadísticas fueron significativas para la concentración de inóculo usado en los métodos de inyección y goteo



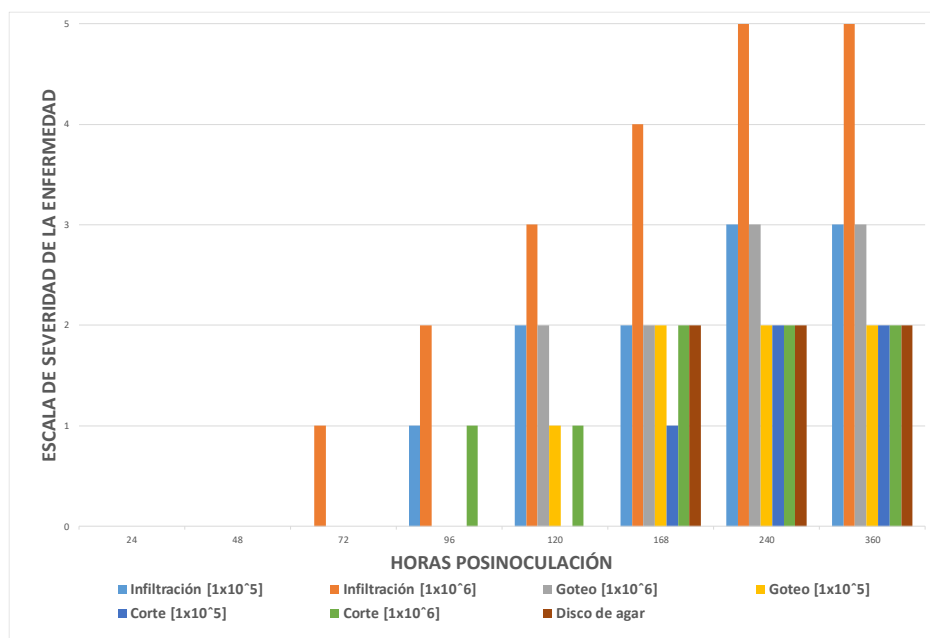
( $p=0,020$ ). Por lo que se continuaron los experimentos descartando la concentración de  $1 \times 10^4$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 5.** Porcentaje de tejido afectado en plántulas del híbrido de palma de aceite inoculados con suspensiones de esporas de *T. paradoxa* ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ) a las 240hpi por los siguientes métodos: infiltración (cuadrado), corte con tijeras (triángulo) y goteo (rombo). Los valores corresponden a la media de tres réplicas. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

Pos-inoculación, las palmas fueron observadas en busca de lesiones iniciales cada 24 horas. El avance de las lesiones fue monitoreado durante dos semanas y clasificados de acuerdo a la escala de grado de severidad de la enfermedad. A las 72 horas se observó la aparición de una pequeña área necrótica rodeada por un halo amarillo en la base de las flechas, en las plántulas inoculadas por el método de infiltración ( $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ). A las 96 hpi las palmas de los métodos de inoculación de discos y goteo presentaron el mismo tipo de lesión inicial. Con el método de corte con tijeras solo se observó lesiones a las 96 horas (Figura 6).

Las lesiones necróticas ascendentes desde la base de la flecha se observaron a las 120 hpi para los métodos de infiltración con las dos concentraciones de inóculo y de goteo (solo con la concentración de  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ). A las 240 hpi la flecha de las plántulas estaban afectadas en diferentes grados de severidad siendo evidente la necrosis y colapso de la flecha, sólo con el método de inyección con concentración de inóculo de  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ . A los 15 días pos inoculación se realizó la última observación sin evidenciar avance en las lesiones en ninguno de los métodos evaluados (Figura 6).



**Figura 6.** Severidad de la enfermedad en plántulas del híbrido de palma de aceite inoculados con suspensiones de *T. paradoxa* ( $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ) por los siguientes métodos: infiltración, corte con tijeras, goteo y bloque de agar. Después de las 240 hpi no se observa aumento en la severidad de la enfermedad con ninguno de los métodos.

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95% en la interacción método-concentración de inóculo, mostró que los mayores porcentajes de daño se produjeron con el método de infiltración ( $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ), siendo estadísticamente diferente al resto de tratamientos (B). Con este método se observó más del 50% de afección en la flecha (tabla 1).

**Tabla 1.** Resumen de las comparaciones por pares para los diferentes métodos de inoculación (Tukey (HSD). Valores con la misma letra no difieren estadísticamente, según la prueba comparativa tipo Tukey al 5%.

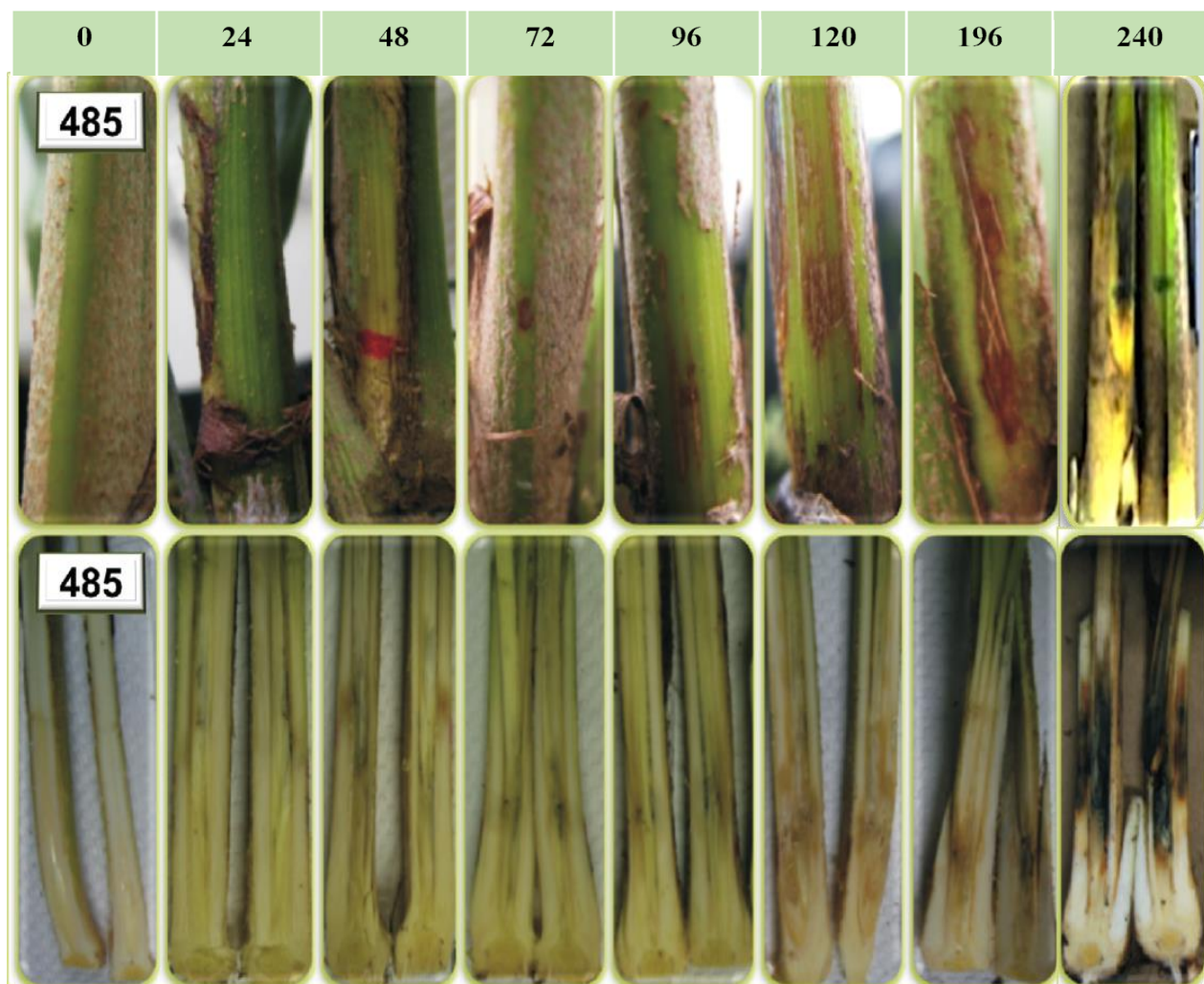
Categoría	Promedio LS (N° Palmas)	Grupos	
Corte [ $1 \times 10^5$ ]	2,500	A	
Bloque	3,000	A	
Corte [ $1 \times 10^6$ ]	3,000	A	
Goteo [ $1 \times 10^5$ ]	3,167	A	
Goteo [ $1 \times 10^6$ ]	4,667	A	B
Infiltración [ $1 \times 10^5$ ]	6,167	A	B
Infiltración [ $1 \times 10^6$ ]	11,167		B

Un segundo grupo (AB) estuvo conformado por los métodos de infiltración ( $1 \times 10^5$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ) y goteo a la base de las flechas con la concentración  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ . Los análisis de varianza determinaron que el método de inoculación que permitió reproducir los síntomas observados en campo y todos los estadios descritos en la escala de severidad fue infiltración con concentración de inóculo de  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ . Aunque puede considerarse un método de inoculación severo debido al daño causado por la aguja, no se evidenció en ninguno de los testigos síntomas o lesiones similares a las causadas por *T. paradoxa*.

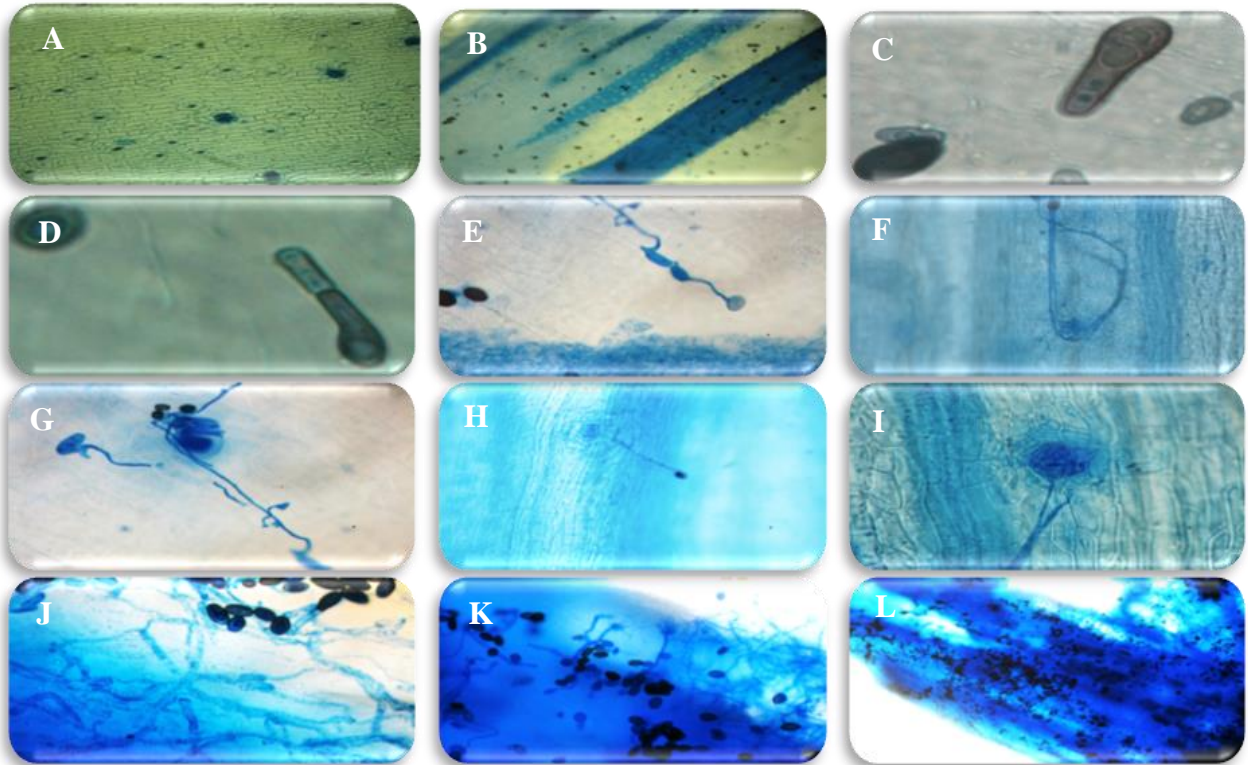
### 2.3.3 Caracterización de la infección

Externamente solo hasta las 72 hpi se empezó a evidenciar un halo amarillo en el sitio de la inoculación, el cual se fue extendiendo a lo largo de la flecha, con aparición de tejido necrótico y colapso de la flecha a las 240 hpi. Sin embargo, durante el muestreo destructivo fue posible evidenciar que a las 24 horas ya había lesiones que iniciaban con pudrición que avanzaba de forma rápida por los tejidos inmaduros del raquis. Así, para las 120 horas, el raquis estaba afectado en más del 50%, con lesiones que corresponden a una pudrición con olor a fermento que provocó el desprendimiento de la hoja recién emitida (flecha) hacia las 240 horas (Figura 7).

Una vez se estableció el contacto físico entre *T. paradoxa* y el tejido de palma, la infección se inició con la germinación de las conidias. Los tubos germinales se empezaron a observar a partir de las 12 hpi y aproximadamente sobre las 18 hpi se observó la formación de hifas que en ocasiones se conectaba con hifas de otras conidias y se extendía hacia los estomas. A las 72 hpi se empezó a observar la ramificación de las hifas por el tejido y a las 96 hpi la presencia de conidias sobre el tejido necrótico. En el control se observó un ligero amarillamiento alrededor del sitio de la inculación sin progreso de la lesión (figura 8).



**Figura 7.** Registro de la progresión de la enfermedad a nivel externo e interno en plántulas de palma de aceite inoculados por infiltración local con una suspensión de *T. paradoxa* de  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ . El daño ocasionado por el hongo a nivel externo no refleja lo que a nivel interno está sucediendo durante el proceso de infección.



**Figura 8.** Proceso de infección de *T. paradoxa* en plántulas de palma de aceite, posinoculación con una suspensión  $1 \times 10^6$  conidias por ml por el método de infiltración local. **A.** Tejido sano de raquis de palma de aceite. **B.** Inoculación de conidias de *T. paradoxa* en raquis 6 hpi (Aumento 10X). **C.** Formación del tubo germinal observado 12 (Aumento 100X). **D.** Formación del septo e hifa de colonización observado a las 18 hpi (Aumento 100X). **E.** Conexión de hifas a las 24 hpi (Aumento 40X). **F y G.** Se observan hifas alrededor de estomas (Aumento 10X). **H e I.** Se aprecia una conidia germinada cuya hifa se dirige hacia el estoma en aumento de 10X y 100X, respectivamente. **J.** Colonización del tejido alcanzada sobre las 36 hpi (Aumento 40X). **K y L.** Proceso de esporulación observado entre las 72 y 96 hpi, aumento de 40X y 10X, respectivamente.

## 2.4 DISCUSIÓN

Las partes desprendidas de las plantas son el material vegetal más adecuado para inocular patógenos a nivel confinado, ya que permiten la manipulación de material bajo condiciones precisas y biológicamente seguras (Punja, 2004). Sin embargo, para estudiar a nivel molecular las respuestas de las plantas a la infección de un patógeno, se debe tener en cuenta que las hojas desprendidas podrían mostrar una serie de respuestas no solo relacionadas con la reacción contra la infección por patógenos, sino también por el estrés general y la senescencia, por lo que se debe tener gran precaución con la interpretación de las respuestas observadas. Otra limitación importante con el ensayo de hojas desprendidas es la ruptura de la relación entre el sistema radicular (nutrición mineral y orgánica,

absorción de agua, microorganismos del suelo, etc.) y el sistema foliar (fotosíntesis, transpiración, emisión foliar, etc.) (Liu et al., 2007). Dado lo anterior, la técnica de la hoja desprendida debe verificarse con el ensayo de la hoja adjunta siempre que sea posible. En este trabajo 4 métodos de inoculación fueron adaptados y evaluados sobre la base de inducir infecciones con *T. paradoxa*, progreso de la enfermedad y el desarrollo de síntomas bajo condiciones de invernadero, como requisito necesario para el establecimiento de un patosistema *T. paradoxa* – híbrido OxG. Al igual que otros fitopatógenos, se cree que *T. paradoxa* penetra a través de aberturas naturales (estomas), heridas mecánicas, o las causadas por insectos que se alimentan de la palma como *Rhynchophorus palmarum*, el cual se ha postulado como probable vector del hongo, ya que se ha demostrado la presencia *T. paradoxa* en su tubo digestivo (Parra et al., 2003; Costa Carvalho et al., 2011)

Los cuatro métodos de inoculación fueron escogidos entre los descritos en la literatura para inoculación de hongos patogénicos y que han sido usados para estudios de interacciones planta-patógeno y adaptados a las condiciones de nuestro modelo (Warwick et al., 2009; Farrag et al., 2011; Arafat et al., 2012).

Los métodos de inoculación empleados en este estudio indujeron los síntomas de la enfermedad por la infección con *T. paradoxa*. Las diferencias en la severidad de la enfermedad dependieron del método de inoculación. Los resultados obtenidos con los métodos de infiltración y goteo fueron concordantes con los reportados por estudios de inoculación de *T. paradoxa* en plantas enteras (Arafat et al., 2012; Giri et al., 2013). El método de infiltración fue el más eficiente, debido a la homogeneidad en los resultados obtenidos.

Los métodos discos de agar y corte no fueron concordantes con los resultados realizados en otros estudios. El método de discos de agar fue modificado, dado que debido al tamaño de las palmas se consideró un método muy agresivo hacer una herida con sacabocados de 5 mm en diámetro y 5 mm de profundidad para inocular el disco de PDA con micelio y conidias descrito por Eman y Kafal (2011), Soyong *et al.* (2005) y Warwick and Passos (2009). Si bien es cierto que en la mayoría de los métodos las lesiones son usadas en las inoculaciones artificiales, es importante considerar que sean leves ya que si se está evaluando a nivel molecular una respuesta no será claro si es debida a la invasión del hongo o es debida a la intensidad de la herida. El método de corte con tijeras impregnadas con suspensión de conidias, tuvo la desventaja de causar una considerable variación en la distribución de las esporas y no fue posible establecer un concentración y volumen promedio de inóculo, además de causar una lesión de dimensiones considerables.

Los métodos de inoculación con disco y corte produjeron los niveles de severidad de la enfermedad más bajos, quizás debido a que la cantidad de inóculo es menor y al hecho de que las defensas de las plantas son rápidamente inducidas en tejidos con grandes áreas lesionadas (Giri et al., 2013). Aunque la progresión de la enfermedad en el método de goteo fue inicialmente rápida, los niveles finales de severidad fueron bajos y las lesiones se mantuvieron confinadas a menos del 25% del tejido. El método de infiltración local parece ser el método más adecuado ya que se conoce el volumen de suspensión de patógeno inoculado y el área de la herida es pequeña.

El establecimiento de la enfermedad y la manifestación de síntomas estuvo relacionado con la concentración de inóculo del patógeno, hubo aumento de la infección en respuesta al aumento de la concentración del inóculo. A medida que la concentración del inóculo aumentaba, los síntomas de la enfermedad aparecieron rápidamente, mientras que, a bajas concentraciones del inóculo, la enfermedad se desarrolló lentamente y los síntomas aparecieron tarde sin evidencia de progreso. Esta correlación entre severidad de la enfermedad y concentración del inóculo ha sido observada en estudios de *T. basicola* (Holtz et al., 1994).

Los postulados de Koch fueron probados durante los experimentos porque se logró aislar *T. paradoxa* de las zonas de avance de la enfermedad en las palmas inoculadas. Las observaciones de los cortes de tejido en palma demostraron que al igual que en otras interacciones hongo patógeno-planta, probablemente el reconocimiento de una señal exógena fue requerido para que *T. paradoxa* iniciara el desarrollo del tubo germinativo, lo cual ocurrió aproximadamente a las 12 hpi, período mayor al observado en *T. basicola* que es de 8 horas en raíz de tabaco (Hood et al., 1997). A partir del tubo germinativo se desarrolló la hifa que creció y se conectó con otras hifas cerca de los estomas por donde se presume es la entrada natural del hongo como se ha sugerido en otros estudios (Punja, 2004).

En esta primera parte del trabajo fue posible establecer un método de inoculación artificial (infiltración) que permitió producir datos reproducibles de la interacción del híbrido OxG de la palma de aceite con el patógeno *T. paradoxa*. Una concentración de inóculo de  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  y un período de incubación de 3 a 7 días fueron decisivos para el desarrollo de los síntomas tan severos como los que se han observado en campo y lo reportado por otros autores en la infección natural (Paterson et al., 2013). El establecimiento de este método permitió la observación de las etapas de desarrollo de la enfermedad, lo cual soportó el desarrollo de una escala de severidad. El establecimiento de enfermedad por inoculación artificial fue esencial para establecer una línea de

tiempo y determinar los tiempos de toma de muestra para la fase de evaluación del transcriptoma. Este método de inoculación puede ser usado para estudios de etiología, resistencia a la enfermedad, interacción planta-patógeno y control de la enfermedad.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, E. H., & Abdulla, A. S. (2003). First report of neck bending disease on date palm in Qatar. *Plant Pathology*, 52(6), 790. doi: 10.1111/j.1365-3059.2003.00899.x
- Abdullah, S. K., Asensio, L., Monfort, E., Gomez-Vidal, S., Salinas, J., Lorca, L. V. L., & Jansson, H. B. (2009). Incidence of the two date palm pathogens, *thielaviopsis paradoxa* and *T. Punctulata* in soil from date palm plantations in Elx, south-east Spain. *Journal of Plant Protection Research*, 49(3), 276–279. doi: 10.2478/v10045-009-0043-z
- Al-Onazi, M., Al-Dahain, S., El-Ansary, A., & Marraiki, N. (2011). Isolation and characterization of *Thielaviopsis paradoxa* L-alanine dehydrogenase. *Asian Journal of Applied Sciences*, 4(7), 702–711. doi: 10.3923/AJAPS.2011.702.711
- Al-Rokibah Y., Abdalla A. (1998). *Effect of water salinity on Thielaviopsis paradoxa and growth of date palm seedlings*. Journal of King Saud University, Agricultural Sciences. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19981009764>
- Arafat, K. H., Mohamad, A. M., & Elsharabasy, S. (2012). Biological Control of Date Palm Root Rots Disease Using Egyptian Isolates of Streptomycetes. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 8(2), 224–230.
- Ayala, L., & Gómez, P. L. (2000). Patogenicidad de aislamientos de *Thielaviopsis paradoxa* principal agente causal de la pudrición de cogollo. *Palmas*, 21(Edición Especial-tomo I), 121–122. Retrieved from <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/772>
- Broadley, R., Wassman, R., & Sinclair, E. (1993). Pineapple pests and disorders. *Undefined*.
- Chinchilla, C. (2008). Las pudriciones del cogollo en palma aceitera : La complejidad del desorden y una guía de convivencia. *ASD Oil Palm Papers*, 32, 11–23. Retrieved from [http://www.asd-cr.com/images/PDFs/OilPalmPapers/Muchas\\_caras\\_de\\_PC\\_32\\_2008.pdf](http://www.asd-cr.com/images/PDFs/OilPalmPapers/Muchas_caras_de_PC_32_2008.pdf)
- Costa Carvalho, R., Souza, P., & S Carvalho Filho, J. L. (2011). 139-739-1-ED. 7. Retrieved from [www.scienciaplana.org.br/043101-1](http://www.scienciaplana.org.br/043101-1)
- Dade, H. A. (1928). *Ceratostomella paradoxa*, the perfect stage of *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) von Höhnel. *Transactions of the British Mycological Society*, 13(3–4), 184–IN7. doi: 10.1016/s0007-1536(28)80017-9
- El-Deeb, H. M., Lashin, S. M., & Arab, Y. A. (2007). Distribution and pathogenesis of date palm fungi in Egypt. *Acta Horticulturae*, 736, 421–429. doi: 10.17660/ActaHortic.2007.736.39
- Elliott, M. L. (2009). *Thielaviopsis Trunk Rot of Palm 1. Disease Management*, 1–5. Retrieved from <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Farrag, E. S. H., & Abo-Elyousr, K. A. (2011). Occurrence of some fungal diseases on date palm trees in upper Egypt and its control. *Plant Pathology Journal*, 10(4), 154–160. doi: 10.3923/PPJ.2011.154.160
- Garofalo, J. F., & McMillan, R. T. (2004). *Thielaviopsis* diseases of palms. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 117, 324–325. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/57e9/49aecc2f67ef1a5ee7af0b7301260246bf0d.pdf>
- Giri, P., Taj, G., & Kumar, A. (2013). Effect of quadratic residue diffuser (QRD) microwave energy on root-lesion nematode, *Prathlenchus penetrans*. *African Journal of Biotechnology*, 12(18), 2471–2477. doi: 10.4314/ajb.v12i18
- Hewajulige, I. G. N., & Wijesundera, R. L. C. (2014). *Thielaviopsis paradoxa*, *Thielaviopsis basicola* (Black Rot, Black Root Rot). In *Postharvest Decay: Control Strategies* (pp. 287–308). doi: 10.1016/B978-0-12-411552-1.00009-0
- Holtz, B. A., & Weinhold, A. R. (1994). *Thielaviopsis basicola* in San Joaquin Valley soils and the relationship between inoculum density and disease severity of cotton seedlings. *Plant Disease*, 78(10), 986–990. doi: 10.1094/PD-78-0986
- Hood, M. E., & Shew, H. D. (1997). Initial cellular interactions between *Thielaviopsis basicola* and tobacco root hairs. *Phytopathology*, 87(3), 228–235. doi: 10.1094/PHYTO.1997.87.3.228
- Karampour, F., & Pejman, H. (2007). Study on possible influence of Pathogenic fungi on date bunch fading disorder in Iran. *Acta Horticulturae*, 736, 431–439. doi: 10.17660/ActaHortic.2007.736.40
- Korlach, J., Bjornson, K. P., Chaudhuri, B. P., Cicero, R. L., Flusberg, B. A., Gray, J. J., Holden, D., Saxena, R., Wegener, J., & Turner, S. W. (2010). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Methods in Enzymology*, 472, 431–455. doi: 10.1126/science.1162986
- Li, F. H., Sun, X. D., Niu, X. Q., Cao, H. X., & Yu, F. Y. (2018). First report of basal stem rot on oil palm caused by *thielaviopsis Paradoxa* in Hainan, China. *Plant Disease*, 102(10), 2029. doi: 10.1094/PDIS-01-18-0009-PDN
- Liu, G., Kennedy, R., Greenshields, D. L., Peng, G., Forseille, L., Selvaraj, G., & Wei, Y. (2007). Detached and Attached Arabidopsis Leaf Assays Reveal Distinctive Defense Responses Against Hemibiotrophic

- Colletotrichum spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 20(10), 1308–1319. doi: 10.1094/MPMI
- Mendoza-Rodríguez, M., Mendoza-Rodríguez, M., Jiménez, E., Maier, F., Schäfer, W., Leiva-Mora, M., Acosta-Suárez, M., & Alvarado-Capó, Y. (2005). Empleo de la tinción anilina azul-KOH en el estudio de la interacción banano-Mycosphaerella fijiensis Morelet. *Biotecnología Vegetal*, 5(1). Retrieved from <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/441>
- Mycobank. (n.d.). Retrieved from <https://www.mycobank.org/>
- Parra, D., Morillo, F., Guerra, J., Sánchez, P., & Pineda, J. (2003). Presencia de Thielaviopsis paradoxa De Seynes Höhn en el tubo digestivo de Rhynchophorus palmarum Linneo (Coleoptera: Curculionidae). *Entomotropica*, 18(1), 49–55. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=640008>
- Paterson, R. R. M., Sariah, M., & Lima, N. (2013). How will climate change affect oil palm fungal diseases? *Crop Protection*, 46, 113–120. doi: 10.1016/j.cropro.2012.12.023
- Paulin-Mahady, A. E., Harrington, T. C., & McNew, D. (2002). Phylogenetic and taxonomic evaluation of Chalara, Chalaropsis, and Thielaviopsis anamorphs associated with Ceratocystis. *Mycologia*, 94(1), 62–72. doi: 10.1080/15572536.2003.11833249
- Ploetz RC. (2003). Diseases of tropical fruit crops. In Diseases of tropical fruit crops. doi: 10.1079/9780851993904.0000
- Polizzi, G., Castello, I., Aiello, D., & Vitale, A. (2007). First report of stem bleeding and trunk rot of kentia palm caused by Thielaviopsis paradoxa in Italy. In Plant Disease (Vol. 91, Issue 8, p. 1057). doi: 10.1094/PDIS-91-8
- Polizzi, G., Castello, I., Vitale, A., Catara, V., & Tamburino, V. (2006). First report of Thielaviopsis trunk rot of date palm in Italy. *Plant Disease*, 90(7), 972. doi: 10.1094/PD-90-0972C
- Punja, Z. K. (2004). Virulence of Chalara elegans on bean leaves, and host-tissue responses to infection. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26(1), 52–62. doi: 10.1080/07060660409507112
- R.N. Warwick, D., & E.M. Passos, E. (2009). Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by Thielaviopsis paradoxa in Sergipe, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 34(3), 175–177. doi: 10.1590/s1982-56762009000300007
- Rodríguez, J., Vélez, D., Sarria, G. A., Torres, G. A., Noreña, C., Navia, M., Romero, H. M., Varón, F., & Martínez, G. (2009). Identificación Morfológica, Molecular Y Patogénica De Los Microorganismos Asociados A La Pudrición Del Cogollo De La Palma De Aceite En Colombia\*. *Fitopatología Colombiana*, 33(2), 49–56.
- Sánchez, V., Rebolledo, O., Picaso, R. M., Cárdenas, E., Córdova, J., González, O., & Samuels, G. J. (2007). In vitro antagonism of Thielaviopsis paradoxa by Trichoderma longibrachiatum. *Mycopathologia*, 163(1), 49–58. doi: 10.1007/s11046-006-0085-y
- Soytong, K., & Jitkasemsuk, S. (2001). First Report of Thielaviopsis paradoxa Causing Fruit Rot on Sala ( Salacca edulis ) in Thailand. *Plant Disease*, 85(2), 230–230. doi: 10.1094/pdis.2001.85.2.230c
- Suleman, P., Al-Musallam, A., & Menezes, C. A. (2001). Incidence and severity of black scorch on date palms in Kuwait. *Kuwait Journal of Science and Engineering*, 28(1), 160–169. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/294761747\\_Incidence\\_and\\_severity\\_of\\_black\\_scorch\\_on\\_date\\_palm\\_s\\_in\\_Kuwait](https://www.researchgate.net/publication/294761747_Incidence_and_severity_of_black_scorch_on_date_palm_s_in_Kuwait)
- Suwandi, Akino, S., & Kondo, N. (2012). Common spear rot of oil palm in Indonesia. *Plant Disease*, 96(4), 537–543. doi: 10.1094/PDIS-08-10-0569
- Tang, Q. H., Niu, X. Q., Yu, F. Y., Zhu, H., Song, W. W., & Qin, W. Q. (2014). First report of Pindo palm heart rot caused by Ceratocystis paradoxa in China. *Plant Disease*, 98(9), 1282. doi: 10.1094/PDIS-04-14-0395-PDN
- Torres, G. A., Sarria, G. A., Martinez, G., Varon, F., Drenth, A., & Guest, D. I. (2016). Bud Rot Caused by Phytophthora palmivora: A Destructive Emerging Disease of Oil Palm. *Am Phytopath Society*, 106(4), 320–329. doi: 10.1094/PHYTO-09-15-0243-RVW
- Yu, F. Y., Niu, X. Q., Tang, Q. H., Zhu, H., Song, W. W., Qin, W. Q., & Zhang, S. X. (2016). First report of trunk rot caused by Ceratocystis paradoxa on triangle palm (Dypsis decaryi) in Hainan, China. *Plant Disease*, 100(8). doi: 10.1094/PDIS-12-15-1496-PDN
- YY Molan, RS Al-Obeid, MM Harhash, S. E.-H. (2004). *Molan: Decline of date-palm offshoots with Chalara... - Google Académico*. Journal of the King Saud University. Retrieved from [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Decline of date palm offshoots infected with Chalara paradoxa in Riyadh region&journal=Journal of the King Saud University](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Decline+of+date+palm+offshoots+infected+with+Chalara+paradoxa+in+Riyadh+region&journal=Journal+of+the+King+Saud+University)
- Zaid A., Wet PF., Djerbi M., O. A. (2002). Chapter XII Diseases and Pests of Date Palm. In A. Zaid & E. Arias-Jimenez (Ed.), *FAO Date palm cultivation* (pp. 227–281). FAO Plant Production and Protection. Retrieved from <http://www.fao.org/3/Y4360E/y4360e0g.htm>

# **CAPÍTULO 3: PERFILES DE EXPRESIÓN EN EL HÍBRIDO INTERESPECÍFICO O<sub>x</sub>G (*E. oleifera* x *E. guineensis*) Y EN *T. paradoxa* DURANTE LA INTERACCIÓN**

## **INTRODUCCIÓN**

Las respuestas de defensa en las plantas dependen del tipo de patógeno. La señalización de fitohormonas que involucra como el ácido salicílico (AS), el ácido jasmónico (AJ), el etileno (ET), la citoquinina (CK) y las auxinas, es un componente integral del sistema de defensa del huésped de múltiples capas contra una gran cantidad de patógenos fúngicos. El estilo de vida de un patógeno a menudo dicta la estrategia de defensa del huésped y el patógeno puede incluso manipular la diafonía hormonal para lograr una colonización exitosa (Andersen et al., 2018). *T. paradoxa* tiene características de un patógeno fúngico hemibiotrófo (F. H. Li et al., 2018), por lo que la resistencia de las plantas está controlada por AS. Los hongos hemibiotrófos tienen una etapa biotrófica, un cambio de biotrófica a necrotrófica y una etapa necrotrófica; algunos estudios han demostrado que las estrategias de infección son cambiantes en las diferentes etapas, por lo que es necesario investigar más a fondo si el metabolismo vegetal desempeñan los mismos o diferentes roles en toda la etapa de la infección (Bhadoria et al., 2013; Chowdhury et al., 2017).

Para identificar reguladores clave en la interacción de la palma con *T. paradoxa*, es necesario descubrir genes a escala global utilizando un enfoque de análisis de transcriptoma de alta cobertura, como el ofrecido por secuenciación usando tecnologías de segunda generación. En los últimos años, las tecnologías de secuenciación de segunda y tercera generación de alto rendimiento se han considerado superiores a los métodos tradicionales de secuenciación, en términos de tiempo y costo, además de la cantidad de datos generados. Varias plataformas de secuenciación comerciales como Ion Torrent e Illumina, que pueden producir miles o millones de lecturas de secuenciación en una sola ejecución a muy bajo costo. Estas tecnologías han revolucionado el área de la investigación genética y genómica, y actualmente son los métodos de elección para comprender fenómenos biológicos complejos a través de enfoques de biología de sistemas, entendiéndose esta como un enfoque "holístico" o "global" que permite comprender integradamente el funcionamiento de los procesos biológicos y profundizar en el entendimiento de cómo sus interacciones internas y con otros

sistemas conllevan a la aparición (emergencia) de nuevas propiedades (Rabbani et al., 2016). En el presente estudio, se utilizó la tecnología RNA-Seq de alto rendimiento para identificar genes expresados por híbridos de palma de aceite contrastante en su respuesta a la infección de *T. paradoxa*. RNA-Seq sirve como una herramienta poderosa para identificar la expresión de genes asociados con rutas o respuestas, variantes de empalme, transcritos de baja abundancia y marcadores moleculares funcionales, por lo que se ha utilizado para realizar estudios de perfiles de expresión en palma de aceite durante la interacción de partes o planta completa con el patógeno *Ganoderma boniense* (Bahari et al., 2018; Ho et al., 2016, 2019) así como para caracterizar el transcriptoma de *G. boniense* durante la evasión de la respuesta inmune de la palma (Dhillon et al., 2021).

El RNA-Seq, que implica la secuenciación del mRNA para estudiar la estructura de la transcripción, la información alélica y la expresión génica de alta resolución en una condición particular en individuos mediante la secuenciación del transcriptoma, se ha convertido en un método de elección por su capacidad de explorar organismos no modelo (Licatalosi et al., 2010; O’Keeffe et al., 2019), como lo es la palma de aceite. En nuestro país resulta relevante estudiar las interacciones de la palma con patógenos que son endémicos, como lo es *T. paradoxa*. La pregunta inmediata que uno podría hacer sobre este experimento con RNA-seq es que genes tienen un perfil de expresión diferente entre un genotipo susceptible y un resistente a la infección por *T. paradoxa*.

El análisis de los datos de RNA-Seq implica múltiples pasos desde el filtrado de las lecturas sin procesar hasta la identificación de genes regulados diferencialmente y transcritos novedosas en una muestra determinada. Hay muchos métodos y herramientas disponibles para analizar los enormes puntos de datos generados por el método RNA-Seq (Blows et al., 2010; Henschel et al., 2012; Langmead et al., 2012; Seyednasrollah et al., 2015; Nelson et al., 2017) .

Específicamente, el pipeline empleado en RNASEq consta de cinco pasos principales, donde cada paso corresponde a una fase del análisis que logra cierto hito:

Paso 1. Control de calidad de las lecturas sin procesar.

Paso 2. Eliminación de lecturas de baja calidad.

Paso 3. Alinear las lecturas sin procesar con un genoma de referencia y ensamblaje de novo.

Paso 4. Calcular la expresión génica a partir de lecturas alineadas.

Paso 5. Análisis diferencial de la expresión génica a partir de la expresión génica ensamblada.

Para la evaluación de la expresión diferencial se han propuesto varios métodos a partir de datos de conteo, pero se han informado sesgos asociados a la longitud del transcrito y las distribuciones de frecuencia del transcrito. Todavía no está claro cuántas lecturas de la secuencia deben generarse en un experimento RNA-seq para obtener resultados confiables y qué se está detectando exactamente. En general, se observa que muchos conjuntos de datos de RNA-seq no alcanzan la saturación para la detección de genes expresados y que la proporción relativa de transcritos de diferentes biotipos cambia a medida que aumenta la profundidad de la secuenciación.

En este trabajo empleamos NOISeq, un enfoque no paramétrico para el análisis de expresión diferencial de datos RNAseq, apropiado cuando el número de réplicas biológicas es bajo (2) o no hay réplicas. NOISeq crea una distribución nula o de ruido del recuento de cambios comparando el número de lecturas de cada gen en muestras dentro de la misma condición. Esta distribución de referencia se usa luego para evaluar si el cambio en el número de recuento entre dos condiciones para un gen dado probablemente sea parte del ruido o represente una expresión diferencial verdadera. NOISeq tiene dos variantes del método: NOISeq-real que utiliza réplicas, cuando están disponibles, para calcular la distribución de ruido y, NOISeq-sim las simula en ausencia de replicación. NOISeq detecta comparativamente más genes codificantes de proteínas que otros métodos, los métodos de identificación de DEG (del inglés differentially expressed genes) que tienen resultados más consistentes son limma + voom, NOIseq y DESeq2 (Costa-Silva et al., 2017).

### 3.1 MATERIALES Y METODOLOGÍA

**Material vegetal:** El programa de mejoramiento genético de Unipalma S.A. (Cumaral, Meta), ha evaluado por medio de diferentes ensayos y condiciones agroecológicas, el desempeño agronómico y productivo de los materiales del programa, teniendo en cuenta el comportamiento fitosanitario en condiciones de campo frente a las diferentes plagas y enfermedades que afectan la palma de aceite en Colombia. Como resultado de estos ensayos se realizó un proceso de selección de varios materiales promisorios del híbrido OxG. Semillas de 16 de estos códigos promisorios fueron donadas por Unipalma para la realización de este proyecto. Los parentales de los híbridos OxG son presentados en la Tabla 2. Las madres (*E. oleifera*) corresponden a palmas con origen de la región amazónica brasileña y se encuentran sembradas en el jardín Oleifera en Unipalma SA de su programa de mejoramiento. Los padres (*E. guineensis*) se seleccionaron basados en características morfo-

agronómicas como su alta producción de racimos de fruta fresca y alta capacidad para extracción de aceite, los padres son de orígenes diferentes: Mongana, Mongana-Nifor, Congo Mixto y Avros x Djongo.

**Evaluación de la severidad de la enfermedad:** Para determinar la severidad de las lesiones observadas se hizo un muestreo destructivo y se usó la escala de severidad desarrollada y descrita en el capítulo 2. Los datos fueron analizados con ANOVA de una sola vía para probar las diferencias entre genotipos de híbridos, y finalmente comparación de las medias con la prueba de rango múltiple de Duncan, métodos implementados en el software SAS versión 9.3.

Cada código se evaluó al cabo de 1 mes post inoculación para determinar si se presentaba o no proceso de recuperación. El proceso de recuperación se define como tejido con lesiones delimitadas sin evidencia de progreso y adicionalmente con emisión de hoja sana.

Los híbridos 485 (Oleífera x Congo Mixto) y 517 (Oleífera x Avros x Djongo) fueron seleccionados porque mostraron fenotipos contrastantes cuando se infectaron con *T. paradoxa*. Las plántulas se cultivaron en el vivero de Unipalma (Meta, Colombia) hasta los tres meses de edad.

**Tabla 2.** Codificación de los híbridos y cruzamiento.

HÍBRIDO	CRUZAMIENTO
447	Oleifera X Congo Mix
455	
458	
517	
539	
540	
546	
460	Oleifera X Mongana
464	
485	Oleifera x Avros-Djongo
505	

<b>519</b>	
<b>530</b>	
<b>544</b>	
<b>462</b>	Oleifera X Mongana-Nifor
<b>487</b>	

### **Preparación del inóculo del hongo**

La cepa de *T. paradoxa* utilizada en este estudio se aisló en 2001 de un tejido de una palma localizada en Unipalma (Cumaral, Meta, Colombia) que presentaba síntomas de pudrición de la hoja más joven (flecha). Esta cepa se seleccionó como la más agresiva de acuerdo a las pruebas realizadas previamente en *E. guineensis* (Ayala et al., 2000). La identidad de la cepa se evaluó previamente utilizando métodos moleculares (Rodríguez et al., 2009).

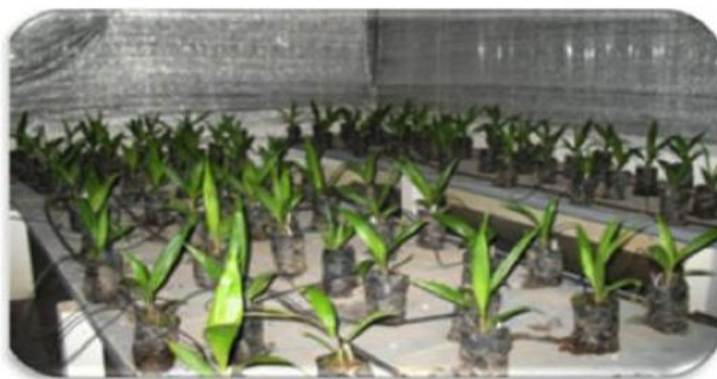
**Inoculaciones:** Las plántulas de 3 meses y medio fueron trasladadas del vivero al invernadero de Cenipalma (ubicado en la misma plantación), donde fueron mantenidas 15 días bajo condiciones de humedad (90%) y temperatura (28-33°C) controladas hasta la inoculación, con el fin de permitir recuperación de las plántulas afectadas durante el traslado y verificar que no presentaran síntomas asociados a plagas, enfermedades o deficiencias nutricionales.

Los 16 materiales fueron inoculados en los meses de febrero, junio, septiembre, teniendo al final tres repeticiones de este experimento. Por cada material había 6 tiempos pos inoculación y por cada tiempo había 3 plántulas inoculadas y un control. Los dos materiales/códigos seleccionados fueron inoculados por la metodología de inyección de 0,1 mL de suspensión de  $1 \times 10^6$  de conidias mL<sup>-1</sup> en tween 80 al 0.03% en la base de la hoja número 3. Para el control de inoculación, las palmas fueron inyectadas con el mismo buffer tween 80 al 0.03%. Después de la inoculación, las plántulas fueron mantenidas por 15 días bajo condiciones controladas de temperatura (28-33°C) y humedad relativa (90%) en una casa de vidrio, figuras 9 y 10.

### **Extracción de RNA y Secuenciación**

Se colectaron muestras de tres individuos (palmas) a 0, 24, 36, 48, 72 y 96 hpi, para cada genotipo (485/517-inoculados, 517-falso inoculado) durante 3 diferentes momentos de muestreo (febrero, junio, septiembre). Para esto, se identificó la región necrótica después de las 36 hpi y se

disectó el área de avance de la lesión sin incluir tejido necrótico (aproximadamente 1cm), y se depositó en un vaso de precipitado donde se homogeneizó en 15 ml de solución estabilizadora de RNALater (Ambion, número de catálogo AM7021). Con el objetivo de obtener suficiente biomasa para la extracción de RNA, 20mg de tejido de cada una de las 54 plantas (3 individuos por 6 puntos de tiempo, y durante las tres repeticiones del ensayo), de cada tratamiento se agruparon en un único pool por cada material, lo que dio como resultado tres muestras para secuenciación, i.e., 485-inoculado, 517-inoculado, 517-control de inoculación. Adicionalmente, se recolectó tejido de micelio y conidios de *T. paradoxa* cultivados en medios sólidos artificiales, para realizar una extracción de RNA adicional. Así, cuatro librerías para secuenciamiento de RNA fueron preparadas con el kit TruSeq RNA, usando la química de lecturas pareadas (PE, por sus siglas en inglés, paired-ends) y secuenciadas en la plataforma Illumina HiSeq-2000 en Macrogen, Corea.



**Figura 9.** Distribución al azar de las plántulas de 16 híbridos O×G en el invernadero.



**Figura 10.** Inoculación de conidios en plántulas de los diferentes híbridos O×G. De izquierda a derecha, desinfección del sitio de inoculación con etanol al 70%, inoculación 0,1 ml de la suspensión de conidios  $1 \times 10^6$  de conidios  $\text{mL}^{-1}$  con jeringa de insulina de 1 ml en la base de la tercera hoja de la plántula, el control negativo fue inyectado con el buffer de suspensión de esporas. En la fotografía final se registran las plántulas inoculadas cubiertas con una bolsa plástica negra para favorecer la germinación de las conidios.



## Filtrado de lecturas y ensamblaje de la secuencia

Los datos brutos fueron puestos a disposición por Macrogen, Corea en formato FastQ y procesados como se describe a continuación. La evaluación de la calidad de las lecturas se llevó a cabo utilizando FastQC (<http://www.bioinformatics.babrahm.ac.uk/projects/fastqc>).

Las lecturas pareadas (2x100 pb) fueron filtradas y los adaptadores eliminados. Para esto se eliminaron las secuencias de baja calidad (lecturas con bases ambiguas 'N') y lecturas con más del 10% de Q<20 bases con el programa clean-reads ([http://bioinf.comav.upv.es/clean\\_reads](http://bioinf.comav.upv.es/clean_reads)) y FastQ/A-trimmer ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit)).

Para separar las lecturas que se originan de la planta y del patógeno, se decidió realizar un ensamblaje de novo de las lecturas limpias de *T. paradoxa* utilizando el programa Trinity RNASeq *de novo* assembler (Garber et al., 2011) con los parámetros predeterminados.

En seguida se eliminaron restos de RNA ribosomal de las lecturas ya limpias de las muestras 485-inoculado, 517-inoculado, 517-falso inoculado. Las lecturas pareadas de alta calidad (limpias y sin RNA ribosomal) fueron mapeadas al ensamblaje de novo del transcriptoma de *T. paradoxa* utilizando Bowtie2 con los parámetros por defecto (Langmead et al., 2012), conservando las lecturas que no mapearon, que putativamente serían generadas por la planta hospedera. En seguida, las lecturas fueron colapsadas utilizando fastx-collapser (Versión 0.0.13, [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/))

Con las secuencias colapsadas se realizó un único ensamblaje de novo del transcriptoma usando Trinity (Versión 2.32), con los siguientes parámetros: min contig length de 200 y min kmer coverage de 4. Este ensamblaje juntaba todos los datos de alta calidad de las muestras, juntando los datos originarios de las muestras 485-inoculado, 517-inoculado, 517-falso, que sería usados más adelante para la cuantificación de los niveles de expresión de los transcritos. Los transcritos ensamblados, junto con ESTs de palma de aceite depositados en el GenBank bajo las accesiones comprendidas entre los números EY396120–EY413718, disponibles públicamente en 2012, fueron procesados con el software TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL) versión 2.06 (Pertea et al., 2003) para generar un conjunto de unigenes, bando de datos no redundante de transcritos. Estos unigenes se segmentaron en dos categorías: grupos (prefijado con CL) y singletons (prefijado con unigene), excepto por el parámetro "porcentaje de identidad para agrupación y ensamblaje" que se estableció en 90%, porque mostró el mayor porcentaje de contigs que producen alineamientos contra base de datos de proteínas no redundantes (NCBI nr). Antes de ejecutar TGICL, se limpió el conjunto de

datos de entrada de EST para eliminar las secuencias contaminantes. Esto se hizo usando Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/>) con filtros de bases de datos con UniVec de NCBI. Trimest, (<http://emboss.bio-informatics.nl/cgi-bin/trimest>) se usó para eliminar las colas de poli-A. Las secuencias de *E. coli* contaminantes se eliminaron después de realizar una comparación contra el genoma bacteriano usando Blast. Las repeticiones conocidas se enmascararon utilizando RepeatMasker (<http://www.repeat.masker.org>).

### **Anotación Funcional**

Las transcritos resultante del procesamiento con TGICL se escanearon utilizando ESTScan versión 3.0.3 (Iseli, Jongeneel y Bucher, 1999) para determinar sus regiones codificantes, ya que estos pueden contener regiones no traducidas (UTRs) en cualquiera de los extremos. Las proteínas predichas fueron alineadas con la base de datos de proteínas Swiss-Prot utilizando BLASTp (versión 2.2.25) y contra la base de datos NCBI Nr (base de datos de secuencias no redundantes NCBI, consultada en 2012) utilizando BLASTx, manteniendo hits con un e-value menor que  $1.0E^{-6}$ . Para buscar secuencias homólogas en las bases de datos de PFAM 24.0 (base de datos de familias de proteínas, <http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/Pfam/releases/>) se utilizó HMMER (versión 3.0, <http://hmmer.org/>). También se usó Blast2GO (Conesa et al., 2009) para obtener una anotación funcional basada en la Ontología de Gene (GO) de las proteínas predichas basadas en BLASTx y BLASTp entre los contigs y varias bases de datos públicas, incluidas: COG, SwissProt (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/COG/COG>) y Kyoto Encyclopedia of Genes y Genomas (KEGG, <https://www.genome.jp/kegg/>), consultadas en 2012. Las anotaciones de las rutas metabólicas de KEGG se realizaron utilizando Blastp contra la base de datos KEGG.

### **Comparación de proteomas**

El conjunto completo de transcritos traducidos se comparó con los proteomas de especies de plantas seleccionadas utilizando el programa OrthoMCL. OrthoMCL proporciona un método escalable para construir grupos ortólogos a través de múltiples taxones eucarióticos, utilizando un algoritmo de clúster de Markov para agrupar ortólogos (supuestos) y parálogos. La comparación con las anotaciones EC asignadas previamente, sugiere un alto grado de confiabilidad, lo que implica una utilidad para la anotación automatizada del genoma eucariótico (Li et al., 2003). El genoma

ensamblado obtenido por nosotros se comparó con el genoma de referencia *Phoenix Dactylifera*, *E. guineensis*, *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*.

### **Mapeo de lecturas al genoma de referencia**

Las lecturas filtradas desde cada librería (485 y 517) fueron mapeadas individualmente al genoma de referencia de *E. guineensis* con Star, Spliced Transcripts Alignment to a Reference, (Dobin et al., 2015, 2016). En los análisis de RNA-seq es de gran interés el descubrimiento de variantes genéticas o de empalme, y el hecho de no buscar nuevas transcritos puede sesgar las estimaciones de expresión y reducir la precisión, STAR utiliza anotaciones para extraer uniones de empalme conocidas y luego construye secuencias "empalmadas" eliminando secuencias de intrones, es decir, uniendo las secuencias de los exones. Esto es muy recomendable, ya que permite un mapeo más preciso de las lecturas empalmadas (Dobin et al., 2016). Las lecturas mapeadas y no mapeadas fueron reportadas como archivos BAM, los cuales fueron usados para análisis posteriores.

### **Perfiles de expresión**

Debido a que los experimentos sin réplicas no permiten la estimación de la dispersión de los conteos en torno al valor esperado para cada material, lo cual es crítico en análisis de expresión diferencial, y este estudio no hay réplicas, se realizó una aproximación para la exploración de los datos, donde se calcularon los cambios basados en conteo normalizado de las lecturas y se aplicó un nivel astringente de corte para determinar cuáles genes están más o menos expresados en cada condición.

Dos metodologías se siguieron para realizar los análisis de expresión diferencial, una paramétrica y otra no paramétrica. Los genes expresados diferencialmente se identificaron utilizando el software R y los paquetes Bioconductor DESeq2 versión 1.14.1 y NOISeq versión 3.16.5.

Comparaciones de tres vías: se realizaron 485vs517, 517vs517F y 485vs517F para comprender la modulación de la expresión génica entre diferentes condiciones experimentales. La expresión (digital) de 20 genes seleccionados que muestran el máximo cambio en  $\log_2$  veces bajo la infección por *T. paradoxa* en comparación con el control no inoculado se validaron mediante PCR de transcripción inversa utilizando cebadores específicos de genes.

### **Análisis por PCR en tiempo real**

Para los los análisis de PCR en tiempo real se emplearon las muestras tomadas para cada tiempo pos inoculación que se habían recolectado y guardado durante el muestreo de cada uno de los materiales. Los cálculos en cuantificación relativa de expresión genética se basaron en la comparación de los valores Ct utilizando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección. Sin embargo, hay un modelo que no requiere la eficiencia de la reacción para acceder a un factor de corrección. Este modelo supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100%) en la eficiencia de reacción en las PCR en tiempo real tanto del gen en estudio como del gen de referencia (Livak & Schmittgen, 2001). Este es el método 2 delta-delta Ct, que sólo es aplicable para una estimación rápida de la proporción relativa de la expresión genética en estudio (Pfaffl, 2004). El método 2 delta-delta Ct expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

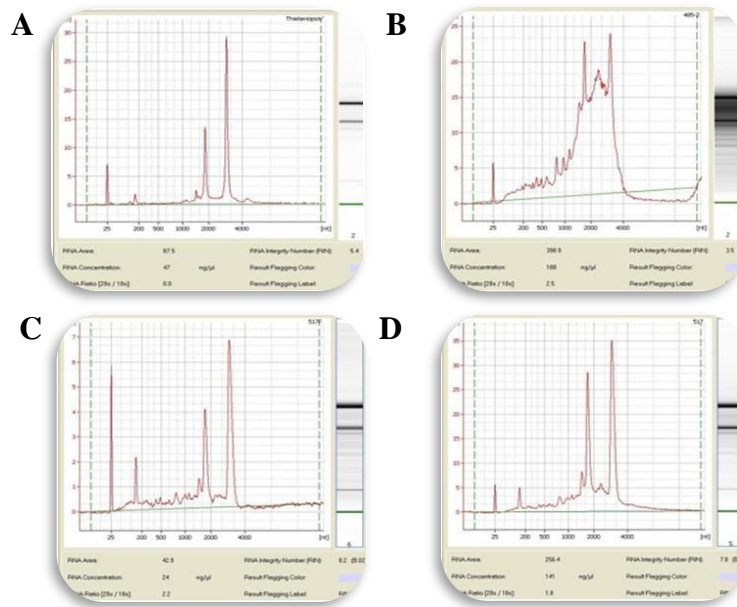
$$\text{Ratio} = 2^{-[\Delta CP \text{ Muestra} - \Delta CP \text{ Control}]}$$
$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

## **3.2 RESULTADOS**

### **3.2.1 Secuenciación de Illumina y control de calidad**

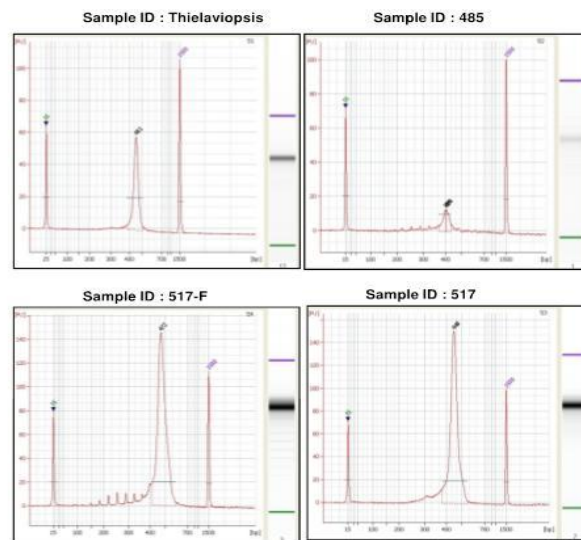
Los datos de RNA-seq generados en el presente estudio se depositaron en el archivo de lectura de secuencias de NCBI (SRA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) con el número de acceso PRJNA750061 (SRR15533162, SRR15533163 y SRR15533164). Las descripciones de las muestras biológicas utilizadas en el presente estudio se pueden encontrar en la base de datos NCBI BioSample (BioSample, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample>) con los números de acceso SAMN20428080, SAMN20428055 y SAMN20430275 .

El análisis de calidad de RNA total extraído de las muestras enviadas evidenció una degradación parcial del RNA de la muestra 485. La calidad del RNA fue verificada usando un Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, CA, USA), y el promedio del Número de Integridad del RNA (RIN) fue 6.63 (figura 11).



**Figura 11.** Gráficas de calidad del RNA extraído para la construcción de librerías. Gráfica para el RNA de *Thielaviopsis*, (figura A), RNA de la muestra 485 inoculada con el hongo (figura B), RNA de la muestra 517 inoculada con buffer (figura C) y RNA de la muestra 517 inoculada con el hongo (figura D).

En los resultados del control de calidad de las librerías se observa un tamaño de fragmentos que varía de 399 a 472 pb, figura 12.



**Figura 12.** Gráficas de calidad de las librerías construidas para cada una de las muestras a secuenciar.

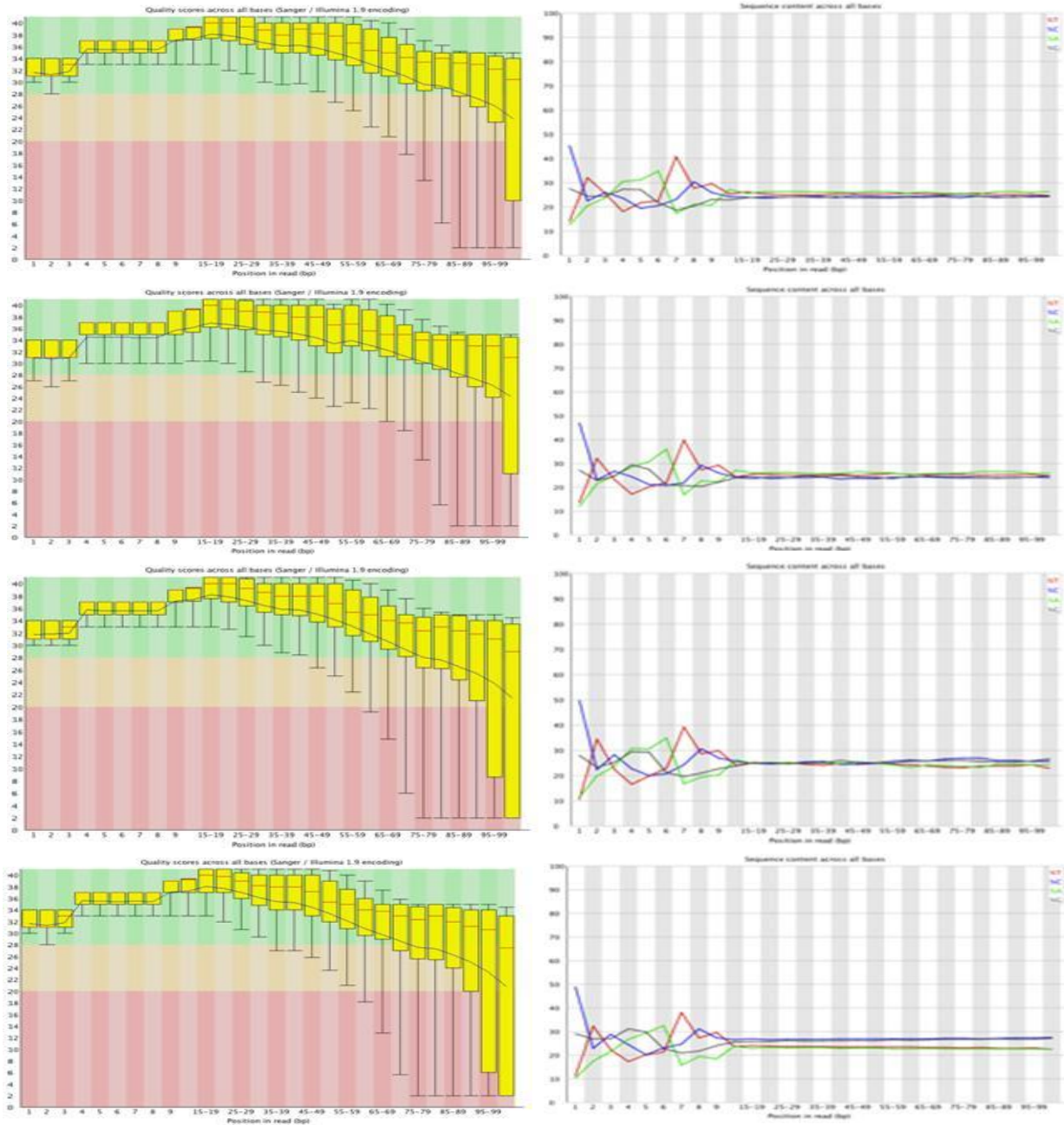
Las lecturas obtenidas de cada muestra fueron analizadas con el programa FastQC, el cual proporciona un reporte exhaustivo de la composición y calidad de los datos obtenidos por secuenciación de alta eficiencia de una librería.

El reporte de uno de los sentidos de secuenciación de cada una de las muestras es presentado en la figura 13, donde se observa en las gráficas de la derecha, la calidad por base de la secuencia, la cual es muy buena en las 4 muestras para 101 pb secuenciadas, ya que solo las últimas pb no tiene un valor de calidad mayor a 20. En la gráfica de la izquierda se encuentran el contenido de bases por secuencia donde cada base debe aparecer como una línea paralela respecto a las otras bases.

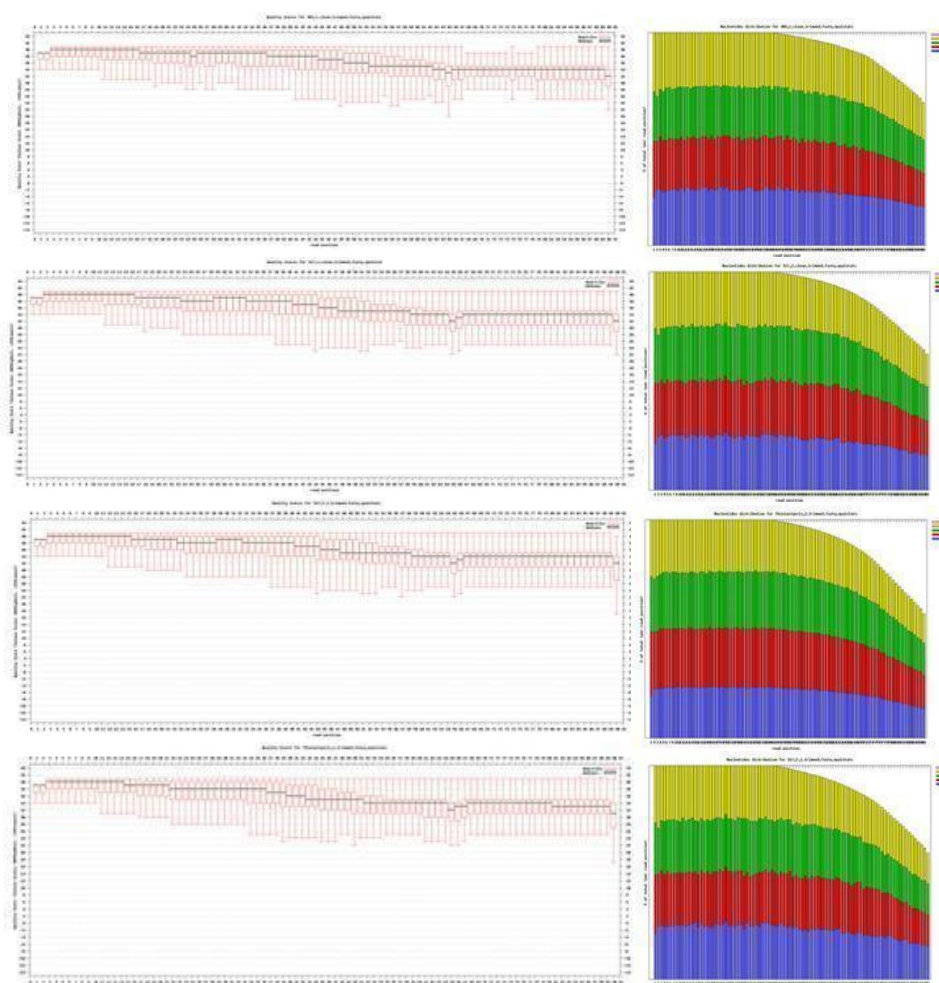
En los dos gráficos se puede observar que las 10 primeras bases, tienen un comportamiento igual en todas las muestras, lo que sugiere la presencia de un primer o barcode posiblemente, por lo que se decidió realizar una limpieza a los reads y eliminar estas primeras bases por medio de los programas CleanReads y trimmer. Después de limpiar las secuencias nuevamente se realizó el control de calidad de los reads con el programa FastQ. En la figura 14, se muestran las gráficas donde la mayoría de las bases de las secuencias tienen una muy buena calidad ( $Q>30$ ).

### 3.2.2 Ensamblaje *De novo*

Con los reads limpios y de alta calidad, se inició el proceso de ensamblaje, el cual se realizó con el programa Trinity para el ensamblaje *de novo* de transcriptos (Henschel et al., 2012; Haas et al., 2013). Gracias a la eficiente reconstrucción y análisis de grupos de los grafos de Bruijn, Trinity, reconstruye una gran fracción de transcritos, incluyendo isoformas de empalme alternativo y transcriptos de genes recientemente duplicados. Comparado con otros ensambladores *de novo*, Trinity recupera más transcriptos de longitud completa a través de un amplio rango de niveles de expresión, con una sensibilidad similar a los métodos que se basan en alineamientos a un genoma de referencia (Grabherr et al., 2011). El número de reads usados para la construcción de los contigs por el ensamblador Trinity para cada una de las muestras es presentado en la tabla 3.



**Figura 13.** Control de calidad de los reads obtenidos de cada muestra, realizados con el programa FastQC. De arriba hacia abajo pool muestra 517 inoculada, pool muestra 517 control, pool muestra 485 y muestra de *T. paradoxa*.



**Figura 14.** Control de calidad después de limpiar las secuencias de reads con el programa FastQ. Las secuencias de los cuatro pools mostraron una buena calidad para realizar análisis bioinformáticos. De arriba hacia abajo pool muestra 517 inoculada, pool muestra 517 control, pool muestra 484 y muestra de *T. paradoxa*.

**Tabla 3.** Presentación resumida por muestra acerca de la cantidad de reads crudos obtenidos en la secuenciación, cantidad de reads limpios que fueron procesados por Trinity y el número de contigs obtenidos.

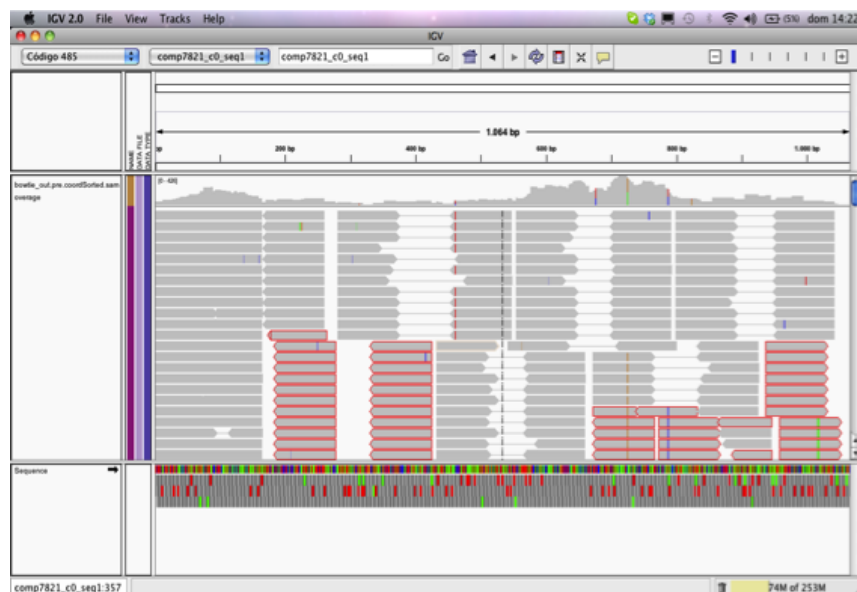
Muestra	Reads	Clean & Trimming	N° Contigs
485	142.603.734	135.264.259	43290
517	109.614.938	102.219.991	94465
517_F	57.006.482	52.688.179	64899
<i>Thielaviopsis</i>	86.193.028	79.778.612	23497



Como parte del análisis, las lecturas fueron alineadas a los contigs obtenidos con Trinity, usando Bowtie, un alineador de reads cortos. El porcentaje de reads que al menos tuvieron 1 alineamiento y los reads no alineados para cada muestra son presentados en la tabla 4. A partir de uno de los archivos de salida de Bowtie se hizo la visualización de los resultados usando el programa IGV (Integrated Genomics viewer), un ejemplo es presentado en la figura 15. En el gráfico se observan las lecturas que solo alinearon una de las secuencias, aparecieron con un borde rojo. También fue posible determinar el sitio de alineamiento de cada lectura y la cobertura de los datos.

**Tabla 4.** Resultados del porcentaje de reads alineados con Bowtie.

Muestra	Reads procesados	Reads min. 1 alineamiento	Reads no alineados
485	135.264.259	75.37 %	32.532.904
517	102.219.991	90.01 %	10.159.194
517_F	52.688.179	89.86 %	5.273.414
<i>Thielaviopsis</i>	79.778.612	93.12 %	5.516.709



**Figura 15.** Ejemplo de la visualización por contig de los reads alineados (forward y/o reverse) y de la cobertura obtenida, con el programa IGV de la muestra susceptible.

Después del ensamblaje de los reads con el programa Trinity, se realizó una estimación de abundancias con el programa RSEM, RNA-Seq by Expectation Maximization (B. Li et al., 2011), figura 16.

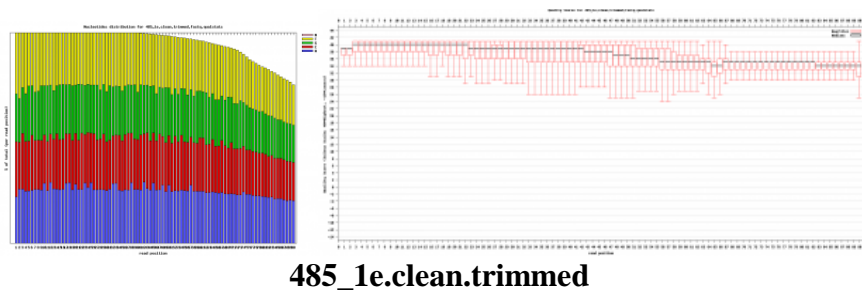
```
#Total fragments mapped to transcriptome: 38122297.97
```

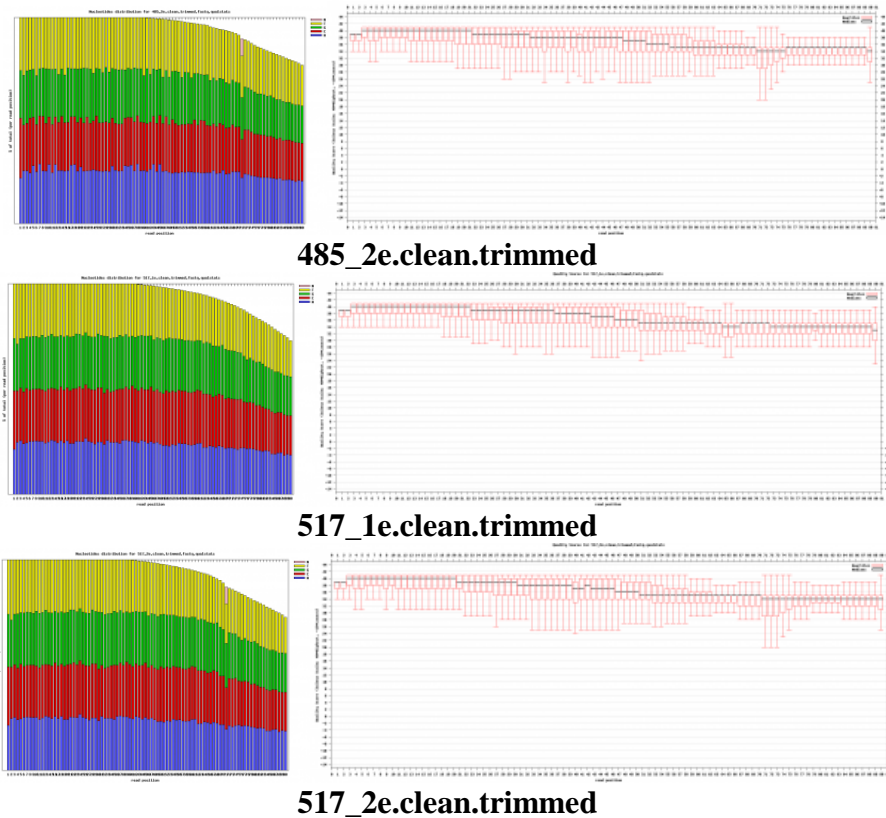
transcriptlength	eff_length	count	fraction	fpkm	%comp_fpkm	
comp23092_c0_seq1	342	10	18.00	1.58e-06	47.22	100.00
comp23092_c0_seq2	312	10	0.00	NA	0.00	0.00
comp25712_c0_seq1	203	10	0.00	NA	0.00	0
comp8380_c0_seq1	347	10	295.00	2.48e-05	773.83	100.00
comp23927_c0_seq1	815	417	260.00	4.49e-06	16.36	100.00
comp23309_c0_seq1	295	10	91.00	1.33e-05	238.71	100.00
comp17736_c0_seq1	253	10	6.00	1.80e-06	15.74	100.00
comp17736_c0_seq2	201	10	0.00	NA	0.00	0.00
comp31331_c0_seq1	225	10	0.00	NA	0.00	0
comp19690_c0_seq1	245	10	0.00	NA	0.00	0
comp26525_c0_seq1	250	10	0.00	NA	0.00	0
comp346_c0_seq1	844	446	611.33	1.01e-05	35.96	0.59
comp346_c0_seq2	771	373	7238.05	1.35e-04	509.02	8.36
comp346_c0_seq3	700	302	6121.62	1.31e-04	531.72	8.73
comp346_c0_seq4	627	229	0.00	NA	0.00	0.00

**Figura 16.** Ejemplo de la salida de RSEM, donde se presentan las estimaciones de expresión de genes y sus isoformas en términos de conteo, TPM y FPKM.

Los resultados obtenidos evidenciaron que la longitud efectiva (longitud del contig que tiene una alta densidad de reads) era de 10 en el 35% de los datos, lo cual evidenció la necesidad de secuenciar nuevamente para aumentar la cobertura y hacer una estimación confiable de la expresión de genes.

Los nuevos reads, fueron sometidos a análisis de calidad y al igual que con los primeros, se les realizó limpieza y eliminación de las primeras bases y nuevamente se verificó su calidad, como se puede observar en las gráficas presentadas en la figura 17.





**Figura 17.** Análisis de calidad de las secuencias después de limpiarlas y eliminar las primeras bases de cada uno de los pair-end de las muestras 485 y 517.

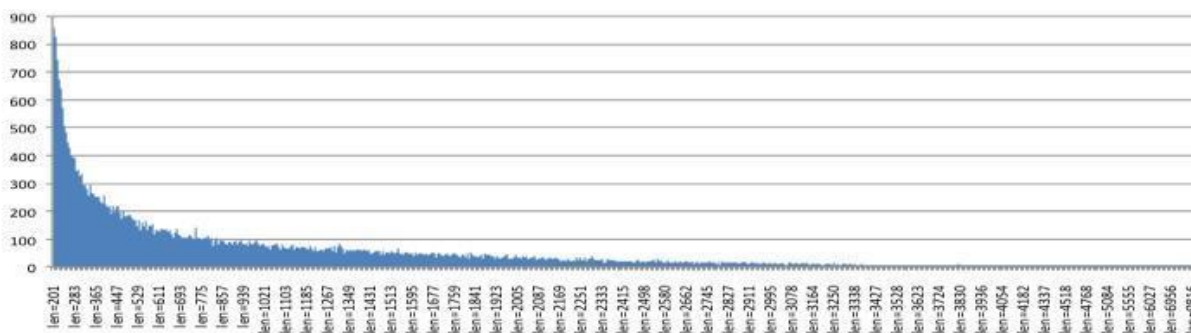
### 3.2.3 Alineamientos

Con las lecturas extra obtenidas de la secuenciación por Illumina paired end en una línea, se decidió concatenar las muestras 485 y 517 extra respectivamente con las primeras lecturas obtenidas. Con estos archivos concatenados se realizó un alineamiento con los resultados de Trinity de las muestras Thielaviopsis y 517F usando el programa Bowtie (Langmead et al., 2012).

Teniendo en cuenta los porcentajes de alineamientos concordantes y discordantes se decide hacer el alineamiento con las lecturas crudas y con las siguientes condiciones: Mode: local, Opción: fast-local, X=600 y Orientación: fr.

Para el análisis de los reads de las muestras 485 y 517, se decidió intentar una aproximación de separación previa a cualquier análisis de los reads del hongo y de la palma. Para esto se tomaron los reads crudos, concatenando los iniciales con los nuevos y a continuación se realizó por medio del programa Bowtie un alineamiento contra los contigs ensamblados usando Trinity de la muestra Thielaviopsis. De los resultados se tomó el archivo discordante para concatenarlo con los reads de la

muestra 517\_F y de esta forma obtener un archivo en teoría con reads solo de palma para realizar el ensamblaje sin problemas. Los reads del archivo generado fueron examinados con FastQ para verificar su calidad. La calidad de los reads fue evaluada con el programa FastQ y la limpieza y eliminación de bases con los programas (Cleaner y FastQ-trimmer). Como en los anteriores análisis, las gráficas permitieron verificar que los reads eran de buena calidad para continuar con el proceso. Con el objetivo de continuar con la eliminación de reads que puedan actuar como interferentes, se decidió realizar un nuevo Bowtie, pero esta vez contra la subunidad ribosomal de plantas, para eliminar el RNA ribosomal. Para esto, se descargaron las secuencias de RNA ribosomal (subunidad pequeña y grande, ([www.plantrdnadatabase.com](http://www.plantrdnadatabase.com))). Y con estas secuencias se construyeron los índices requeridos para el alineamiento. Con el archivo discordante (sin rRNA) obtenido se realizó eliminación de redundancia y con el archivo resultante se realizó el ensamblaje con el programa Trinity, obteniéndose un archivo con 115489 contigs o transcritos. El tamaño de los contigs estuvo en el rango de 201-16454 y la mediana de la longitud del contig (N50) fue de 554. El número de contigs disminuyó al aumentar la longitud del contig como se puede observar en la figura 18.



**Figura 18.** Gráfica del tamaño de los contigs obtenidos con el programa Trinity, y su respectiva frecuencia.

Con el objetivo de generar secuencias consenso más largas y completas, se utilizó el programa TGICL. La inclusión de ESTs disponibles en el GenBank nos permitió mejorar los resultados del ensamblaje de novo y obtener contigs más largos.

Con el archivo Trinity.fasta obtenido, se realizó una búsqueda de regiones codificantes por medio del programa ESTScan. ESTScan, es una herramienta bioinformática que puede detectar regiones codificantes en secuencias de DNA con alta selectividad y sensibilidad, aún si éstas son de baja calidad y corrige errores de secuencia que conducen a cambios de marco de lectura.

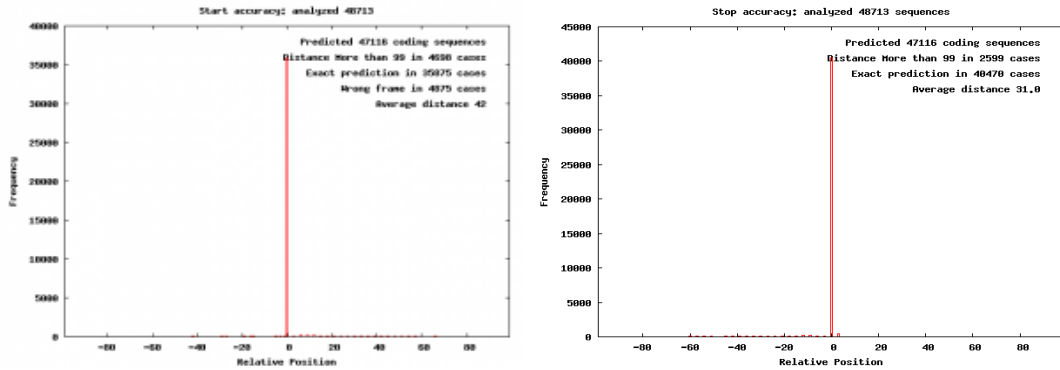
ESTScan no es un programa de predicción de genes, ni tampoco un detector de marco de lectura abierto. De hecho, su fuerza radica en el hecho de que no requiere un marco de lectura abierto para detectar una región de codificación. Como resultado, el programa puede pasar por alto algunos aminoácidos traducidos en el extremo N o C, pero detectará las regiones codificantes con alta selectividad y sensibilidad. Usa un modelo de Markov para representar la tendencia en el uso de hexanucleótidos encontrados en regiones codificantes en relación a regiones no codificantes. Adicionalmente, ESTScan permite inserciones y deleciones cuando estas mejoran las estadísticas de regiones codificantes. Debido a que la puntuación absoluta para una secuencia dada depende de su longitud y su contenido de G+C, se crean tablas que permiten el cálculo de una puntuación normalizada que es independiente de estos parámetros. El uso de ESTScan implica la creación de matrices de puntuación las cuales reflejan las preferencias de codones en el organismo estudiado y pueden ser obtenidas usando tres scripts: `extract_mrna`, `prepare_data` y `build_model`. En la figura 19 se presenta el flujo de trabajo realizado para la construcción de las matrices. Para la construcción de las matrices fue necesario descargar las secuencias disponibles en los sitios FTP para las especies *E. guineensis* y *T. paradoxa*, sin embargo, no había datos disponibles para ninguna, por lo que se buscó en orden taxonómico ascendente hasta encontrar datos disponibles. Así, para el caso de *T. paradoxa* se encontraron datos en Sordariomycetes (3 especies) y para *E. guineensis* en Commelinids (9 especies).



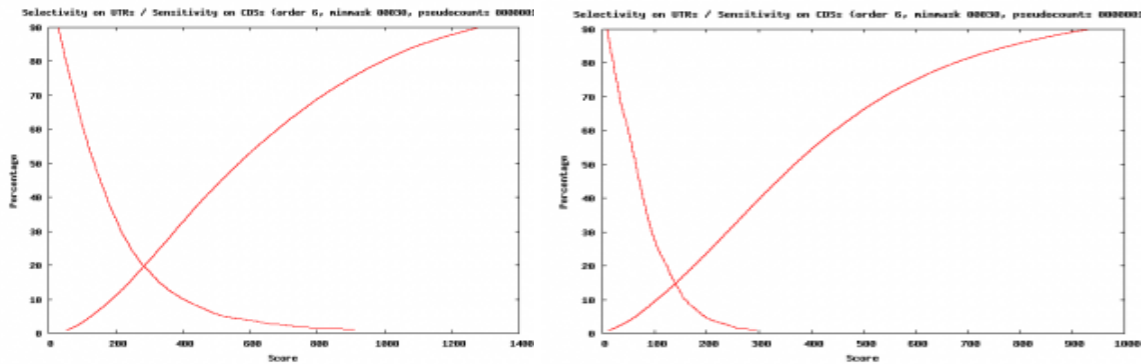
**Figura 19.** Elaboración de las matrices de ESTScan. Para el script `extract_mrna` se tomaron desde los respectivos sitios FTP secuencias de las bases RefSeq y Unigene.

Una vez construidas las matrices se procedió a evaluarlas por medio de dos scripts: `extract_UG_EST` y `evaluate_model`. Las figuras 20 y 21 corresponden al modelo en hongos y las figuras 21 y 22 al

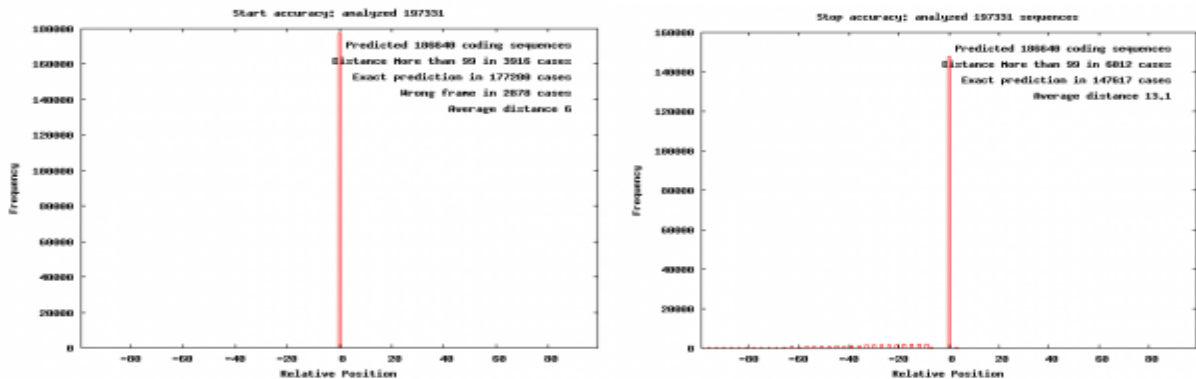
modelo en plantas. En estas gráficas se presenta la exactitud de la predicción para los sitios de inicio y de parada y en la gráfica 21 la sensibilidad y especificidad del modelo para hacer las predicciones.



**Figura 20.** Distribución de distancias entre los sitios de inicio predichos y anotados para hongos. En el eje X se encuentra la posición relativa y el eje Y la frecuencia. La posición cero es el sitio de parada e inicio predicho, respectivamente.



**Figura 21.** Sensibilidad y especificidad del modelo para UTR y CDS de plantas (a la izquierda) y de hongos (a la derecha). En el eje X se encuentra el porcentaje y en el eje Y el score.



**Figura 22.** Distribución de distancias entre los sitios de inicio predichos y anotados para plantas. La posición cero es el sitio de inicio predicho.

Finalmente, después de evaluar las matrices, se corrió ESTScan para las muestras usando la respectiva matriz para cada caso. Finalmente, la agrupación se realizó por medio de una versión modificada de megablast (NCBI), y los grupos resultantes fueron luego ensamblados con el programa CAP3 (X. Huang et al., 1999). TGICL comienza con un archivo multi-FASTA y genera un conjunto de archivos desde CAP3 de scaffolds y unigenes, Como resultado TGICL generó 127.254 componentes de transcritos de la palma de aceite que fueron usados para el proceso de anotación con Blast2GO (Conesa et al., 2009). La cantidad de reads usados para cada ensamblaje, el número de contigs y clusters obtenidos son presentados en la tabla 5.

**Tabla 5.** Resumen de los resultados de Trinity y TGICL.

MUESTRA	Reads procesados	Contigs	TGICL
<i>T. paradoxa</i>	86.193.028	23.497	N.A
Palma	673.670.687	115.489	127.254

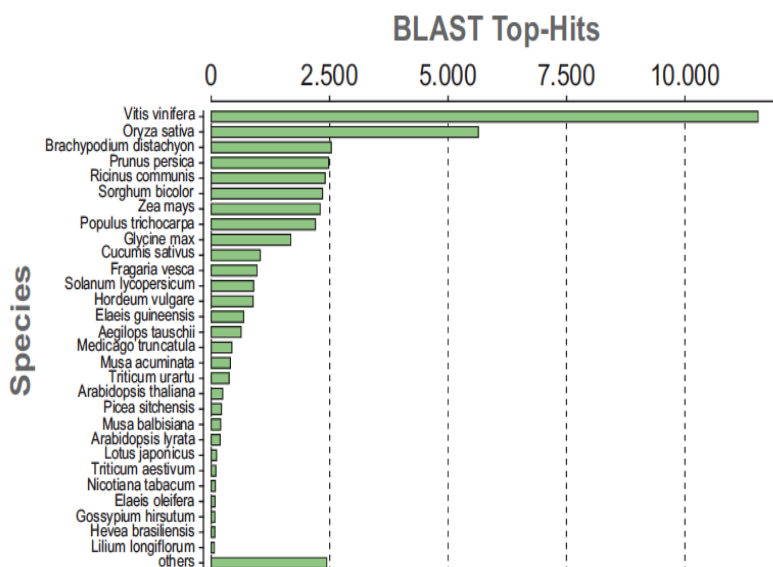
El blast de los transcritos ensamblados fue hecho contra la base de datos del NCBI y los resultados de la anotación mostraron que los hits encontrados de los clusters de palma correspondieron a plantas (no hubo hits con hongos), demostrando que la sustracción in sílico permitió eliminar la mayoría de reads de *T. paradoxa*, como se puede observar en la gráfica de distribución de especies generada a partir de Blast2GO (figura 23), donde se observa además hits de los clusters con *E. guineensis* y *E. oleífera*, lo cual demuestra que la estrategia de sustracción in sílico implementada en este trabajo para patosistemas sin información de genoma disponible, funciona eficientemente.

## **ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL HÍBRIDO O<sub>x</sub>G**

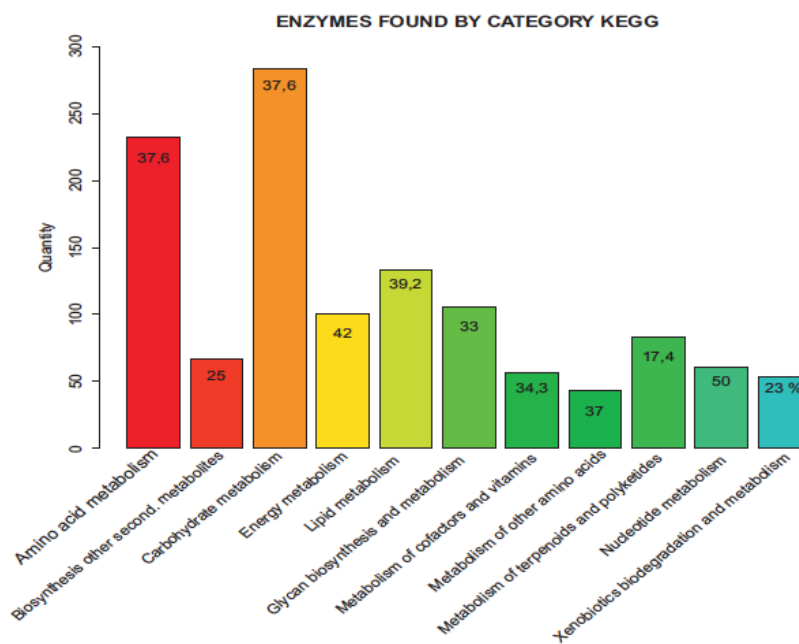
### **3.2.4 Anotación Funcional**

Con los resultados se realizó la anotación funcional usando la base de datos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Qiu, 2013), a partir del cual se obtuvo las rutas metabólicas en las que se encuentran las enzimas anotadas. Estas rutas se encuentran organizadas por categorías. En total se logró asignar 1220 códigos de enzima en 11 categorías. En la figura 24 se grafica la cantidad de enzimas encontradas por categoría y el porcentaje de ocupación respecto al total de

enzimas de cada categoría, siendo las principales categorías con mayor número de enzimas metabolismo de nucleótidos, metabolismo de la energía, metabolismo de lípidos, carbohidratos y aminoácidos.



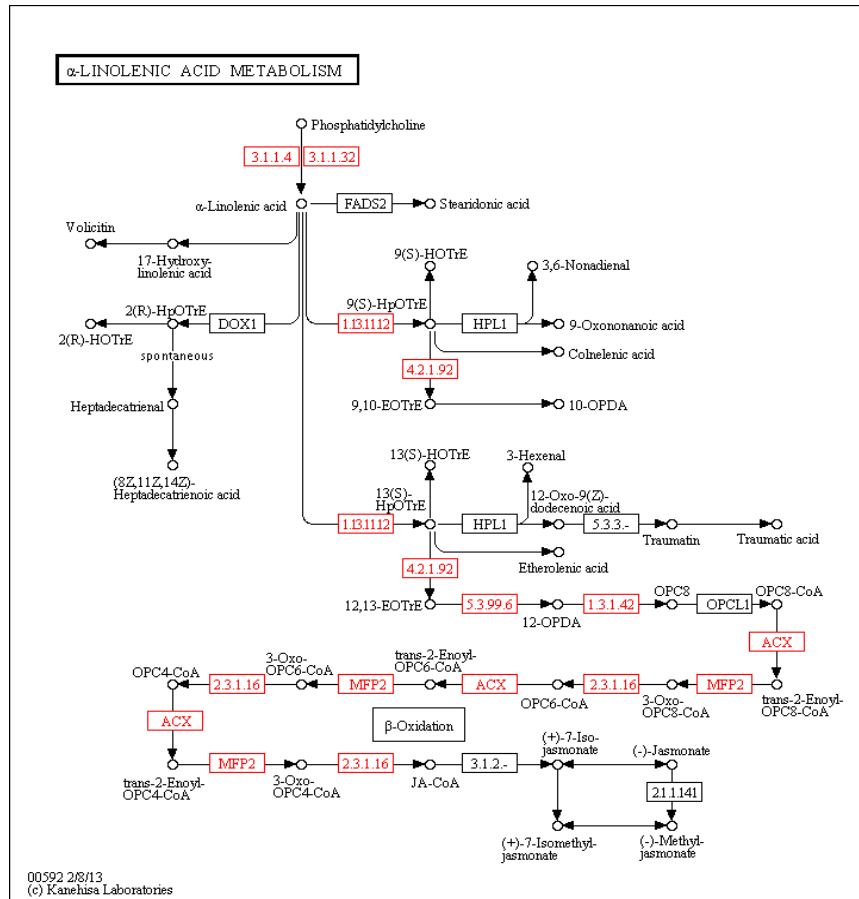
**Figura 23.** Distribución de los principales hits de especies con los clusters de palma ensamblados de novo.



**Figura 24.** Diagrama de las categorías donde se encontraron la mayoría de las enzimas anotadas del transcriptoma de palma.

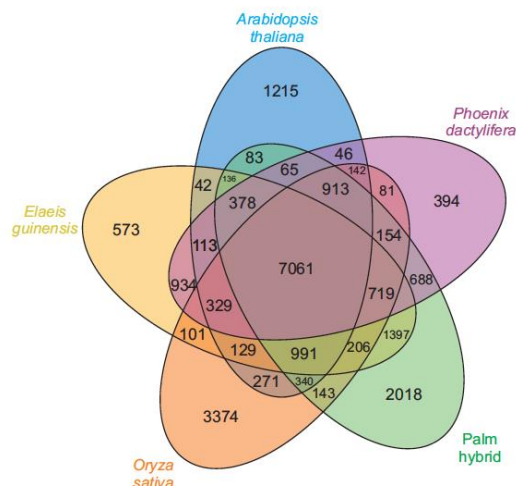


Una ruta de interés (figura 25), encontrada en este transcriptoma fue la de los octadecanoides (síntesis del ácido alfa linoleico), la cual fue analizada y se encontró que el 80% de las enzimas que conforman esta ruta fueron anotadas para el transcriptoma de palma, esta ruta es importante ya que es la que produce el ácido jasmónico, enzima que participa en diferentes procesos (Zdyb et al., 2018). Actúan como moléculas señalizadoras de la respuesta de las plantas a numerosas situaciones de estrés y participan en diversos procesos de desarrollo (Checker et al., 2018). El ácido jasmónico es producido después del daño ocasionado por el patógeno, el cual genera cambios a nivel celular como influjo de iones de calcio, producción de especies reactivas de oxígeno, inducción de cascadas de proteínascinasa activadas por mitógeno (MAPK) y proteínas cinasa dependientes de calcio (PKDC), que inducen la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la transducción de señales de defensa de las plantas, como inhibidores de proteasas, biosíntesis de flavonoides, lipooxigenasas y proteínas relacionadas con la patogénesis (Yang et al., 2019). Esta fitohormona lipídica (JA), es un derivado oxigenado de los ácidos grasos linoleico y linolénico, que se liberan desde los fosfolípidos de las membranas celulares por la acción de lipasas y se sintetizan a través de la vía de biosíntesis de oxilipina, comenzando con ácido  $\alpha$ -linolénico que se libera de las membranas del cloroplasto después de la infección del patógeno o ataque del insecto. La catálisis posterior es procesada por lipoxygenase (LOX), allene oxide synthase (AOS) y allene oxide cyclase (AOC) para generar ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) en el cloroplasto. El OPDA se transporta al peroxisoma, donde tienen lugar varios ciclos de  $\beta$  oxidación y se sintetiza el (+) - 7-iso-JA (Yang et al., 2019; Zdyb et al., 2018). Después de la secreción en el citosol, el (+) - 7-iso-JA se conjuga con el aminoácido isoleucina (Ile) para generar JA-Ile, la forma más bioactiva de JA. En el citosol, el JA se convierte en metabolitos de JA a través de hidroxilación y / o carboxilación, para atenuar la señalización de JA. Una vez que el JA es sintetizado en el peroxisoma debe ser transportado al citoplasma, donde activa el sistema de degradación de proteínas (Proteína JAZ y el complejo represor que regula la activación de MYC2), que funciona como activador de los genes de defensa (Checker et al., 2018).



**Figura 25.** Ruta del metabolismo del ácido alfa-linolénico. Esta vía conduce a la producción de ácido jasmónico. Las cajas representan las enzimas de la ruta y las que están en rojo las enzimas identificadas en el transcriptoma del híbrido de palma.

Con los reads de palma ensamblados y agrupados se realizó un cluster de ortólogos con *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Elaeis guineensis* y *Phoenix dactylifera* y se generó un diagrama de Venn con el programa OrthoMCL, donde se observó que de 16301 clusters de palma, 11897 clusters son compartidos con *E. guineensis*, 10719 con *P. dactylifera* y 2018 clusters están solo en palma (Figura 26).



**Figura 26.** Diagrama de Venn de los clusters de ortólogos obtenidos con OrthoMCL con 5 genomas entre los reads ensamblados y agrupados del híbrido de palma con *A. thaliana*, *O. sativa*, *E. guineensis* y *P. dactylifera*. Cada especie tiene su propio color. El número en el medio es el número de grupos ortólogos compartidos por las cinco cepas. El número de singletons (los genes para los que no se encontró un gen ortólogo) se indica para cada especie.

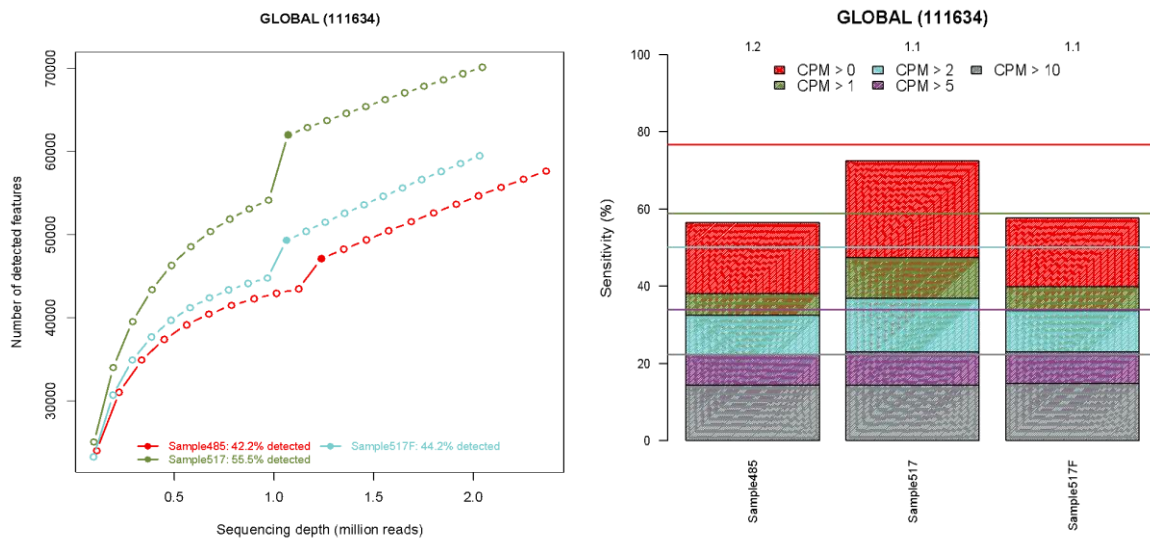
### 3.2.5 Análisis de perfiles de expresión

Dos metodologías se siguieron para realizar los análisis de expresión diferencial, basadas en si se usa o no un genoma de referencia. Los genes expresados diferencialmente se identificaron utilizando R y los paquetes Bioconductor DESeq2 versión 1.14.1 y NOISeq versión 3.16.5. Los parámetros predeterminados se utilizaron para DESeq2 y NOISeq con expresión logarítmica relativa del método de normalización para DESeq2 y RPKM para NOISeq. DESeq2 utiliza el valor p-ajustado Benjamini-Hochberg (valor q) por lo que los puntos de corte se establecieron en 0,001. Para NOISeq, que utiliza probabilidades de expresión diferencial, se utilizó un valor de corte  $> 0,9$ . Esto es más alto que el 0,8 recomendado, pero se ha demostrado que se superpone bien con los datos de la matriz experimental, lo que representa una selección específica de los genes expresados diferencialmente.

En la aproximación sin genoma se usó el paquete NOISeq (Tarazona et al., 2012), se usó el algoritmo de simulación que imita la estructura de la muestra y los valores de datos reales, mientras controla el nivel de ruido y la magnitud de los cambios en la expresión génica. Usando este algoritmo, se generó una gráfica de 'Saturación', que evaluó la profundidad de secuenciación disponible. Esta gráfica estimó que en el rango de lecturas totales proporcionó una buena cobertura del transcriptoma y por lo tanto aumentar el número de lecturas no conduciría a un mayor número de nuevas detecciones, luego se consideró que se había alcanzado la saturación y que cualquier secuencia adicional

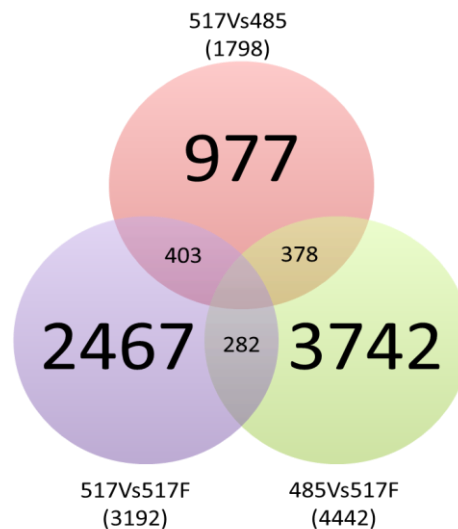
principalmente mejoraría la cuantificación de los genes previamente detectados. Los sesgos tecnológicos, como la longitud de la transcripción, el contenido de GC, los artefactos de PCR, la cobertura desigual de lecturas del transcrito, contaminación por transcritos fuera del objetivo o grandes diferencias en las distribuciones de transcritos, son factores que interfieren en la relación lineal entre la abundancia de transcritos y el número de lecturas mapeadas en un locus genético (conteos).

El análisis se completó con el gráfico de "Sensibilidad" (Figura 27), que mostró el número de genes con más de 0, 1, 2, 5 o 10 conteos por millón (CPM) para cada muestra (barras) o en cualquiera de las muestras (líneas horizontales). Esta gráfica reflejó la fracción total de los genes de baja expresión dentro del número total de transcritos. En este caso el 50% de los genes tuvieron más de un CPM en cualquiera de las muestras. Se eligió un umbral de CPM de uno para eliminar los genes de recuento bajo y se calcularon los DEG utilizando NOISeq. Se eliminaron un total de 42.366 genes de recuento bajo después de aplicar el umbral de CPM, lo que dio como resultado 683 (NOISeq) genes que pertenecían a un rango de expresión superior. Estos resultados resaltan el impacto del filtrado de recuento bajo en el análisis de DE de ARN-seq y cómo los recursos del paquete NOISeq se pueden usar para abordar esta tarea.



**Figura 27.** Noiseq generó una gráfica de la saturación global de las tres muestras. En la muestra 517 se detectaron más transcritos. El punto sólido representa la cantidad de transcritos detectados para cada muestra, mientras que los puntos vacíos son estimaciones que el programa realiza. En la gráfica del lado derecho, cada barra presenta el % de transcritos encontrados en la escala de 0 a 10 conteos por millón.

El diagrama de Venn (figura 28) muestra los genes con expresión diferencial únicos y comunes en cada uno de los genotipos.



**Figura 28.** Diagrama de Venn mostrando los genes con perfiles de expresión para cada una de las comparaciones entre los genotipos infectados con *T. paradoxa* y en comparación con el material falsamente inoculado.

Los genes diferencialmente expresados fueron enriquecidos con amiGo contra la base de datos PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) (Mi et al., 2009). Este Sistema de Clasificación fue diseñado para clasificar las proteínas (y sus genes) con el fin de facilitar el análisis de alto rendimiento. Las proteínas fueron clasificadas de acuerdo con:

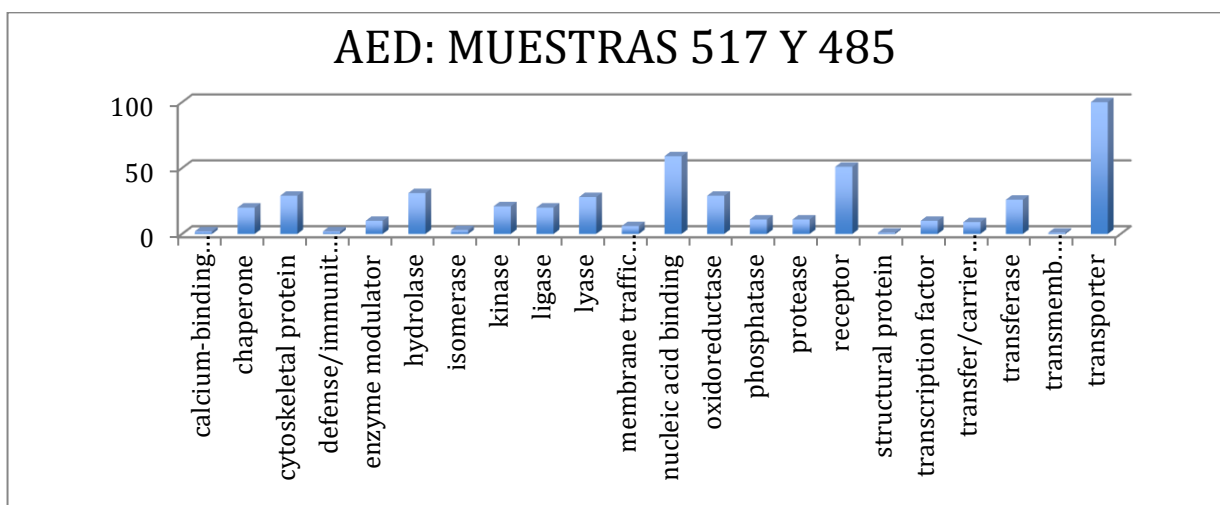
- Familia y subfamilia: las familias son grupos de proteínas relacionadas evolutivamente; Las subfamilias son proteínas relacionadas que también tienen la misma función.
- Función molecular: la función de la proteína por sí misma o con proteínas que interactúan directamente a un nivel bioquímico, por ejemplo, una proteína cinasa
- Proceso biológico: la función de la proteína en el contexto de una red más grande de proteínas que interactúan para realizar un proceso a nivel de la célula u organismo, por ejemplo, la mitosis.
- Vía: similar al proceso biológico, pero una vía también especifica explícitamente las relaciones entre las moléculas que interactúan.

Las principales familias de acuerdo a la función molecular que estuvieron sobreexpresadas en la muestra 517 fueron: **unión a ácidos nucleicos** (DNA, RNA y regiones reguladoras de ácidos

nucleicos); Transportador (trasmembranal activo y pasivo); **actividad hidrolasa** (enlaces éster, carbono-nitrógeno, serina, ubiquitina); **proteínas del citoesqueleto** (Actina, microtúbulos o filamentos intermedios); **oxidoreductasa** (actuando sobre grupos CH-OH, CH-CH, difenoles y sustancias relacionadas, disulfuro); **liasa** (cataliza el rompimiento de enlaces carbono-oxígeno y fósforo-oxígeno); **transferasa** (transferencia de grupos acil, alkil, glicosil, grupos de un carbono, grupos que contiene fosforo y ubiquitinas); **cinasa**; **ligasa** (formación de enlaces carbono-sulfuro) y **chaperona** (figura 29)

**Tabla 6.** Número de genes diferencialmente expresados en la comparación de las muestras 517 y 485 de acuerdo a los términos GO.

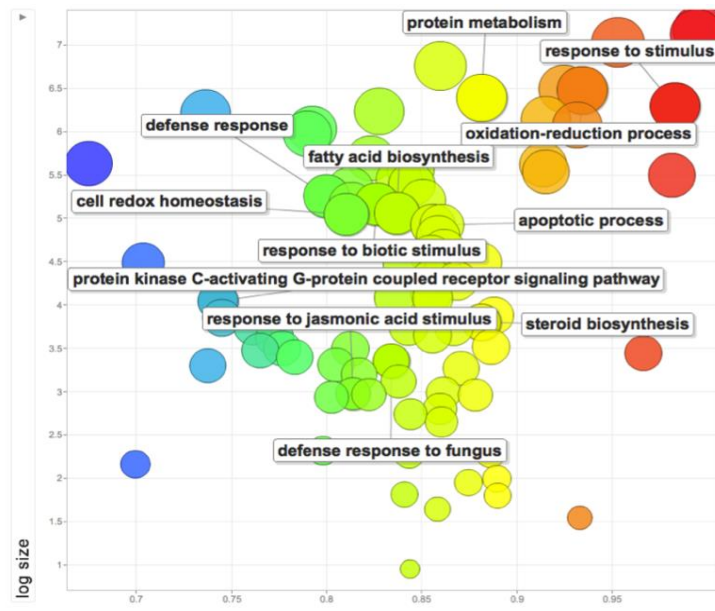
Sample	Biological process	Cellular component	Molecular function
517 Vs.485	152	227	265
(up in first condition)	107	164	183



**Figura 29.** Distribución de los transcritos en las familias de PANTHER durante la anotación de los transcritos expresados diferencialmente entre las muestras 517 y 485.

InterProScan predijo anotaciones funcionales para 1987 proteínas; con BLASTP informando hits para 1249 proteínas con similitud de secuencia significativa (esperar un valor menor que  $1.0 \times 10^{-3}$ ). Se analizaron términos GO de InteproScan para informar y generar una lista de entradas únicas que contienen categorías GO (The Gene Ontology Consortium 2000). Además, se usó ReviGO (Supek et al., 2011b, 2011a) para agrupar estos términos GO e identificar las principales categorías representadas. Estas categorías incluyeron respuesta a estímulos bióticos, respuesta de defensa,

respuesta a ácido jasmónico, biosíntesis de ácidos grasos, procesos de oxidorreducción (figura 30). La vía del metabolismo del ácido alfa-linolénico se enriqueció en los dos genotipos infectados. AJ y sus derivados, que son reguladores clave de las respuestas de defensa de las plantas a patógenos, se sintetizan a partir de la vía del ácido alfa-linolénico (Yang et al., 2019; Zdyb et al., 2018). Las vías metabólicas primarias, como las de los carbohidratos, aminoácidos y lípidos estaban sobreexpresados durante el proceso de infección.

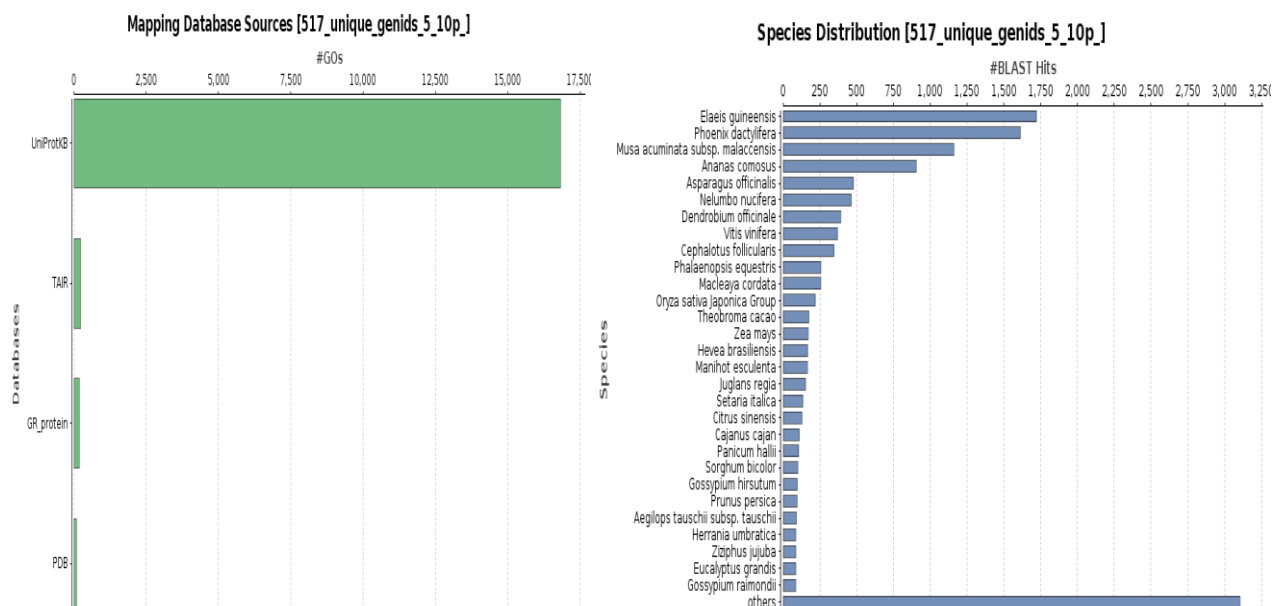


**Figura 30.** Imagen obtenida con el programa REVIGO. El diagrama de dispersión muestra a los representantes del grupo en un espacio bidimensional derivado de la aplicación de escalamiento multidimensional a una matriz de similitudes semánticas de los términos GO. El color de la burbuja indica el valor p proporcionado por el usuario; el tamaño indica la frecuencia del término GO en la base de datos.

### Análisis de Enriquecimiento GO

La gran mayoría de reads fueron mapeados contra la base de datos de UniprotKB y en la distribución de especies la gran mayoría correspondieron a *Elaeis guineensis* y *Phoenix dactylifera*, como se observa en la figura 31. Los términos GO enriquecidos para el material 517 y 485 se detallan en la figura 32. Entre los términos enriquecidos comunes en ambos genotipos del híbrido de palma, algunos términos de GO se asociaron a respuesta de la planta al ataque de hongos como: “respuesta de defensa” (GO:0006952), "Actividad de MAP cinasa cinasa cinasa"(GO:0004709), "proceso de oxidación-reducción" (GO: 0055114),"Respuesta al estrés" (GO:0006950) y "respuesta a estímulos" (GO: 0050896), fosforilación de proteínas (GO:0001934), regulación de la transcripción

(GO:0006355), proteólisis (GO:0006508), procesos metabólicos (GO:0008152), organización de la pared celular (GO:0009664), respuesta a estrés oxidativo (GO:0006979) y respuesta a auxinas (GO:0009733).



**Figura 31.** Fuente de las bases de datos a los cuales mapean los reads y la distribución de las especies con las que se hizo alineamiento durante el análisis de enriquecimiento para el material 517.

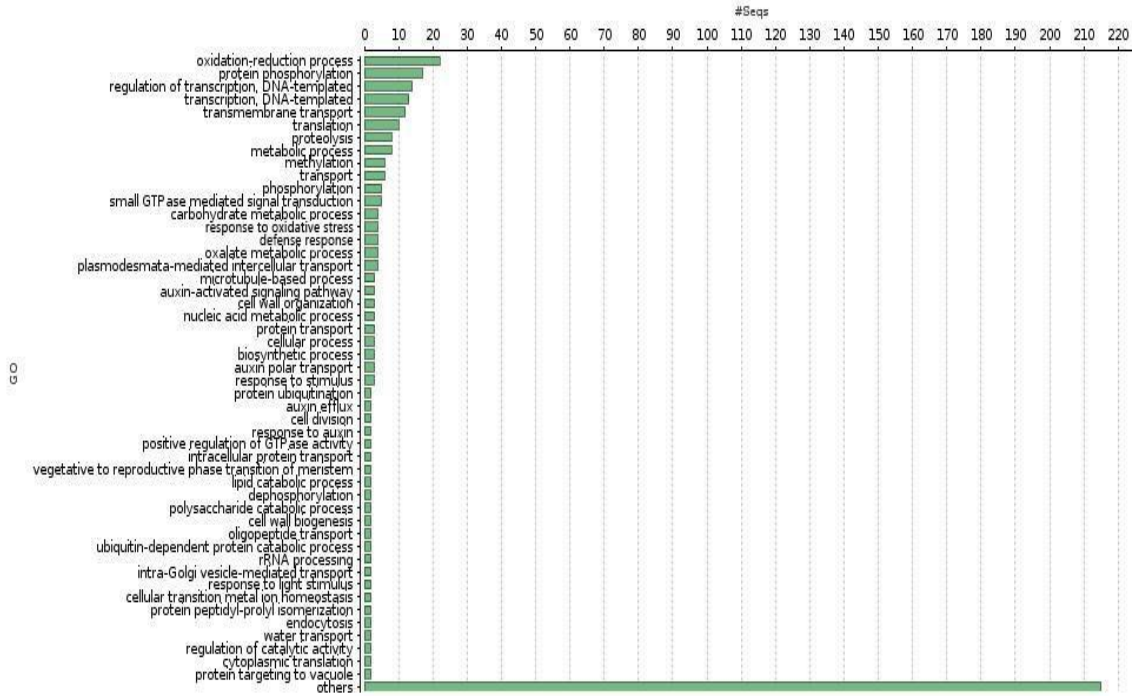
Entre los términos GO que se encuentran únicamente en el material 517, pero no en 485 están: Respuesta al estímulo del ácido abscísico (GO:0009737), proceso biosintético del ácido jasmónico (GO:0009695), respuesta de defensa a hongos (GO:0050832), respuesta a estímulos bióticos (GO:0009607) y vía de señalización de la proteína tirosina cinasa del receptor transmembranal (GO:0007169).

### Profundidad de la Secuenciación

La profundidad de la secuenciación fue verificada usando el módulo junction\_saturation.py. Este módulo verifica la saturación por medio de submuestras del 5 al 95% del total de los alineamientos en archivos BAM o SAM y luego detecta empalmes desde cada subgrupo y los compara contra el genoma de referencia. Para hacer esto se realizó la conversión del archivo de referencia EG5\_Genes.V2.gff3 (descargado de la página de <http://genomsawit.mpob.gov.my/genomsawit/>).



### Direct GO Count (BP) [485\_unique\_genids\_5\_10p\_]



### Direct GO Count (BP) [517\_unique\_genids\_5\_10p\_]

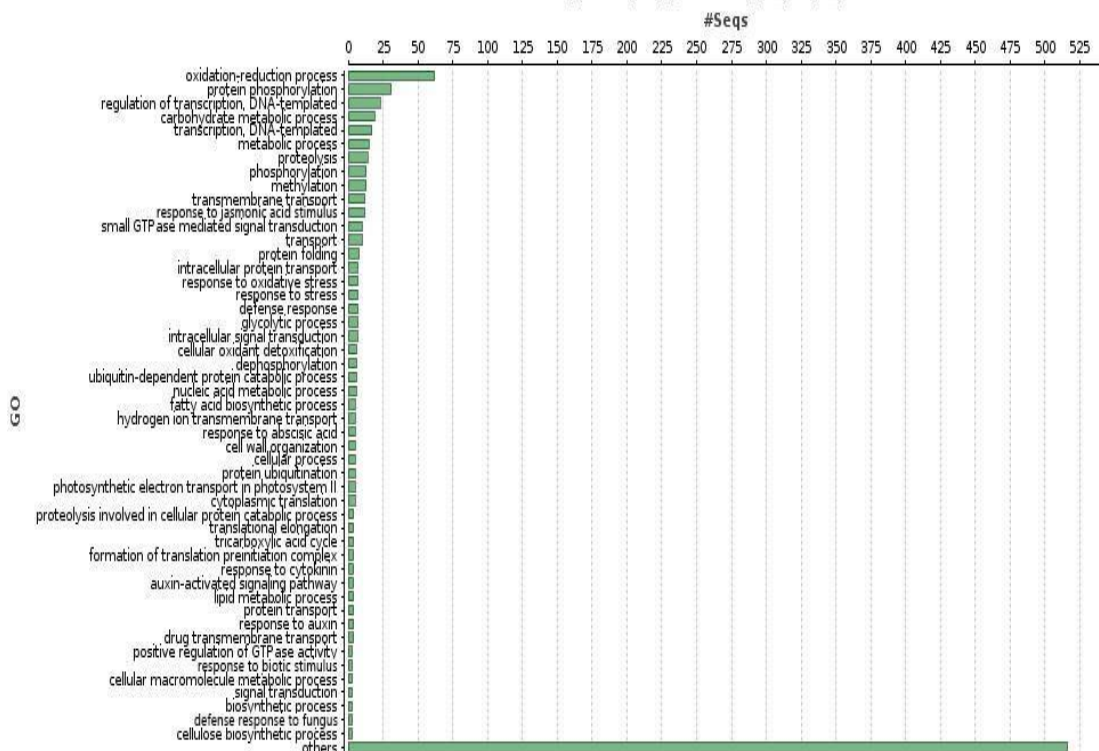
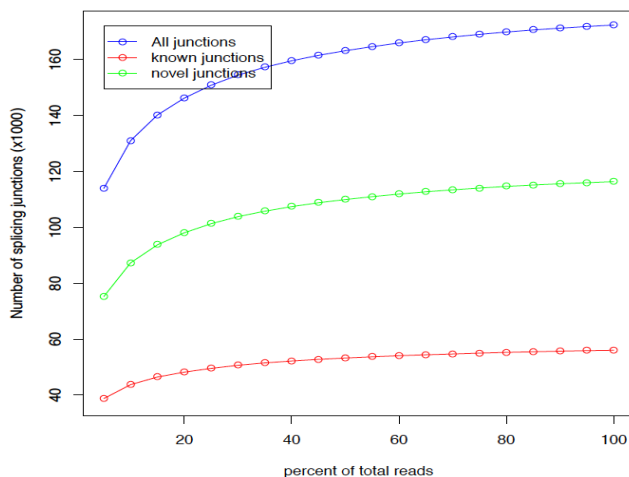


Figura 32. Términos enriquecidos de procesos biológicos del gene ontology para el material 517 (Imagen superior) y material 485 (imagen inferior).

En la figura 33 se observa saturación en los nuevos empalmes (línea verde) para las muestras 485 y 517, demostrándose que la profundidad alcanza en el estudio fue lo suficientemente buena para detectar la mayor cantidad de empalmes.



**Figura 33.** Gráfica de la Saturación para la detección de nuevos empalmes. En el eje X se presenta el porcentaje total de reads y en el eje Y el número de empalmes. En la gráfica se presentan los empalmes conocidos (línea roja), los empalmes nuevos (línea verde) y el total de empalmes (línea azul). Estos resultados demuestran que un incremento en la secuenciación aumentará la cobertura, pero no detectará más empalmes.

### 3.2.6 Selección de Genes para los Análisis por PCR en Tiempo Real

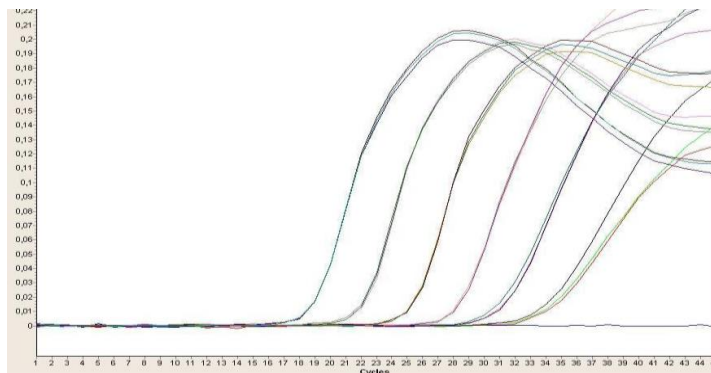
Teniendo en cuenta la relevancia de las enzimas en los diferentes mecanismos de defensa de la palma durante su interacción con *T. paradoxa*, se realizó un catálogo de genes que incluyó 70 enzimas relacionadas con defensa a patógenos de las cuales se escogieron las 20 que mostraron mayor cambio en los análisis de expresión diferencial. Con estas secuencias se realizó el diseño de primers con el software PrimerQuest Integrated DNA Technologies, IDT (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>).

**Tabla 7.** Contigs seleccionados para su evaluación por PCR en tiempo real.

CONTIG	TERMINOS GO	PROCESO	GO FUNCION	ANOTACIÓN GO
comp73500_c0_seq1	GO:0012505	endomembrane system	C	peroxidase 73-like
comp75155_c0_seq1	GO:0006979	jasmonic acid biosynthetic process	P	4-coumarate-- ligase-like 5-like
comp71675_c0_seq1	GO:0006979	response to oxidative stress	P	ascorbate peroxidase
comp71381_c1_seq1	GO:0003700	sequence-specific DNA binding transcription factor activity	F	wrky transcription factor 40
comp69047_c0_seq1	GO:0006952	defense response	P	defensin 1
comp78693_c0_seq1	GO:0016023	cytoplasmic membrane-bounded vesicle	C	probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase at1g74360-like
comp70842_c0_seq1	GO:0047763	caffeate O-methyltransferase activity	F	caffeic acid o-methyltransferase
309950379	GO:0016023	cytoplasmic membrane-bounded vesicle	C	bowman-birk type trypsin inhibitor
comp67147_c0_seq1	GO:0000156	two-component response regulator activity	F	ethylene receptor
comp71304_c0_seq1	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	P	glucan -beta-glucosidase
comp69236_c0_seq1	GO:0016301	kinase activity	F	mitogen-activated protein kinase kinase kinase a-like
comp78791_c0_seq1	GO:0004672	protein kinase activity	F	probable serine threonine-protein kinase at1g18390-like
comp76290_c0_seq3	GO:0006351	transcription, DNA-dependent	P	wrky transcription factor 6-like
comp74401_c0_seq3	GO:0005488	Binding	F	zinc finger protein zat10-like
comp75694_c0_seq6	GO:0003677	DNA binding	F	SNF1-related protein kinase
comp67676_c0_seq1	GO:0046872	metal ion binding	F	allene oxide synthase
comp75603_c0_seq1	GO:0000156	two-component response regulator activity	F	ethylene receptor
comp72336_c0_seq4	GO:0003677	DNA binding	F	ap2erf domain-containing transcription factor
comp64198_c0_seq2	GO:0051920	peroxiredoxin activity	F	glutathione peroxidase
comp75603_c0_seq2	GO:0050896	response to stimulus	P	pathogenesis-related protein 1

Se seleccionaron primers para tres genes normalizadores (Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, Actina y 40S ribosomal), los cuales fueron evaluados en los diferentes tiempos y materiales, obteniéndose que el gen con expresión constante para ser usado como normalizador fue: Gliceraldehido 3-fosfato Deshidrogenasa. La temperatura de hibridación para este gen fue 58,5 ° C

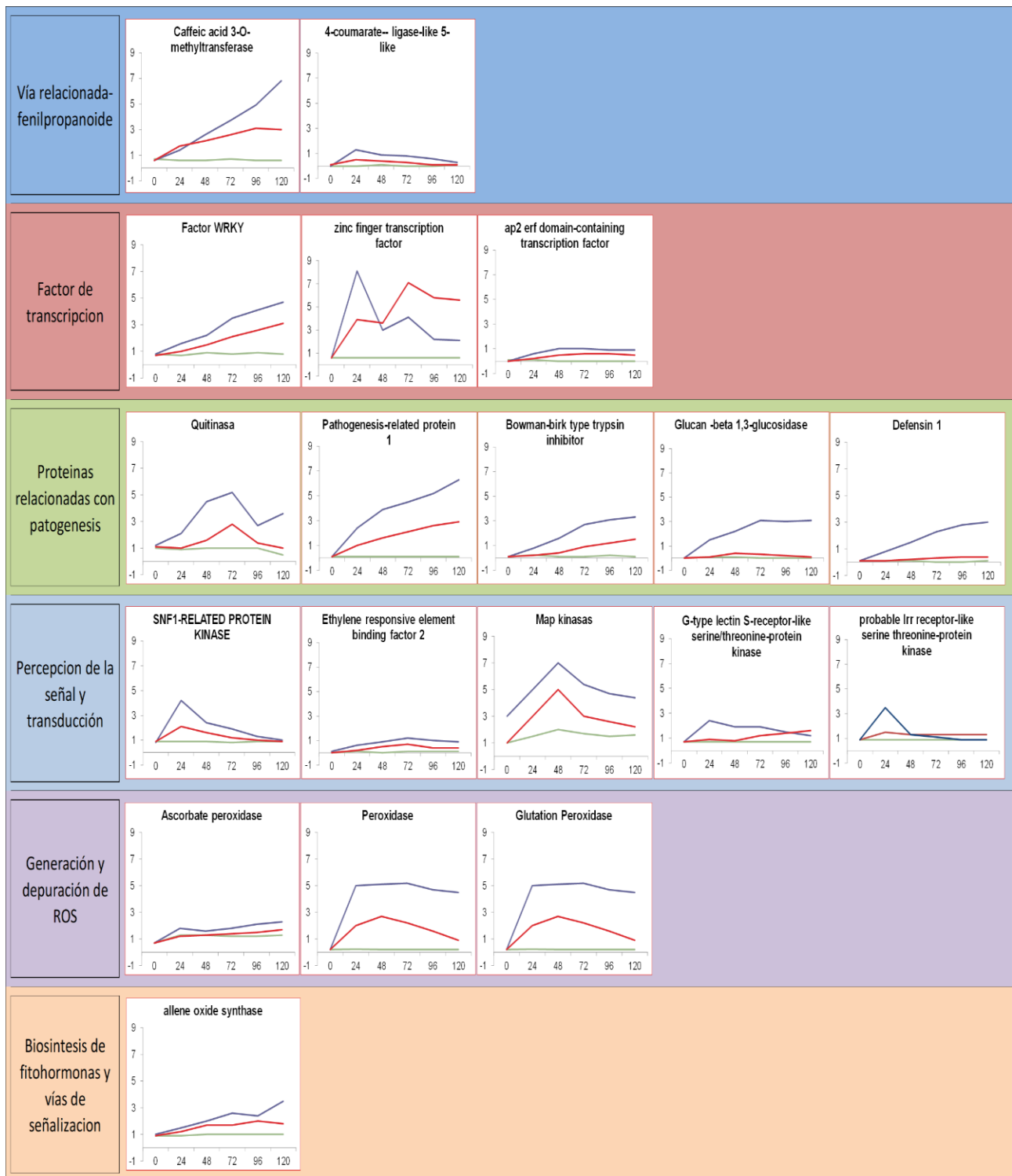
y las concentraciones de cebador de 0,7  $\mu\text{M}$ . La eficiencia (E) de la reacción de qPCR se calculó con la fórmula  $E = [10^{(-1 / \text{pendiente})} - 1]$ , que fue del 99%. Se generaron curvas estándar para los cADN de palma con la qPCR para determinar las cantidades de cADN de palma en las muestras analizadas. Los límites de detección promediados de la qPCR fueron 1,55 pg de cADN de palma. En la figura 34 se presenta la eficiencia de estos primers.



**Figura 34.** Gráfica de las curvas de amplificación de los genes normalizadores (Gliceraldehido 3-fosfato Deshidrogenasa, Actina y 40S ribosomal) evaluados a diferentes tiempos.

Una vez establecido el gen normalizador, se procedió a evaluar por cuantificación relativa los genes por PCR en tiempo real. Esta técnica se utiliza para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de un gene en estudio en comparación con uno o más genes de referencia (Pfaffl, 2004).

Los genes que tuvieron un  $\log_2$  [Número de lecturas en la palma aceitera infectada / Número de lecturas en la palma aceitera sin infectar]  $\geq | 2.0 |$  (correspondientes a 2 veces o más para la sobre-expresión o sub-expresión, respectivamente) con un valor de  $p \leq 0.05$ , se definieron como GDE significativos en las dos muestras que se compararon, figura 35 y tabla 8.

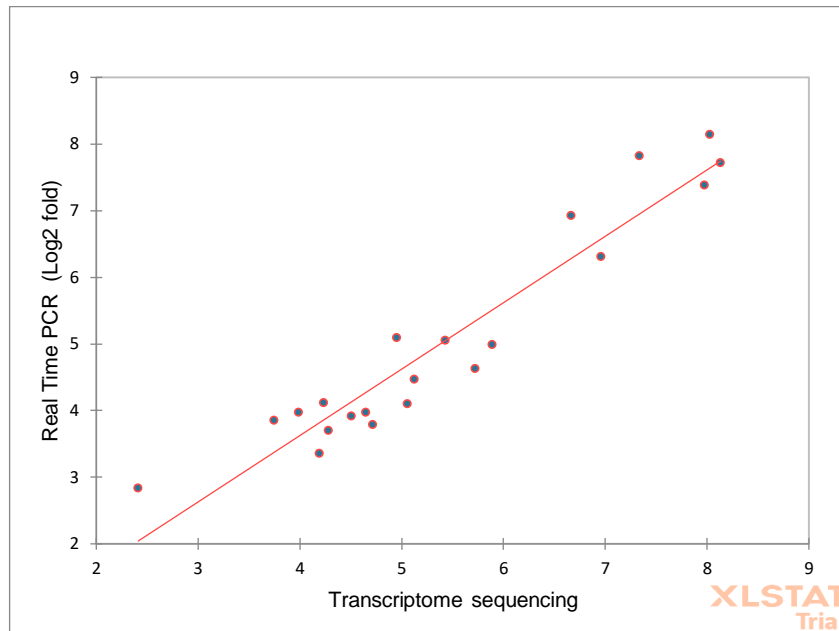


**Figura 35.** Evaluación por qRT-PCR de los perfiles de expresión de algunos de los genes identificados por análisis de RNaseq. En el eje Y se representa la expresión relativa del gen y en el eje X las horas post inoculación. La línea azul representa el material 517, la línea roja el material 485 y la línea verde el material 517 control.

**Tabla 8.** Cambios en la expresión de los genes putativos seleccionados a nivel del transcriptoma y RT-PCR.

IDENTIDAD PUTATIVA	Cambio en la expresión usando	
	Secuenciación del transcriptoma	RT-PCR (Log2 fold)
Peroxidase	8,03	8,1394
WRKY transcription factor	7,97	7,3799
Caffeate O-methyltransferase activity	7,34	7,8186
Ethylene responsive element binding factor 2	8,13	7,7117
Ser/Thre protein kinase activity	6,66	6,9202
SNF1-related protein kinase	6,96	6,3049
Probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase	4,95	5,0882
MAPKinase	5,89	4,9847
Glutathione peroxidase	5,72	4,6232
Allene oxide synthase	4,24	4,1138
Bowman birk type trypsin inhibitor	4,65	3,9643
Defensin 1	5,13	4,4677
Pathogenesis-related protein 1	5,06	4,0936
AP2 ERF domain-containing transcription factor	3,99	3,97
Class I chitinase	4,51	3,9091
Zinc transcription factor	4,72	3,7834
Allene oxide synthase	3,75	3,8442
Beta 1,3 glucosidasa	2,41	2,8317
4 cumarato ligasa	4,19	3,3519
Ascorbate peroxidase	4,28	3,6965

El análisis de correlación de Pearson realizado con Excel (2016) entre los datos de RNA-Seq y qRT-PCR fue del 91% (nivel de significación  $\alpha=0,05$ ), lo que indica consistencia entre los dos enfoques, figura 36.



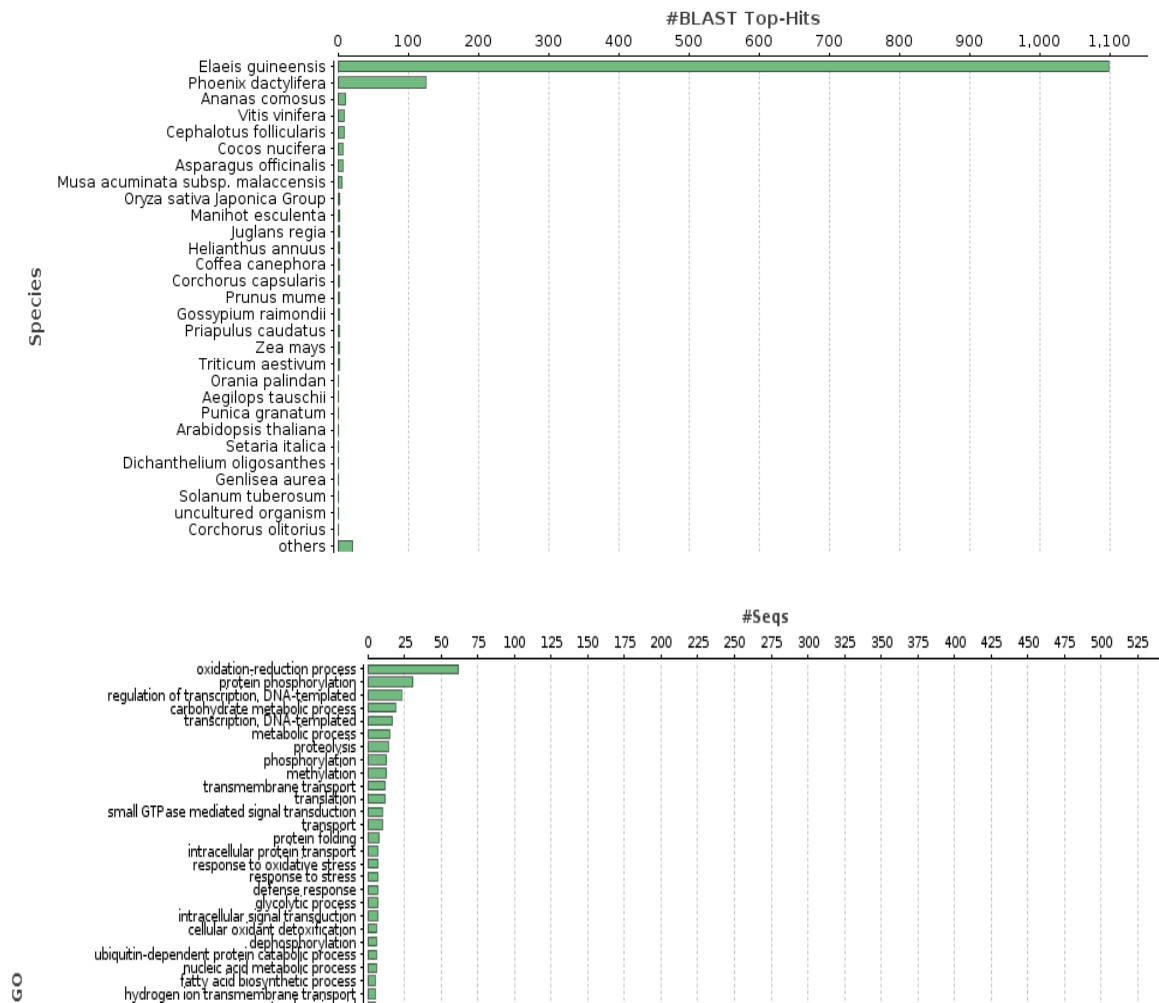
**Figura 36.** Análisis de correlación entre los datos de expresión de genes por RNASeq y qRT-PCR. En el eje X se presenta la expresión obtenida por RNASeq y en el eje Y los resultados por qRT-PCR.

### 3.2.7 Alineamiento contra genoma de referencia y análisis de SNPs

Se realizó un análisis de SNPs utilizando el genoma de referencia de *E. guineensis* publicado por The Malaysian Palm Oil Board (MPOB) en (<http://genomsawit.mpob.gov.my/>), usando el software STAR (Dobin et al., 2013; Nelson et al., 2017). El archivo de alineamiento mostró que el porcentaje de reads no mapeados fue bajo (7,13% para el material 485; 2,63% para el material 517F y 3,22% para el material 517), tabla 9. El resultado del análisis con Blas2GO, determinó que la mayoría de reads fueron de *E. guineensis* y los resultados de anotación contra el GO, mostraron que la mayoría de reads fueron anotados en los procesos de oxido-reducción, fosforilación de proteínas, regulación de la transcripción, procesos metabólicos, transporte transmembrana, respuesta a estrés oxidativo y respuestas de defensa (figura 37).

**Tabla 9.** Resumen del alineamiento contra genoma de referencia de *E. guineensis*.

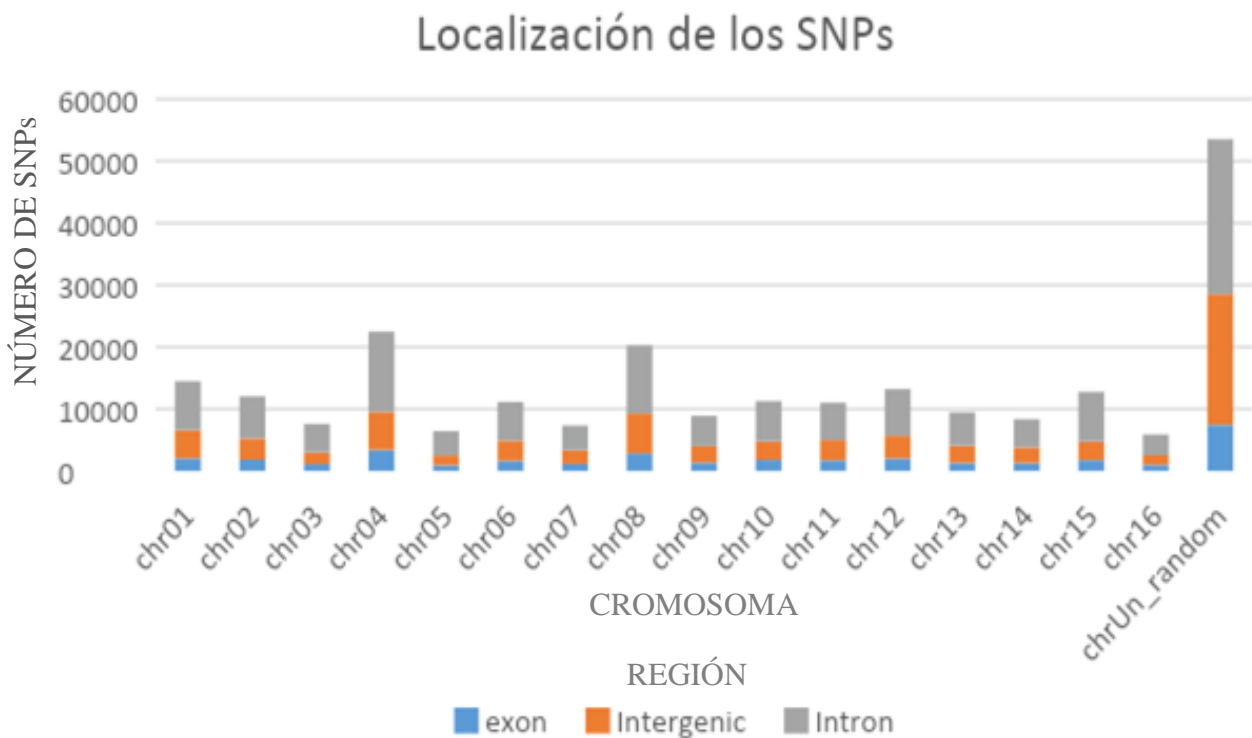
Detalle	485	517F	517
<b>Número de lecturas de ingreso</b>	125949495	24739673	88604347
<b>Longitud promedio de la lectura de ingreso</b>	171	166	169
<b>Número de lecturas mapeadas una vez</b>	100740117	15171428	59641054
<b>% de lecturas mapeadas una vez</b>	79,98%	61,32%	67,31%
<b>Número de empalmes: Total</b>	52105179	4928200	27588919
<b>Número de empalmes: Anotado (sjdb)</b>	42787204	4153561	23233635
<b>Número de lecturas mapeada a multiples loci</b>	15534529	8727702	25415064
<b>% de lecturas mapeadas a multiples loci</b>	12,33%	35,28%	28,68%
<b>Número de lecturas mapeadas a demasiados loci</b>	692448	188665	697911
<b>% de lecturas mapeadas a muchos loci</b>	0,55%	0,76%	0,79%
<b>% de lecturas no mapeadas: demasiadas discor</b>	0,00%	0,00%	0,00%
<b>% of reads unmapped: muy cortas</b>	7,13%	2,63%	3,22%



**Figura 37.** Resultados del alineamiento contra genoma de referencia y anotación.



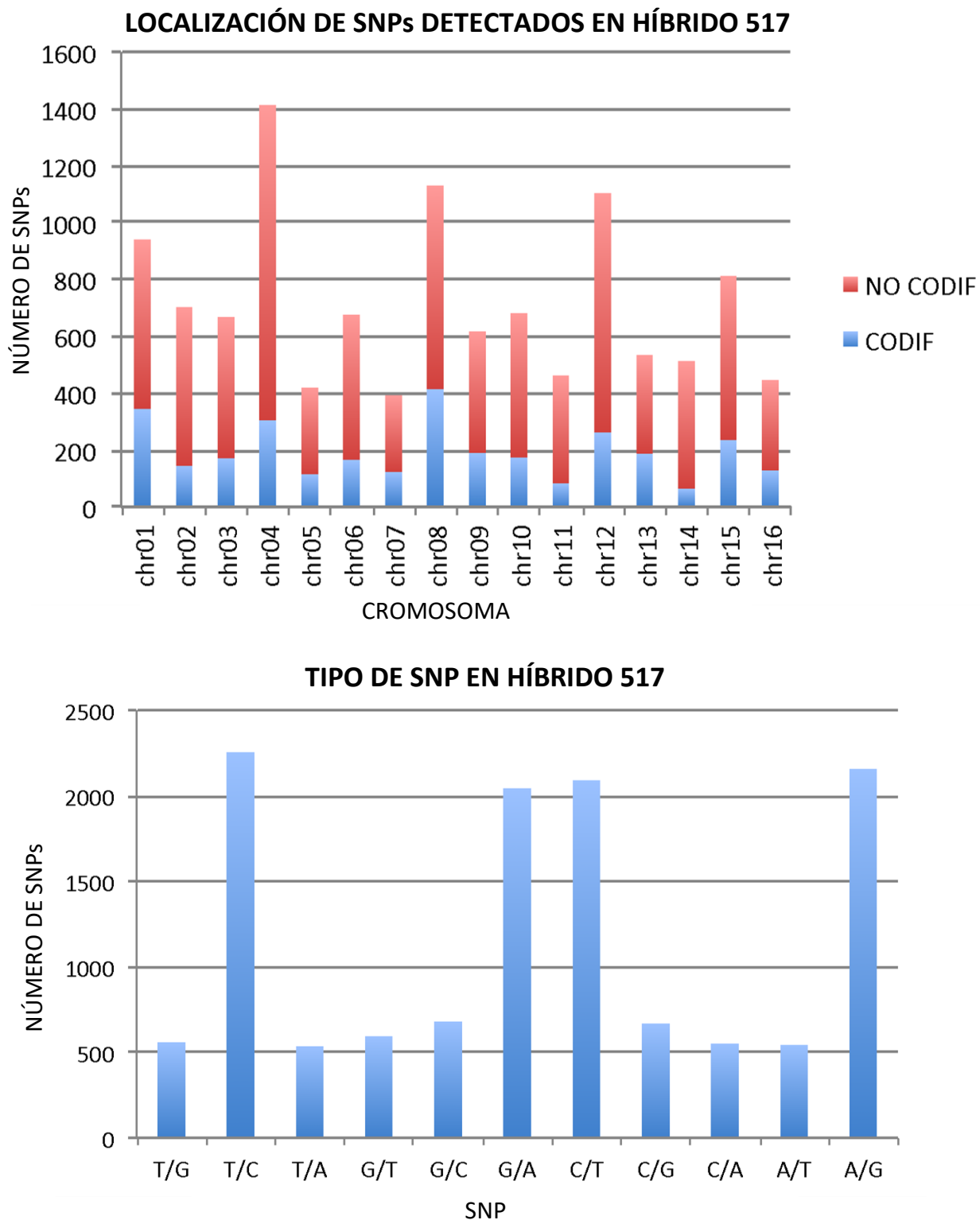
Para el análisis de SNPs se usó el software NGSEP (Duitama et al., 2014; Tello et al., 2019) y las secuencias de los genes sobreexpresados en cada material. Como resultado se encontraron 579.358 SNPs para la muestra 517 y 234.837 para la muestra 485, siendo comunes a las dos muestras 188.848. Los SNPs fueron filtrados y la mayoría fueron detectados en regiones no codificantes. La figura 38 representa las regiones donde se detectaron los SNPs y la figura 38, los tipos de SNPs por cromosoma. El 27% de los SNPs no pudieron ser localizados en un cromosoma.



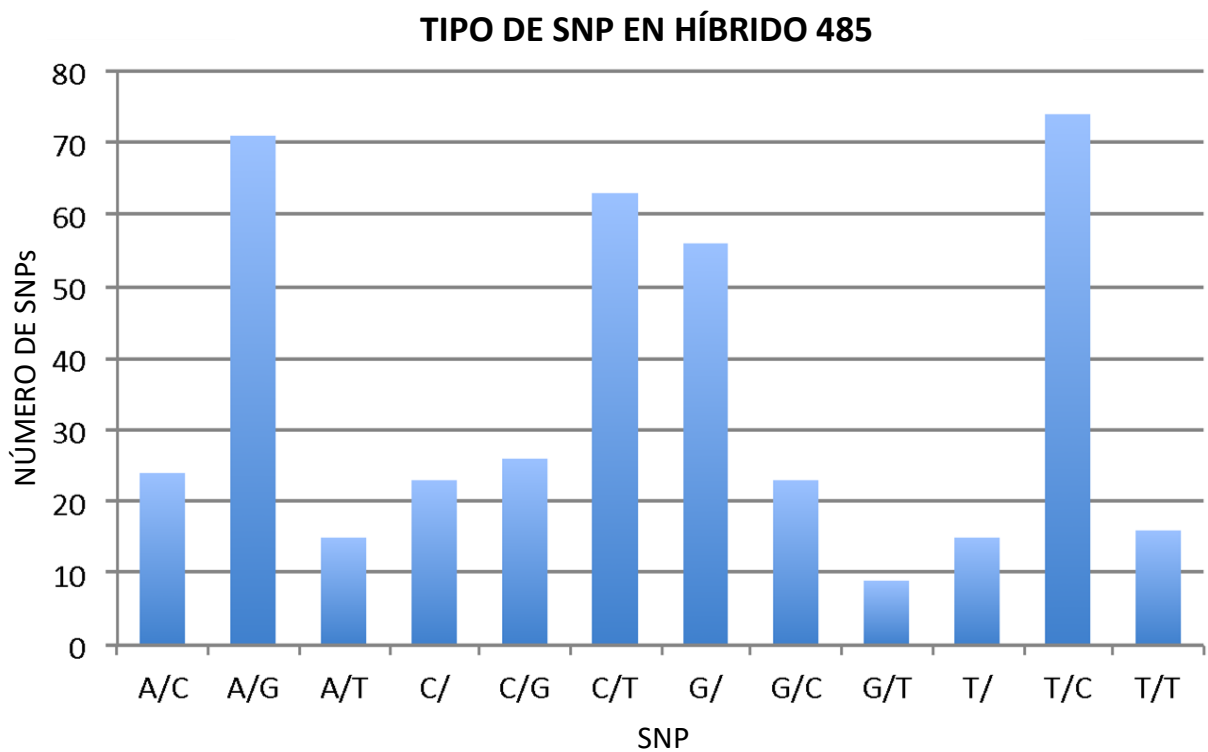
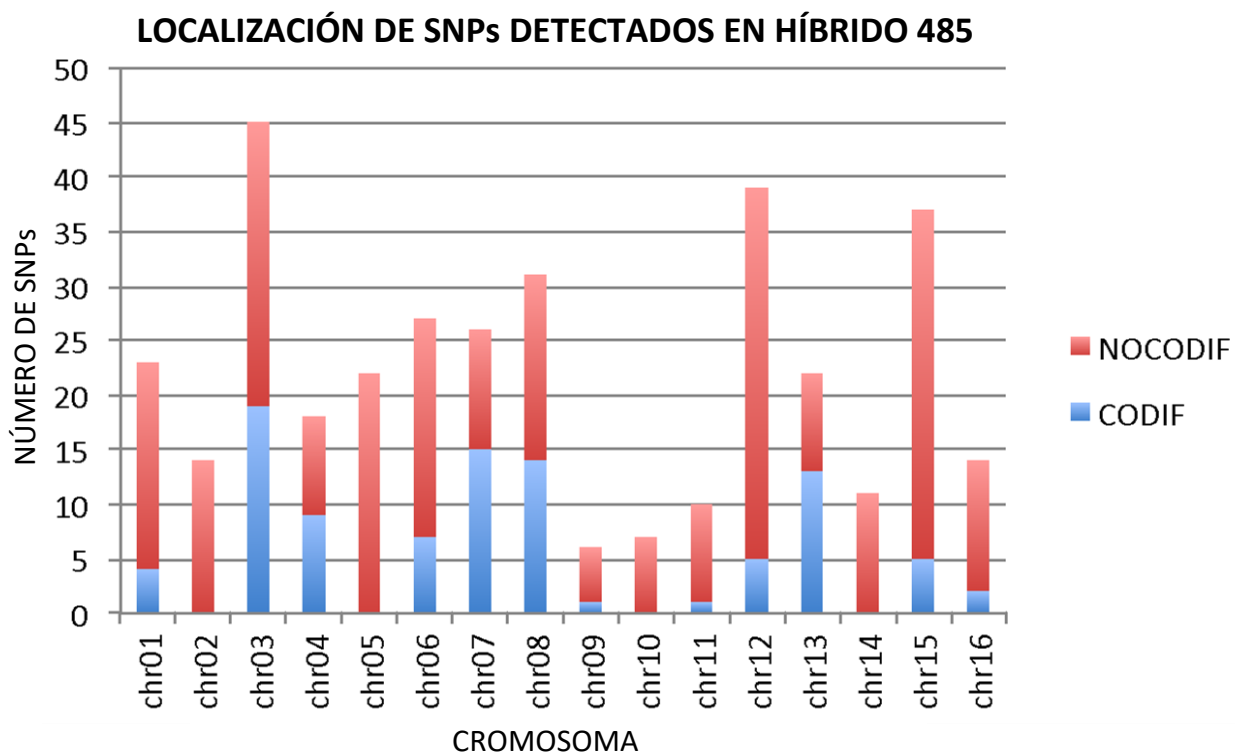
**Figura 38.** Análisis de los SNPs por región (exón, intrón e intergénica) donde se localizó en cada cromosoma.

Al analizar los SNPs detectados para cada uno de los genotipos, se observó que en el material 517 los cromosomas que tuvieron mayor cantidad de SNP en regiones no codificantes fueron 4, 8 y 12. Dentro de los patrones de SNPs observados los más frecuentes fueron las transiciones G/A, C/T, A/G, T/C y la transversión G/C, figura 39.

En el material 485 los cromosomas que tuvieron mayor cantidad de SNP en las regiones no codificantes fueron 3, 12 y 15. Dentro de los patrones de SNPs observados los más frecuentes fueron las transiciones T/C, C/T y A/G, la transversión C/G y las delecciones G/ y C/, figura 40.



**Figura 39.** Análisis de los SNPs en el material 517 por región donde se localizó en cada cromosoma y frecuencia de los SNPs detectados.



**Figura 40.** Análisis de los SNPs en el material 485 por región donde se localizó en cada cromosoma y frecuencia de los SNPs detectados.

Los transcritos identificados mediante el mapeo de las lecturas de RNAseq que presentaban sitios polimórficos entre ambos materiales se anotaron y agruparon en la clasificación de términos GO utilizando el software blast2go (Conesa et al., 2009). En total 117 unigenes fueron anotados, figura 41.



Figura 41. Términos GO asignados a los 117 unigenes.

### 3.2.8 Discusión de los resultados del transcriptoma de los materiales del híbrido OxG

En este estudio se investigó por primera vez si esta respuesta molecular dinámica del híbrido OxG contra un patógeno hemibiotrófico es diferente en un hospedante resistente frente a uno susceptible. Se encontró un aumento significativo en los niveles de diferentes enzimas involucradas en diferentes procesos de defensa durante la infección: percepción y señales de transducción, generación y depuración de ROS, vía relacionada con fenilpropanoide, factores de transcripción, biosíntesis de fitohormonas y proteínas relacionadas con patogénesis.

Debido a que *T. paradoxa* es un hongo hemibiótrofo, las vías de señalización dependientes de AS, AJ y ET funcionan presumiblemente en respuesta de defensa y regulan la expresión de genes relacionados con la defensa, genes involucrados en el estallido oxidativo, síntesis de compuestos

antimicrobianos, regulación de factores de transcripción y muerte celular programada localizada en palma en respuesta a la infección por hongos (Geeta et al., 2018; Yang et al., 2019). Los perfiles de expresión en este trabajo se caracterizaron en diferentes grupos de acuerdo a su significado funcional putativo como se describe a continuación:

➤ Genes involucrados en la percepción y vías de señalización de defensa.

Las plantas pueden sentir una variedad de estímulos externos y endógenos, que se traducen en respuestas celulares y las proteínas cinasas se han implicado en estos estímulos y en las interacciones planta-microorganismo. Muchas proteínas cinasas similares a receptores de plantas (RLK) son cinasas Ser / Thr. Estos participan en la percepción de la señal del patógeno y activan la defensa inducible. En el transcriptoma del híbrido se expresaron diferentes receptores RLK: Receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g74360; receptor-like protein kinase hsl1-like; Receptor-like protein kinase HAIKU2 y LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase, siendo este último sobre-expresado en el genotipo 517. Otro receptor que tuvo mayor expresión en el genotipo 517 durante la infección con *T. paradoxa* fue G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase, el cual tiene el potencial de ser un oligosacárido de quitosano, el cual tiene la capacidad de mejorar la resistencia de las plantas a plagas y enfermedades a través de la activación del sistema inmunológico de la planta (Liu et al., 2018; Tang et al., 2017).

En este estudio se observó la sobreexpresión (mayor expresión relativa comparado con el control) de las enzimas como las cinasas dependientes de calcio (CDPK), las calmodulinas (CaM). Las cuales juegan un papel muy importante ya que reconocen los niveles elevados de calcio en condiciones de estrés. El aumento en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico es indicativo de la activación de la inmunidad innata de la planta y ese influjo de iones Ca se genera debido al reconocimiento de elicitores o PAMPs del patógeno por estos receptores originando cambios en el potencial de membrana. Estos niveles elevados de calcio inducen la apertura de los canales de membrana (Eflujo de  $\text{K}^+$  y nitrato, Influjo de  $\text{H}^+$ ), lo cual conduce a una alcalinización extracelular y a una depolarización de la membrana plasmática (Mithöfer et al., 2007; Shen et al., 2017; Kudla et al., 2018).

Otro evento posterior al reconocimiento PAMP, es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chinchilla, 2008; Segal et al., 2018a). Las ROS generadas por los homólogos oxidativos de

estallido respiratorio (Rboh) están involucradas en numerosos procesos de señalización de células vegetales. Ante la percepción de PAMP, Rboh es fosforilada por las CDPKs inducidas por  $\text{Ca}^{2+}$  para la activación de la NADPH oxidasa (Baxter et al., 2014). El  $\text{Ca}^{2+}$  también regula la RBOHD a través de la unión directa al N terminal de la proteína del factor de elongación (Ali et al., 2018). Durante la interacción del híbrido con *T. paradoxa* se observó una sobreexpresión de RbohB, los cuales además de producir ROS como parte de respuesta inmune de las plantas.

También se observó un incremento en los transcritos para la mayoría de los genes MAPK durante la infección, así como factores de transcripción WRKY se indujeron significativamente a 48 hpi (Figura 35). Los factores de transcripción WRKY son los más conocidos por su inducibilidad por SA y patógenos, y su papel en la regulación de la expresión de genes dependientes de SA. Sin embargo, también hay ejemplos de WRKY que regulan positivamente otros genes regulados por hormonas, incluidos los genes de defensa regulados por AJ (Caarls et al., 2015; Lui et al., 2017). Estos hallazgos revelaron que múltiples vías de señalización de defensa del hospedante participaron en la respuesta a la infección.

La activación de la vía MAPK también es una de las respuestas de defensa que contribuyen a la resistencia a la infección por hongos en plantas. Los inductores de heridas y patógenos inducen una rápida activación de la señalización en cascada MAPK. La señalización en cascada de MAPK involucra tres componentes: MAPK cinasa cinasa (MAPKKK), MAPK cinasa (MAPKK) y MAPK. En la cascada de señalización MAPK, el MAPKKK activada MAPKK, que a su vez activa MAPK. La activación de la cascada de señalización de MAPK regula los factores de transcripción corriente abajo, que inducen la expresión de los genes relacionados con la defensa, lo que conduce a una mayor respuesta de defensa a largo plazo y resistencia a la infección fúngica mediante la regulación de la síntesis de péptidos y productos químicos antimicrobianos, la muerte celular programada y la expresión de hormonas del estrés (JA y ET) y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Devendrakumar et al., 2018; Wang et al., 2020). En las células del tabaco, los elicitores tipo PAMPs de hongos contribuyeron a la activación prolongada de MAPK, que regula la expresión de ROS. Las ROS, que desempeñan un papel importante en las respuestas de defensa de las plantas, se sintetizan mediante el complejo de enzimas fagocíticas de la NADPH oxidasa (Jiang et al., 2018). Los transcritos que codifican la enzima glutatión peroxidasa (GPX), la ascorbato peroxidasa (APX) y la peroxidasa (POX), que están involucradas en el procesamiento de ROS y la depuración, mostraron una mayor actividad

en el genotipo 517 durante la infección del hongo y su mayor expresión está asociada con la resistencia a patógenos como se ha observado en estudios de palma de aceite y su interacción con otro importante patógeno (Ho et al., 2015; Nusaibah et al., 2016). El peróxido de hidrógeno también puede actuar como un mensajero secundario e iniciar la regulación de genes relacionados con la defensa. La sobreexpresión de estos transcritos sugirió que la lesión y la subsiguiente infección por *T. paradoxa* activaron la respuesta de defensa regulada por ROS en ambos genotipos.

➤ Factores de transcripción (TFs)

Los factores de transcripción controlan la regulación transcripcional activando o reprimiendo la expresión de genes posteriores en respuesta a la infección por patógenos. Dentro de los factores de transcripción, aproximadamente el 49,9% estuvieron sobre-expresados y 26,3% sub-expresados y los que tuvieron cambios significativos fueron AP2/ERF, WRKY, Zinc Finger y MYB. Se sabe que el factor de transcripción WRKY se induce bajo heridas e infecciones fúngicas (Lui et al., 2017). En el genotipo 517, seis transcritos relacionados con WRKY (comp68051\_c0\_seq1; comp71555\_c0\_seq1; comp78393\_c0\_seq3; comp76290\_c0\_seq6 y comp76290\_c0\_seq3 (WRKY6); comp71381\_c1\_seq1 (WRKY40)) se expresaron diferencialmente bajo infección fúngica. El factor WRKY6 está involucrado en el control de procesos relacionados con senescencia y defensa contra patógenos (Lui et al., 2017). En pimiento, CaWRKY40 está regulado por CaWRKY6, que a su vez regula la resistencia de *R. solanacearum*, también proporciona tolerancia a altas temperaturas y alta humedad (Cai et al., 2015).

Se ha establecido que la familia APETALA2 (AP2) / Etileno sensible al factor de respuesta (ERF) está involucrada en la activación de genes relacionados con la defensa en respuesta a la infección por patógenos a través de las vías de ET y JA (Dey et al., 2015; Phukan et al., 2017). Los miembros de la familia AP2 / ERF se expresaron diferencialmente en respuesta a la infección en el genotipo 517. El FT AP2 / ERF (comp69615\_c0\_seq1; 191194954; comp75603\_c0\_seq1; comp67147\_c0\_seq1; comp75603\_c0\_seq1; comp75603\_c0\_seq2; comp75603\_c0\_seq3) estuvo sobreexpresado en el genotipo 517 en comparación con el genotipo 485. Se sabe que los genes de la familia AP2 / ERF son altamente inducidos en respuesta a las heridas en *Arabidopsis*.

Otro FT estuvo sobreexpresado en ambos genotipos fueron los de la familia bZIP. El papel de los FT de la familia bZIP en las respuestas de estrés biótico de las plantas está bien establecido (Dröge-Laser et al., 2018; Noman et al., 2017).

Otro factor de transcripción con aumento en su expresión fue la proteína de dedos de zinc (ZFP-TF), los cuales según estudios tiene un papel crucial en respuesta a fitohormonas, desarrollo y crecimiento de la planta, tolerancia al estrés y regulación transcripcional, siendo esta última muy importante para incrementar la resistencia de la planta a patógenos (Noman et al., 2017). En este trabajo, se observó que en el material 517 hubo una sobreexpresión con un pico en las primeras 24 horas, el cual disminuyó a las 48 horas manteniéndose esta expresión hasta las 72 hpi, tiempo en el cual volvió a disminuir, mientras que en material 485 se evidenció un incremento a las 24 y solo hasta las 72 horas hubo una sobreexpresión similar a la observada en el material 517. Lo cual es concordante con el estudio de Shi y colaboradores (2014), que probaron en Arabidopsis, que la sobre-expresión de AtZAT6 (ZAP-TF) activó constitutivamente la defensa de la planta vía acumulación intensificada de ROS y además observaron extensiva muerte celular en tejidos de hoja. Por el contrario, las plantas que tenían regulación negativa de AtZAT6, expresaron una baja inducción de respuestas de defensa, así como niveles de acumulación de ROS y reducción de la muerte celular (Shi et al., 2014). Estos hallazgos sugieren que el factor de transcripción ZFP fue importante en la resistencia a la enfermedad. Los perfiles de expresión génica de los factores de choque térmico (HSF) y los FT del tipo homeobox (HB) también estaban alterados en respuesta a la infección.

Dado los conocidos mecanismos reguladores para controlar la expresión de genes y sus funciones sería importante la caracterización de algunos de estos FT para comprender su papel en la respuesta de defensa de la palma a la infección por *T. paradoxa*.

➤ Genes que interfieren con la agresividad y el crecimiento de hongos

La identificación y caracterización de genes de plantas, que interfieren con la invasión de hongos en las plantas puede ser útil para reducir la agresividad de los hongos. Transcritos anotados como quitinasas tipo I, se expresaron diferencialmente bajo la infección por *T. paradoxa* en ambos genotipos, pero hubo una mayor sobreexpresión en el genotipo 517. Las quitinasas de plantas poseen actividad de lisozima y son muy activas para inhibir el crecimiento de hongos (Kumar et al., 2018). Además, la sobreexpresión de los genes de la quitinasa ha conferido resistencia a la infección por hongos en plantas, como palma, tabaco, el maní y el arroz (Kumar et al., 2013; Richa et al., 2017; Kumar et al., 2018). Se observaron dos transcritos que codifican para proteínas inhibidores de proteasa (PIP) en los dos genotipos. Se sabe que los PIP poseen actividad antifúngica y se ha demostrado que inhiben la germinación conidial y el crecimiento de hifas de patógenos, ya que varios



fitopatógenos secretan diferentes tipos de proteasas extracelulares, que desempeñan un papel activo en el desarrollo de la enfermedad (Pontual et al., 2013; Clemente et al., 2019). En este estudio se observó sobre-expresión del inhibidor de proteasas Bowman-Birk en el material 517 desde las primeras 24 horas y que se incrementó en el tiempo, hasta 3,1 y 1,6 veces más en comparación con el control no inoculado y el genotipo 485, respectivamente. El nivel de expresión de otra enzima importante como la beta 1,3-glucosidase, que juega un papel importante en la degradación de la celulosa (Yeoh et al., 2012), también se aumentó significativamente en 517 en comparación con 485 y 517F.

Otras enzimas que están implicadas en la respuesta a estrés abiótico (por condiciones difíciles físicas o químicas del entorno) y biótico (tales como los que generan los hongos o las bacterias) son las defensinas (Stotz et al., 2009). Su actividad biológica va desde la inhibición de proteasas y amilasas, bloqueo de canales iónicos e inhibición de la síntesis de proteínas, hasta efectos citotóxicos sobre células vegetales y animales (Graham et al., 2008; Odintsova et al., 2008). En este trabajo se observó que la defensina-1 se sobreexpresó en el genotipo 517. El efecto más destacado de la actividad antimicrobiana de las defensinas es la inhibición del crecimiento en hongos filamentosos y levaduras (Parisi et al., 2019; Sher Khan et al., 2019). Se ha descrito en diferentes estudios, que las defensinas son activas en hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicola*, *A. longipes*, *Fusarium culmorum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Neurospora crassa*, *Magnaporthe oryzae*, *Ganoderma boninense* y levaduras como *C. albicans* (Ali et al., 2018; Parisi et al., 2019; Tan et al., 2016). La acción de las defensinas sobre hongos produce un incremento en la toma de  $\text{Ca}^{+2}$  y expulsión de  $\text{K}^{+}$ , cambios de potencial de membrana y alcalinización del medio, lo que afecta directamente el gradiente de  $\text{Ca}^{+2}$  factor fundamental en la elongación de las hifas (Sher Khan et al., 2019). Dada la importancia de las defensinas para contrarrestar la infección por el hongo, es importante realizar estudios en torno a caracterizar esta enzima en el híbrido OxG.

#### ➤ Genes involucrados en reforzamiento estructural

Las vías de los fenilpropanoides y flavonoides son bien conocidas por su función para el desarrollo y la defensa de las plantas. Las plantas acumulan fitoalexinas y sustancias similares a la lignina como mecanismo de resistencia en respuesta a la infección por hongos en patógenos (Pandey et al., 2016; Aoun, 2017). Los genes implicados en el metabolismo de los fenilpropanoides, que sirven como fuente para las fitoalexinas y ligninas de furanocumarina e isoflavonoides, se expresaron en los

dos genotipos, pero se observó una sobreexpresión mayor en el genotipo 517. Las enzimas fenilalanina amonio-liasa (PAL, comp71998\_c2\_seq2), 4 coumarato CoA ligasa (4CL; comp71998\_c2\_seq2) y chalcona sintasa (CHS; comp71998\_c2\_seq2), involucradas en la vía fenilpropanoide estaban altamente expresadas en los tejidos del genotipo 517 bajo la infección. Los transcritos CHS estuvieron sobreexpresados en ambos genotipos. Otros genes implicados en la biosíntesis de la lignina, tales como cinamoil-CoA reductasa 1 (CCR, comp71998\_c2\_seq2), hidroxicinil-CoA shikimate / quinato hidroxicinamoil transferasa (HCT, comp69867\_c0\_seq1) y cafeína-CoA 3-O-metiltransferasa (CCOAMT, comp40455\_c0\_seq1), estaban aumentados en el tejido del genotipo 517 infectado. La regulación simultánea de los genes PAL, 4CL y CHS de la vía fenilpropanoide sugirió que estos genes están regulados de manera coordinada en respuesta a la infección por hongos y que estos transcritos se acumularon a un nivel mucho más alto en el genotipo 517 como una respuesta inducida de defensa de la planta al hongo invasor. La vía metabólica fenilpropanoide es un indicador temprano para la defensa de la planta. Se ha descrito que los precursores de la vía fenilpropanoide también participan en la síntesis de sustancias fenólicas y poseen actividades antifúngicas (Zhang et al., 2017).

La producción de fitoalexinas y la acumulación de PAL, CHS y HRGP en la infección indica una respuesta de hipersensibilidad, estableciendo así la inmunidad de las células distantes no infectadas (Tugizimana et al., 2014; Zhang et al., 2017). Los genes de lipoxigenasa (LOX) de la vía de biosíntesis de LOX se expresaron diferencialmente en tejido de los dos genotipos infectados por *T. paradoxa*. Estos resultados sugirieron que la expresión de los genes LOX era más abundante en el genotipo 517 como un posible mecanismo de resistencia contra la infección por *T. paradoxa*. Estudios anteriores han informado sobre el papel antifúngico de los genes LOX en el maní, el maíz y la soya (Genva et al., 2019). También se ha demostrado que heridas y la infección por patógenos regulan los genes implicados en la biosíntesis y modificaciones de la pared celular, como pectinas, celulosa y hemicelulosa. Los transcritos que codifican la xiloglucan endotransglucosilasa (XTH, CL2624Contig1), celulosa sintasa (CS, comp66274\_c0\_seq1, comp40455\_c0\_seq1), UDP-Dgalactosa 4-epimerasa (UGE, comp74230\_c0\_seq4, comp64491\_c1\_seq1), expansina (EXP, 161973583) y glicosiltransferasa (GT, comp70737\_c0\_seq3; comp71042\_c0\_seq1; comp71393\_c0\_seq1), que están involucradas en la modificación de la pared celular, fueron regulados por la infección por el hongo. Los resultados también sugirieron que los genes

modificadores de la pared celular y los genes involucrados en la producción de sustancias antimicrobianas estaban sobreexpresados en el genotipo 517 en comparación del genotipo 485. Por lo tanto, es evidente que el hongo *T. paradoxa* desempeñó un papel importante en la activación de los genes antifúngicos y modificadores de la pared celular en los tejidos de palma de aceite.

➤ Vías de señalización

Dado que las respuestas hormonales de las plantas desempeñan un papel importante en la red de defensa del hospedante durante la interacción planta-patógeno (Chanclud et al., 2016; Yang et al., 2019), se examinó la expresión de los genes implicados en las vías de señalización del ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ), etileno (ET) y las cascadas de señalización de proteína cinasa activada (MAPK). La activación de las vías son dependientes de patógenos que involucran actividades mutuamente antagónicas. El AJ y ET trabajan de forma sinérgica en respuesta a la infección por patógenos en las plantas. En este estudio, los transcritos que codifican para alcohol deshidrogenasa (ADH, comp41856\_c0\_seq1; comp75209\_c0\_seq1), fosfolipasa (comp77552\_c0\_seq1; comp77029\_c0\_seq3), lipasa estearasa GDSL (comp74264\_c0\_seq2; comp70973\_c0\_seq; comp73221\_c0\_seq1) y óxido de aleno sintasa (AOS, comp74982\_c0\_seq1; comp70883\_c0\_seq2; comp70883\_c0\_seq2), involucradas en la biosíntesis de AJ, se indujeron en los dos genotipos.

La proteína de dominio zim jasmonato (JAZ) inhibe la señalización de AJ en plantas al interactuar con el gen JIN1/MYC2 y reprime la expresión de los genes sensibles a AJ (Checker et al., 2018; Pandey et al., 2016; Zdyb et al., 2018). Sin embargo, el transcrito que codifica JAZ no fue anotado. El gen de la proteína cinasa activada por mitógenos, MPK4, actúa como un regulador positivo de AJ y un regulador negativo de la vía de señalización de SA en plantas y se expresó durante la infección en los dos genotipos.

Se produjeron cambios transcripcionales más abundantes a las 48 hpi en ambos genotipos, lo que sugiere la importancia de este punto temporal de infección para el estudio de los mecanismos de resistencia a *T. paradoxa*. El análisis del transcriptoma de palma permitió una visión de las vías involucradas en defensa del híbrido de palma de aceite distinguiendo dos tipos de respuestas (tolerante y susceptible) a la enfermedad. Los resultados mostraron que la expresión general de genes

involucrados en la percepción, vías de señalización y proteínas relacionadas con patogénesis en genotipos tolerantes y susceptibles podría representar el mecanismo básico de defensa del híbrido OxG contra *T. paradoxa*. Lo que se encontró notablemente diferente entre la respuesta tolerante y susceptible fue la modulación de los factores de transcripción WRKY, las cascadas MAPK (que están involucradas en la inducción de vías de señalización) y proteínas relacionadas con patogénesis, que estaban sobreexpresados en el genotipo tolerante. Además, se encontraron algunos genes del citocromo P450 involucrados en la producción de metabolitos relacionados con la defensa altamente expresados en el genotipo 517.

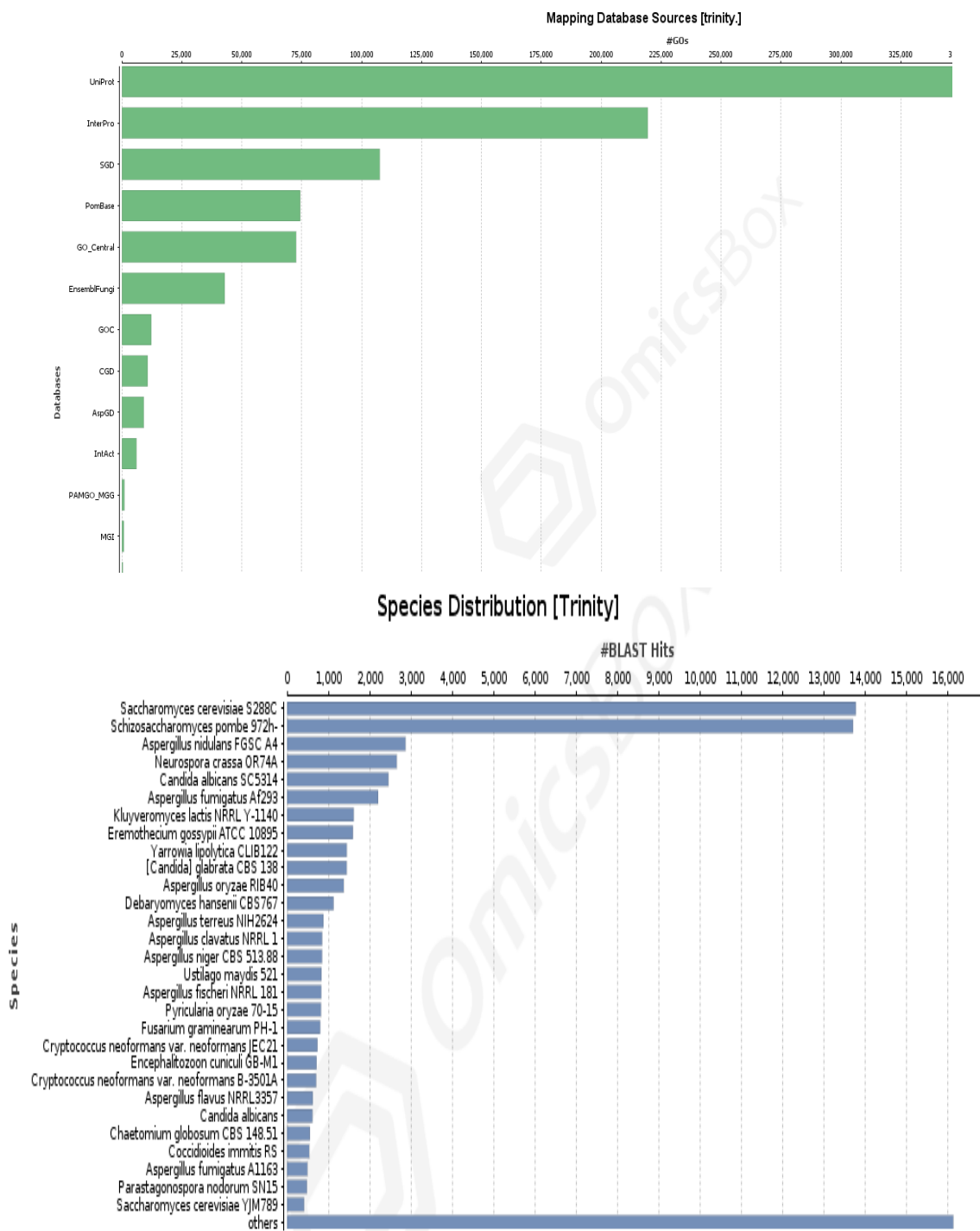
Con este primer análisis del transcriptoma de defensa del híbrido OxG, se muestra la respuesta a la infección por el hemibiotrófo *T. paradoxa*, caracterizada por una regulación positiva del ácido jasmónico, genes PR y las quitinasas y la modificación de la pared celular. La regulación transcripcional de algunos factores que se sabe que interfieren con la resistencia del hospedante difirió en los dos híbridos OxG evaluados. Adicionalmente, esta respuesta de defensa fue más rápida en el genotipo resistente que en el susceptible durante la infección, lo que en última instancia influye en la gravedad de la enfermedad. Esta información es un primer paso importante para comprender la respuesta del híbrido OxG a *T. paradoxa* que reveló muchos procesos importantes en la resistencia, que merecen ser ampliados estudios más detallados.

## ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE *THIELAVIOPSIS PARADOXA*

### 3.2.9 Anotación Funcional

El proceso de infección de *T. paradoxa* inicia con la adhesión de la conidia al tejido del hospedador, posteriormente se da la germinación y la hifa de penetración permite que se dé el crecimiento invasivo en la planta. Después de la penetración, el hongo se encuentra con una serie de barreras preformadas o inducidas durante su intento de infectar la palma (Petit-Houdenot et al., 2017). Durante la interacción el hospedero puede desencadenar respuestas de defensa rápidas y efectivas. Estas incluyen la respuesta hipersensible, la producción de especies reactivas de oxígeno, fortificación de la pared celular, la acumulación de compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas y la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Ali et al., 2018; Wang et al., 2020). En una interacción compatible, sin embargo, tales respuestas de defensa ocurren tarde, por lo que no logran restringir el ingreso del patógeno. Los productos genéticos del patógeno activados en la planta pueden ser factores putativos de patogenicidad necesarios para la establecimiento y mantenimiento de la infección o desarrollo de síntomas de la planta. La exploración de los genes del patógeno necesarios para el crecimiento invasivo en el hospedante ha sido objeto de diferentes estudios (Quoc et al., 2016; Gao et al., 2017; Mousavi-Derazmahalleh et al., 2019).

En este trabajo se estudió el perfil de expresión de genes de *T. paradoxa* durante la infección de la palma. Considerando que el genoma de *Thielaviopsis* aún no ha sido secuenciado, se usó la estrategia de sustracción *in silico*, para separar los reads del hongo del los de la palma durante la interacción. Los reads separados del hongo fueron ensamblados con el software Trinity. Las principales bases de datos contra las que mapearon los componentes fueron Uniprot e Interpro, seguida de Saccharomyces Genome Database (SGD), PomBase, Go\_Central y EnsemblFungi entre otras. Las anotaciones de los componentes generados fueron hechas usando el software Blast2go, obteniendo que la mayoría de componentes anotados tuvo similitud con hongos ascomicetos lo cual evidencia que la sustracción *in silico* fue muy eficiente ya que no hubo anotaciones asociadas con planta. Los ascomicetos con mayor número de componentes anotados fueron en orden descendente: *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* (figura 42).

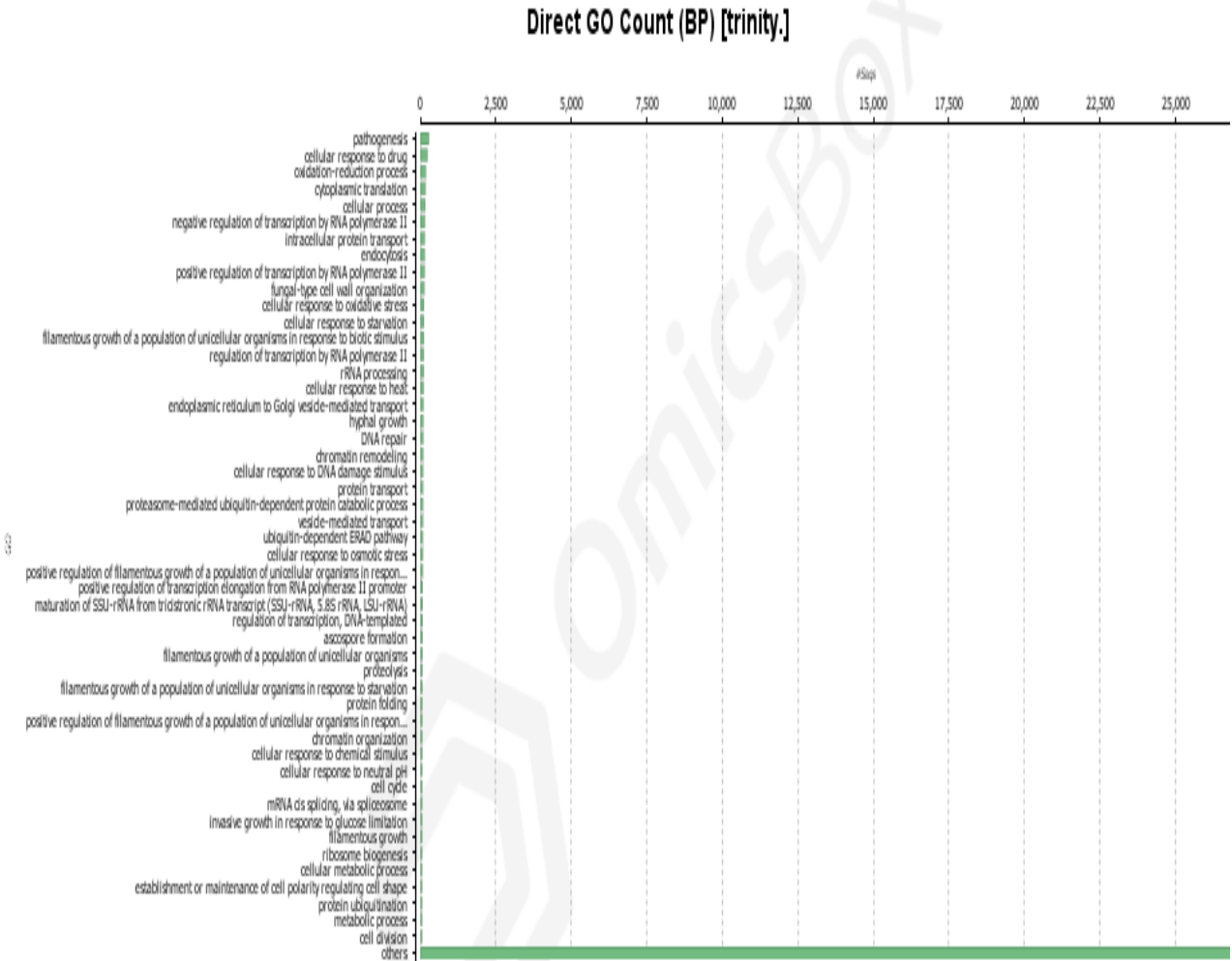
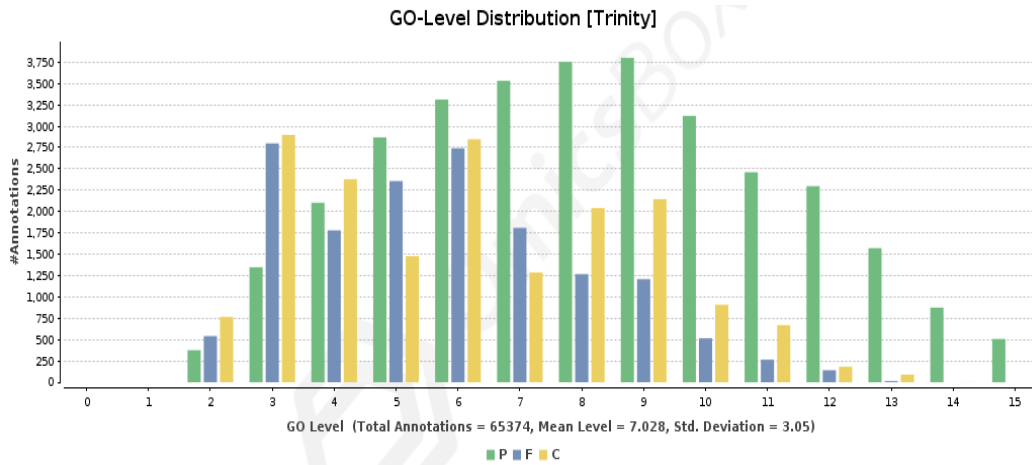


**Figura 42.** Gráfica de fuentes de bases de datos y de distribución de especies contra las cuales se anotó la mayoría de componentes obtenidos durante el ensamblaje con Trinity.

Los híbridos de palma solo produjeron lesiones visibles 24 horas después de la inoculación. Sin embargo, la inducción o represión de la expresión de diferentes genes en *T. paradoxa* se inició desde el contacto con la palma. Fueron identificados 23497 contigs en total, correspondientes a la expresión *en planta* o en medio sólido *in vitro*. Durante las dos interacciones con palma fueron inducidos 10847 genes (46,16 %) simultáneamente. Se indujeron un total de 12523 genes (53.29%) solo durante la interacción con el material 485 y 12720 genes (54,13%) se indujeron durante la interacción con el material 517, lo que evidencia que durante la colonización de la palma se necesitó una reprogramación transcripcional de *T. paradoxa*.

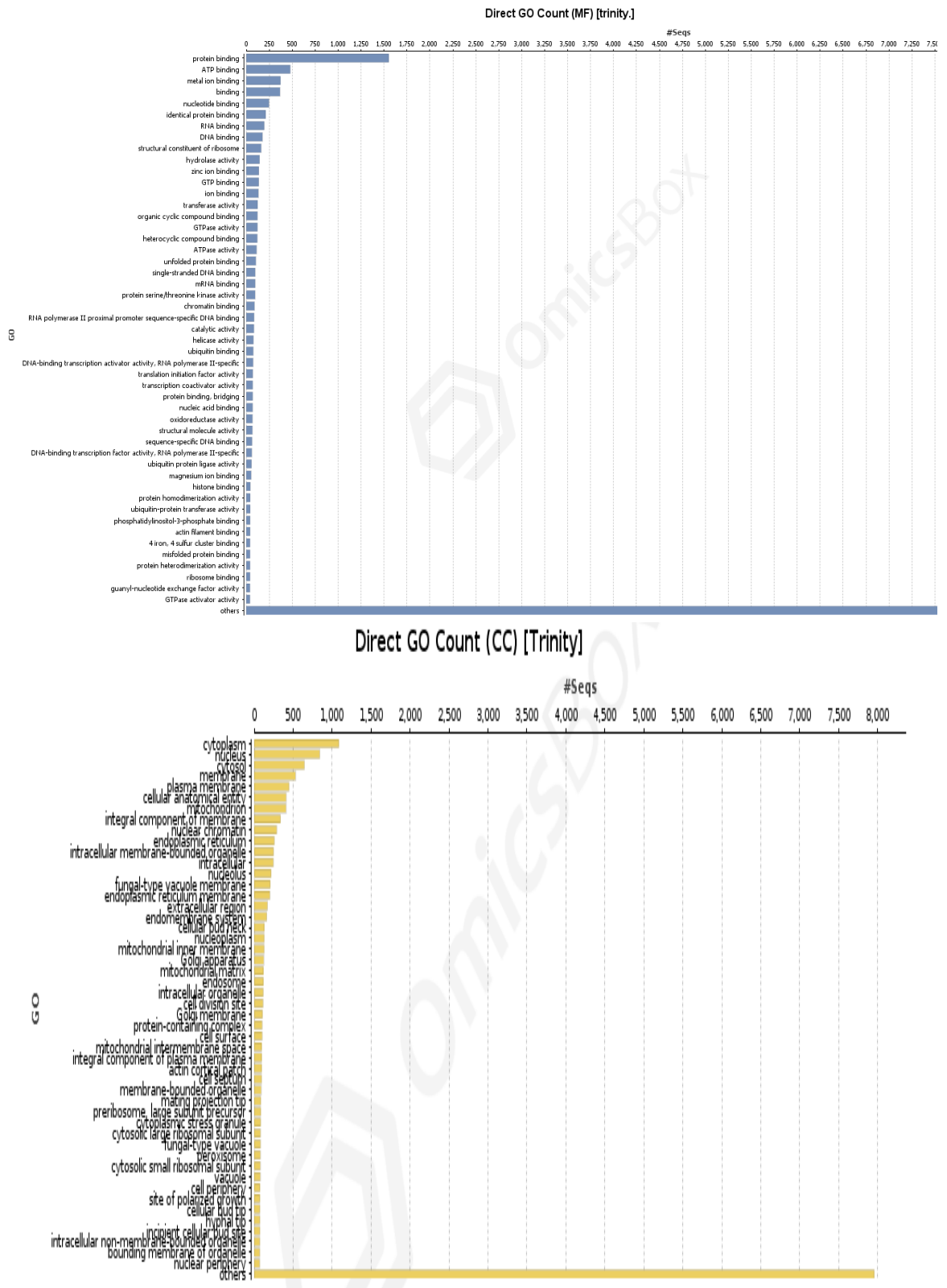
Para comprender mejor el proceso de infección del híbrido de palma de aceite, todos los genes se enriquecieron funcionalmente y se clasificaron en función de la homología con secuencias de blast y las anotaciones de ontología génica (GO) utilizando el software Blast2GO, seleccionando el NCBI blast fungi como filtro de taxonomía y usando los parámetros predeterminados. De acuerdo a la distribución del GO, los procesos biológicos tuvieron la mayor cantidad de anotaciones. Los principales procesos biológicos fueron procesos celulares, procesos metabólicos, regulación biológica y biogénesis u organización de componentes celulares, siendo patogénesis el proceso celular con mayor número de reads anotados, evidenciando el proceso de infección de *T. paradoxa* (Figura 43). Los genes se agruparon en la regulación de diferentes funciones moleculares (MF) donde las más abundantes fueron unión de proteínas, de ATP e iones metálicos y los componentes celulares más abundantes correspondían a citoplasma, núcleo y membrana plasmática (figura 44).

Cuando *T. paradoxa* estaba sobre sustrato sólido se anotaron transcritos asociados con GO:1900436 “positive regulation of filamentous growth of a population of unicellular organisms in response to starvation”; GO:0001403 “invasive growth in response to glucose limitation”; GO:0036170 “filamentous growth of a population of unicellular organisms in response to starvation”; GO:0036180 “filamentous growth of a population of unicellular organisms in response to biotic stimulus”.



**Figura 43.** Distribución de los términos GO en los niveles proceso biológico (BP), función molecular (MF) y componente celular (CC) de las anotaciones de los ensamblajes de *T. paradoxa* (Imagen superior). Porcentaje de genes que codifican enzimas asignadas a las subcategorías del Proceso Biológico (BP) que fueron inducidas durante la infección por *T. paradoxa*. El análisis de ontología génica se realizó utilizando el software Blast2Go.



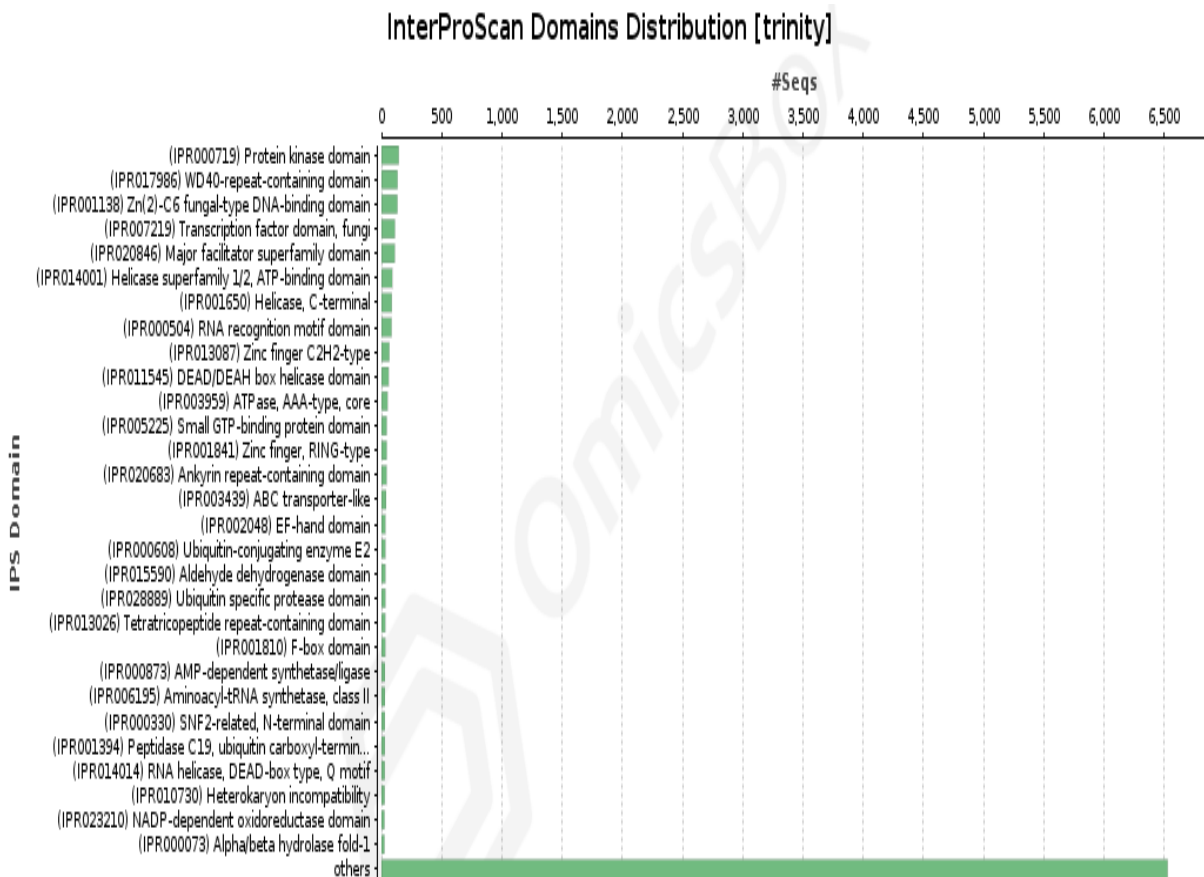
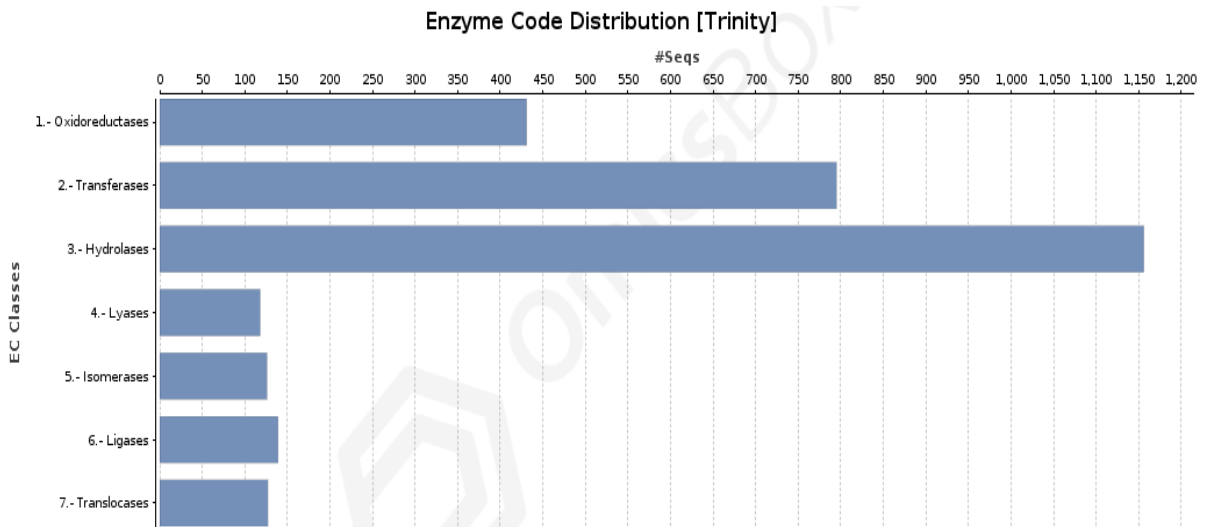


**Figura 44.** Distribución de los términos GO en los niveles proceso biológico (BP), función molecular (MF) y componente celular (CC) de las anotaciones de los ensamblajes de *T. paradoxa*.

Cuando se anotaron los transcritos durante el proceso de infección de *T. paradoxa* los siguientes términos fueron obtenidos: GO:0044409 “entry into host”; GO:0044416 “induction by symbiont of host defense response” se anotaron transcritos a los siguientes términos GO: GO:0044406 “adhesion to host” y GO:0009847 “spore germination”; GO:0044114 “development of symbiont in host”; GO:0030447 “filamentous growth”; GO:0030448 “hyphal growth”; GO:0006031 “chitin biosynthetic process”; GO:0031505 “fungal-type cell wall organization”; GO:0048315 “conidia formation” GO:0001410 “chlamydospore formation” GO:0006038 “cell wall chitin biosynthetic process” GO:0032995 “regulation of fungal-type cell wall biogenesis”; GO:0000185 “activation of MAPKKK activity” y GO:0006696 “ergosterol biosynthetic process”.

Para identificar procesos y funciones sobrerrepresentados en *T. paradoxa* durante la infección, también se aplicó el análisis de códigos de enzimas donde se determinó que se distribuían principalmente en hidrolasas, transferasas y oxidoreductasas. A nivel de InterproScan las familias de proteínas se distribuyeron en orden descendente en el dominio Proteína cinasa, dominio conteniendo repeticiones WD-40, dominio de unión a DNA tipo Zn(2)-C6 fúngico y factores de transcripción fúngicos principalmente (figura 45).

Para investigar las vías metabólicas afectadas en *T. paradoxa* durante la infección, se realizó un análisis de la vía KEGG y se identificaron 55 vías que involucraron 135 genes (valor  $P < 0.05$ ).



**Figura 45.** Distribución de los códigos de enzima (superior) y familias de proteínas por dominios en InterProScan de las anotaciones de los ensamblajes de *T. paradoxa*.

### 3.2.10 Discusión de los resultados del transcriptoma de *Thielaviopsis paradoxa*

El proceso de patogénesis de un hongo es un proceso complejo que involucra a nivel general los siguientes pasos: adhesión al hospedero, reconocimiento, penetración, crecimiento invasivo dentro del hospedero, desarrollo de la lesión y producción de partículas infecciosas. Los tipos de genes esenciales para la patogénesis dependen del proceso de infección para un hongo en particular. Al revisar las anotaciones se encontraron varios términos GO relacionados con los procesos de patogénesis que se analizaron de acuerdo al proceso de patogénesis en el que participan.

#### ➤ Genes involucrados con adhesión al hospedero

Cuando las conidias llegan a la superficie al tejido del hospedante, se unen por medio de moléculas de adhesión donde se produce la germinación. A partir del tubo germinativo se inicia el crecimiento de la hifa la cual también está unida firmemente a la superficie del hospedero por las moléculas de adhesión. Dos términos GO de *T. paradoxa* relacionados con este proceso de adhesión fueron anotados durante el proceso de infección: GO:0044406 “adhesion to host” (comp787\_c0\_seq1, comp1677\_c0\_seq1, comp2682\_c0\_seq1, comp2001\_c0\_seq1, comp2001\_c0\_seq4, comp2001\_c0\_seq5, comp3803\_c0\_seq1, comp5350\_c0\_seq2, comp5256\_c0\_seq1, comp4261\_c0\_seq5, comp787\_c0\_seq1) y GO:0009847.

Adicionalmente se anotaron dos términos GO relacionados con el proceso de germinación: “spore germination” (comp5690\_c0\_seq1, comp9730\_c0\_seq1, comp12418\_c0\_seq1, comp16324\_c0\_seq2, comp930\_c0\_seq2) GO: 0075005 “spore germination on or near host” (comp930\_c0\_seq2; comp129\_c0\_seq1; comp533\_c0\_seq1; comp533\_c0\_seq2; comp1197\_c0\_seq4; comp800\_c0\_seq1). Se ha demostrado el hidrocarburo gaseoso y las hormonas vegetales liberadas para iniciar la maduración de los frutos, pueden desencadenar la germinación del patógeno (Sephton-Clark et al., 2018).

#### ➤ Genes involucrados con reconocimiento y penetración

Durante la germinación de las esporas, las esporas previamente inactivas se adaptan a un estado metabólicamente activo que se caracteriza por cambios rápidos en el paisaje transcripcional, el metabolismo, la composición de la pared celular y la fisiología celular.

Dentro de estos cambios las señales de transducción son un componente integral del proceso de reconocimiento del hospedero. Varias señales descritas fueron anotadas, entre ellas las señales G-protein coupled receptor protein signal transduction (comp306\_c0\_seq3; comp2513\_c0\_seq2), cAMP-mediated signal transduction (comp4954\_c0\_seq1; comp4712\_c0\_seq1), calcium or calmodulin-mediated signal transduction (comp11097\_c0\_seq1; comp1186c0\_seq1) y adenylate cyclase-mediated signal transduction (comp2256\_c0\_seq1) (Rafiqi et al., 2009) las cuales fueron expresadas durante el proceso de infección del híbrido de palma de aceite.

Otro cambio importante tras la germinación, es que el hongo libera cutinasa extracelular, enzima que hidroliza la capa de cutina de la planta, permitiendo de esta forma el acceso del patógeno a la cutícula de la planta (Sephton-Clark et al., 2018). La penetración exitosa de la planta no depende solo de la formación de estructuras de infección, sino que también requiere de enzimas capaces de degradar componentes de la pared celular y otras barreras físicas como la pectina y cutina (Sephton-Clark et al., 2018). En este estudio observó la expresión de cutinasas y pectinasas sugiriendo su papel activo en la degradación de los componentes de la pared celular de la palma. Se anotaron las enzimas pectate lyase A (PLYA, comp8121\_c0\_seq1), Polygacturonase (PGLR, comp1335\_c0\_seq1) y Pectin methylesterase (PME, comp12684\_c0\_seq1). También se anotó una probable cutinase 1 (CUTII\_ASPNC, comp5121\_c0\_seq1) y el factor transcription Cutinase 1 alpha (CTF1\_FUSSO, comp1153\_c0\_seq1; comp1153\_c0\_seq2). Los genes cutinasa y pectinasa, que son inducidos durante la etapa del inicio de la interacción, se han identificado en varios patosistemas y pueden ser factores de patogenicidad en aquellos hongos que necesitan penetrar directamente la superficie del hospedero como sucede con *T. paradoxa* (Skamnioti et al., 2008; Ikeda et al., 2019). Se han reportado genes de cutinasa en *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum* y *Magnaporthe grisea* (Skamnioti et al. 2008).

➤ Genes involucrados en señalización

Los hongos al igual que otros organismos usan cascadas de señalización que responden a cambios en el ambiente alterando la expresión de sus genes. En los análisis de expresión de *T. paradoxa* se encontró que los genes de señalización como proteínas G heterotrimérica,

proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), proteína cinasa dependiente de cAMP y la vía de señalización de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) estaban expresados durante la infección de los dos genotipos del híbrido de palma de aceite. Las vías de señalización de la proteína G están involucradas en la detección del medio ambiente, lo que permite a los hongos coordinar la función celular, el metabolismo y el desarrollo con su entorno, promoviendo así su supervivencia, propagación y virulencia (Brown et al., 2018). Los GPCR son la clase más grande de receptores de superficie celular en los hongos, lo cuales perciben estímulos extracelulares e inician señalización de eventos intracelulares gracias a que tienen dominios transmembranales que están asociados con proteínas G (Kochman, 2014). En animales y hongos, la unión del ligando a un GPCR provoca un cambio en su conformación, que a su vez activa el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF). Teniendo en cuenta que en los genomas de plantas no codifican GPCR a pesar de que hay ~ 54 proteínas predichas en *Arabidopsis*, estas no muestran actividad GEF (Zhong et al., 2019). Debido a su ubicación en la superficie celular y su papel central en la señalización celular, este receptor podría ser considerado un blanco terapéutico, por lo que sería interesante continuar estudios que permitan caracterizar estos GPCR en *Thielaviopsis*.

Adicionalmente se encontraron secuencias de genes fúngicos que participan en la biosíntesis de ergosterol entre los transcritos de *T. paradoxa* exclusivamente durante la infección, el cual pudo actuar como una señal que fue percibida por los PRP y desencadenó la PTI en la palma. Como sucede en células de tabaco, donde el ergosterol desencadenó cambios diferenciales en el metaboloma y variaciones en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Tugizimana et al., 2014).

➤ Genes involucrados en respuesta al ambiente del hospedero

El crecimiento en la planta representa otros retos para el hongo, ya que las plantas producen muchos metabolitos secundarios, algunos de los cuales tienen propiedades antimicrobianas y que podrían protegerlas contra ataques. Sin embargo, los hongos producen enzimas que degradan estos metabolitos en respuesta al ataque (Wu et al., 2004; Milani et al., 2012). En adición a las defensas químicas, el hongo posee genes que podrían bombear toxinas de las plantas, en el caso de *T. paradoxa* fueron anotados dos genes ABC transporter

(comp1177\_c0\_seq1; comp11840\_c0\_seq1), ABC multidrug transporter MDR2 (comp11342\_c0\_seq1; comp2741\_c0\_seq1), ABC multidrug transporter mdr1 (comp6219\_c0\_seq1; comp5435\_c0\_seq1); ABC multidrug transporter atrI (comp3723\_c0\_seq1; comp5869\_c0\_seq2); Major facilitator superfamily (MFS) multidrug transporter FLU1(comp1334\_c0\_seq1; comp7317\_c0\_seq1) (Chen et al., 2017). La importancia de la estrategia de los transportadores para hacer frente a los metabolitos tóxicos fue comprobada hace muchos años con una cepa de *M. grisea* que tenía una inserción en el promotor de un transportador ABC. La expresión de ABC1 fue fuertemente estimulada por una fitoalexina de arroz in vitro. In vivo la sobreexpresión de ABC1 parece ser necesario para permitir la progresión de la enfermedad (Urban et al., 1999; Del Sorbo et al., 2000). Esto demuestra que los transportadores funcionan como una bomba de flujo para proporcionar resistencia a los compuestos antimicrobianos producidos por las plantas, en el caso de *T. paradoxa* en que se anotaron varios tipos de transportadores ABC y MFS, explicaría cómo puede evadir los metabolitos secundarios e invadir diferentes hospederos.

➤ Genes involucrados con producción de toxinas

Algunos hongos producen toxinas que pueden inhabilitar funciones celulares del hospedero o matar las células durante un estado necrótico. En este estudio se anotó un transcrito con similitud a AM-toxin biosynthesis protein 16 (comp1379\_c0\_seq1; comp1379\_c0\_seq2; comp1379\_c0\_seq3; comp1379\_c0\_seq5; comp1379\_c0\_seq9 y comp1379\_c0\_seq10). Esta es una toxina específica del hospedero, producida por patógenos fúngicos de plantas, son generalmente metabolitos secundarios de bajo peso molecular y son determinantes críticos de patogenicidad hospedero específica en varias interacciones planta-patógeno (Harimoto et al., 2008). La regulación transcripcional de múltiples grupos de metabolitos secundarios se sabe que es controlada por el regulador global LaeA (Butchko et al., 2012; Takao et al., 2016; Wu et al., 2012). LaeA, una metiltransferasa, se caracterizó por primera vez como un regulador positivo del metabolismo secundario y el desarrollo en *Aspergillus nidulans* (Butchko et al., 2012; Wu et al., 2012), la cual se estaba sobreexpresada en *T. paradoxa* durante el proceso de infección. Se ha informado que los ortólogos de proteínas LaeA están involucrados en la producción de metabolitos secundarios, desarrollo de hongos y virulencia del patógeno del

maíz *Cochliobolus heterostrophus* raza T y el patógeno del arroz *Fusarium fujikuroi* (Butchko et al., 2012; Visentin et al., 2012).



## BIBLIOGRAFÍA

- Ali, M., Cheng, Z., Ahmad, H., & Hayat, S. (2018). Reactive oxygen species (ROS) as defenses against a broad range of plant fungal infections and case study on ros employed by crops against verticillium dahlia wilts. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 353–363. doi: 10.1080/17429145.2018.1484188
- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., Tyagi, A., Islam, S. T., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., & Grover, A. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212–213, 29–37.
- Andersen, E. J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., & Nepal, M. P. (2018). Disease resistance mechanisms in plants. In *Genes* (Vol. 9, Issue 7, p. 339). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. doi: 10.3390/genes9070339
- Aoun, M. (2017). Host defense mechanisms during fungal pathogenesis and how these are overcome in susceptible plants: A review. In *International Journal of Botany* (Vol. 13, Issue 2, pp. 82–102). doi: 10.3923/ijb.2017.82.102
- Astorkia, M., Hernandez, M., Bocs, S., de Armentia, E. L., Herran, A., Ponce, K., León, O., Morales, S., Quezada, N., Orellana, F., Wendra, F., Sembiring, Z., Asmono, D., & Ritter, E. (2019). Association mapping between candidate gene SNP and production and oil quality traits in interspecific oil palm hybrids. *Plants*, 8(10). doi: 10.3390/plants8100377
- Astorkia, M., Hernández, M., Bocs, S., Ponce, K., León, O., Morales, S., Quezada, N., Orellana, F., Wendra, F., Sembiring, Z., Asmono, D., & Ritter, E. (2020). Detection of significant SNP associated with production and oil quality traits in interspecific oil palm hybrids using RARSeq. *Plant Science*, 291. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.110366
- Ayala, L., & Gómez, P. L. (2000). Patogenicidad de aislamientos de *Thielaviopsis paradoxa* principal agente causal de la pudrición de cogollo. *Palmas*, 21(Edición Especial-tomo I), 121–122. Retrieved from <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/772>
- Bahari, M. N. A., Sakeh, N. M., Abdullah, S. N. A., Ramli, R. R., & Kadkhodaei, S. (2018). Transcriptome profiling at early infection of *Elaeis guineensis* by *Ganoderma boninense* provides novel insights on fungal transition from biotrophic to necrotrophic phase. *BMC Plant Biology*, 18(1), 377. doi: 10.1186/s12870-018-1594-9
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1229–1240. doi: 10.1093/JXB/ERT375
- Bhadauria, V., Banniza, S., Vandenberg, A., Selvaraj, G., & Wei, Y. (2013). Overexpression of a novel biotrophy-specific *Colletotrichum truncatum* effector, CtNUDIX, in hemibiotrophic fungal phytopathogens causes incompatibility with their host plants. *Eukaryotic Cell*, 12(1), 2–11. doi: 10.1128/EC.00192-12
- Blows, F. M., Driver, K. E., Schmidt, M. K., Broeks, A., van Leeuwen, F. E., Wesseling, J., Cheang, M. C., Gelmon, K., Nielsen, T. O., Blomqvist, C., Heikkilä, P., Heikkinen, T., Nevanlinna, H., Akslen, L. a, Bégin, L. R., Foulkes, W. D., Couch, F. J., Wang, X., Cafourek, V., ... Huntsman, D. (2010). Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Medicine*, 7(5), e1000279. doi: 10.1371/journal.pmed.1000279
- Brown, N. A., Schrevens, S., Van Dijk, P., & Goldman, G. H. (2018). Fungal G-protein-coupled receptors: Mediators of pathogenesis and targets for disease control. In *Nature Microbiology* (Vol. 3, Issue 4, pp. 402–414). Nature Publishing Group. doi: 10.1038/s41564-018-0127-5
- Butchko, R. A. E., Brown, D. W., Busman, M., Tudzynski, B., & Wiemann, P. (2012). Lae1 regulates expression of multiple secondary metabolite gene clusters in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(8), 602–612. doi: 10.1016/j.fgb.2012.06.003
- Caarls, L., Pieterse, C. M. J., & Van Wees, S. C. M. (2015). How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Frontiers in Plant Science*, 6(MAR). doi: 10.3389/fpls.2015.00170
- Cai, H., Yang, S., Yan, Y., Xiao, Z., Cheng, J., Wu, J., Qiu, A., Lai, Y., Mou, S., Guan, D., Huang, R., & He, S. (2015). CaWRKY6 transcriptionally activates CaWRKY40, regulates *Ralstonia solanacearum* resistance, and confers high temperature and high-humidity tolerance in pepper. *Journal of Experimental Botany*, 66(11), 3163–3174. doi: 10.1093/jxb/erv125
- Chanclud, E., & Morel, J. B. (2016). Plant hormones: a fungal point of view. In *Molecular plant pathology* (Vol. 17, Issue 8, pp. 1289–1297). Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1111/mpp.12393
- Checker, V. G., Kushwaha, H. R., Kumari, P., & Yadav, S. (2018). Role of phytohormones in plant defense: Signaling and cross talk. In *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (pp. 159–184). Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-7371-7\_7
- Chen, L.-H., Tsai, H.-C., Yu, P.-L., & Chung, K.-R. (2017). A Major Facilitator Superfamily Transporter-Mediated

- Resistance to Oxidative Stress and Fungicides Requires Yap1, Skn7, and MAP Kinases in the Citrus Fungal Pathogen *Alternaria alternata*. *PLOS ONE*, 12(1), e0169103. doi: 10.1371/journal.pone.0169103
- Chen, W., Lee, M.-K., Jefcoate, C., Kim, S.-C., Chen, F., & Yu, J.-H. (2014). Fungal Cytochrome P450 Monooxygenases: Their Distribution, Structure, Functions, Family Expansion, and Evolutionary Origin. *Genome Biology and Evolution*, 6(7), 1620–1634. doi: 10.1093/gbe/evu132
- Chinchilla, C. (2008). Las pudriciones del cogollo en palma aceitera : La complejidad del desorden y una guía de convivencia. *ASD Oil Palm Papers*, 32, 11–23. Retrieved from [http://www.asd-cr.com/images/PDFs/OilPalmPapers/Muchas\\_caras\\_de\\_PC\\_32\\_2008.pdf](http://www.asd-cr.com/images/PDFs/OilPalmPapers/Muchas_caras_de_PC_32_2008.pdf)
- Chowdhury, S., Basu, A., & Kundu, S. (2017). Biotrophy-necrotrophy switch in pathogen evoke differential response in resistant and susceptible sesame involving multiple signaling pathways at different phases. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-17248-7
- Clemente, M., Corigliano, M. G., Pariani, S. A., Sánchez-López, E. F., Sander, V. A., & Ramos-Duarte, V. A. (2019). Plant serine protease inhibitors: Biotechnology application in agriculture and molecular farming. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 6, p. 1345). MDPI AG. doi: 10.3390/ijms20061345
- Conesa, A., & Stefan, G. (2009). *Blast2GO Tutorial*. June.
- Costa-Silva, J., Domingues, D., & Lopes, F. M. (2017). RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. In *PLoS ONE* (Vol. 12, Issue 12). Public Library of Science. doi: 10.1371/journal.pone.0190152
- Del Sorbo, G., Schoonbeek, H. J., & De Waard, M. A. (2000). Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. In *Fungal Genetics and Biology* (Vol. 30, Issue 1, pp. 1–15). doi: 10.1006/fgbi.2000.1206
- Devendrakumar, K. T., Li, X., & Zhang, Y. (2018). MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2018 75:16, 75(16), 2981–2989. doi: 10.1007/S00018-018-2839-3
- Dey, S., & Corina Vlot, A. (2015). Ethylene responsive factors in the orchestration of stress responses in monocotyledonous plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(AUG), 28. doi: 10.3389/fpls.2015.00640
- Dhillon, B., Hamelin, R. C., & Rollins, J. A. (2021). Transcriptional profile of oil palm pathogen, *Ganoderma boninense*, reveals activation of lignin degradation machinery and possible evasion of host immune response. *BMC Genomics*, 22(1). doi: 10.1186/S12864-021-07644-9
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
- Dobin, A., & Gingeras, T. R. (2015). Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Current Protocols in Bioinformatics*. doi: 10.1002/0471250953.bi1114s51
- Dobin, A., & Gingeras, T. R. (2016). Optimizing RNA-seq mapping with STAR. In *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-4939-3572-7\_13
- Dröge-Laser, W., Snoek, B. L., Snel, B., & Weiste, C. (2018). The Arabidopsis bZIP transcription factor family — an update. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 45, pp. 36–49). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.pbi.2018.05.001
- Duitama, J., Quintero, J. C., Cruz, D. F., Quintero, C., Hubmann, G., Foulquié-Moreno, M. R., Verstrepen, K. J., Thevelein, J. M., & Tohme, J. (2014). An integrated framework for discovery and genotyping of genomic variants from high-throughput sequencing experiments. *Nucleic Acids Research*, 42(6). doi: 10.1093/NAR/GKT1381
- Gao, F.-Y., Li, L., Wang, J.-Y., Wang, Y.-L., & Sun, G.-C. (2017). The functions of PEX genes in peroxisome biogenesis and pathogenicity in phytopathogenic fungi. *Yi Chuan = Hereditas*, 39(10), 908–917. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29070486>
- Garber, M., Grabherr, M. G., Guttman, M., & Trapnell, C. (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature Methods*, 8(6), 469–477. doi: 10.1038/nmeth.1613
- Geeta, & Mishra, R. (2018). Fungal and bacterial biotrophy and necrotrophy. In *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (pp. 21–42). Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-7371-7\_2
- Genva, M., Obounou Akong, F., Andersson, M. X., Deleu, M., Lins, L., & Fauconnier, M. L. (2019). New insights into the biosynthesis of esterified oxylipins and their involvement in plant defense and developmental mechanisms. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 18, Issue 1, pp. 343–358). Springer Netherlands. doi: 10.1007/s11101-018-9595-8
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. a, Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–652. doi: 10.1038/nbt.1883

- Harimoto, Y., Tanaka, T., Kodama, M., Yamamoto, M., Otani, H., & Tsuge, T. (2008). Multiple copies of AMT2 are prerequisite for the apple pathotype of *Alternaria alternata* to produce enough AM-toxin for expressing pathogenicity. *Journal of General Plant Pathology*, *74*(3), 222–229. doi: 10.1007/s10327-008-0089-1
- Henschel, R., Nista, P. M., Lieber, M., Haas, B. J., Wu, L. S., & Leduc, R. D. (2012). Trinity RNA-Seq assembler performance optimization. *ACM International Conference Proceeding Series*. doi: 10.1145/2335755.2335842
- Ho, C.-L., & Tan, Y.-C. (2015). Molecular defense response of oil palm to *Ganoderma* infection. *Phytochemistry*, *114*, 168–177. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.10.016
- Ho, C. L., Tan, Y. C., Yeoh, K. A., Ghazali, A. K., Yee, W. Y., & Hoh, C. C. (2016). De novo transcriptome analyses of host-fungal interactions in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *BMC Genomics*, *17*(1), 1–19. doi: 10.1186/s12864-016-2368-0
- Ho, C. L., Tan, Y. C., Yeoh, K. A., Lee, W. K., Ghazali, A. K., Yee, W. Y., & Hoh, C. C. (2019). Leaf transcriptome of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) infected by *Ganoderma boninense*. *Trees - Structure and Function*, *33*(3), 943–950. doi: 10.1007/S00468-019-01830-9
- Huang, X., & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, *9*(9), 868–877. doi: 10.1101/gr.9.9.868
- Ikeda, K., Park, P., & Nakayashiki, H. (2019). Cell biology in phytopathogenic fungi during host infection: commonalities and differences. In *Journal of General Plant Pathology* (Vol. 85, Issue 3, pp. 163–173). Springer Tokyo. doi: 10.1007/s10327-019-00846-w
- Jiang, C., Zhang, X., Liu, H., & Xu, J. R. (2018). Mitogen-activated protein kinase signaling in plant pathogenic fungi. *PLoS Pathogens*, *14*(3). doi: 10.1371/journal.ppat.1006875
- Kim, Y., Park, S. Y., Kim, D., Choi, J., Lee, Y. H., Lee, J. H., & Choi, W. (2013). Genome-scale analysis of ABC transporter genes and characterization of the ABCC type transporter genes in *Magnaporthe oryzae*. *Genomics*, *101*(6), 354–361. doi: 10.1016/j.ygeno.2013.04.003
- Kochman, K. (2014). Superfamily of G-protein coupled receptors (GPCRs) - Extraordinary and outstanding success of evolution. In *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej* (Vol. 68, pp. 1225–1237). Polska Akademia Nauk. doi: 10.5604/17322693.1127326
- Kudla, J., Becker, D., Grill, E., Hedrich, R., Hippler, M., Kummer, U., Parniske, M., Romeis, T., & Schumacher, K. (2018). Advances and current challenges in calcium signaling. In *New Phytologist* (Vol. 218, Issue 2, pp. 414–431). Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1111/nph.14966
- Kumar, M., Brar, A., Yadav, M., Chawade, A., Vivekanand, V., & Pareek, N. (2018). Chitinases—Potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 8, Issue 7). doi: 10.3390/agriculture8070088
- Kumar, V., Joshi, S. G., Bell, A. A., & Rathore, K. S. (2013). Enhanced resistance against *Thielaviopsis basicola* in transgenic cotton plants expressing *Arabidopsis* NPR1 gene. *Transgenic Research*, *22*(2), 359–368. doi: 10.1007/s11248-012-9652-9
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, *9*(4), 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, *12*(1), 1–16. doi: 10.1186/1471-2105-12-323
- Li, F. H., Sun, X. D., Niu, X. Q., Cao, H. X., & Yu, F. Y. (2018). First report of basal stem rot on oil palm caused by *thielaviopsis Paradoxa* in Hainan, China. *Plant Disease*, *102*(10), 2029. doi: 10.1094/PDIS-01-18-0009-PDN
- Li, L., Stoeckert, C. J., & Roos, D. S. (2003). OrthoMCL: Identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Research*, *13*(9), 2178–2189. doi: 10.1101/gr.1224503
- Licatalosi, D. D., & Darnell, R. B. (2010). RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nature Reviews. Genetics*, *11*(1), 75–87. doi: 10.1038/nrg2673
- Liu, D., Jiao, S., Cheng, G., Li, X., Pei, Z., Pei, Y., Yin, H., & Du, Y. (2018). Identification of chitosan oligosaccharides binding proteins from the plasma membrane of wheat leaf cell. *International Journal of Biological Macromolecules*, *111*, 1083–1090. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.113
- Lui, S., Luo, C., Zhu, L., Sha, R., Qu, S., Cai, B., & Wang, S. (2017). Identification and expression analysis of WRKY transcription factor genes in response to fungal pathogen and hormone treatments in apple (*Malus domestica*). *Journal of Plant Biology*, *60*(2), 215–230. doi: 10.1007/s12374-016-0577-3
- Mei, C., Qi, M., Sheng, G., & Yang, Y. (2006). Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, PR gene expression, and host resistance to fungal infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(10), 1127–1137. doi: 10.1094/MPMI-19-1127
- Mi, H., & Thomas, P. (2009). PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *563*, 123–140. doi: 10.1007/978-1-60761-175-2\_7

- Milani, N. A., Lawrence, D. P., Elizabeth Arnold, A., & Van Etten, H. D. (2012). Origin of pisatin demethylase (PDA) in the genus *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(11), 933–942. doi: 10.1016/j.fgb.2012.08.007
- Mithöfer, A., Ebel, J., & Felle, H. H. (2007). Cation Fluxes Cause Plasma Membrane Depolarization Involved in  $\beta$ -Glucan Elicitor-Signaling in Soybean Roots. [Http://Dx.Doi.Org/10.1094/MPMI-18-0983](http://Dx.Doi.Org/10.1094/MPMI-18-0983), 18(9), 983–990. doi: 10.1094/MPMI-18-0983
- Mousavi-Derazmahalleh, M., Chang, S., Thomas, G., Derbyshire, M., Bayer, P. E., Edwards, D., Nelson, M. N., Erskine, W., Lopez-Ruiz, F. J., Clements, J., & Hane, J. K. (2019). Prediction of pathogenicity genes involved in adaptation to a lupin host in the fungal pathogens *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* via comparative genomics. *BMC Genomics*, 20(1). doi: 10.1186/s12864-019-5774-2
- Nelson, J. W., Sklenar, J., Barnes, A. P., & Minnier, J. (2017). The START App: A web-based RNAseq analysis and visualization resource. *Bioinformatics*, 33(3), 447–449. doi: 10.1093/bioinformatics/btw624
- Noman, A., Liu, Z., Aqeel, M., Zainab, M., Khan, M. I., Hussain, A., Ashraf, M. F., Li, X., Weng, Y., & He, S. (2017). Basic leucine zipper domain transcription factors: the vanguards in plant immunity. In *Biotechnology Letters* (Vol. 39, Issue 12, pp. 1779–1791). Springer Netherlands. doi: 10.1007/s10529-017-2431-1
- Nusaibah, S. A., Siti Nor Akmar, A., Idris, A. S., Sariah, M., & Mohamad Pauzi, Z. (2016). Involvement of metabolites in early defense mechanism of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) against *Ganoderma* disease. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 109, 156–165. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.09.014
- O’Keefe, K. R., & Jones, C. D. (2019). Challenges and solutions for analysing dual RNA-seq data for non-model host–pathogen systems. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(3), 401–414. doi: 10.1111/2041-210X.13135
- Pandey, Dinesh, Rajendran, S. R. C. K., Gaur, M., Sajeesh, P. K., & Kumar, A. (2016). Plant Defense Signaling and Responses Against Necrotrophic Fungal Pathogens. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(4), 1159–1174. doi: 10.1007/s00344-016-9600-7
- Parisi, K., Shafee, T. M. A., Quimbar, P., van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. A. (2019). The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 88, 107–118.
- Pertea, G., Huang, X., Liang, F., Antonescu, V., Sultana, R., Karamycheva, S., Lee, Y., White, J., Cheung, F., Parvizi, B., Tsai, J., & Quackenbush, J. (2003). TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics*, 19(5), 651–652. doi: 10.1093/bioinformatics/btg034
- Petit-Houdenot, Y., & Fudal, I. (2017). Complex Interactions between Fungal Avirulence Genes and Their Corresponding Plant Resistance Genes and Consequences for Disease Resistance Management. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1072. doi: 10.3389/FPLS.2017.01072
- Pfaffl, M. W. (2004). *Quantification strategies in real-time PCR*.
- Phukan, U. J., Jeena, G. S., Tripathi, V., & Shukla, R. K. (2017). Regulation of *Apetala2*/Ethylene response factors in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 150. doi: 10.3389/fpls.2017.00150
- Pontual, E., Breitenbach, L. C., & Coelho, B. (2013). *Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/275772079>
- Qiu, Y.-Q. (2013). KEGG Pathway Database. In *Encyclopedia of Systems Biology* (pp. 1068–1069). Springer New York. doi: 10.1007/978-1-4419-9863-7\_472
- Quoc, N. B., & Bao Chau, N. N. (2016). The Role of Cell Wall Degrading Enzymes in Pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*. *Current Protein & Peptide Science*, 18(10). doi: 10.2174/1389203717666160813164955
- Rabbani, B., Nakaoka, H., Akhondzadeh, S., Tekin, M., & Mahdieh, N. (2016). Next generation sequencing: implications in personalized medicine and pharmacogenomics. *Molecular BioSystems*, 12(6), 1818–1830. doi: 10.1039/c6mb00115g
- Rafiqi, M., Bernoux, M., Ellis, J. G., & Dodds, P. N. (2009). In the trenches of plant pathogen recognition: Role of NB-LRR proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(9), 1017–1024. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.04.010
- Richa, K., Tiwari, I. M., Devanna, B. N., Botella, J. R., Sharma, V., & Sharma, T. R. (2017). Novel chitinase gene LOC\_Os11g47510 from indica rice tetep provides enhanced resistance against sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* in rice. *Frontiers in Plant Science*, 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00596
- Rodríguez, J., Vélez, D., Sarria, G. A., Torres, G. A., Noreña, C., Navia, M., Romero, H. M., Varón, F., & Martínez, G. (2009). IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y PATOGENICA DE LOS MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN DEL COGOLLO DE LA PALMA DE ACEITE EN COLOMBIA\*. *Fitopatología Colombiana*, 33(2), 49–56.
- Segal, L. M., & Wilson, R. A. (2018). Reactive oxygen species metabolism and plant-fungal interactions. *Fungal*

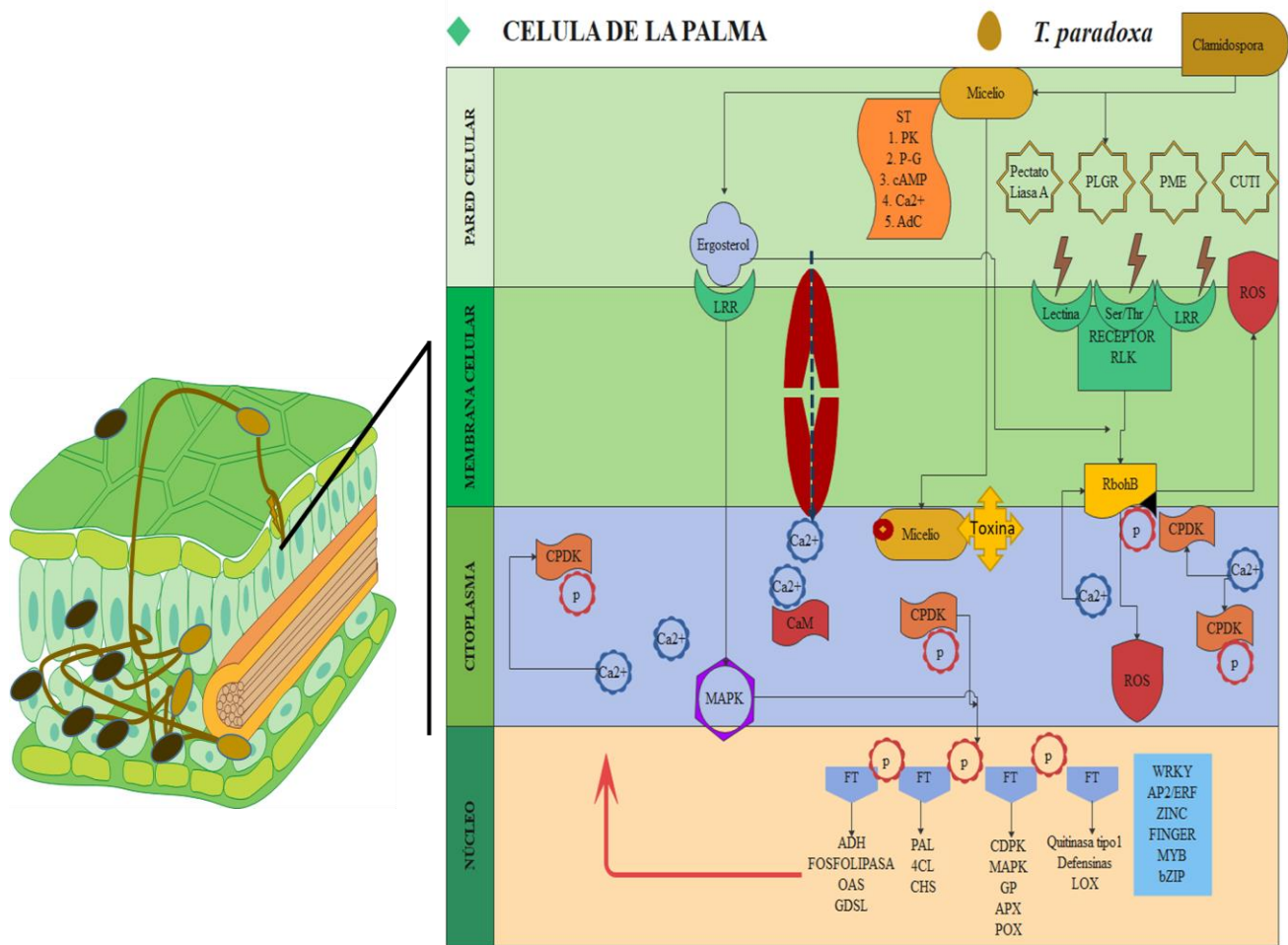
- Genetics and Biology*, 110, 1–9. doi: 10.1016/j.fgb.2017.12.003
- Sephton-Clark, P. C. S., & Voelz, K. (2018). Spore Germination of Pathogenic Filamentous Fungi. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 102, pp. 117–157). Academic Press Inc. doi: 10.1016/bs.aambs.2017.10.002
- Seyednasrollah, F., Laiho, A., & Elo, L. L. (2015). Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. *Briefings in Bioinformatics*, 16(1), 59–70. doi: 10.1093/bib/bbt086
- Shen, Y., Liu, N., Li, C., Wang, X., Xu, X., Chen, W., Xing, G., & Zheng, W. (2017). The early response during the interaction of fungal phytopathogen and host plant. In *Open Biology* (Vol. 7, Issue 5). Royal Society of London. doi: 10.1098/rsob.170057
- Sher Khan, R., Iqbal, A., Malak, R., Shehryar, K., Attia, S., Ahmed, T., Ali Khan, M., Arif, M., & Mii, M. (2019). Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. *3 Biotech*, 9(5). doi: 10.1007/s13205-019-1725-5
- Shi, H., Wang, X., Ye, T., Chen, F., Deng, J., Yang, P., Zhang, Y., & Chan, Z. (2014). The Cysteine2/Histidine2-Type Transcription Factor *ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA6* Modulates Biotic and Abiotic Stress Responses by Activating Salicylic Acid-Related Genes and *C-REPEAT-BINDING FACTOR* Genes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 165(3), 1367–1379. doi: 10.1104/pp.114.242404
- Skamnioti, P., Furlong, R. F., & Gurr, S. J. (2008). Evolutionary history of the ancient cutinase family in five filamentous Ascomycetes reveals differential gene duplications and losses and in *Magnaporthe grisea* shows evidence of sub- and neo-functionalization. *New Phytologist*, 180(3), 711–721. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02598.x
- Stotz, H. U., Thomson, J. G., & Wang, Y. (2009). Plant defensins: defense, development and application. In *Plant signaling & behavior* (Vol. 4, Issue 11, pp. 1010–1012). Taylor & Francis. doi: 10.4161/psb.4.11.9755
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011a). Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, 6(7). doi: 10.1371/journal.pone.0021800
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011b). REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLOS ONE*, 6(7), e21800. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0021800
- Takao, K., Akagi, Y., Tsuge, T., Harimoto, Y., Yamamoto, M., & Kodama, M. (2016). The global regulator LaeA controls biosynthesis of host-specific toxins, pathogenicity and development of *Alternaria alternata* pathotypes. *Journal of General Plant Pathology*, 82(3), 121–131. doi: 10.1007/s10327-016-0656-9
- Tan, Y.-C., Ang, C.-L., Wong, M.-Y., & Ho, C.-L. (2016). Oil Palm Defensin: A Thermal Stable Peptide that Restricts the Mycelial Growth of *Ganoderma boninense*. *Protein & Peptide Letters*, 23(11), 994–1002. doi: 10.2174/0929866523666161006103855
- Tang, D., Wang, G., & Zhou, J. M. (2017). Receptor kinases in plant-pathogen interactions: More than pattern recognition. *Plant Cell*, 29(4), 618–637. doi: 10.1105/TPC.16.00891
- Tarazona, S., García, F., Ferrer, A., Dopazo, J., & Conesa, A. (2012). NOIseq: a RNA-seq differential expression method robust for sequencing depth biases. *EMBNET Journal*, 17(B), 18. doi: 10.14806/ej.17.b.265
- Tello, D., Gil, J., Loaiza, C. D., Riascos, J. J., Cardozo, N., & Duitama, J. (2019). NGSEP3: accurate variant calling across species and sequencing protocols. *Bioinformatics*, 35(22), 4716–4723. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTZ275
- Tugizimana, F., Steenkamp, P. A., Piater, L. A., & Dubery, I. A. (2014). Multi-platform metabolomic analyses of ergosterol-induced dynamic changes in *Nicotiana tabacum* cells. *PLoS ONE*, 9(1), e87846. doi: 10.1371/journal.pone.0087846
- Urban, M., Bhargava, T., & Hamer, J. E. (1999). An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. In *The EMBO Journal* (Vol. 18, Issue 3).
- Visentin, I., Montis, V., Döll, K., Alabouvette, C., Tamietti, G., Karlovsky, P., & Cardinale, F. (2012). Transcription of genes in the biosynthetic pathway for fumonisin mycotoxins is epigenetically and differentially regulated in the fungal maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Eukaryotic Cell*, 11(3), 252–259. doi: 10.1128/EC.05159-11
- Wang, W., Feng, B., Zhou, J. M., & Tang, D. (2020). Plant immune signaling: Advancing on two frontiers. In *Journal of Integrative Plant Biology* (Vol. 62, Issue 1, pp. 2–24). Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1111/jipb.12898
- Wu, D., Oide, S., Zhang, N., Choi, M. Y., & Turgeon, B. G. (2012). ChLae1 and ChVell regulate T-toxin production, virulence, oxidative stress response, and development of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *PLoS Pathogens*, 8(2), e1002542. doi: 10.1371/journal.ppat.1002542
- Wu, Q., & VanEtten, H. D. (2004). Introduction of plant and fungal genes into pea (*Pisum sativum* L.) hairy roots reduces their ability to produce pisatin and affects their response to a fungal pathogen. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(7), 798–804. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.7.798
- Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., & Wang, C. (2019). The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant

- Response to Biotic and Abiotic Stresses. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10, p. 1349). Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fpls.2019.01349
- Yeoh, K. A., Othman, A., Meon, S., Abdullah, F., & Ho, C. L. (2012). Sequence analysis and gene expression of putative exo- and endo-glucanases from oil palm (*Elaeis guineensis*) during fungal infection. *Journal of Plant Physiology*, *169*(15), 1565–1570. doi: 10.1016/j.jplph.2012.07.006
- Zdyb, A., Salgado, M. G., Demchenko, K. N., Brenner, W. G., Płaszczycza, M., Stumpe, M., Herrfurth, C., Feussner, I., & Pawlowski, K. (2018). Allene oxide synthase, allene oxide cyclase and jasmonic acid levels in *Lotus japonicus* nodules. *PLoS ONE*, *13*(1), e0190884. doi: 10.1371/journal.pone.0190884
- Zhang, X., Abraham, C., Colquhoun, T. A., & Liu, C. J. (2017). A proteolytic regulator controlling chalcone synthase stability and flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *29*(5), 1157–1174. doi: 10.1105/tpc.16.00855
- Zhong, C.-L., Zhang, C., & Liu, J.-Z. (2019). Heterotrimeric G protein signaling in plant immunity. *Journal of Experimental Botany*, *70*(4), 1109–1118. doi: 10.1093/jxb/ery426

#### 4. CONSIDERACIONES FINALES

La interacción entre las plantas y sus patógenos es un proceso dinámico y complejo. Estas interacciones deben analizarse como un proceso, y las reacciones de la planta no deben ser separadas de los del patógeno (Andersen et al., 2018). La secuenciación ARN dual hecha en este estudio permitió el estudio simultáneo de transcriptomas tanto del hospedante como del patógeno, detectando transcripciones específicas de patógenos en la misma muestra, proporcionando una visión más completa de la biología de la infección por patógenos y mecanismos de defensa del hospedante. Con esta investigación se pretende proporcionar información útil para el futuro desarrollo de estrategias de control y manejo de la enfermedad. A continuación, se presenta el modelo propuesto de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio (figura 46).

Cuando *T. paradoxa* interactuó con el híbrido de la palma de aceite, desencadenó una respuesta de defensa de la palma que activó varios procesos, tanto en la palma como en el hongo, y posiblemente en el hongo activo la síntesis de ergosterol, el cual probablemente fue reconocido por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), vías de señalización de fitohormonas, vías secretoras y producción de metabolitos secundarios. Después de la inoculación, se encontraron sobreexpresadas endopolygalacturonasas, pectinesterasas pectinasas, así como las pectato liasas, que participan en la escisión de las pectinas, así como la ruptura de enlaces glicosídicos en oligo o polisacáridos, incluida la celulosa y hemicelulosa, se encontraron entre las vías activadas en *T. paradoxa*, lo que le permitió penetrar en la palma. Dado que la pectina es la componente principal de la laminilla media de los tejidos vegetales y por tanto tiene un papel fundamental bloqueando el desarrollo de hongos intercelulares, la expresión de pectinasas en *T. paradoxa* puede tener un papel importante en la patogenicidad. La presencia del hongo fue percibida por los RLKs que se encontraron expresados en la palma, tras lo cual se inició una cascada de señalización que incluyó MAPK cinasas, proteína cinasas dependientes de calcio y la producción de EROs. Después de la penetración exitosa del hongo dentro de la palma, de acuerdo a los datos del transcriptoma, el hongo expresó varios genes relacionados con metabolismo secundario, como la superfamilia de monooxigenasas del citocromo P450, las cuales son esenciales para la defensa fúngica contra sustancias antimicrobianas producidas por el hospedero, como las micotoxinas, tipo aflatoxinas, lo cual probablemente ayudó a *Thielaviopsis* en el proceso de adaptación al ambiente de la palma, ya que las monooxigenasas que contienen flavina son proteínas microsomales involucradas en el proceso del metabolismo de los xenobióticos (Mei et al., 2006; Kim et al., 2013; Chen et al., 2014).



**Figura 46.** Modelo de la respuesta de defensa del híbrido OxG. Una vez las conidias entran en contacto con las células del híbrido OxG y encuentran las condiciones ambientales adecuadas se da la germinación. Las hifas inician su crecimiento e infectan las células de la palma, para lo cual se da inicio a la producción de diferentes enzimas y metabolitos. En este modelo se evidenció la producción de enzimas como Pectato- Liasa A, Poligacturonasa (PGLR), Pectin metilesterasa (PME) y cutinasa (CUTI), implicadas en la degradación de la pared celular, y la expresión de diferentes factores de transcripción y metabolitos como el ergosterol. Este ergosterol y los productos de degradación de la pared celular, probablemente son importantes en la percepción de la palma por medio de receptores de reconocimiento de patrones de superficie celular (PRR) o proteínas con dominios de repetición ricos en leucina (LRR) para percibir patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). El aumento de los niveles de calcio citosólico (Ca<sup>2+</sup>) desencadenados por la interacción de PAMP-PRR son detectados por proteínas cinasa dependiente de calcio (CDPK) específicas, que desencadenan la activación posterior de distintos eventos inmunes. Las CDPK podrían actuar de forma sinérgica o independiente con la cascada de proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), que consta de tres cinasas escalonadas, MAPK (MPK), MAPK cinasa (MKK) y MKK cinasa (MKKK), en la regulación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las CDPK fosforilan distintos sustratos en la regulación de la señalización de la inmunidad como los factores de transcripción (FT) para la expresión de genes inmunitarios y el homólogo de oxidasa de explosión respiratoria D / F (RbohD / F) para la producción de ROS. Esta una cascada de fosforilación también regula la biosíntesis y la señalización del ácido Jasmónico (AJ). La señalización del AJ induce la acumulación de metabolitos secundarios y proteínas PR. En respuesta a estas defensas, es probable que *T. paradoxa* produzca metabolitos necesarios para su patogenicidad y sobreexpresione transportadores que funcionan como una bomba de flujo para proporcionar resistencia para evadir los metabolitos secundarios.



También se observó la expresión de diferentes genes relacionados con proteínas transportadoras del tipo MFS (Major Facilitator Superfamily), los cuales podrían jugar un papel en la exportación de metabolitos secundarios dentro del proceso de patogénesis. Por lo anterior, se sugiere que *Thielaviopsis* dirigió parte de sus esfuerzos a la degradación de compuestos tóxicos producidos por la planta como flavonoides, compuestos fenólicos y terpenoides. Además, hubo expresión de genes que codifican homogentisate dioxygenase, tyrosinase y fumarylacetoacetate hydrolase que tienen la capacidad de degradar los precursores de la fenilpropanoide, que son producidos por la planta hospedante como mecanismos de defensa. Estas enzimas pudieron tener un papel importante en la patogénesis en el material 485 que, al parecer, no empezó la síntesis de ácido jasmónico en una etapa temprana. A diferencia, en el material 517 se observó la expresión diferencial de muchos genes relacionados con las respuestas de defensa relacionadas con los procesos de infección. Otra de las respuestas de defensa de la palma fue la síntesis y secreción de proteínas PR. La mayoría de las proteínas PR tienen actividades antimicrobianas y toxicidad hacia las paredes celulares de patógenos. Las proteínas PR también pueden participar en la señalización de las defensas de las plantas. La infección por *T. paradoxa* activó la vía JA / ET e indujo genes relacionados con la biosíntesis de fitoalexinas. Las fitoalexinas se sabe, están involucradas en la reducción de la germinación de esporas y la inhibición de la penetración de hongos (Pandey et al., 2016). Las fenilalanina-amoniacolasas son enzimas clave del metabolismo de los fenilpropanoides, importantes en el desarrollo de las plantas y sirven como marcadores de resistencia en plantas (Zhang et al., 2017). Así, las variaciones de los genotipos del híbrido en relación con su resistencia a la infección, el grado de colonización por el hongo y la gravedad de la enfermedad podrían estar relacionados con esta estrategia de defensa.

## 5. CONCLUSIONES

### 5.1 COROLARIO

El cultivo de la palma de aceite es afectado por diferentes enfermedades, algunas devastadoras (Woittiez et al., 2017). En Colombia, las pérdidas asociadas a pudrición de cogollo, en la última década, se han situado cerca de los US\$ 2.000 millones de acuerdo a lo reportado por Cenipalma en 2019 (<https://www.cenipalma.org/actualidad>) (Chaves et al., 2018). Dentro de la palma africana (*Elaeis guineensis*) que es la especie que se siembra en todo el mundo, no existen cultivares comerciales probados con resistencia a la PC. Sin embargo, el híbrido interespecífico OxG entre la palma americana (*E. oleifera*) y la palma africana (*E. guineensis*) presenta resistencia a diferentes enfermedades. Existen diferentes tipos de híbridos interespecíficos OxG, dependiendo del origen (sitio de colección) de las madres oleíferas, y del origen del polen (pisifera africana). Sin embargo, para hacer del híbrido una solución viable a las enfermedades, es necesario establecer las características agronómicas, de cosecha, y mecanismos de defensa a enfermedades. Sobre el último a la fecha se carece de estudios sobre la caracterización molecular de la respuesta de defensa del híbrido OxG ante un patógeno endémico en Colombia y es por esta razón que se propuso realizar el presente proyecto en el cual se buscaba estudiar el transcriptoma durante interacción entre un hongo fitopatógeno y el híbrido, con el objetivo de contribuir al conocimiento en esta área. Para ello, se inició por seleccionar un grupo de cruces interespecíficos dirigidos de cultivares con alto potencial de desarrollo. Como no se había establecido un mecanismo de inoculación del patógeno fue necesario establecer el más eficiente y concentración de inóculo a usar, concluyéndose que el mejor mecanismo de inoculación fue infiltración local. Posterior a esto se evaluó la respuesta de los híbridos a la inoculación de las conidias de *T. paradoxa* con el objetivo de identificar los fenotipos más contrastantes y adicionalmente esto permitió definir los tiempos de infección a los cuales se tomarían las muestras a incluir en la etapa de secuenciación. Por cada material se armaron los pooles de muestras para secuenciación y esta información permitió establecer que la respuesta de defensa de la palma a *T. paradoxa* está mediado por el ácido jasmónico. Adicionalmente, se realizó el análisis del transcriptoma de *T. paradoxa*, donde se anotaron genes relacionados con adhesión, reconocimiento, penetración, señalización y producción de toxinas.

## 5.2 CONCLUSIONES

La interacción entre plantas y hongos en interacciones modelo ha generado el conocimiento que hoy en día se tiene de la respuesta de defensa de la planta, que es una compleja red que incluye inmunidad innata, múltiples vías de señalización, productos metabólicos secundarios e interacciones cruzadas que determinan el resultado de la interacción. Sin embargo, la información sobre la respuesta en el híbrido de palma de aceite a los patógenos fúngicos oportunistas está limitada a *Ganoderma*, patógeno que no es endémico en Colombia.

1. El método de inoculación con mejores resultados fue infiltración local con una suspensión  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , por generar un área de lesión muy reducida y lo más importante permitir un proceso efectivo de infección que se evidenció con la reproducción de todos los síntomas observados en campo.
2. Los síntomas externos fueron evidentes a las 72 hpi, con la presencia de un pequeño halo amarillo en el sitio de la inoculación, el cual se fue extendiendo a lo largo de la flecha, con aparición de tejido necrótico y colapso de la flecha a las 240 hpi. Sin embargo, al interior del tejido se observó afectación a las 24 hpi.
3. La caracterización del proceso de infección permitió establecer los tiempos a los que se tomarían las muestras para constituir el pool: germinación de conidias (12 horas), formación de hifas (24 horas), crecimiento de las hifas e interconexión (48 horas), invasión del tejido (72 horas) y formación de conidias (96 horas).
4. La estrategia de ensamblaje de novo usando Trinity y posteriormente TGICL permitió obtener 127.254 componentes que fueron anotados en diferentes bases de datos.
5. Estos componentes fueron anotados en la base de datos de KEGG, de donde se obtuvo las rutas metabólicas en las que se encuentran las enzimas anotadas. En total se logró asignar 1220 códigos de enzima en 11 categorías, siendo las principales categorías con mayor número de enzimas las correspondientes a metabolismo de nucleótidos, metabolismo de la energía, metabolismo de lípidos, carbohidratos y aminoácidos. Una ruta de interés fue la de los octadecanoides (síntesis del ácido alfa linoleico), la cual fue analizada y se encontró que el 80% de las enzimas que conforman esta ruta fueron anotadas para el transcriptoma de palma, esta ruta es importante ya que es la que produce el ácido jasmónico, enzima que participa en

diferentes procesos, entre ellos activar el sistema de degradación de proteínas, que funciona como activador de los genes de defensa.

6. Al realizar un análisis de enriquecimiento, los términos relacionados por procesos biológicos del GO que únicamente fueron anotados en el material 517, correspondieron a respuesta al estímulo del ácido abscísico (GO:0009737), proceso biosintético del ácido jasmónico (GO:0009695), respuesta de defensa a hongos (GO:0050832), respuesta a estímulos bióticos (GO:0009607) y vía de señalización de la proteína tirosina cinasa del receptor transmembrana (GO:0007169).
7. Debido a que *T. paradoxa* es un hongo hemibiótrofo, las vías de señalización dependientes de AJ y ET funcionan presumiblemente en respuesta de defensa y regulan la expresión de genes relacionados con la defensa, genes involucrados en el estallido oxidativo, síntesis de compuestos antimicrobianos, regulación de factores de transcripción y muerte celular programada localizada en palma en respuesta a la infección por hongos.
8. Al realizar un análisis de SNPs, se encontró que la mayoría de los SNPs detectados se localizaron en regiones no codificantes, lo cual puede tener consecuencias en el proceso de traducción, sobre todo en procesos como el splicing, la unión de factores de transcripción o modificar la secuencia de ARN no codificante (Astorkia et al., 2019, 2020). La presencia de variabilidad en los genes que probablemente coordinan los primeros pasos de la señalización y respuesta a estímulos, pueden ser considerados como polimorfismos candidatos para estudios de validación como marcadores moleculares.
9. Durante el análisis del transcriptoma de *T. paradoxa* fueron identificados 23497 contigs en total, correspondientes a la expresión en planta o en medio sólido *in vitro*. Durante las dos interacciones con palma fueron inducidos 10847 genes (46,16 %) simultáneamente. Se indujeron un total de 12523 genes (53.29%) solo durante la interacción con el material 485 y 12720 genes (54,13%) se indujeron durante la interacción con el material 517, lo que evidencia que durante la colonización de la palma se necesitó una reprogramación transcripcional de *T. paradoxa*.
10. Se identificaron transportadores tipo ABC y MSF en *T. paradoxa*, que de acuerdo a la literatura actúan como bombas de eflujo de metabolitos secundarios como fitoalexinas. Es importante continuar estudios en estos dos transportadores para comprobar si su función es la evasión de la respuesta de defensa de la palma aceitera.

El análisis de la expresión génica en este estudio proporcionó una mejor comprensión del mecanismo de defensa del híbrido de palma de aceite OxG contra *T. paradoxa* y aportó nuevo conocimiento de la patogénesis y la dinámica de la infección de este patógeno. Probablemente el ergosterol induce las respuestas de defensa del híbrido de palma de aceite desencadenando la biosíntesis de ácido jasmónico, la señalización y la respuesta de defensa mediada por JA. Al analizar los perfiles de expresión de los dos materiales del híbrido se puede inferir que los procesos de percepción y transducción de señales, factores de transcripción y producción de proteínas relacionadas con patogénesis son claves para controlar el establecimiento de la enfermedad.

Los resultados de este estudio mejoran nuestra comprensión sobre las interacciones moleculares de la palma de aceite y *T. paradoxa*, lo cual es muy importante para poder establecer estrategias de control de la pudrición de la flecha.

### **5.3 RECOMENDACIONES**

Debido a que son muy diversos los campos de aplicación del RNA-seq, se deben tener unas consideraciones básicas que deben tomarse en cuenta durante la planeación de experimentos de RNA-seq para optimizar la robustez y fiabilidad de los resultados que se derivan a partir de ellos. Algunos estudios recomiendan incluir al menos dos réplicas biológicas de cada condición, aunque otros estudios sugieren que la robustez estadística de los resultados se alcanza con al menos seis réplicas biológicas. Por su parte, las réplicas técnicas de secuenciación no se requieren pues la variabilidad asociada a las plataformas de secuenciación es mínima.

Dado que el transcriptoma es dinámico y cambia de una condición a otra y debido a que la calidad del ensamblaje depende de la cantidad y calidad de lecturas obtenidas, se recomienda estimar la profundidad de secuenciación en cada experimento. Se debe obtener al menos 200 millones de lecturas mapeables con el objetivo de detectar transcritos poco abundantes o eventos raros de empalme alternativo.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Andersen, E. J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., & Nepal, M. P. (2018). Disease resistance mechanisms in plants. In *Genes* (Vol. 9, Issue 7, p. 339). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. doi: 10.3390/genes9070339
- Astorkia, M., Hernandez, M., Bocs, S., de Armentia, E. L., Herran, A., Ponce, K., León, O., Morales, S., Quezada, N., Orellana, F., Wendra, F., Sembiring, Z., Asmono, D., & Ritter, E. (2019). Association mapping between candidate gene SNP and production and oil quality traits in interspecific oil palm hybrids. *Plants*, 8(10). doi: 10.3390/plants8100377
- Astorkia, M., Hernández, M., Bocs, S., Ponce, K., León, O., Morales, S., Quezada, N., Orellana, F., Wendra, F., Sembiring, Z., Asmono, D., & Ritter, E. (2020). Detection of significant SNP associated with production and oil quality traits in interspecific oil palm hybrids using RARSeq. *Plant Science*, 291. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.110366
- Chen, L.-H., Tsai, H.-C., Yu, P.-L., & Chung, K.-R. (2017). A Major Facilitator Superfamily Transporter-Mediated Resistance to Oxidative Stress and Fungicides Requires Yap1, Skn7, and MAP Kinases in the Citrus Fungal Pathogen *Alternaria alternata*. *PLOS ONE*, 12(1), e0169103. doi: 10.1371/journal.pone.0169103
- Chen, W., Lee, M.-K., Jefcoate, C., Kim, S.-C., Chen, F., & Yu, J.-H. (2014). Fungal Cytochrome P450 Monooxygenases: Their Distribution, Structure, Functions, Family Expansion, and Evolutionary Origin. *Genome Biology and Evolution*, 6(7), 1620–1634. doi: 10.1093/gbe/evu132
- Kim, Y., Park, S. Y., Kim, D., Choi, J., Lee, Y. H., Lee, J. H., & Choi, W. (2013). Genome-scale analysis of ABC transporter genes and characterization of the ABCC type transporter genes in *Magnaporthe oryzae*. *Genomics*, 101(6), 354–361. doi: 10.1016/j.ygeno.2013.04.003
- Mei, C., Qi, M., Sheng, G., & Yang, Y. (2006). Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, PR gene expression, and host resistance to fungal infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), 1127–1137. doi: 10.1094/MPMI-19-1127
- Pandey, D., Rajendran, S. R. C. K., Gaur, M., Sajeesh, P. K., & Kumar, A. (2016). Plant Defense Signaling and Responses Against Necrotrophic Fungal Pathogens. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(4), 1159–1174. doi: 10.1007/s00344-016-9600-7