



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**ANÁLISIS GENÓMICO Y
TRANSCRIPTÓMICO DE LA INTERACCIÓN
Musa - Pseudocercospora fijiensis COMO
HERRAMIENTA EN LA IDENTIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE GENES FÚNGICOS
DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD**

Javier Mauricio Torres Bonilla

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2024

**ANÁLISIS GENÓMICO Y TRANSCRIPTÓMICO DE LA
INTERACCIÓN *Musa-Mycosphaerella fijiensis* COMO
HERRAMIENTA EN LA IDENTIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE GENES FÚNGICOS DE
VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD**

Javier Mauricio Torres Bonilla

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Biotecnología

Director:

Rafael Eduardo Arango Isaza MD., PhD.

Codirector:

Juan Gonzalo Morales Osorio, Ing., M.Sc., PhD.

Línea de Investigación:

Patosistema *Mycosphaerella fijiensis*

Grupo de Investigación:

Biotecnología Vegetal Unalmed-CIB

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2024

Dedicatoria

A mi familia, a mi esposa Jessica, a mi hija Valentina y a mi madre Luz Mery; gracias por estar a mi lado, ser mi apoyo incondicional y razón diaria de lucha.

Agradecimientos

Al doctor Rafael Eduardo Arango Isaza, por su colaboración y dirección en el desarrollo de este trabajo de investigación; por su orientación a lo largo de estos doce años en todo el proceso de mi formación como investigador.

Al grupo de Biotecnología Vegetal Unalmed-CIB por permitirme desarrollar esta investigación en sus laboratorios, un reconocimiento especial a todos mis compañeros por permitirme aprender no solo como profesional sino como persona.

A la Asociación de Bananeros de Colombia AUGURA, a su Centro de Investigaciones en Banano Cenibanano, a John Jairo Mira, a Jaiver Danilo Sánchez, a Marcela Cadavid, a Helena Bornacelly y a Vicente Rey; por toda su colaboración en términos de apoyo técnico, trabajo de campo y financiación de este trabajo de investigación.

Al Departamento de Ciencia Tecnología e Innovación (Colciencias) por la financiación para realizar mis estudios de doctorado, mediante recursos de la Convocatoria Nacional para estudios de Doctorado en Colombia año 2012 y para el desarrollo de las actividades de investigación mediante el proyecto titulado “Identificación y análisis de genes candidatos relacionados con la patogenicidad en *Mycosphaerella fijiensis*”, financiado bajo la Convocatoria Nacional para la Conformación de un Banco de Proyectos Elegibles de CTeI año 2012, bajo el contrato RC. No. 0031– 2013.

Resumen

La Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, sinónimo de *Pseudocercóspora fijiensis* es la enfermedad más importante en el cultivo del banano en el mundo. La enfermedad afecta la capacidad fotosintética de planta y posteriormente el tamaño y calidad de la fruta, generando grandes pérdidas económicas. Son pocos los estudios genéticos reportados que permiten entender cómo el hongo enferma a la planta y cómo evade las defensas de esta; para ello es necesario identificar en el hongo genes candidatos asociados con la patogenicidad y la virulencia. En este trabajo se empleó un análisis bioinformático y de microarreglos para identificar en el hongo la presencia de proteínas secretadas ricas en cisteína (SSPs) con expresión diferencial durante la interacción incompatible planta - *P. fijiensis*. Adicionalmente, se realizó una búsqueda sistemática de genes mediante el ensamble y anotación de 27 genomas de *P. fijiensis*, *P. musae* y *P. eumusae*. Se encontraron 12 genes codificantes para SSPs con expresión diferencial, además, se encontraron 5 genes asociados con patogenicidad, 7 genes asociados con el desarrollo del patógeno y 7 genes asociados con la biosíntesis de la melanina. Una vez identificados, se procedió con la evaluación funcional de dos genes candidatos mediante nocaouts para los genes SD y 85220, además de permitir la evaluación de un método de disrupción génica mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, con lo cual se estableció un protocolo efectivo de evaluación génica, nuestros resultados posibilitan la incursión hacia futuros trabajos de análisis poblacional o de genes con importancia fisiológica en *P. fijiensis*.

Palabras clave: SSPs, nocaouts, virulencia, complejo sigatoka

Abstract:

Genomic and transcriptomic analysis of the interaction musa - pseudocercospora fijiensis as tool in the identification and characterization of fungal genes of virulence and pathogenicity

Black Sigatoka caused by the fungus *Mycosphaerella fijiensis* (anamorph *Pseudocercospora fijiensis*), is the most important disease in banana cultivation worldwide. The disease affects the plant's photosynthetic capacity and subsequently the size and quality of the fruit, leading to significant economic losses. There are few reported genetic studies that help understand how the fungus infects the plant and evades its defenses; therefore, it is necessary to identify candidate genes associated with pathogenicity and virulence in the fungus. In this study, a bioinformatic and microarray analysis was used to identify secreted cysteine-rich proteins (SSPs) with differential expression during the incompatible interaction between the plant and *P. fijiensis*. Additionally, a systematic search for genes was conducted by assembling and annotating 27 genomes of *P. fijiensis*, *P. musae*, and *P. eumusae*. Twelve genes encoding for SSPs with differential expression were found, as well as five genes associated with pathogenicity, seven genes associated with the pathogen's development, and seven genes associated with melanin biosynthesis. Once identified, two candidate genes were functionally evaluated through knockout experiments for the SD and 85220 genes, in addition to assessing a gene disruption method mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. This established an effective protocol for genetic evaluation, and our results enable future population analysis or studies of genes with physiological importance in *P. fijiensis*.

Keywords: SSPs, nocaouts, virulence, Sigatoka complex

Contenido

	Pág.
1. Capítulo 1: La Sigatoka negra del banano: Revisión de literatura.....	3
1.1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.2 GENERALIDADES DE LA PLANTA DE BANANO (<i>MUSA ACUMINATA</i>).....	4
1.3 PRODUCCIÓN DE BANANO	6
1.4 Agentes fitopatógenos de los cultivos de banano.....	7
1.5 SIGATOKA NEGRA.....	8
1.6 EPIDEMIOLOGÍA DE <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	10
1.7 Hospederos naturales de <i>P. fijiensis</i>	11
1.8 Distribución geográfica y dispersión.....	11
1.9 INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO	13
1.10 Proteínas relacionadas con patogenicidad y virulencia	13
1.11 INTERACCIÓN BANANO- <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	15
1.12 Resistencia a fungicidas por parte de <i>P. fijiensis</i>	16
Bibliografía	17
2. Capítulo 2: Análisis comparativo de genomas fúngicos del complejo sigatoka	25
2.1 INTRODUCCIÓN.....	25
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.2.1 Extracción de ADN para la secuenciación genómica de los aislamientos	27
2.2.2 Ensamble genómico.....	29
2.2.3 Análisis de repeticiones y predicción de genes.....	30
2.2.4 Análisis filogenético.....	30
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
2.3.1 Selección de algoritmo de ensamble	31
2.3.2 Ensamble de novo de genomas de aislamiento del complejo sigatoka	33
2.3.3 Comparación entre el tamaño de los genomas ensamblados y la presencia de secuencias repetidas.....	35
2.3.4 Análisis filogenético de los aislamientos del complejo sigatoka	36
2.3.5 Anotación y comparación de SSPs.....	37
2.3.6 Análisis de complejidad de los genomas ensamblados	38
2.3.7 Comparación de SSPs compartidas entre aislamientos.....	39
2.4 Conclusiones	40

3. Capítulo 3: Análisis de los patrones de expresión de las proteínas secretadas relacionadas con la patogénesis durante una interacción incompatible entre *Musa* y *Pseudocercospora fijiensis*.....47

3.1	INTRODUCCIÓN.....	47
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
3.2.1	Material vegetal.....	49
3.2.2	Material fúngico e inoculación de plantas de banano.....	49
3.2.3	Extracción de ARN.....	49
3.2.4	Diseño del microarreglo.....	50
3.2.5	Análisis del microarreglo	50
3.3	RESULTADOS	51
3.3.1	Genes expresados durante la interacción incompatible <i>Musa</i> - <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	51
3.3.2	Anotación funcional y clasificación	54
3.3.3	Identificación de genes asociados con el desarrollo de <i>P. fijiensis</i>	56
3.4	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	57
3.5	Conclusiones	58
	Bibliografía	58

4. Capítulo 4: Evaluación funcional de genes codificantes para proteínas secretadas relacionadas con la patogénesis en *Pseudocercospora fijiensis*63

4.1	INTRODUCCIÓN.....	63
4.2	Materiales y métodos.....	64
4.2.1	Construcción de vectores de transformación para <i>M. fijiensis</i>	64
4.2.1.1	Clonación de secuencias flanqueantes.....	67
4.2.2	Desarrollo de nocaouts de <i>P. fijiensis</i> para genes relacionados con la patogenicidad	71
4.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
4.3.1	Confirmación de colonias transformadas	74
4.3.2	Ensayo de nocaouts de <i>P. fijiensis</i> para los genes 85220 y Scytalone deshidratasa	75
4.3.3	Confirmación por PCR de los nocaouts de <i>P. fijiensis</i>	77
4.1	Conclusiones	79
	Bibliografía	79

5. Conclusiones y recomendaciones82

5.1	Conclusiones	82
5.2	Recomendaciones	83

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 1-1: Anatomía de una planta de banano	5
Figura 1-2: Producción global de banano por continente en el 1994-2021.....	6
Figura 1-3: Ciclo biológico de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	9
Figura 1-4: Estadíos de <i>P. fijiensis</i>	10
Figura 1-5: Mapa de distribución de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	12
Figura 2-1: Distribución geográfica de los aislamientos del complejo sigatoka	28
Figura 2-2: Estadísticas generales de ensamble de genomas para la selección del mejor software.....	32
Figura 2-3: Comparación de los tamaños de los genomas de los aislamientos del complejo sigatoka secuenciados con respecto a la cantidad de regiones altamente repetitivas.	35
Figura 2-4: Árbol filogenético construido por Máxima Verosimilitud (ML) con 9 secuencias nucleares de aislados del complejo sigatoka a partir de los resultados de MEGA7 con 1.000 bootstraps.....	36
Figura 2-5: Resultados obtenidos de la anotación génica de los genomas del complejo sigatoka (panel izquierdo), comparado con la cantidad de proteínas de tipo SSP (Panel derecho)	38
Figura 2-6: Resultado de los análisis de completación de los genomas ensamblados mediante BUSCO.....	39
Figura 3-1: Análisis de genes diferencialmente expresados de primer nivel mediante Blas2go.	52
Figura 3-2: A. Análisis de componentes principales de los datos del microarreglo. Componentes principales (PCs) 1 y 2 para 32.1 y 24.7 % de la varianza, respectivamente. Rojo, <i>Pseudocercospora fijiensis</i> 0 HPI; Amarillo, <i>Pseudocercospora fijiensis</i> 24 HPI; Verde, <i>Pseudocercospora fijiensis</i> 72 HPI; Azul, <i>Pseudocercospora fijiensis</i> 144 HPI. B. diagrama de Venn para el análisis de los genes diferencialmente expresados en los 4 tiempos post infección, en la que se puede observar la cantidad de genes expresados en varios tiempos simultáneamente. C. Heatmap de los genes diferencialmente expresados en los 4 tiempos posinfeccion.....	53
Figura 3-3: Resultados cuantitativos del análisis por BLAST2GO de los genes diferencialmente expresados identificados mediante la técnica de microarreglos en la interacción <i>Musa acuminata</i> – <i>Pseudocercospora fijiensis</i> . A. Blast; B. Interproscan.	54

Figura 3-4: Distribución de los resultados cuantitativos por grupos del análisis por INTERPROSCAN en el programa BLAST2GO de los genes diferencialmente expresados identificados mediante la técnica de microarreglos en la interacción <i>Musa acuminata</i> – <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	55
Figura 3-5: Perfil de expresión del gen CYP51A de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> durante la infección de plantas de <i>Musa acuminata</i> var. Calcutta 4 a diferentes tiempos de infección	56
Figura 4-1: Estructura general del casete de transferencia para el desarrollo de nocaúts de " <i>P. fijiensis</i>	65
Figura 4-2: Diagrama esquemático del vector pDONR 221 GFP-HYG	66
Figura 4-3: Amplificación por PCR del casete contenedor del gene de resistencia a higromicina y de expresión de GFP para su uso en el sistema de clonación MultiSite Gateway® Pro Plus.....	67
Figura 4-4: A. esquema de los vectores de clonación de kit MultiSite Gateway® Pro Plus clonados en <i>E. coli</i> ; B. resultado de la transformación bacteriana de <i>E. coli</i> con los vectores de clonación para el kit MultiSite Gateway® Pro Plus.	68
Figura 4-5: Resultados de la clonación del casete GFP-HYG previamente amplificado en el vector pDONR 221 P4-P3.....	70
Figura 4-6: A. Primers diseñado para la confirmación del casete GFP-HYG en el vector pDONR 221 P4-P3. B. Diagrama de ubicación de los primers de confirmación del casete GFP-HYG	70
Figura 4-7: Colonias bacterianas transformadas con los vectores de transformación para <i>P. fijiensis</i>	72
Figura 4-8: Extracción de ADN plasmídico de bacterias transformadas.....	72
Figura 4-9: Proceso de generación de nocaúts de <i>P. fijiensis</i> . A. Inoculo de <i>A. tumefaciens</i> ; B. Suspensión miceliar; C. Co-cultivo; D. Regeneración	74
Figura 4-10: Observación en gel de agarosa al 1% del ADN plasmídico de las colonias de <i>E. coli</i> transformadas con el vector pDONR 221 HYG-GFP PRO	75
Figura 4-11: Confirmación por enzimas de restricción (NotI y AluI) de ADN plasmídico.	75
Figura 4-12: Resultados de la transformación de <i>P. fijiensis</i> para la obtención de nocaúts para los genes SD y 85220.	76
Figura 4-13: Observaciones en microscopio de fluorescencia de los eventos de transformación obtenidos en la generación de nocaúts de <i>P. fijiensis</i> para los genes SD y 85220.	76
Figura 4-14: Resultados obtenidos en la confirmación por PCR de la inserción correcta y generación de nocaúts de <i>P. fijiensis</i> para los genes SD y 85220.....	77
Figura 4-15: Resumen de los resultados obtenidos en la confirmación por PCR para los genes SD y 85220.....	78

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 1-1: Patógenos e insectos plaga más frecuentes en el cultivo de banano.....	7
Tabla 2-1: Listado de los aislamientos fúngicos del complejo sigatoka secuenciados.	28
Tabla 2-2: Estadísticas finales de los ensambles.....	34
Tabla 3-1: Códigos de secuencias de SSPs de <i>P. fijiensis</i> que se encontraron diferencialmente expresados en el microarreglo.....	52
Tabla 3-2: Genes asociados con el desarrollo del <i>Pseudocercospora fijiensis</i> identificados mediante microarreglos con expresión diferencial.....	56
Tabla 4-1: Primers diseñados para el reemplazo de los extremos attL1 y attL2 por los extremos attL4 y attL3.....	66
Tabla 4-2: Primers diseñados para la clonación de las regiones flanqueantes de los genes codificantes de la Scytalon deshidratasa y la SSP 85220.	69
Tabla 4-3: Vectores generados que han sido empleados en los ensayos de generación de nocaouts de <i>P. fijiensis</i>	71

Introducción

La industria bananera representa el tercer sector de exportación agrícola para el país después del café y las flores (DANE 2019). La Sigatoka negra, causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*, es considerada la enfermedad foliar más destructiva que afecta los cultivos de banano y plátano en todo el mundo. Esta patología se caracteriza por la inducción de necrosis foliar en las hojas de las plantas y maduración temprana de los frutos lo que impide su comercialización (Churchill, 2011; Campo-Arana *et al.*, 2020). El uso de fungicidas químicos es la principal medida de control de la Sigatoka negra, lo que representa aproximadamente 20% a 30% de los costos de producción (Churchill, 2011). En los últimos años, varias moléculas como el benomil y las estrobilurinas se han retirado de los planes de fumigación porque el hongo ha generado cepas resistentes (Sierotzki *et al.* 2001; Fraaije *et al.*, 2007), y Colombia no es ajena a esta situación. Aunque existen estudios relacionados con la respuesta del hospedero a la infección por el microorganismo, el conocimiento sobre los determinantes de patogenicidad del hongo son escasos. Debido a lo anterior, es importante realizar estudios moleculares que profundicen el entendimiento de las interacciones planta-patógeno, lo cual permitirá comprender los eventos que tienen lugar durante los procesos de infección.

El estudio de genes asociados con patogenicidad en hongos fitopatógenos es de suma importancia debido a su impacto en la agricultura y la seguridad alimentaria. Estos hongos son responsables de causar diversas enfermedades en cultivos, lo que resulta en pérdidas significativas de rendimiento y calidad de los productos agrícolas. Comprender los mecanismos moleculares y genéticos que permiten a los hongos fitopatógenos infectar y colonizar las plantas es esencial para desarrollar estrategias efectivas de control y mitigación de enfermedades. El estudio de genes asociados con patogenicidad proporciona información clave para identificar dianas para el control de enfermedades, al conocer los genes que son críticos para la virulencia del hongo, se pueden diseñar métodos específicos para inhibir su función, ya sea a través de fungicidas dirigidos o mediante la manipulación genética de las plantas para obtener resistencia. Además, la

identificación de genes específicos de patogenicidad puede ser utilizada para mejorar la resistencia de los cultivos a las enfermedades, a través de técnicas de ingeniería genética o mejora convencional. Asimismo, el estudio de estos genes permite descubrir los mecanismos moleculares que regulan la infección y la respuesta de defensa de las plantas, lo que puede conducir a nuevas estrategias de control basadas en la manipulación de estas interacciones. También, al identificar genes específicos de patogenicidad, es posible desarrollar herramientas moleculares para la detección rápida y precisa de hongos fitopatógenos en los cultivos, lo que permite una intervención oportuna para evitar la propagación de las enfermedades. Finalmente, la comprensión de los mecanismos de patogenicidad puede llevar a prácticas agrícolas más sostenibles y reducir la dependencia de pesticidas químicos, lo que beneficia tanto al medio ambiente como a los agricultores. En resumen, el estudio de genes asociados con patogenicidad en hongos fitopatógenos es esencial para avanzar en el manejo y control de enfermedades en la agricultura, promoviendo la seguridad alimentaria y la sostenibilidad de los sistemas agrícolas.

Mediante el presente trabajo se amplió la información genética disponible para el hongo *P. fijiensis* enfocada en la búsqueda de genes codificantes a proteínas clave en la patogenicidad y virulencia, por lo que hipotetizamos estos genes serían la base de información genética necesaria para el desarrollo de estrategias alternativas al tratamiento con fungicidas, favoreciendo un aumento en productividad y reducción de costos del cultivo. Por esta razón los objetivos para esta investigación fueron: 1. Identificar secuencias con características de genes determinantes de patogenicidad y virulencia en el genoma de *Mycosphaerella fijiensis*. 2. Determinar los niveles de expresión de los genes polimórficos seleccionados durante la infección de plantas de banano. 3. Secuenciar y analizar los genes candidatos obtenidos a partir de aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis*, que representen la mayor variabilidad posible de la población. 4. Seleccionar los genes que codifican proteínas putativas que muestren el mayor polimorfismo no sinónimo e identificar dominios que puedan estar relacionados con virulencia y patogenicidad. 5. Evaluar la funcionalidad de los genes identificados mediante la generación de nocaouts de *M. fijiensis*.

1. Capítulo 1: La Sigatoka negra del banano: Revisión de literatura

1.1 INTRODUCCIÓN

Los cultivos de plátano y banano constituyen un importante renglón del sector agrario en numerosos países ubicados en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo. Además de su importancia en la alimentación, son importantes productos de exportación para países como Colombia. El banano (*Musa acuminata*) es el segundo producto alimenticio con mayor importancia económica en la balanza comercial de Colombia después del café; la mayor parte de la producción es para exportación y una pequeña cantidad para consumo interno. La producción de banano a nivel mundial supera las 125 millones toneladas anuales (FAOSTAT 2021). La producción nacional se encuentra concentrada en las regiones de Urabá y Magdalena con un total de 53.318 hectáreas sembradas (AUGURA, Coyuntura Bananera, 2023 (<https://augura.com.co/wp-content/uploads/2023/04/Coyuntura-Bananera-2022-2.pdf>, consultado el 15 de junio de 2023). Durante el año 2022, Colombia exportó 108 millones de cajas de banano por un valor de 892 millones de US dólares. Para este mismo año, las exportaciones colombianas de plátano alcanzaron los 4,28 millones de cajas por un valor de 52,72 millones de US dólares.

El cultivo de banano se ve afectado por varias enfermedades que disminuyen la producción, y limitan su sostenibilidad. La Sigatoka negra, ocasionada por el hongo ascomiceto *Pseudocercospora fijiensis* (sinónimo: *Mycosphaerella fijiensis*), se considera la principal enfermedad de los cultivos de plátano y banano en todo el mundo, generando pérdidas de hasta un 100 %, si no se toman medidas de control oportunas y efectivas (Jones y Daniells, 2018).

P. fijiensis destruye rápidamente el tejido foliar de las plantas, reduciendo su capacidad fotosintética y afectando la producción debido a la maduración temprana y la baja calidad de la fruta obtenida, la cual no alcanza la talla ni la forma ideal para su comercialización (Stover y Simonds, 1987; Churchill, 2011). De manera tradicional, el control de la Sigatoka negra se realiza con la aspersión de fungicidas protectantes y/o sistémicos, los cuales pueden ocasionar un impacto negativo sobre el ambiente y la salud y un incremento significativo en los costos de producción. Adicionalmente, en las poblaciones del patógeno se genera resistencia a muchos de los compuestos activos empleados, por lo que su uso ya no es efectivo para su control (Orozco, 1998; Marín et al., 2003). La resistencia del hongo hacia algunos fungicidas hace necesario el incremento en las dosis y frecuencias de aplicación, que en algunos casos se encuentra entre las 35 y 50 aplicaciones por cada ciclo de cultivo (Chica et al., 2004), aumentando el problema fitosanitario. Además, recientemente en la Unión Europea, la cual es principal destino de las exportaciones de la fruta, se han establecido límites de residuos para numerosos fungicidas, por lo que no es posible usarlos para el control de *P. fijiensis*, quedando muy pocas herramientas para el manejo de la Sigatoka negra como lo son el control biológico, el uso de inductores de resistencia y el control cultural (AUGURA, Informe Gremial, 2020. <http://augura.com.co/wp-content/uploads/2021/06/INFORME-GREMIAL-2020-1.pdf>, consultada el 15 de septiembre de 2021; Campo-Arana et al., 2020).

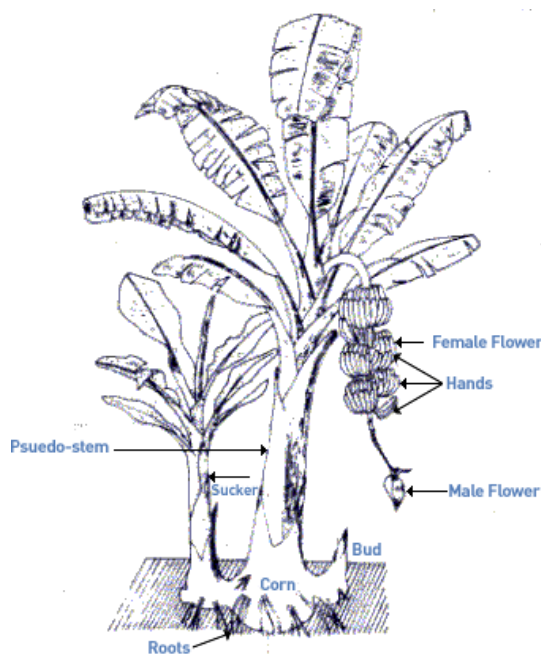
Por lo tanto, se requiere en forma urgente y prioritaria, el conocimiento necesario sobre las bases de la interacción planta-hongo, para el mejoramiento o el diseño de nuevas estrategias de manejo de la Sigatoka negra en los cultivos de banano y plátano, para el logro de los objetivos de sostenibilidad.

1.2 GENERALIDADES DE LA PLANTA DE BANANO (*Musa acuminata*)

Los bananos y plátanos pertenecen al orden Zingiberales, familia Musáceae, género *Musa*. Son plantas monocotiledóneas, herbáceas, poliploides y perennes, ampliamente adaptadas a regiones tropicales y subtropicales; miden hasta los 3.0 metros de altura (Tomlinson, P. B. 1969; Soto, M. 2014), su centro de origen y diversidad se encuentra ubicado en el sudeste asiático y en la región oeste del Pacífico. Aunque se desconoce con certeza el proceso de domesticación, los reportes más antiguos de cultivo datan de más

de 2500 años en la India (Robinson & Saúco, 2010; Daniells *et al.*, 2001; Simmonds, N.W. 1962). En la planta se distinguen tres partes importantes: el cormo o rizoma con hijuelos y un sistema radical; el pseudotallo con el sistema foliar formado por hojas emergentes en forma de cilindro enrollado y el racimo o inflorescencia, formado a partir del tallo verdadero de la planta (Figura 1-1) (Simmonds y Shepherd, 1955; Jones y Daniells, 2019). Dos especies diploides, *M. acuminata* Colla (genoma A) y *M. balbisiana* Colla (genoma B) (Perrier *et al.* 2011), son los ancestros comunes de todos los cultivares triploides y tetraploides conocidos (Simmonds y Shepherd, 1955; Perrier *et al.* 2011). *Musa acuminata* es uno de los más importantes cultivos en el mundo en términos de producción y consumo (Martínez-Solórzano & Rey-Brina 2021).

Figura 1-1: Anatomía de una planta de banano.



Fuente: FAO 2019 (<http://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/banana/en/>)

Las plantas de banano se cosechan en más de 120 países en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, donde proporciona un alimento básico para al menos 400 millones de personas alrededor del mundo y adicionalmente constituye un rubro de exportación muy importante (Nadal-medina *et al.*, 2009; Jones y Daniells, 2019). Se

considera un alimento de alto nivel energético, rico en minerales y vitaminas, con un corto periodo de vida media (Manrique et al., 2007). En orden de importancia económica, existen bananos triploides (AAA, AAB y ABB), diploides (AA y AB) y tetraploides (AAAA, AAAB), siendo los triploides los principales cultivares comerciales de banano, altamente estériles, partenocárpicos y propagados asexualmente (Perrier et al. 2011; Jones y Daniells, 2019). Los bananos triploides corresponden en un 95 % a cultivares del grupo Cavendish y el 5 % restante a cultivares exóticos como Apple (Manzano), baby banana (Bocadillo o Pisang Mas) y ice cream (Lady Finger) (Robinson & Saúco, 2010).

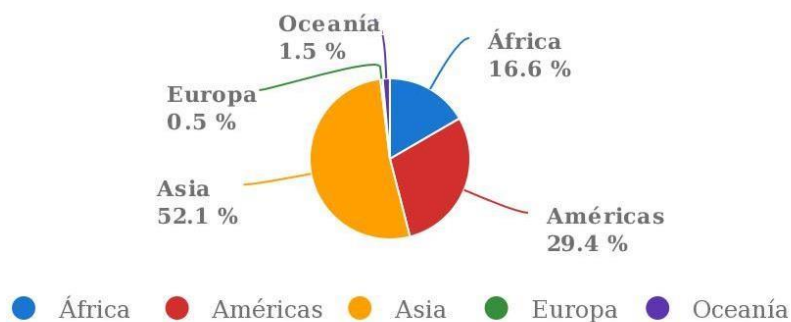
1.3 PRODUCCIÓN DE BANANO

La producción global de banano en el 2021 estuvo cercana a los 125 millones de toneladas, equivalentes a 5,3 millones de hectáreas de superficie cultivada (FAOSTAT 2021). En Latinoamérica, la producción durante el periodo 1994 – 2021, estuvo cercana a los 91,2 millones de toneladas en promedio por año (FAO 2023). El 80 % de la producción con fines de exportación corresponde a los países de Latinoamérica y del Caribe (5,6 billones de dólares) (FAO 2019a), seguido por Asia (16,1 %) y África (3,9 %), representados en 19,2 millones de toneladas en el 2018 (FAO 2019b). Ecuador figura como el mayor país exportador de banano en el mundo con el 36 % de participación en el mercado (FAO 2019a), seguido de Costa Rica, Guatemala y Colombia (FAOSTAT 2018).

Figura 1-2: Producción global de banano por continente en el 1994-2021.

Proporción de producción de Bananos por región

Promedio 1994 - 2021



Source: FAOSTAT (jul. 29, 2023)

Fuente: FAOSTAT 2023

En Colombia el banano es el tercer producto agrícola en importancia para exportación, después del café y las flores (DANE 2019), representando 892 millones de dólares en el año 2022 y una producción de 108 millones de cajas (AUGURA 2023). Los cultivos de banano en Colombia ocupan aproximadamente 60.000 hectáreas, o sea el 7 por ciento de la superficie total plantada de cultivos frutícolas (Espinal et al., 2005), ocupando el quinto lugar en producción a nivel global (FAOSTAT 2021). La producción de banano de exportación en Colombia se realiza en dos zonas ecológicas diferentes ubicadas en la Costa Norte sobre el mar Caribe: la primera es la zona de Urabá (Municipios de Apartadó, Carepa, Chigorodó y Turbo) donde se cultivan cerca de 33.902 hectáreas; la segunda es la zona del Caribe (departamentos de Magdalena, la Guajira y Cesar) con aproximadamente 19.426 has cultivadas (AUGURA, 2023).

1.4 Agentes fitopatógenos de los cultivos de banano

La producción de banano en el mundo se ve frecuentemente afectada por la susceptibilidad del cultivo a diversas plagas y enfermedades (Tabla 1-1). Dentro de los patógenos del banano más importantes se encuentran la bacteria *Ralstonia solanacearum* y los hongos *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* y *Pseudocercospora fijiensis*, causantes de las enfermedades denominadas Moko, Mal de panamá y Sigatoka negra respectivamente (Jones y Daniells, 2019). *Pseudocercospora fijiensis*, objeto de este estudio, es un hongo devastador para el cultivo de banano, causa grandes pérdidas económicas para los cultivadores y normalmente se controla con el empleo de diversos tipos de fungicidas de síntesis química que aumentan los costos de producción y afectan negativamente el medio ambiente y la salud de los trabajadores (Mosquera et al. 2009).

Tabla 1-1: Patógenos e insectos plaga más frecuentes en el cultivo de banano.

Tipo de patógeno	Especies más comunes
Bacterias	<i>Ralstonia solanacearum</i> ¹ , <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Musacearum</i> ² , <i>Erwinia</i> sp. ¹
Hongos	<i>Pseudocercospora fijiensis</i> ^{3,4} , <i>Pseudocercospora musicola</i> ⁴ , <i>Pseudocercospora eumusae</i> ⁴ ,

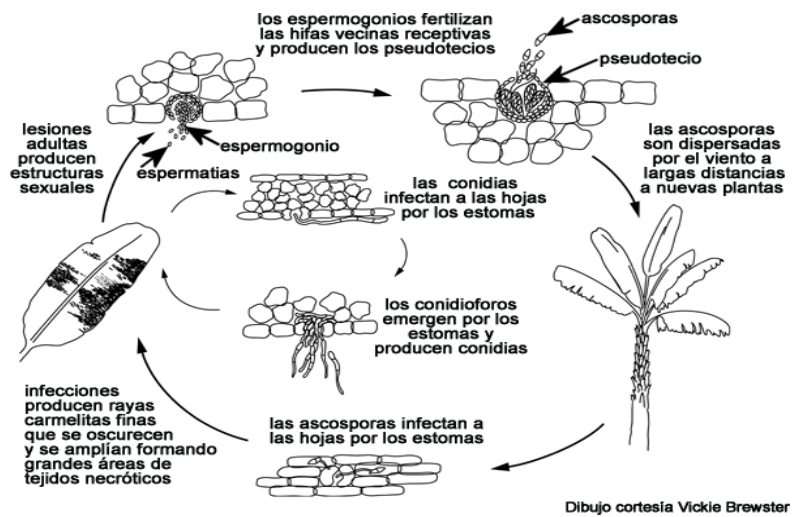
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> (razas 1,2 y 3) ⁵ (Raza 4) ⁶ , <i>Cordana musae</i> ⁷ , <i>Guignardia musae</i> ^{4 y} <i>Colletotrichum musae</i> ⁸
Virus	Banana bunchy top virus, , Bavuvirus ⁹ , Cucumber mosaic virus (CMV) ⁴ , Banana streak virus (BSV) ¹⁰ .
Insectos	<i>Colaspis spp.</i> ¹¹ , <i>Urocyclus flavescens</i> ¹¹ , <i>Nacoleia octasema</i> ¹¹ , <i>Chaetanaphothrips spp.</i> ¹¹ , <i>Frankliniella spp.</i> ¹¹ , Thrips ¹¹ , <i>Pentalonia nigronervosa</i> Coq ⁸

¹(Sequeira, L. 1998), ²(Tushemereirwe et al., 2003), ³(Marin et al., 2003), ⁴(Jones y Daniells, 2019), ⁵(Stover, R.H. 1962), ⁶(Ploetz, R. 2008), ⁷(Cordeiro et al., 2005), ⁸(Finlay & Brown, 1993) (Coquerel C. 1859), ⁹(Horser et al., 2001), ¹⁰(Fauquet et al., 2005), ¹¹(Robinson & Saúco, 2010).

1.5 SIGATOKA NEGRA

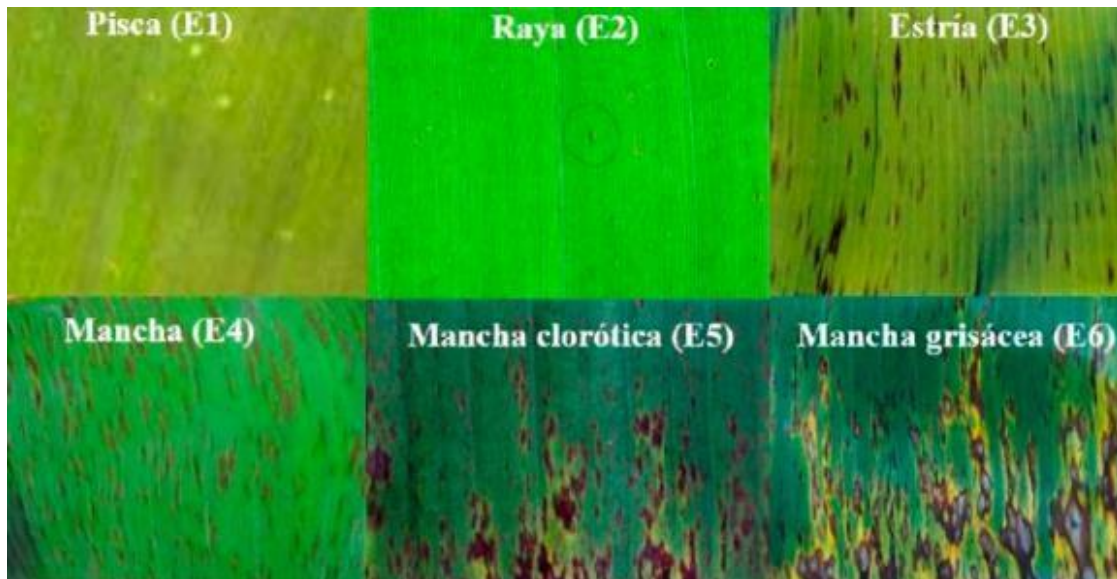
La Sigatoka negra, causada por el hongo ascomicete *Pseudocercospora fijiensis* (sinónimo: *Mycosphaerella fijiensis* Morelet), estado perfecto de *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, es, desde el punto de vista económico, la enfermedad foliar más importante que afecta la producción comercial de bananos y plátanos (*Musa spp.*) en la mayoría de las regiones productoras del mundo (Stover y Simonds, 1987).

La Sigatoka negra es una típica enfermedad policíclica, en la que tanto conidias como ascosporas participan de la dispersión (Figura 1-3). Las conidias y las ascosporas son los agentes de diseminación de la enfermedad, siendo los medios principales de dispersión, la salpicadura y el lavado por lluvia. Las conidias asexuales se forman en lesiones jóvenes como estrías y aparecen en el primer estadio de mancha. Se producen de manera abundante en periodos de alta humedad, especialmente si cuentan con una película de agua libre sobre las hojas. Estos propágulos están asociados principalmente con infecciones a corta distancia, entre hojas de una misma planta, de la planta madre a los hijos y entre plantas cercanas. Las ascosporas sexuales en cambio, son los medios primarios de dispersión sobre distancias más largas entre plantaciones y son los medios principales de diseminación durante periodos de lluvia (Ploetz, R. 1994 , Agrios, G. 1988).

Figura 1-3: Ciclo biológico de *Pseudocercospora fijiensis*

Fuente: Bennett y Arneson 2003

Se han establecido 6 estadios en la evolución de la enfermedad: uno de punto, dos de rayas y 3 de mancha; 1) Estadio de punto inicial: aparición de puntos pequeños de color amarillo pálido de 0,25 mm de diámetro visibles en el envés de la hoja; 2) Primer estadio de estría: formación de estrías de color castaño de 1mm de ancho por 2 mm de largo, visibles en el haz y paralelas a las venas laterales de la hoja; 3) Segundo estadio de estría: alargamiento de las estrías hasta alcanzar 20-25 mm de longitud y 2 mm de ancho, las cuales toman una coloración marrón oscuro y son visibles en el envés como rayas amarillas; 4) Primer estadio de mancha: ensanchamiento de las estrías que se tornan color marrón oscuro y son rodeadas por una zona amarilla pálida, puede considerarse el primer estadio de mancha; 5) Segundo estadio de mancha: inicio del colapso del centro de color negro de la mancha y formación de un halo amarillo ligero en el tejido de la hoja que rodea el borde acuoso de la mancha; 6) Tercer estadio de mancha: el centro de la mancha se seca, adquiere un color gris claro y además se torna hundido o comprimido. La mancha es rodeada por un borde estrecho bien definido, color pardo oscuro o negro. Entre este borde y el color verde normal de la hoja, hay frecuentemente una zona de transición amarillo brillante (Manzo-Sánchez *et al.*, 2014; Fouré, 1985).

Figura 1-4: Estadíos de *P. fijiensis*

Tomado de: <http://www.scielo.org.pe/img/revistas/agro/v8n1/a03fig01.jpg>.

1.6 EPIDEMIOLOGÍA DE *Pseudocercospora fijiensis*

La epidemiología de la Sigatoka negra depende de factores bióticos y abióticos. Los patrones de temperatura, humedad y disponibilidad de inóculo, son los principales factores en la velocidad de evolución de la enfermedad (Porrás, 1997). En particular, la lluvia posee un papel muy importante en la liberación del inóculo ya que provee condiciones de humedad que favorece el desarrollo de la infección (Gauhl, F. 1994).

Las temperaturas favorables para el desarrollo de la enfermedad fluctúan entre los 25 y 28°C, con una temperatura óptima alrededor de los 27 °C. Normalmente, las temperaturas por debajo del rango constituyen limitantes sobre el desarrollo del patógeno, mientras que temperaturas más altas no (Jacome y Schun, 1992). La humedad relativa es importante porque aporta las condiciones hídricas para la germinación de las esporas y el desarrollo de las infecciones. El viento y el agua son los factores que permiten y favorecen la diseminación de las esporas del patógeno, una vez que estas han sido liberadas. Se han encontrado correlaciones con otros factores ambientales como una humedad relativa mayor del 92%, la tasa de evaporación y la duración de la humedad foliar, con el desarrollo activo de la infección (Jacome y Schun, 1992).

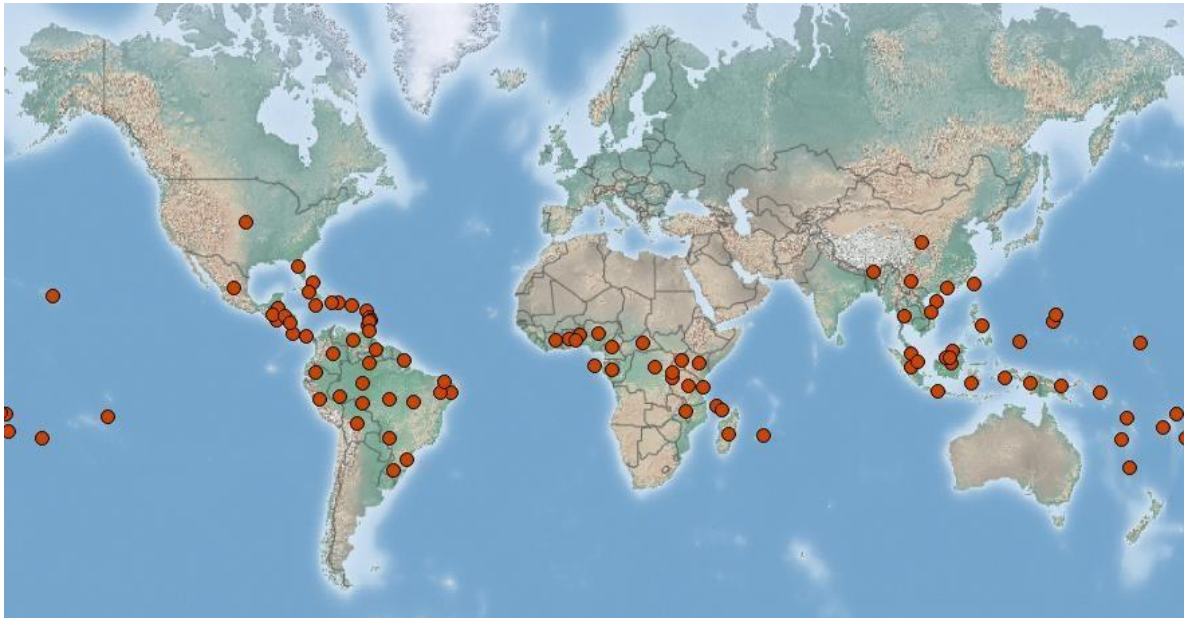
1.7 Hospederos naturales de *P. fijiensis*

Además de afectar plantas de banano y plátano, se ha reportado el desarrollo de sintomatología similar al observado sobre plantas susceptibles en *Heliconia psittacorum* (Gasparotto et al, 2005), planta ornamental de la que se cree que podría actuar como vehículo dispersor del patógeno.

1.8 Distribución geográfica y dispersión

Pseudocercospora fijiensis se ha distribuido en todas las zonas productoras de banano y plátano alrededor del mundo, desde su primera descripción en el valle Sigatoka de la isla de Vitu Levu en Fiji en 1963 (Rhodes, P. L. 1964). Sin embargo, reportes posteriores sugieren una aparición más temprana en Hawái (1958), Papua Nueva Guinea (1957) y Taiwán (1927) (Meredith, D. S. 1970 & Stover, R. H. 1976), dificultando parcialmente la definición de su patrón de dispersión temprana debido a la similitud de sintomatología con la causada por *Pseudocercospora musícola* (Jones 2003). *Pseudocercospora fijiensis* ha sido reportado en cuatro continentes y en más de ochenta países (CABI 2019) (Figura 1-5). En tres países (Zambia, Guadalupe y Surinam), se reporta como ausente o sin confirmación y solamente en Australia se considera como erradicado mediante confinamiento (Jones 1990; CABI 2019).

El patógeno fue identificado por primera vez en Gabón (África) en 1978 (Frossard, P. 1975), aunque se presume su aparición desde 1973 en Zambia (Reamarkers 1975), esto no ha sido confirmado. Para América se tienen reportes de la aparición de *P. fijiensis* desde 1972 en Honduras y 1981 en México (Orozco Santos et al. 2013), en donde se postula la introducción en un solo evento a partir del estado de Chiapas y su posterior diseminación y evolución (Manzo-Sánchez et al. 2019) en el resto de Centroamérica. En Colombia se cree que fue introducido desde 1991.

Figura 1-5: Mapa de distribución de *Pseudocercospora fijiensis*.

Fuente: CABI 2019

En el 2013, la industria del banano requirió cerca de 162.000 personas en empleos directos e indirectos en las zonas productoras en Colombia (Minagricultura, 2013). Sin embargo, como indica Espinal G. (2005), el banano colombiano ha experimentado una pérdida de posicionamiento competitivo en el marco de un sobreabastecimiento de los mercados mundiales, con niveles próximos a la saturación especialmente en países desarrollados, como consecuencia del crecimiento de la oferta de competidores fuertes como Ecuador. La reducción de competitividad en Colombia obedece a diversos factores entre los que sobresalen la baja productividad por hectárea del cultivo y el deterioro en la calidad de la fruta, debido principalmente a problemas sanitarios como la Sigatoka negra, el Moko y recientemente el Amarillamiento por *Fusarium* en las plantaciones.

El estudio de la Sigatoka negra se ha centrado principalmente en la búsqueda de metodologías de control principalmente mediante la aplicación de fungicidas químicos protectantes y sistémicos, los cuales se agrupan en tres grupos: Metil Benzimidazol Carbamatos (MBCs), Inhibidores de la Quinona "situada" fuera (Qols; Estrobilurinas) e inhibidores de la demetilación del esteroles (DMIs) (Arango, 2002; Orozco, et. al., 2002.; Corrales, et al., 2002.; Fraaije et al., 2007). Sin embargo, con un estudio más profundo y

la aplicación de principios y técnicas de biología molecular y genómica podría lograrse una comprensión más básica y profunda de la enfermedad (Canto, et al. 2007), dado que hasta la fecha son muy pocos los estudios genéticos y moleculares reportados sobre la Sigatoka negra (Canto, B., et al. 2007; Carlier, J. et al., 1996).

1.9 INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO

En las interacciones incompatibles la resistencia puede darse de dos maneras: constitutiva e inducida; los factores de resistencia constitutiva también conocidos como factores preformados, son características químicas y morfológicas que están presentes en la planta antes de ser atacadas por cualquier patógeno. La cutícula puede ser considerada como la primera línea de defensa contra alteraciones ambientales incluidos los patógenos. Un gran número de metabolitos secundarios son producidos constitutivamente por la planta, como es el caso de los glucósidos cianogénicos y saponinas. Estos compuestos químicos preformados son también conocidos como Fitoanticipinas (Bowyer et. al. 1995).

La resistencia inducida se refiere a los procesos de defensa que son activados solamente por un intento de infección. Dentro de las respuestas más importantes de las plantas frente a un microorganismo patogénico se encuentran la biosíntesis de metabolitos secundarios de bajo peso molecular que presentan actividad antimicrobiana (Fitoalexinas), la inducción de una muerte celular rápida y localizada (Respuesta Hipersensible) y la síntesis de proteínas que inhiben el avance del patógeno (Proteínas relacionadas con la patogénesis (Thordal-Christensen, H. 2003).

1.10 Proteínas relacionadas con patogenicidad y virulencia

Una fracción importante del secretoma de los microorganismos comprende enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas, ligninasas, celulasas, glucosil hidrolasas, esterases, etc., que desempeñan importantes funciones no solo en la nutrición, sino también en el proceso de infección, colonización y desarrollo de enfermedades si el microorganismo es un patógeno. La composición del secretoma es extraordinariamente versátil y varía en función de las condiciones ambientales, del estado fisiológico y del sustrato en el cual crece el microorganismo. Phalip et al (2005), observaron que en *Fusarium graminearum* el patrón

de proteínas extracelulares varía cuando se le cultiva en un medio con glucosa o con paredes celulares de *Humulus lupulus* (lupus); las paredes celulares además de favorecer la acumulación, también inducen una mayor diversidad de proteínas extracelulares, la mayoría enzimas que degradan la pared celular del hospedero.

Douaiher et al (2007), compararon en *Mycosphaerella graminicola* la producción de proteínas extracelulares en dos cepas con diferente grado de patogenicidad. Para la investigación utilizaron tres medios de cultivo diferentes, uno conteniendo harina de trigo, dado que la planta de trigo es el huésped natural de *M. graminicola*. Los investigadores observaron que el patrón de la actividad de celulasas y en particular la producción de xilanasas fueron más altas en este medio. Estas enzimas pudieron ser correlacionadas con la patogenicidad de las cepas, sugiriendo que las xilanasas desempeñan un papel importante en el proceso de desarrollo de la enfermedad. Chuc en 2007 estudió la producción de proteínas extracelulares de *P. fijiensis* en medio V8 líquido, cuyo filtrado indujo una respuesta hipersensible en hojas de banano. Dicha respuesta parece ser mediada, al menos en parte, por proteasas tipo subtilisina secretadas por *P. fijiensis*. A nivel molecular no se conocen las secuencias de los genes responsables de inducir esta respuesta en plantas de banano. En general el conocimiento que se tiene sobre los genes que codifican las proteínas responsables de los procesos de patogenicidad de *P. fijiensis* sobre plantas musáceas es muy pobre.

El análisis de todas las posibles proteínas secretadas, proteínas de la superficie celular, entre otras pueden ser ahora estudiadas más profunda y completamente, explorando la información que se está generando a partir de los proyectos de secuenciación del genoma. El DOE Joint Genome Institute actualmente tiene publicado en su página la versión 2 del genoma de *P. fijiensis*. Estas anotaciones se realizaron a partir del análisis de 40.000 secuencias EST generadas del secuenciamiento de 3 librerías *in vitro*. Adicionalmente, se conoce que el actual mapa de ligamiento genético de *P. fijiensis* contiene 10 grupos de ligamiento grandes y 13 pequeños, con marcadores espaciados aproximadamente cada 7.0 cM., además, 11 locus del tipo de apareamiento (Conde-Ferrández et al 2006; Manzo-Sánchez et al. 2008), ha sido recientemente secuenciado, revelando dos idiomorfos (alelos que codifican para proteínas diferentes) que son similares a los de otros hongos ascomicetos. Toda esta información generada necesita ser analizada

y puesta a prueba con experimentos funcionales más puntuales para obtener resultados más aplicados y contundentes. En este trabajo se dio inicio a la identificación detallada de los genes que codifican las proteínas responsables de la virulencia y la patogenicidad de *P. fijiensis*.

1.11 INTERACCIÓN BANANO- *Pseudocercospora fijiensis*

El estudio de la Sigatoka negra se ha centrado principalmente en la búsqueda de metodologías de control mediante la gestión integrada de enfermedades y el entendimiento de la patología en términos agronómicos. Como resultado, la Sigatoka negra se maneja primordialmente mediante la aplicación de fungicidas sistémicos. En la actualidad se emplean los grupos DMIs, las aminas y las anilipirimidinas (Vicente Rey – Cenibanano, comunicación personal). Sin embargo, el uso de fungicidas de síntesis química no es sostenible, por lo que es urgente entender los mecanismos de la interacción planta - patógeno, para poder generar estrategias novedosas de control. Un mayor entendimiento de las interacciones entre el hospedero y el patógeno se obtiene con el uso de herramientas de biología molecular y genómica (Canto et al. 2007). Sin embargo, hasta la fecha son muy pocos los estudios moleculares, bioquímicos y genéticos reportados para *P. fijiensis* (Rodríguez, H. A et al. 2020; Canto et al; 2007; Carlier et al., 1996).

La especificidad de la interacción banano - *P. fijiensis* está descrita a nivel de la reacción mostrada por diferentes cultivares hacia el patógeno (Fullerton & Olsen, 1991, Riveros A. E., 1992; Beveraggi et al 1993). En banano y plátano se ha identificado un patrón que varía entre resistencia parcial (PR) y alta resistencia (HR) (Fouré, 1993). El establecimiento del patógeno en un cultivar susceptible se inicia con la penetración de las hifas a través de los estomas y su esparcimiento intercelular con una nutrición biotrófica durante un periodo de 3 a 4 semanas, antes de que aparezcan los síntomas necróticos en las hojas (Hoss et al., 2000). El fenotipo de resistencia parcial parece estar ligado a la acumulación de compuestos fenólicos especializados que se almacenan en las células del parénquima. Una vez el material es liberado en los espacios intercelulares, se produce el contacto con las hifas del hongo para limitar su extensión en el parénquima. Este mecanismo se cree

que desempeña un papel importante en las últimas etapas del proceso de la infección. Los fenotipos con HR muestran una rápida inducción de los mecanismos de defensa, que inducen a una muerte rápida de las células huésped en los sitios de la infección, una reacción que se encuentra en las interacciones incompatibles planta-patógeno (Agrios, 2004).

A pesar de la importancia que tienen los cultivos de banano y plátano a nivel mundial, la mayoría de los aspectos de la interacción planta – patógeno son desconocidos. Con el desarrollo de los métodos en genómica, el análisis del transcriptoma y los análisis funcionales, hoy en día es posible entender estos mecanismos de interacción a una escala y velocidad mayor, lo que sin duda beneficiará a los productores y a la sociedad en general.

1.12 Resistencia a fungicidas por parte de *P. fijiensis*

La aplicación de fungicidas químicos es la principal herramienta para el manejo de la Sigatoka negra, la cual se realiza mediante aplicación alterna y en mezcla de fungicidas protectores y sistémicos (Martínez, *et al.*, 2011). Los fungicidas protectores son de acción multisitio (bajo o nulo riesgo de resistencia) y se incluyen en este grupo el Mancozeb y el Clorotalonil; los sistémicos son de acción sitio-específico (moderado a alto riesgo de resistencia) e incluyen fungicidas de grupos como benzimidazoles, aminas, triazoles, estrobirulinas y anilinopirimidinas (Martínez, *et al.*, 2011). En muchos estudios se ha reportado la pérdida de sensibilidad frente a estos compuestos. *P. fijiensis* ha desarrollado resistencia a los benzimidazoles, triazoles y estrobirulinas, lo cual ha reducido su eficacia en campo y limitado su uso (Martínez & Guzmán, 2010). El desarrollo de resistencia a los fungicidas de los grupos antes mencionados ha incrementado el uso de aminas y anilinopirimidinas, lo cual se vislumbra como un riesgo, debido al aumento en la presión de selección que se ejerce sobre el patógeno (FRAC, 2010).

Parte de la resistencia adquirida por estos microorganismos se ha visto relacionado con el número de aspersiones por ciclo de cultivo. En un estudio realizado en el suroeste de México, se evidenció la correlación entre el número de aplicaciones y los valores de proporción de resistencia al Propiconazol tanto a nivel de CE50 como de CE₉₅ (Martínez-

Bolaños *et al.*, 2012). La rápida aparición de resistencia indica que las poblaciones de *P. fijiensis* son altamente adaptables a los mecanismos que se emplean para su control, por lo que es indispensable la búsqueda de nuevas alternativas de manejo de la enfermedad.

El estudio profundo del genoma de *P. fijiensis* permitirá la identificación de genes candidatos a determinantes de patogenicidad, que puedan ser empleados como posibles blancos de control, que a futuro se reflejarían en la disminución de uso de fungicidas, por esta razón el presente trabajo permitió Identificar mediante el estudio comparativo del genoma y del transcriptoma del hongo *Pseudocercospora fijiensis* genes candidatos a determinantes de virulencia y patogenicidad.

Bibliografía

Agrios, G. N. 2004. Plant Diseases Caused by Fungy. En: *Plant Pathology*. (Fifth Edition ed.). Academic Press, Inc, San Diego New York. pp. 353 - 355.

Arango, M.E. 2002. Management alternatives for biological control of Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) in banana (*Mussa AAA*). In: Memories of reunión internacional Acrobat, Cartagena de Indias, Colombia. P. 130 - 134.

Asociación de Bananeros de Colombia (2023). Coyuntura Bananera 2022 [Internet]. [citado 15 de junio de 2023]. Disponible en: <https://augura.com.co/wp-content/uploads/2023/04/Coyuntura-Bananera-2022-2.pdf>

Beveraggi, A., X; Mourichon y G. Salle. 1993. Study of host-parasite interactions in susceptible and resistant bananas inoculated with *Cercospora fijiensis*, pathogen of black leaf streak disease. En: Breeding Banana and Plantain for resistance to disease and pests. J., Ganry, Editor., CIRAD, INIBAP: Montpellier, France., p 213- 220.

Bowyer, P., Clarke, B.R., Lunness, P., Daniels, M.J., and Osbourn, A.E. (1995). Host range of a plant pathogenic fungus determined y a saponin detoxifying enzyme. *Science* 267, 371-374.

CABI (2019). *Mycosphaerella fijiensis* (black Sigatoka) datasheet. In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK. [online] URL: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/35278>

Campo-Arana, R., Vélez-Leiton, S., & Barrera-Violeth, J. (2020). La sigatoka negra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, en los cultivos de plátano y banano: una revisión. *Fitopatología Colombiana*, 44(2), 61-66.

Canto, B.; Guille, D.; Peraza, L.; Conde, L. y James, A. 2007. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of the causal agent of Black Sigatoka fungal leaf spot disease of banana and plantain, *Mycosphaerella fijiensis*. En: *Molitechnol.* 36, Pag 64-70.

Carlier, J.; Lebrun, H.; Zapater, M. F.; Dubois, C. y Mourichon, X. 1996. Genetic structure of the global population of banana leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. En: *Molecular Ecology*, 5: 499-510.

Chuc-Uc, J. (2007). Caracterización del perfil de proteínas intracelulares y extracelulares durante el ciclo de cultivo in vitro de *Mycosphaerella fijiensis*. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán, 50 páginas.

Conde-Ferráez, L., Canto-Canché, B., Waalkjwik, C., Kema, G., James, A., & Abeln, E. (2005). Cloning of the mating type locus of *Mycosphaerella fijiensis*. In *Memorias VI Congreso sobre Biología Molecular y Celular de Hongos. Morelia, Michoacán, México. Resumen* (p. 77).

Coquerel, C. (1859). Note sur quelques insectes de Madagascar et de Bourbon. *Annales de la Société Entomologique de France (3ième séries)*, 7, 239-260.

Cordeiro, Z.J., Matos, A.P. and Kimati, H. (2005) Doenças de bananeira. In: Kimati, H., Amorim, I., Rezende, J.A. and Camargo, L.E.A. (eds) *Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas*. Agronomica Ceres, São Paulo, pp. 99–117.

Corrales, O.; Knight, S. y Madrigal, A. 2002. Control of Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) and the red burrowing nematode (*Radopholus similis* COBB) in banana using the plant activator Boost 50 SC within a reduced-input crop protection program. En: Memorias de reunión internacional Acrobat, Cartagena de Indias, Colombia. Pag. 143 - 147.

Departamento Administrativo Nacional de Estadística [DANE] (2019) Boletín técnico del comercio exterior - exportaciones. Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/exportaciones/bol_exp_nov18.pdf

Douaiher, M.-N., Nowak, E., Dumortier, V., Durand, R., Reignault, Ph. and Halama, P. (2007). *Mycosphaerella graminicola* produces a range of cell wall-degrading enzyme activities in vitro that vary with the carbon source. European Journal of Plant Pathology 117:71-79.

Espinal G, Carlos; Covalada M, Héctor y Marín P, Yadira. 2005. La Cadena de Banano en Colombia: Una mirada Global de su estructura y dinámica. DOCUMENTO DE TRABAJO N° 60. Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural, Observatorio Agrocadenas. Bogotá, Colombia. <www.agrocadenas.gov.co> [Consulta: 20 Agosto 2018].

FAOSTAT (2018). Faostat:Food and Agriculture Data. Rome: FAOSTAT. [online] URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

FAO. (2019a). Bananas and major tropical fruits in Latin America and the Caribbean. [Internet]. In: Biannual Report on Global Food Market. Roma. [online] URL: <http://www.fao.org/3/ca4526en/ca4526en.pdf>.

FAO. (2019b). Banana Market Review: Preliminary results for 2018 Rome. 12 pp. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A. (eds) (2005) Virus Taxonomy. Elsevier Academic Press, London, UK.

Finlay, A. R., & Brown, A. E. (1993). The relative importance of *Colletotrichum musae* as a crown-rot pathogen on Windward Island bananas. *Plant Pathology*, 42(1), 67-74.

Frossard, P. (1980). Appearance of a new and serious leaf disease of bananas and plantains in Gabon: black streak disease, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Fruits*, 35(9), 519-578.

Gasparotto, L., Pereira, J. C. R., Urben, A. F., Hanada, R. E., & Pereira, M. C. (2005). *Heliconia psittacorum*: hospedeira de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da sigatoka-negra da bananeira. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 423-425.

Horser, C.L., Harding, R.M. and Dale, J.L. (2001) Banana bunchy top nanovirus DNA-1 encodes the master replication initiation protein. *Journal of General Virology* 82, 459–464.

Hoss, R.; Helbig, J. y Bochow H. 2000. Function of Host and Fungal Metabolites in Resistance Response of Banana and Plantain in the Black Sigatoka Disease Pathosystem (*Musa* spp. -*Mycosphaerella fijiensis*). En: *Journal of Phytopathology*, Volume 148, Numbers 7-8., pp. 387-394(8).

Fraaije, B. A., Cools, H. J., Kim, S. H., Motteram, J., Clark, W. S., & Lucas, J. A. (2007). A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Molecular plant pathology*, 8(3), 245–254. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00388.x>

Fullerton, R. A.; y Olsen T. L. Valmayor R. V.; Umali, B. E. y Bejosano C. P. 1991. Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. En: *Banana Diseases in Asia and the Pacific*. pp.105- 114. INIBAP, Montpellier.

Jones, D.R. (1990). Black Sigatoka - a threat to Australia. In: Fullerton RA, Stover RH, eds. *Sigatoka Leaf Spot Diseases of Bananas*, Proceedings of an International Workshop held at San José, Costa Rica, March 28-April 1, 1989. Montferrier-sur-Lez, France: INIBAP, 38-46.

Jones, D. R. (2003). The distribution and importance of the *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana. *Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook*. INIBAP, San José, Costa Rica, 25-41.

Jones, D. R., & Daniells, J. W. (2019). Introduction to banana, abaca and enset. *Handbook of diseases of banana, abacá and enset*, 1-40.

Manrique-Trujillo, S. M., Ramírez-López, A. C., Ibarra-Laclette, E., & Gómez-Lim, M. A. (2007). Identification of genes differentially expressed during ripening of banana. *Journal of plant physiology*, 164(8), 1037-1050.

Manzo-Sánchez, G., Orozco-Santos, M., Islas-Flores, I., Martínez-Bolaños, L., Guzmán-González, S., Leopardi-Verde, C. L., & Canto-Canché, B. (2019). Genetic variability of *Pseudocercospora fijiensis*, the black Sigatoka pathogen of banana (*Musa* spp.) in Mexico. *Plant Pathology*, 68(3), 513-522.

Manzo-Sánchez, G., Orozco-Santos, M., Martínez-Bolaños, L., Garrido-Ramírez, E., & Canto-Canche, B. (2014). Enfermedades de importancia cuarentenaria y económica del cultivo de banano (*Musa sp.*) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(2), 89–107.

Manzo-Sánchez, G., Zapater, M. F., Luna-Martínez, F., Conde-Ferráez, L., Carlier, J., James-Kay, A., & Simpson, J. (2008). Construction of a genetic linkage map of the fungal pathogen of banana *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black leaf streak disease. *Current genetics*, 53, 299-311.

Marin, D. H., Romero, R. A., Guzmán, M., & Sutton, T. B. (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant disease*, 87(3), 208-222.

Martínez-Solórzano, G. E., & Rey-Brina, J. C. (2021). Bananos (*Musa* AAA): Importancia, producción y comercio en tiempos de Covid-19. *Agronomy Mesoamerican*, 1034-1046.

Meredith, D. S. (1970). Banana leaf spot disease (sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* Leach. *Phytopathological papers*, (11).

Ministerio de Agricultura. 2013 Gobierno y bananeros invertirán cerca de \$20.000 millones para mantener controlada “Sigatoka Negra” en Antioquia, Magdalena y Guajira. < [https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Gobierno-y-bananeros-invertir%C3%A1n-cerca-de-\\$20-000-millones-para-mantener-controlada-%E2%80%9CSigatoka-Negra%E2%80%9D-en-Antioquia,-Magdalena.aspx](https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Gobierno-y-bananeros-invertir%C3%A1n-cerca-de-$20-000-millones-para-mantener-controlada-%E2%80%9CSigatoka-Negra%E2%80%9D-en-Antioquia,-Magdalena.aspx) > [Consulta: 27 de Abril 2014].

Mosquera M, O. M., Echeverry, L. M., & Niño Osorio, J. (2009). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* MORELET. *Scientia et Technica*, 1(41), 232–236.

Nadal-medina, R., Manzo-sánchez, G., Orozco-romero, J., Orozco-santos, M., & Guzmán-Gonzalez, S. (2009). Diversidad genética de bananos y plátanos (*Musa spp.*) determinada mediante marcadores rapd. *Rev. Fitotec. Mex.*, 32(1), 1–7.

Orozco Santos, M., García Mariscal, K., Manzo Sánchez, G., Guzmán González, S., Martínez Bolaños, L., Beltrán García, M., ... Canto Canché, B. (2013). *La sigatoka negra y su manejo integrado en banano*. Mexico: CIRPACINIFAP.

Perrier, X., De Langhe, E., Donohue, M., Lentfer, C., Vrydaghs, L., Bakry, F., ... & Lebot, V. (2011). Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa spp.*) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11311-11318.

Phalip, V., Delalande, F., Carapito, C., Goubet, F., Hatsch, D., Leize-Wagner, E., Dupree, P., Van Dorselaer, A. and Jeltsch, J. 2005. Diversity of exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Current Genetics* 48:366-379.

Ploetz, R. (2008) Tropical race 4 of Panama disease: risk assessment and an action plan to address the problem. In: Abstracts Workbook. XVIII ACORBAT International Meeting. Guayaquil, Ecuador. 10–14/XI/2008, 38.

Raemaekers, R. (1975). Black leaf streak like disease in Zambia. *PANS Pest Articles & News Summaries*, 21(4), 396-400.

Riveros, AE. 1992. Etude comparative de l'interaction hôte- parasite entre un cultivar sensible et un cultivar résistant a la cercosporiose noire du bananier. Faculte des Sciences Agronomiques de Gembloux: Belgique p77.

Rhodes, P. L. (1964). A new Banana disease in Fiji. *Commonwealth Phytopathological News*, 10(3), 38-41.

Robinson, J. C., & Saúco, V. G. (2010). *Bananas and plantains*(Vol. 19). Cabi.

Rodríguez, H. A., Hidalgo, W. F., Sanchez, J. D., Menezes, R. C., Schneider, B., Arango, R. E., & Morales, J. G. (2020). Differential regulation of jasmonic acid pathways in resistant (Calcutta 4) and susceptible (Williams) banana genotypes during the interaction with *Pseudocercospora fijiensis*. *Plant pathology*, 69(5), 872-882.

Sequeira, L. (1998). Bacterial wilt: the missing element in international banana improvement programs. In 'Bacterial Wilt Disease; Molecular and Ecological Aspects'. (Eds P Prior, C Allen, J Elphinstone) pp. 6–14. (INRA Editions: Paris)

Simmonds, N. W., & Shepherd, K. (1955). The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 55(359), 302-312.

Simmonds, N. W. (1962). *The Evolution of the Bananas*. (Longmans, London).

Soto, M. (2014). *Bananos I: conceptos básicos*. 1 ed. Cartago, Costa Rica. Editorial Tecnológica de Costa Rica, 338p.

Stover, R.H. (1962). *Fusarial Wilt (Panama Disease) of Bananas and Other Musa Species*. Commonwealth Mycological Institute Phytoph. Papers 4. Commonwealth Mycological Institute, Kew, London, UK.

Stover, R. H. (1976). Distribution and cultural characteristics of the pathogens causing banana leaf spot. *Tropical Agriculture*, 53(2), 111-114.

Thordal-Christensen, H. (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 351-357.

Tomlinson, P. B. (1969). Anatomy of the monocotyledons. III. Commelinales-Zingiberales. *Anatomy of the monocotyledons. III. Commelinales-Zingiberales*.

Tushemereirwe W, Kangire A, Smith J, Ssekiwoko F, Nakyanzi M, et al. (2003). Outbreak of bacterial wilt on banana in Uganda. *Infomusa* 12, 6–8.

2. Capítulo 2: Análisis comparativo de genomas fúngicos del complejo sigatoka

2.1 INTRODUCCIÓN

El complejo sigatoka está constituido por un grupo de tres hongos pleomorfos del género *Pseudocercospora* (sinónimo: *Mycosphaerella*), *Pseudocercospora fijiensis*, *Pseudocercospora eumusae* y *Pseudocercospora musae* (Chang *et al.*, 2016), estos hongos son responsables de enormes pérdidas económicas en los países productores de banano y plátano en todo el mundo (Churchill A. 2011, Ebimieowei & Wabiye 2011, Noar *et al.*, 2022); de los tres patógenos el más conocido y estudiado es *Pseudocercospora fijiensis*, causante de la sigatoka negra, enfermedad destructiva de amplia distribución global caracterizada por la aparición de lesiones foliares crecientes, consecuente con la disminución de la superficie foliar fotosintéticamente activa y promoviendo la maduración prematura de los frutos, generando racimos que no pueden ser comercializados debido a su calidad inferior (Bebber D. 2019).

El control de la sigatoka en el mundo está basado en el uso de fungicidas químicos en aplicaciones recurrentes, incrementando de manera significativa los costos de producción (Chong *et al.* 2019), que en algunos casos alcanza hasta el 30 %; sin contar con las graves afectaciones al ambiente y a la salud humana que se generan por el alto consumo de este tipo de compuestos tóxicos (Noblecilla & Batista 2018). Los fungicidas comúnmente aplicados son los triazoles, estrobirulinas, benzimidazoles y DMIs (Inhibidores de Demetilación de Esteroles) (Reuveni, M. 2021), compuestos considerados como poco amigables con el ambiente y que de manera recurrente presentan poca efectividad sobre

el desarrollo de la enfermedad debido a la aparición de resistencia por parte de los patógenos a ellos; generando la necesidad de encontrar métodos alternativos de control basados en el estudio molecular de la interacción entre el hongo y las plantas de banano.

Estudios preliminares han permitido el hallazgo de mutaciones puntuales en el genoma de *Pseudocercospora fijiensis* responsables de la resistencia al Azoxistrobin, Benomil y Propiconazol, fungicidas de uso frecuente en el cultivo de banano y que han tenido que ser eliminados o sustituidos de los programas de fumigación (Soares, et al. 2019, Noar et al. 2022); también se ha trabajado en la caracterización de genes relacionados con la virulencia, en los que se ha podido evidenciar la importancia de efectores como el *MfEcp2* y *MfAvr4* y sus variantes alélicas en diferentes poblaciones naturales como parte del mecanismo de evasión de *P. fijiensis* al reconocimiento y respuesta por parte de la planta (Stergiopoulos et al. 2014). De la misma manera se han adelantado estudios dirigidos a la obtención de la secuencia genómica de las tres especies fúngicas del complejo sigatoka, la primera de ellas permitió la caracterización del genoma de *P. fijiensis*, reportando un tamaño de 74 MB para los aislamientos CIRAD86 y CIRAD 139A, con un total de 13.107 modelos génicos y 172 genes codificantes para SSPs (Proteínas Pequeñas Secretadas) (Arango et al. 2016); información que se complementa con la caracterización inicial de los genomas de *P. musae* (60.4 MB) y *P. eumusae* (47.12 MB) (Chang et al. 2016), y la obtención de la secuencia del genoma mitocondrial de *P. fijiensis* (Arcila et al. 2021).

Los hongos del complejo sigatoka muestran cambios evolutivos paralelos en sus genomas. Esto sugiere que han compartido mecanismos similares de adaptación y evolución, lo que podría haber contribuido a su capacidad incrementada para afectar negativamente a las plantas de banano, además, estos cambios genéticos paralelos se correlacionan con un aumento en la virulencia de ambos hongos sobre el huésped de banano. En otras palabras, a medida que evolucionaron, adquirieron una mayor capacidad para causar daño a las plantas de banano, lo que resulta en una enfermedad más agresiva y destructiva (Chang et al. 2016).

Por esta razón, describimos el ensamblaje *de novo* de 27 genomas de aislamientos de hongos del complejo sigatoka y su posterior anotación. Se identificó un gran conjunto de

genes posiblemente involucrados en la interacción patógeno-hospedador y en la maquinaria de degradación de polisacáridos. Las proteínas efectoras predichas de *P. fijiensis* serían útiles para identificar posibles blancos de control y para el diseño de estrategias eficientes contra este patógeno devastador, pero poco caracterizado.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Extracción de ADN para la secuenciación genómica de los aislamientos

Se seleccionaron 27 aislamientos para secuenciación genómica de las tres especies del complejo sigatoka provenientes de distintas zonas productoras en el mundo (Figura 2-1), discriminados así: 24 aislamientos de *P. fijiensis*, dos aislamientos de *P. eumusae* y un aislamiento de *P. musae* (Tabla 2-1); 8 de los aislamientos de *P. fijiensis* fueron obtenidos a partir de la colección de microorganismos de la Corporación Para Investigaciones Biológicas CIB (Medellín-Colombia), estos fueron obtenidos mediante cultivo monoascospórico aislado de material vegetal infectado proveniente de las zonas productoras de banano de Urabá (Antioquia) y de los departamentos del Magdalena y Guajira, los restantes aislamientos fueron obtenidos bajo convenio con el instituto Wageningen Plant Research de la Universidad de Wageningen (Países Bajos). Para obtener el micelio adecuado para la extracción de ADN, fragmentos de micelio fueron cultivados en medio PDA (Papa Dextrosa Agar) por dos semanas a 24 °C y posteriormente pequeños fragmentos fueron transferidos a medio Sabouraud líquido (Difco) por dos semanas más a 24 °C, hasta obtener aproximadamente 20 gramos de material fúngico. El micelio fue colectado y macerado en nitrógeno líquido hasta pulverizar, posteriormente se extrajo el ADN a partir de 2 gramos del micelio pulverizado mediante CTAB 2X (Arango *et al.*, 2003) y las trazas de ARN fueron eliminadas mediante digestión con ARNasa (Fermentas), la calidad de material genético extraído fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y espectrofotometría UV bajo el análisis de relación 260/280. Las muestras de ADN genómico purificado fueron enviadas al High-Throughput Sequencing Facility HTSF (Universidad de North Caroline, New chapell, NC, USA) para la construcción de las librerías y secuenciación, según protocolo standard de librerías Paired-end (Illumina,

San Diego CA, USA), para un total de 27 librerías con tamaños de insertos cortos (400 pb x 2).

Figura 2-1: Distribución geográfica de los aislamientos del complejo sigatoka.

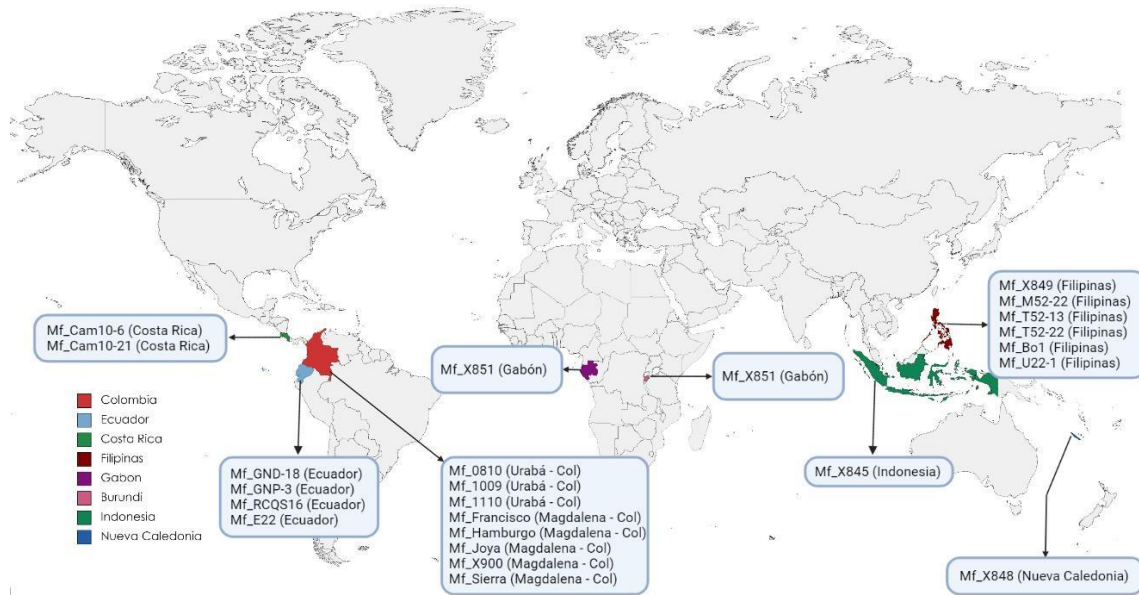


Tabla 2-1: Listado de los aislamientos fúngicos del complejo sigatoka secuenciados.

Me_X870	<i>P. eumusae</i>		
Me_X874			
Mf_0810	Urabá - Col.	Suramérica	
Mf_1009	Urabá - Col.		
Mf_1110	Urabá - Col.		
Mf_Francisco	Magdalena - Col.		
Mf_Hamburgo	Magdalena - Col.		
Mf_Joya	Magdalena - Col.		
Mf_X900	Magdalena - Col.		
Mf_Sierra	Magdalena - Col.		
Mf_GND-18	Ecuador		
Mf_GNP-3	Ecuador		
Mf_RCQS16	Ecuador		
Mf_E22	Ecuador		
Mf_Cam10-6	Costa Rica	Centroamérica	
Mf_Cam10-21	Costa Rica		
Mf_X849	Filipinas	Asia	
Mf_M52-22	Filipinas		
Mf_T52-13	Filipinas		
Mf_T52-22	Filipinas		
Mf_Bo1	Filipinas		
Mf_U22-1	Filipinas		
			<i>P. fijiensis</i>

Mf_X845	Indonesia		
Mf_X848	Nueva Caledonia	Oceanía	
Mf_X851	Gabón	África	
Mf_X852	Burundi		
Mm	<i>P. musae</i>		

2.2.2 Ensamble genómico

El ADN genómico de los 27 aislamientos del complejo sigatoka fueron secuenciados mediante la plataforma Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego CA, USA), generando en promedio 10 gigabases de reads de información para cada uno de los genomas. Los análisis bioinformáticos de las secuencias se realizaron en el Laboratorio de Tecnologías de Alto Desempeño LacTAD, (Universidad Estadual de Campinas UNICAMP, Campinas, SP, Brasil), el control de calidad de las secuencias fue llevado a cabo mediante FastQC version 0.11.5 (Andrews, S. 2010) y posteriormente fueron filtradas usando Trimmomatic (Bolger *et al.* 2014), con el fin de eliminar bases erróneas y presencia de adaptadores.

Con las secuencias corregidas se procedió a determinar la mejor estrategia de montaje *de novo*, ya que los resultados pueden variar significativamente dependiendo del programa de montaje empleado, así comparten similitud en el algoritmo de ensamble. Se emplearon cuatro softwares para ensamble de genomas basados en los gráficos de bruijn, lo cual consiste en el uso de secuencias de una longitud k (k-mers) de cada lectura, las cuales representan un nodo. Posteriormente, cada par de nodos es conectado, de tal manera que se mueve una base (k-1) entre cada par de k-mers. Los ensambladores usados fueron: SGA (Simpson *et al.* 2012), IBDA-UD (Peng *et al.* 2012), MEGAHIT (Li *et al.* 2015) y SPAdes version 3.8.1 (Bankevich *et al.* 2012). El análisis estadístico de los ensamblajes generados por los cuatro programas fue realizado mediante el script en Perl Assemblathon.pl (Bradnam *et al.* 2013), los parámetros más importantes a considerar en este punto fueron: tamaño completo del ensamble, cantidad de scaffolds, scaffold más largo y N50, fueron evaluados con el total de los reads y con los reads mayores de 500 pb. SPAdes fue el que presentó las mejores métricas, ya que al comparar con el tamaño del genoma reportado previamente de 74.1 MB (Arango, *et al.* 2016), fue el más cercano con 70.29 MB (Figura 2-2).

El montaje *de novo* definitivo de los 27 aislamientos se realizó mediante SPAdes versión 3.8.1 (Bankevich et al. 2012) usando kmers múltiples (71, 81 y 91) y tratando de reducir la aparición de mismatches mediante la opción `-carefull`, posteriormente se llevó a cabo el scaffolding mediante SSPACE (SSAKE-based Scaffolding of Pre-Assembled Contigs after Extension) versión 3.0 (Boetzer et al. 2013) y el cierre de gaps mediante Gapfiller versión 1.10 (Nadalin et al. 2013) a los ensamblados se obtuvieron las estadísticas básicas mediante el script de Perl `Assemblathon_stats.pl` (Bradnam et al. 2013) y la precisión del ensamblado mediante REAPR (Hunt et al. 2013) .

2.2.3 Análisis de repeticiones y predicción de genes

Con los genomas ensamblados se procedió con la detección de las clase de familia de repeticiones mediante RepeatModeler (Smit & Hubley, 2008), el cual incorpora RECON (Bao & Eddy, 2002), RepeatScout (Price, 2005), TRF (Benson, 1999), y RepeatMasker (Smit & Hubley, 2012), posteriormente, la anotación de los genomas enmascarados se realizó mediante el pipeline MAKER2 (Holt & Yandell, 2011), en el que se incorporan varios modelos predictores basados en varios modelos, entre los que se encuentran AUGUSTUS (Stanke & Waack 2003), SNAP (Korf, 2004) y GENEMARK-ES (Ter-Hovhannisyan et al. 2008), las predicciones se realizaron con una iteración y entrenando los predictores con las secuencias reportadas anteriormente para el genoma de *P. fijiensis* (Arango et al. 2016) y empleando el transcriptoma ensamblado como comprobación de los genes predichos (Noar & Duab 2016), para verificar la compleción de la anotación de cada uno de los genomas ensamblados y las anotaciones fue evaluada de manera cuantitativa mediante el software BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) (Simão et al. 2015), software que permite la valoración de la anotación mediante el cálculo de la integridad de la anotación y la expectativa del contenido de genes.

2.2.4 Análisis filogenético

La comparación e identificación de los aislamientos se llevó a cabo mediante la comparación multilocus de secuencias de un grupo de nueve marcadores nucleares, los genes extraídos Actina (ACT), Tubulina (TUB), Calmodulina (CaM), Factor de elongación 1 α (Ef1), Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (G3PD), ARN polimerasa II (RPB2) y las

secuencias de las regiones ITS de rADN 5.8S, 18S y 28S. Las secuencias fueron extraídas mediante PCR *in silico* de los genomas ensamblados mediante primers específicos en Geneious 7.1.9 (Kearse *et al.* 2012) y alineadas con Muscle (Edgar, R. C. 2004) en el software MEGA 7 (Kumar *et al.* 2008), los análisis filogenéticos fueron realizados con las secuencias de los nueve marcadores concatenados para la construcción de dos árboles de Máxima Verosimilitud (Maximum-Likelihood) con 1.000 réplicas bootstrap, uno para todos los aislamientos del complejo sigatoka y otro para los aislamientos de *P. fijiensis*, bajo los modelos Tn93 con distribución Gamma (Tn93+G) y Tamura 3-parametros, con una distribución gamma discreta y modelo de sitios variable (Tn92+G+I) respectivamente, el mejor modelo para cada caso fue seleccionado mediante jModelTest 2.0 y los respectivos análisis filogenéticos y construcción de los árboles definitivos se realizó mediante MEGA 7 (Kumar *et al.* 2008), los árboles filogenéticos fueron visualizados y editados en la aplicación web Evolview (<http://www.evolgenius.info/evolview/>).

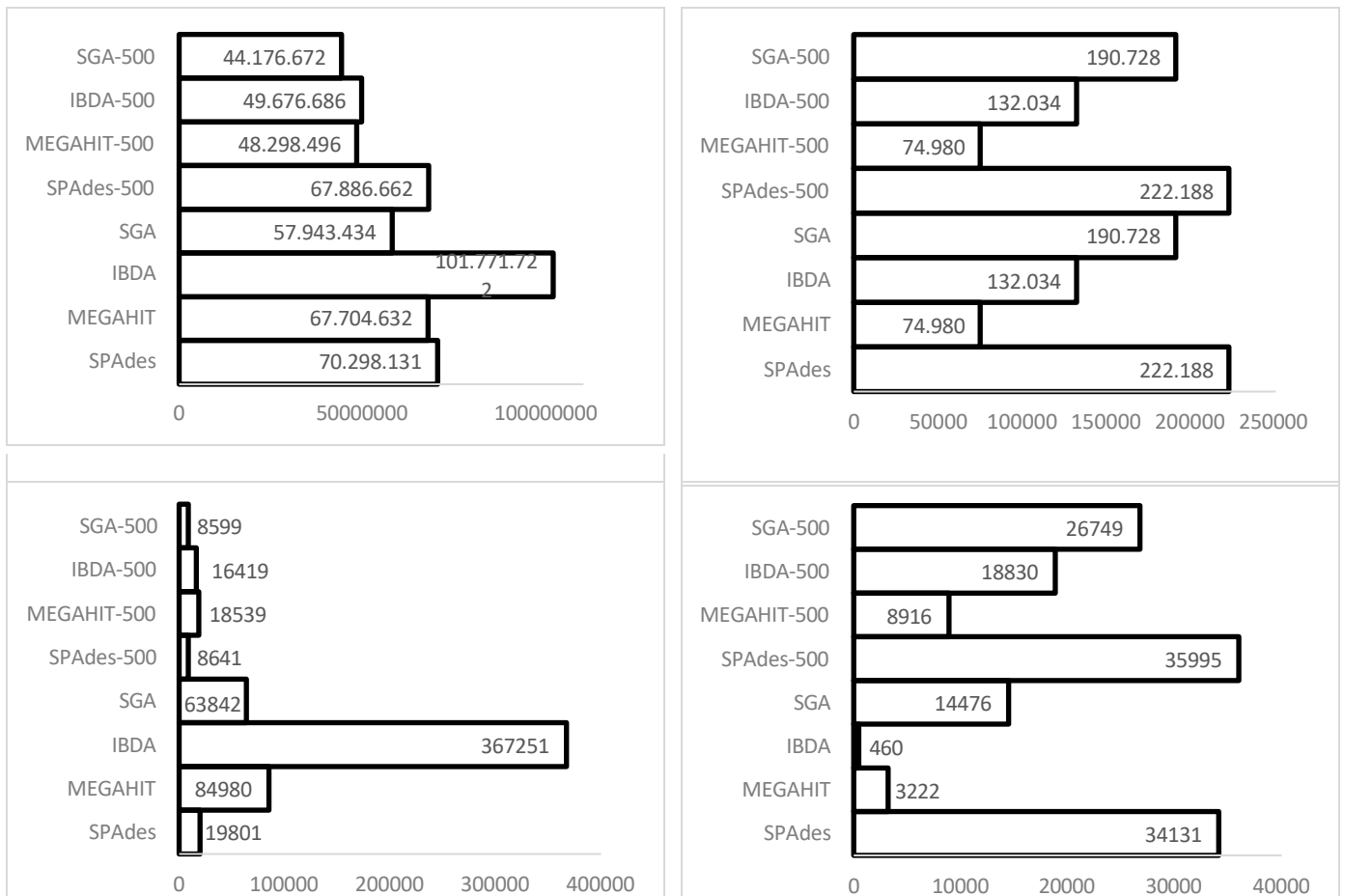
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Selección de algoritmo de ensamble

El análisis estadístico de los ensambles generados por los cuatro programas fue realizado mediante el script en Perl llamado Assemblathon.pl (Bradnam *et al.*, 2013). El primero de los parámetros evaluados fue el tamaño total del ensamble como indicador del tamaño del genoma, en este punto para SGA se obtuvo un ensamble de 57,9 MB, para Megahit 67,7 MB, para IBDA 101,77 MB y para SPAdes 70,29 MB (Figura 2-2); este último fue el que presentó las mejores métricas ya que al comparar con el tamaño del genoma reportado previamente de 74MB (<http://genome.jgi.doe.gov/Mycfi2/Mycfi2.home.html>). Los otros tres parámetros de evaluación (cantidad de scaffolds, N50 y scaffold más largo), son considerados fundamentales para la determinación de la calidad del montaje y de la muestra tomada, ya que ensambles con cantidades de scaffolds superiores a los 20.000 no son aceptados por baja calidad, así como el tamaño del scaffold más largo, ya que indica de manera directa la calidad de la secuencia obtenida, esperando que se ajuste a valores superiores a las 100.000 pares de bases para el caso específico de *P. fijiensis*. Al

comparar los valores obtenidos para estas importantes estadísticas, se hace evidente un mejor desempeño de SPAdes como ensamblador, ya que para el caso del parámetro correspondiente al scaffold más largo se encuentra en las 222.188 pb, valor significativo al compararlo con los otros tres ensambladores; esta misma tendencia se hizo evidente en el caso de la N50 (34131pb) y en el número total de scaffolds (8641) (figura 2-2).

Figura 2-2: Estadísticas generales de ensamble de genomas para la selección del mejor software. (a) Tamaños de los ensamblados obtenidos mediante el uso de cuatro softwares diferentes con reads totales y con reads filtrados mayores de 500 pb. (b) Tamaño del scaffold más grande obtenidos mediante el uso de cuatro softwares diferentes con reads totales y con reads filtrados mayores de 500 pb. (c) N50 obtenido mediante el uso de cuatro softwares diferentes con reads totales y con reads filtrados mayores de 500 pb. (d) Numero de scaffolds obtenidos mediante el uso de cuatro softwares diferentes con reads totales y con reads filtrados mayores de 500 pb.



2.3.2 Ensamble *de novo* de genomas de aislamiento del complejo sigatoka

Los resultados finales del ensamble de genomas de las especies fúngicas del complejo sigatoka son llamativos, ya que se presentó variación en los tamaños totales de los genomas, para *P. fijiensis* se encontraron entre los 55MB (X845) y las 75MB (CAM10-21) (Tabla 2-2), aunque el 80 % de los aislamientos se encontró con valores muy cercanos al reportado en la versión publicada del genoma (Arango *et al* 2016), este comportamiento de variación en el tamaño de los genomas de aislamientos diferentes ha sido reportado previamente para *Mycosphaerella graminicola* ; para el caso de los dos aislamientos secuenciados para *P. eumusae* los tamaños de los genomas fueron de 39MB y 44MB, resultado similar al encontrado en trabajos similares realizados para el complejo sigatoka, Chang *et al.* en 2016 realizaron el primer reporte de las secuencias genómicas para *P. eumusae* y *P. musae* con tamaños de 40 MB y 60 MB respectivamente, nuestros resultados para *P. eumusae* son similares, pero difieren para el caso de *P. musae*, ya que el tamaño encontrado en nuestros análisis apunta hacia un genoma con tamaño cercanos a los 80MB (Tabla 2-2).

La variabilidad entre el tamaño de los genomas de una misma especie de hongos es un fenómeno bien conocido. Los genomas de los hongos pueden variar en tamaño desde algunos miles de bases hasta millones de pares de bases (Mbp) (Gregory & Hebert. 1999; Mohanta & Bae 2015). Esta variabilidad se debe a una serie de factores, incluyendo la evolución, la reproducción y las condiciones ambientales. La evolución es uno de los factores más importantes que contribuyen a la variabilidad del tamaño del genoma en los hongos (Petrov 2001). Los hongos son organismos muy antiguos y han evolucionado a lo largo de millones de años. Durante este tiempo, sus genomas han sufrido una serie de cambios, incluyendo la adición, eliminación y duplicación de genes (Koszul *et al.* 2004), así como debido a la variación en la cantidad de transposones (Chang *et al.* 2016). Estos cambios han dado lugar a una gran diversidad de tamaños de genoma en los hongos, como se ha visto en algunos hongos como *Candida albicans* (Carreto *et al.* 2008), *Aspergillus fumigatus* (Garcia-Rubio *et al.* 2018), *Cryptococcus neoformans* (Ormerod *et al.* 2013), entre otros.

La reproducción también es un factor que contribuye a la variabilidad del tamaño del genoma en los hongos. Los hongos se reproducen tanto asexual como sexualmente. Durante la reproducción sexual, los genomas de los dos hongos se recombinan, lo que puede dar lugar a cambios en el tamaño del genoma del nuevo organismo (Galagan et al. 2005). Las condiciones ambientales también pueden influir en el tamaño del genoma de los hongos. Por ejemplo, los hongos que crecen en condiciones de estrés pueden tener genomas más pequeños que los hongos que crecen en condiciones favorables (Taylor et al 2017). Esto se debe a que los hongos que crecen en condiciones de estrés necesitan sintetizar menos proteínas y ARN, lo que les permite reducir el tamaño de su genoma.

Tabla 2-2: Estadísticas finales de los ensamblados.

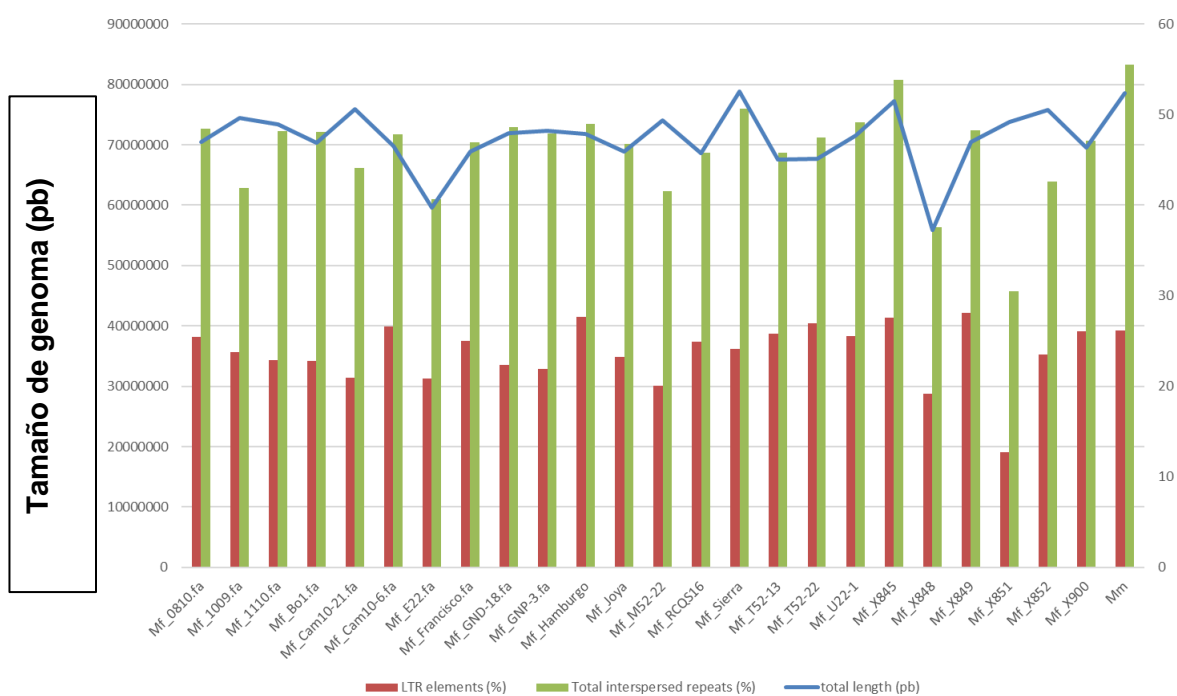
	LONGITUD TOTAL	NUMERO DE SECUENCIAS	LONGITUD MEDIA	LONGITUD DE LA SECUENCIA MAS LARGA	N50
ME_X870	39437479	4033	9778.70	477332	75772, n = 144
ME_X874	44590323	4093	10894.29	413484	79311, n = 157
MF_0810	70530184	9226	7644.72	269715	35045, n = 517
MF_1009	74424945	12717	5852.40	208461	27716, n = 633
MF_1110	73391685	13209	5556.19	277249	22588, n = 776
MF_FRANCISCO	68905274	9116	7558.72	229150	33057, n = 534
MF_HAMBURGO	71821216	6545	10973.45	301987	52805, n = 372
MF_JOYA	68946479	7104	9705.30	269960	41900, n = 447
MF_X900	69576768	6134	11342.81	338178	54215, n = 358
MF_SIERRA	78828234	16811	4689.09	199008	20917, n = 878
MF_GND-18	71956893	10982	6552.26	211484	31530, n = 570
MF_GNP-3	72375068	8375	8641.80	303728	41436, n = 444
MF_RCQS16	68570664	12021	5704.24	205562	28540, n = 583
MF_E22	59555943	9377	6351.28	261628	26974, n = 568
MF_CAM10-6	69854428	8039	8689.44	262199	38616, n = 464
MF_CAM10-21	75875289	7877	9632.51	436610	59189, n = 343
MF_X849	70464802	5160	13655.97	563789	67176, n = 285
MF_M52-22	74054102	10587	6994.81	335329	36153, n = 506
MF_T52-13	67531855	4216	16017.99	504184	79477, n = 244
MF_T52-22	67746302	5640	12011.76	289189	61573, n = 305
MF_BO1	70311003	8480	8291.39	342678	46375, n = 381

MF_U22-1	71583481	8326	8597.58	282859	42365, n = 445
MF_X845	77244627	9513	8119.90	231029	36057, n = 564
MF_X848	55924774	9538	5863.36	240687	27167, n = 528
MF_X851	73806854	10011	7372.58	321172	38955, n = 476
MF_X852	75792019	9514	7966.37	1572390	40029, n = 421
MM	78566482	9065	8667.01	310650	42428, n = 457

2.3.3 Comparación entre el tamaño de los genomas ensamblados y la presencia de secuencias repetidas

Chang et al en 2016 ya había encontrado una relación entre la cantidad de secuencias LTR de clase I en las tres especies del complejo sigatoka y sugiere la participación fundamental en el proceso evolutivo de especiación en los hongos del género *Pseudocercospora*, mediante los resultados obtenidos se puede soportar mejor esta afirmación, ya que se evidencia la variabilidad intraespecífica entre el contenido de estas repeticiones y elementos transponibles.

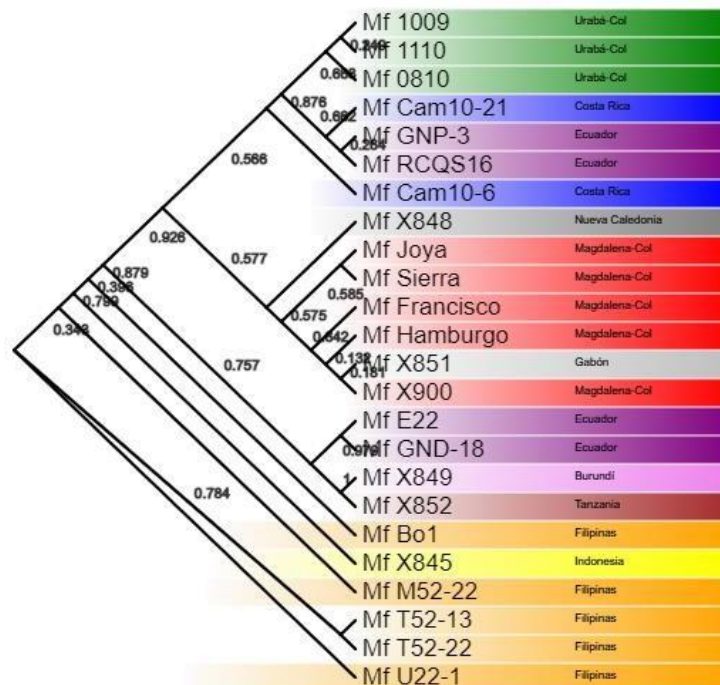
Figura 2-3: Comparación de los tamaños de los genomas de los aislamientos del complejo sigatoka secuenciados con respecto a la cantidad de regiones altamente repetitivas.



2.3.4 Análisis filogenético de los aislamientos del complejo sigatoka

Un análisis filogenético permite mediante la comparación de secuencias de genes encontrar relaciones familiares y evolutivas entre organismos a partir de un grupo de nueve secuencias correspondientes en su mayoría a genes en los genomas secuenciados se pudo realizar este tipo de análisis. Mediante este análisis se encontraron 4 grupos claramente diferenciados (Figura 2-4), en uno de ellos (el más diverso) se encuentran la mayoría de aislamientos provenientes de filipinas (rama inferior) y los otros tres grupos son consistentes con la ubicación geográfica, uno de ellos ubica a los aislamientos provenientes de la región de Urabá con algunos aislamientos provenientes de Ecuador, pero es clara la separación con los aislamientos provenientes de la región del Magdalena, la cual guarda relación más estrecha con aislamientos africanos y asiáticos.

Figura 2-4: Árbol filogenético construido por Máxima Verosimilitud (ML) con 9 secuencias nucleares de aislados del complejo sigatoka a partir de los resultados de MEGA7 con 1.000 bootstraps.



En este estudio, no se establece una relación directa entre la distancia y el grado de variabilidad. Nuestros resultados muestran una clara relación geográfica zonal entre países y zonas productoras, lo que sugiere una posible influencia de actividades antropogénicas similares a las mencionadas por Hanada (2002), curiosamente de evidencia una relación estrecha entre los aislamientos y la posible fuente de material vegetal, ya que para el cultivo de banano al ser clonal condicionaría los cambios evolutivos del patógeno, para el caso de Colombia la diversificación de las dos principales zonas productoras se ve divergente, ya que los aislamientos de Urabá guardan relación estrecha con aislamiento de Ecuador y Costa Rica, mientras que aislamientos del norte de Colombia guardan relación con aislamiento provenientes de Gabon y Nueva Caledonia. Nuestros resultados también confirman la variabilidad genética más alta entre los aislamientos provenientes de Filipinas e Indonesia, soportado por los hallazgos de Hayden et al. 2003 quienes indican la presencia de efectos fundadores en áreas cultivadas y mayor diversidad en el sudeste asiático.

2.3.5 Anotación y comparación de SSPs

Adicionalmente, no se encontraron variaciones importantes en la cantidad de SSPs (Small Secreted Proteins) (Figura 2-5). Dichas proteínas podrían servir para ayudar a estrategias de mejoramiento vegetal que permitan obtener plantas con resistencia a la enfermedad, además de ofrecer información importante de la interacción *Musa* - Sigatoka. de manera consistente con los resultados obtenidos de variabilidad genómica de los aislamientos, se evidencia variabilidad en la cantidad de proteínas anotadas y proteínas secretadas (Figura 1-5), para el caso de *P. musae* y *P. eumusae* no se presentan diferencias significativas con respecto a la cantidad de proteínas secretadas, pero si se observa una disminución de proteínas totales, por lo que se puede inferir que la no disminución en la cantidad de proteínas secretadas garantiza el éxito infectivo de los hongos del complejo sigatoka y que probablemente la disminución en el contenido génico se debe a rearrreglos cromosómicos característicos en hongos (Koszul et al. 2004), la ausencia de una pérdida significativa de proteínas secretadas y SSPs (Figura 1-5) se puede atribuir a la presión de selección homogénea presente en las tres especies. Estas especies cohabitan las mismas áreas

geográficas y comparten los mismos hospederos, lo que contribuye a mantener la estabilidad en la expresión de estas proteínas. (Girard et al. 2013).

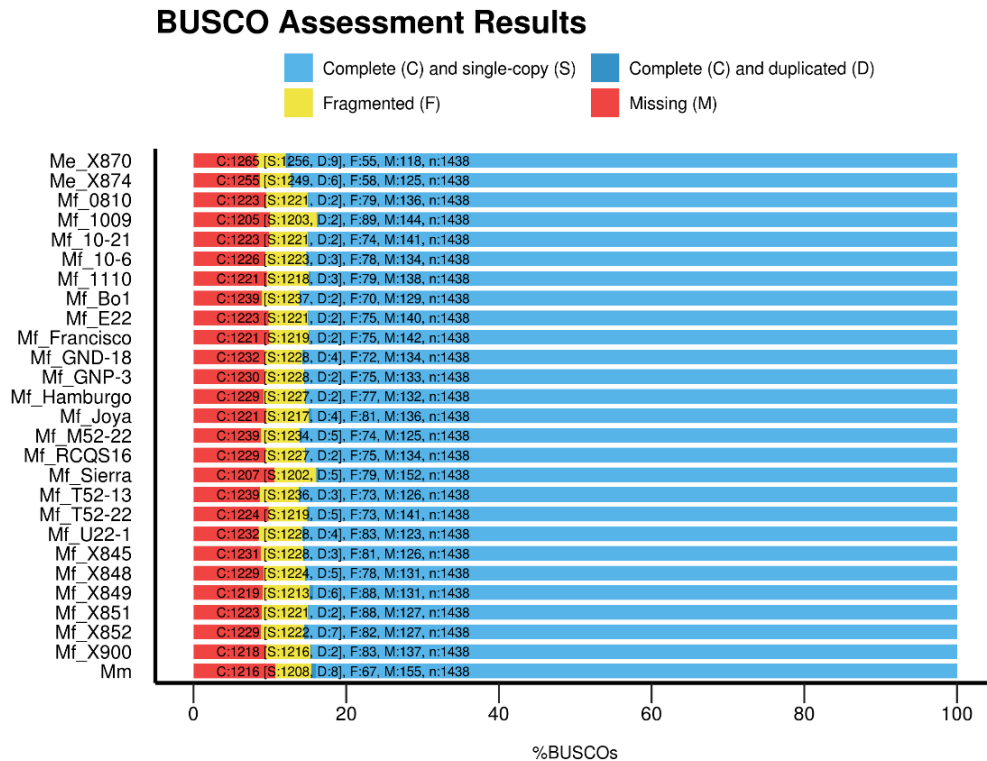
Figura 2-5: Resultados obtenidos de la anotación génica de los genomas del complejo sigatoka (panel izquierdo), comparado con la cantidad de proteínas de tipo SSP (Panel derecho).



2.3.6 Análisis de complejidad de los genomas ensamblados

Con el fin de determinar la calidad de los genomas ensamblados en términos de fragmentación y compleción, se evaluaron las proteínas predichas por MAKER mediante el pipeline BUSCO (Simão 2015), este análisis consiste en la comparación de los genes determinados contra una base de datos de genes denominados “core”, que son genes compartidos en todos los grupos taxonómicos y que para el caso de los hongos son 1438, la tasa de compleción de los genomas ensamblados se encontró entre el 86 y el 87 % (Figura 2-6), estos resultados son comparable con otros proyectos de secuenciación y son considerados como aceptables para el caso de genomas draft (Jauhal & Newcomb 2021).

Figura 2-6: Resultado de los análisis de completación de los genomas ensamblados mediante BUSCO.



2.3.7 Comparación de SSPs compartidas entre aislamientos

Con las secuencias para SSPs identificadas, se procedió a realizar un análisis para la determinación de ortogrupos, un ortogrupo se define como un posible gen que se comparte por todos o varios organismos diferentes, para este caso se identificaron ortogrupos dentro de los genes identificados como SSPs dentro de los 27 aislamientos del complejo sigatoka, identificando 8 ortogrupos (Tabla 3), con las secuencias de estos se procedió a realizar una búsqueda en las bases de datos internacionales (Genbank y ENA), encontrando correspondencia con genes importantes como el AVR4, gen reportado en la literatura como importante dentro del proceso infeccioso (Chen *et al.*, 2021), adicionalmente se encontró similitud con dos proteasas, enzimas que permitirían la degradación de las membranas celulares vegetales, además de encontrar una glucanasa, con función similar en términos de degradación de paredes celulares (Tabla 2-3).

Tabla 2-3. Ortogrupos compartidos por los 27 aislamientos complejo sigatokas correspondientes a proteínas secretadas.

<i>Orthogrupo</i>	<i>Resultado BlastP</i>	<i>% de Identidad</i>
OG01	carbohydrate-binding module family 14 protein [Pseudocercospora fijiensis CIRAD86]	97
OG02	hypothetical protein MYCFIDRAFT_80396 [Pseudocercospora fijiensis CIRAD86]	97
OG03	lytic transglycosylase [Cercospora zeina]	66
OG04	class 1 hydrophobin [Passalora fulva]	36
OG05	PR-1-like protein [Aureobasidium pullulans EXF-150]	57
OG06	putative exo-beta-1,3- glucanase [Aspergillus novofumigatus IBT16806]	32
OG07	acid proteinase [Grosmannia clavigera kw1407]	37
OG08	hypothetical protein MYCFIDRAFT_195371 [Pseudocercospora fijiensis CIRAD86]	86

2.4 Conclusiones

En resumen, el estudio realizado sobre el ensamble de genomas de aislamientos del complejo sigatoka utilizando diferentes programas de ensamblaje mostró que SPAdes fue el mejor ensamblador en términos de tamaño del ensamble, cantidad de scaffolds, N50 y tamaño del scaffold más largo. Los tamaños de los genomas de las especies fúngicas del complejo sigatoka variaron significativamente, lo que puede atribuirse a factores como la evolución, la reproducción y las condiciones ambientales; relacionándose con la cantidad de secuencias repetidas, específicamente LTR de clase I, las cuales presentaron variabilidad intraespecífica en las tres especies del complejo sigatoka, lo que sugiere su participación en el proceso evolutivo de especiación en el género *Pseudocercospora*.

El análisis filogenético reveló la existencia de cuatro grupos claramente diferenciados, con una relación geográfica entre los aislamientos provenientes de diferentes países y regiones productoras de banano. Esto sugiere la influencia de actividades antropogénicas similares y la posible relación con las fuentes de material vegetal utilizadas para el cultivo de banano.

La anotación y comparación de proteínas secretadas (SSPs) revelaron diferencias en la cantidad total de proteínas, pero no en la cantidad de proteínas secretadas, lo que sugiere una presión de selección homogénea en las tres especies del complejo Sigatoka. Además, se identificaron SSPs compartidas entre los aislamientos, algunas de las cuales están asociadas con genes clave para el proceso infectivo, como el gen AVR4.

En general, estos resultados proporcionan información valiosa sobre la variabilidad genética, las relaciones filogenéticas y las características genómicas del complejo sigatoka, lo que puede ser relevante para el desarrollo de estrategias de mejoramiento vegetal y el estudio de la interacción entre las especies de *Pseudocercospora* y las plantas de banano. Se encontraron diferencias significativas en el tamaño de los genomas de los aislamientos de *P. fijiensis* secuenciados, asociadas con la abundancia de regiones altamente repetitivas, fenómeno reportado en otros hongos ascomicetos. Se evidencia una separación clara del origen filogenético de los aislamientos de las dos principales zonas productoras de banano en Colombia, Urabá con relación con aislamientos de Centroamérica y Suramérica; Santa Marta con relación con aislamientos de africanos y de asiáticos. Se encontraron genes que pueden ser importantes en el proceso infectivo del hongo sobre plantas de banano, genes como las proteínas secretadas (SSPs), proteasas secretadas, hidrolasas e hidrofobinas; estos genes pueden ser empleados en posteriores estudios funcionales y de mejoramiento genético de variedades comerciales de banano.

Bibliografía

Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.

Arango, I. P., Beltrán, E. R., Cardona, A. S., & Isaza, R. E. A. (2003). Diagnóstico y caracterización molecular de aislamientos de *Mycosphaerella* sp. Provenientes de plantaciones de banano y plátano de diferentes regiones de Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 56(2), 1941-1950.

Arango Isaza, R. E., Diaz-Trujillo, C., Dhillon, B., Aerts, A., Carlier, J., Crane, C. F., ... & Kema, G. H. (2016). Combating a global threat to a clonal crop: banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (synonym *Mycosphaerella fijiensis*) genomes reveal clues for disease control. *PLoS genetics*, *12*(8), e1005876.

Arcila-Galvis, J. E., Arango, R. E., Torres-Bonilla, J. M., & Arias, T. (2021). The mitochondrial genome of a plant fungal pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (Mycosphaerellaceae), comparative analysis and diversification times of the Sigatoka disease complex using fossil calibrated phylogenies. *Life*, *11*(3), 215.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, *19*(5), 455-477.

Bebber, D. P. (2019). Climate change effects on Black Sigatoka disease of banana. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, *374*(1775), 20180269.

Boetzer, M., Henkel, C. V., Jansen, H. J., Butler, D., & Pirovano, W. (2011). Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics*, *27*(4), 578-579.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114-2120.

Bradnam, K. R., Fass, J. N., Alexandrov, A., Baranay, P., Bechner, M., Birol, I., ... & Korf, I. F. (2013). Assemblathon 2: evaluating de novo methods of genome assembly in three vertebrate species. *GigaScience*, *2*(1), 2047-217X.

Carreto, L., Eiriz, M. F., Gomes, A. C., Pereira, P. M., Schuller, D., & Santos, M. A. (2008). Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. *BMC genomics*, *9*(1), 1-17.

Chang, T. C., Salvucci, A., Crous, P. W., & Stergiopoulos, I. (2016). Comparative genomics of the Sigatoka disease complex on banana suggests a link between parallel evolutionary changes in *Pseudocercospora fijiensis* and *Pseudocercospora eumusae* and increased virulence on the banana host. *PLoS Genetics*, *12*(8).

Chen, L. H., Kračun, S. K., Nissen, K. S., Mravec, J., Jørgensen, B., Labavitch, J., & Stergiopoulos, I. (2021). A diverse member of the fungal Avr4 effector family interacts with de-esterified pectin in plant cell walls to disrupt their integrity. *Science advances*, *7*(19).

Chong, P., Vichou, A. E., Schouten, H. J., Meijer, H. J., Arango Isaza, R. E., & Kema, G. H. (2019). Pfcyp51 exclusively determines reduced sensitivity to 14 α -demethylase inhibitor fungicides in the banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. *Plos one*, *14*(10).

Churchill, A. C. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular plant pathology*, *12*(4), 307-328.

Ebimieowei, E., & Wabiye, Y. H. (2011). Control of black Sigatoka disease: Challenges and prospects. *African Journal of Agricultural Research*, *6*(3), 508-514.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, *32*(5), 1792-1797.

Galagan, J. E., Henn, M. R., Ma, L. J., Cuomo, C. A., & Birren, B. (2005). Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. *Genome research*, *15*(12), 1620-1631.

Garcia-Rubio, R., Monzon, S., Alcazar-Fuoli, L., Cuesta, I., & Mellado, E. (2018). Genome-wide comparative analysis of *Aspergillus fumigatus* strains: the reference genome as a matter of concern. *Genes*, *9*(7), 363.

- Gladyshev, E. (2017). Repeat-induced point mutation and other genome defense mechanisms in fungi. *The fungal kingdom*, 687-699.
- Girard, V., Dieryckx, C., Job, C., & Job, D. (2013). Secretomes: the fungal strike force. *Proteomics*, 13(3-4), 597-608.
- Gregory, T. R., & Hebert, P. D. (1999). The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. *Genome Research*, 9(4), 317-324.
- Hanada, R. E., Gasparotto, L., & Pereira, J. C. R. (2002). Sobrevivência de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes materiais. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 408-411.
- Hayden, H. L., Jean Carlier, and Elizabeth AB Aitken. "Genetic structure of *Mycosphaerella fijiensis* populations from Australia, Papua New Guinea and the Pacific Islands." *Plant pathology* 52.6 (2003): 703-712.
- Hunt, M., Kikuchi, T., Sanders, M., Newbold, C., Berriman, M., & Otto, T. D. (2013). REAPR: a universal tool for genome assembly evaluation. *Genome biology*, 14(5), 1-10.
- Jauhal, A. A., & Newcomb, R. D. (2021). Assessing genome assembly quality prior to downstream analysis: N50 versus BUSCO. *Molecular Ecology Resources*, 21(5), 1416-1421.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kozul, R., Caburet, S., Dujon, B., & Fischer, G. (2004). Eucaryotic genome evolution through the spontaneous duplication of large chromosomal segments. *The EMBO journal*, 23(1), 234-243.

Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., & Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics*, 9(4), 299-306.

Li, D., Liu, C. M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T. W. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, 31(10), 1674-1676.

Manzo-Sánchez, G., Orozco-Santos, M., Islas-Flores, I., Martínez-Bolaños, L., Guzmán-González, S., Leopardi-Verde, C. L., & Canto-Canché, B. (2019). Genetic variability of *Pseudocercospora fijiensis*, the black Sigatoka pathogen of banana (*Musa* spp.) in Mexico. *Plant Pathology*, 68(3), 513-522.

Mohanta, T. K., & Bae, H. (2015). The diversity of fungal genome. *Biological procedures online*, 17, 1-9.

Nadalín, F., Vezzi, F., & Policriti, A. (2012). GapFiller: a de novo assembly approach to fill the gap within paired reads. *BMC bioinformatics*, 13(14), 1-16.

Noar, R. D., Thomas, E., & Daub, M. E. (2022). Genetic characteristics and metabolic interactions between *Pseudocercospora fijiensis* and banana: Progress toward controlling black Sigatoka. *Plants*, 11(7), 948.

Noblecilla, C. J. C. I., & Batista, C. R. M. G. (2018). Efecto del uso predominante de fungicidas sistémicos para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella Fijiensis* Morelet) en el área foliar del banano. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(1), 128-136.

Ormerod, K. L., Morrow, C. A., Chow, E. W., Lee, I. R., Arras, S. D., Schirra, H. J., ... & Fraser, J. A. (2013). Comparative genomics of serial isolates of *Cryptococcus neoformans* reveals gene associated with carbon utilization and virulence. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3(4), 675-686.

Peng, Y., Leung, H. C., Yiu, S. M., & Chin, F. Y. (2012). IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*, 28(11), 1420-1428.

Petrov, D. A. (2001). Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *TRENDS in Genetics*, 17(1), 23-28.

Reuveni, M. (2021). Replacing Mancozeb with Tea Tree Oil-Based Timorex Gold for the Successful Control of Black Sigatoka and the Reduction of Chemical Load in Banana Plantations. *Industrial Biotechnology*, 17(5), 239-241.

Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210-3212.

Simpson, J. T., & Durbin, R. (2012). Efficient de novo assembly of large genomes using compressed data structures. *Genome research*, 22(3), 549-556.

Soares, J. M., Rocha, A. J., Nascimento, F. S., Santos, A. S., Miller, R. N., Ferreira, C. F., ... & Amorim, E. P. (2021). Genetic improvement for resistance to black Sigatoka in bananas: A systematic review. *Frontiers in plant science*, 12, 657916.

Stergiopoulos, I., Cordovez, V., Ökmen, B., Beenen, H. G., Kema, G. H., & De Wit, P. J. (2014). Positive selection and intragenic recombination contribute to high allelic diversity in effector genes of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of the black leaf streak disease of banana. *Molecular Plant Pathology*, 15(5), 447-460.

Taylor, J. W., Branco, S., Gao, C., Hann-Soden, C., Montoya, L., Sylvain, I., & Gladieux, P. (2017). Sources of fungal genetic variation and associating it with phenotypic diversity. *The Fungal Kingdom*, 635-655.

3. Capítulo 3: Análisis de los patrones de expresión de las proteínas secretadas relacionadas con la patogénesis durante una interacción incompatible entre *Musa* y *Pseudocercospora fijiensis*

3.1 INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra causada por el hongo ascomiceto *Pseudocercospora fijiensis*, es la enfermedad fúngica más importante en el cultivo del banano en todo el mundo, su control se basa principalmente en el uso de fungicidas químicos, incrementando los costos de producción hasta en un 30% (Kema, 2006), con el agravante de que estos productos pierden su efectividad a mediano plazo (Canas-Gutierrez et al., 2009; Cools 2013; Romero y Sutton, 1997). El estudio de la sigatoka negra se ha centrado en la búsqueda de metodologías de control mediante la gestión integrada de plagas y el entendimiento de la patología de la enfermedad en términos agronómicos; la especificidad de la interacción banano - *P. fijiensis* está descrita a nivel de especies para el patógeno y a nivel de cultivares para el hospedero. (Fullerton & Olsen, 1991, Salle *et al.*, 1989; Riveros A. E., 1992; Beveraggi et al 1993) representando un patrón de susceptibilidad que varía entre resistencia parcial (PR) y alta resistencia (HR) (Fouré, 1993). Con el uso de técnicas de biología molecular y genómica se puede lograr una comprensión más básica y profunda de la enfermedad, pero hasta la fecha son muy pocos los estudios genéticos reportados. Para entender como el hongo enferma la planta y como evade las defensas es necesario conocer aspectos básicos como la identificación de los genes que son responsables de la patogenicidad y virulencia, la variabilidad de estos genes, así como la capacidad de la planta de generar respuestas de defensa (Churchill, A. C. 2011).

Las interacciones planta-patógeno son una importante fuerza que moldea la diversidad entre los organismos. La mayoría de los estudios genéticos que relacionan la planta y el patógeno se enfocan en las interacciones gen-por-gen. En este tipo de interacción, la planta produce proteínas codificadas por genes de resistencia (genes R) que detectan factores de avirulencia o elicitores o proteínas efectoras producidas por el patógeno, codificadas por genes de avirulencia (genes Avr) causando la inducción de HR (Respuesta Hipersensible) y SAR (Resistencia Sistémica Adquirida). Durante estos dos tipos de respuestas se activa la transcripción de varios genes y en consecuencia se produce una serie de proteínas conocidas como proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Bishop et al 2000).

Dentro de los grupos de proteínas efectoras producidas por el hongo, se encuentran las Small Secreted Proteins o SSPs, proteínas relacionadas estrechamente con los procesos de patogénesis y que como característica importante poseen tamaños pequeños de no más de 300 aminoácidos, más de 4 residuos de Cisteína y la presencia de un péptido señal para proteínas secretadas (Stergiopoulos & de Wit 2009). Stergiopoulos en 2010 reportó la presencia de los efectores Avr4 y Ecp2 en *Pseudocercospora fijiensis* homólogos de *Cladosporium fulvum* (Stergiopoulos et al., 2010), los cuales han sido relacionado en la respuesta generada por el hongo a estrés biótico o abiótico (Stergiopoulos et al., 2014).

A pesar de la importancia que tienen los cultivos de banano y plátano a nivel mundial, la mayoría de los aspectos de la interacción son desconocidos. Con el desarrollo de los métodos en genómica, el análisis del transcriptoma y los análisis funcionales hoy en día es posible entender estos mecanismos de interacción a una velocidad mayor, lo que sin duda beneficiará a los productores y a la sociedad en general. Dentro del amplio estudio de este patosistema se pretende analizar la expresión génica de *P. fijiensis* en tres diferentes tiempos después de la infección de plantas de banano de la variedad Calcutta 4 y así poder identificar posibles genes candidatos determinantes de los procesos de patogenicidad y virulencia de *P. fijiensis*.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Se tomaron plantas de banano *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides* var. *calcutta* 4 (Musa AA) de 25 cm de alto, colectadas en la finca de la Universidad de Caldas, municipio de Palestina (Caldas), vereda Santágueda a 1110 m.s.n.m, las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero hasta obtener una altura de 30 cm y 3 meses de edad, momento en el que fueron utilizadas para infección con *P. fijiensis* (Torres et al 2013).

3.2.2 Material fúngico e inoculación de plantas de banano

A partir de plantas de banano naturalmente infectadas de la zona bananera de Urabá, se aisló un cultivo monoasporico referenciado con código 080930 según los procedimientos anteriormente descritos por Torres et al 2013, este aislamiento en particular tiene una alta virulencia y resistencia al propiconazol, con el cultivo purificado se procedió a preparar el inóculo en medio V8 (Campbell Soup Company, Camden, NJ, USA), suplementado con 0.2 g/L CaCO₃, necesario para la infección de las plantas de banano bajo condiciones controladas, (Sepúlveda et al., 2009). La inoculación se realizó con un aerógrafo, a una distancia aproximada de 20 cm por el envés de cada hoja. Se asperjó un volumen de 1 ml de solución de conidias por hoja (1×10^6 conidias por hoja) y se inocularon las 3 ó 4 primeras hojas de cada planta. Las plantas controles se inocularon con la solución de gelatina microbiológica al 2%, sin conidias. Las plantas se incubaron en la cámara a una temperatura constante de 29°C, humedad relativa del 95 % y un fotoperiodo de 12 h luz/12 horas oscuridad (Torres et al 2013).

3.2.3 Extracción de ARN

El ARN total fue extraído con el Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen) de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante, a partir de tejido foliar infectado bajo condiciones controladas de 4 diferentes tiempos: 0, 24, 72 y 144 Horas post infección (HPI) con *Pseudocercospora fijiensis*. Para la elaboración de las librerías de cDNA se utilizó el kit TransPlex Whole Transcriptome Amplification (Sigma, USA), utilizando las indicaciones del

fabricante. Para remover los residuos de cebadores y nucleótidos se usó el QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Alemania) según especificaciones del fabricante.

3.2.4 Diseño del microarreglo

Cada uno de los tiempos se realizó por triplicado para un total de doce microarreglos, tanto la síntesis de las sondas, hibridación del cDNA y lectura de la placa fue desarrollado por la compañía Roche Nimblegen ©. El diseño de las sondas se realizó con 14,872 secuencias de unigenes. Se seleccionaron las 4 mejores sondas por cada gen blanco y cada uno de estos se consideró como una réplica técnica del experimento.

3.2.5 Análisis del microarreglo

Los datos obtenidos del microarreglo fueron normalizados en la plataforma Subio (Subio Inc., Tokyo, Japan), empleando Subio Basic Plug-in versión 1.6, usando una baja señal de cutoff (mean raw signal < 100 para todos los tiempos), seguido de un análisis ANOVA para la identificación de los genes que se encuentran diferencialmente expresados. Además de esto se llevó a cabo la selección específica de proteínas SSPs, para ello a partir de la información obtenida del genoma de *P. fijiensis* (<http://genome.jgi-psf.org/Mycfi2/Mycfi2.home.html>), se realizó un filtrado para identificar el total de SSPs teniendo en cuenta las características básicas: secuencias con menos de 300 aminoácidos y con cuatro o más residuos de cisteína, además de identificar la presencia del péptido señal mediante la aplicación Signalp 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Con las SSPs identificadas se procedió a hacer la anotación, utilizando el programa Blast2Go (<http://www.blast2go.com/b2ghome>). La anotación se realizó en tres pasos: 1) BLAST para encontrar secuencias homologas; 2) MAPPING (Mapeo) para recuperar los términos y 3) GO y ANOTACION para seleccionar las funciones confiables.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Genes expresados durante la interacción incompatible *Musa - Pseudocercospora fijiensis*

Se encontraron un total de 726 genes de *P. fijiensis* expresados diferencialmente entre las 0 y las 144 horas post infección (HPI), al realizar la anotación funcional de estos genes, la mayor cantidad de genes están asociados a procesos metabólicos del hongo (187) seguido de genes asociados a procesos celulares (176), localización celular, regulación biológica y respuesta a estímulos (Figura 3-1). A partir del total de genes expresados diferencialmente se clasificaron en los tres tiempos de infección, encontrándose la mayor cantidad de genes expresados diferencialmente a las 72 HPI (308), momento clave en los procesos infectivos del hongo, la menor cantidad de genes se encontraron a las 24 HPI, momento en el cual se está iniciando el establecimiento y adaptación del hongo (Torres et al 2012), de los genes expresados diferencialmente se encontraron 12 genes codificantes para SSPs, algunos en más de uno de los tiempos estudiados (Tabla 3-1). Con el fin de realizar un análisis global de la relación de los datos del transcriptoma con los diferentes tiempos evaluados y determinar el efecto generado por la infección de *P. fijiensis* sobre las plantas resistentes de banano, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA), revelando cambios significativos en el transcriptoma del hongo causados por los procesos de interacción.

En general las muestras correspondientes a las 24, 72 y 144 HPI están muy separadas de la muestra correspondiente a las 0 HPI, se denotan claramente 2 grupos separados claramente de la expresión a 0 HPI, el primero de los grupos corresponde a 24 y 144 HPI, y todavía más separado se encuentra la expresión a 72 HPI (Figura 3-2A); al analizar el diagrama de Venn para relacionar los genes diferencialmente expresados en los tiempos analizados se encontró una serie de 43 genes expresados diferencialmente durante los tres tiempos posteriores a 0 horas (24, 72 y 144 HPI) (Figura 3-2B).

Figura 3-1: Análisis de genes diferencialmente expresados de primer nivel mediante Blas2go.

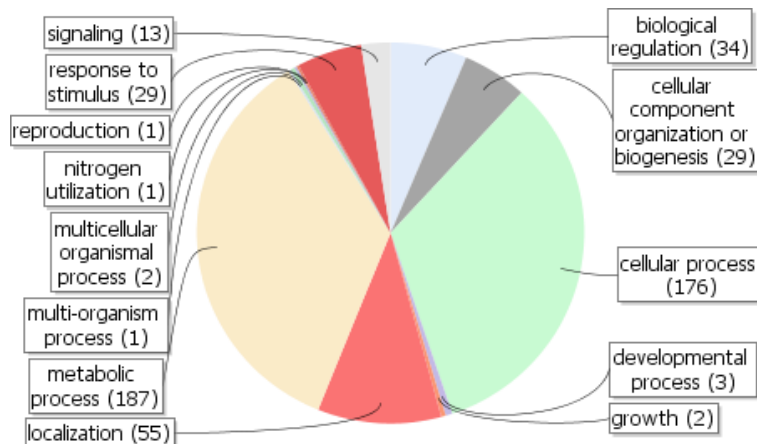
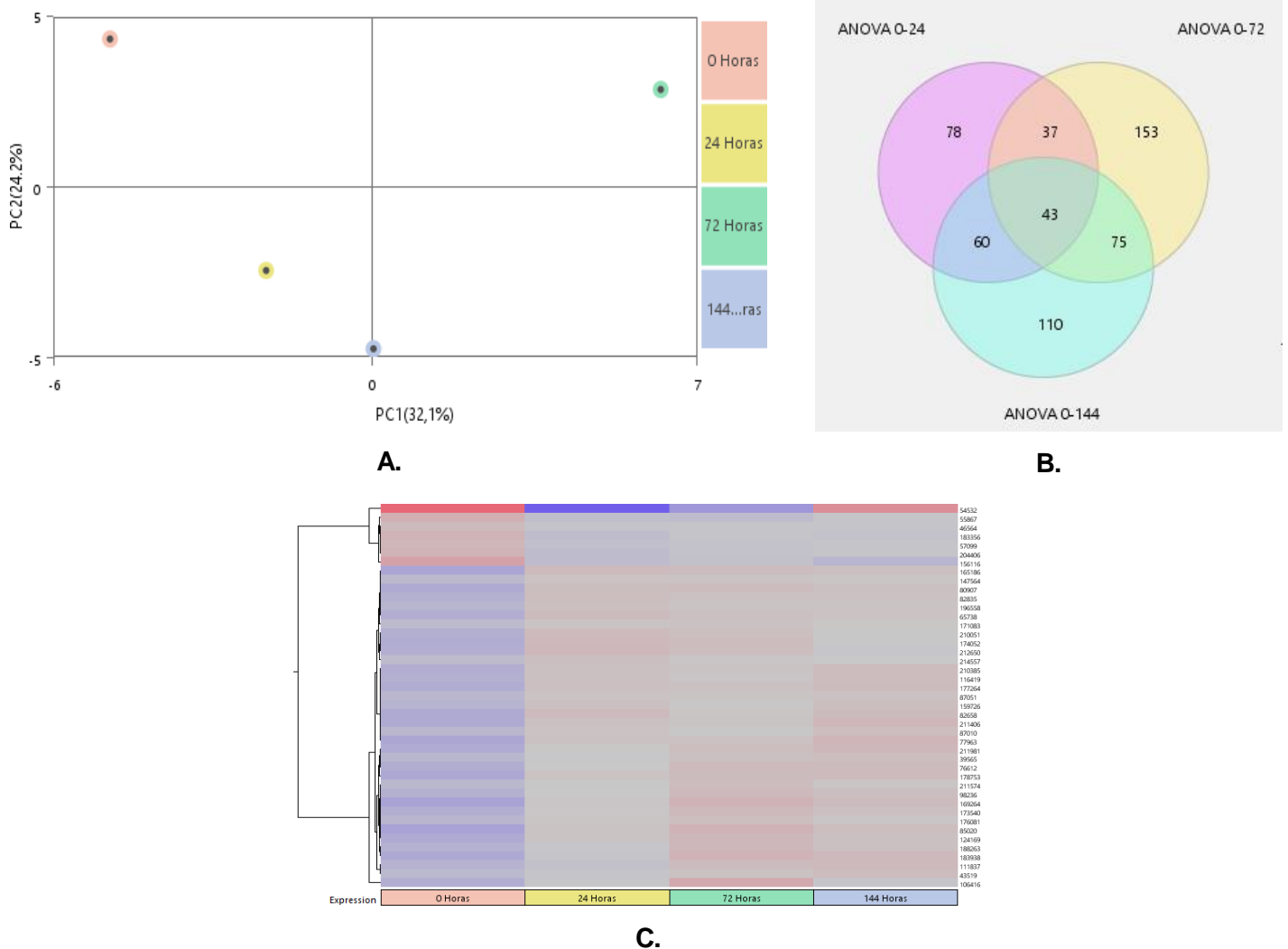


Tabla 3-1: Códigos de secuencias de SSPs de *P. fijiensis* que se encontraron diferencialmente expresados en el microarreglo.

24 Horas	72 Horas	144 Horas
SSP186	SSP222	SSP148
SSP085	SSP223	SSP186
SSP109	SSP149	SSP159
SSP070	SSP040	SSP133
		SSP040

De los 43 genes con expresión diferencial permanente para todos los tiempo analizados, se encontraron 7 genes subexpresados (Figura 3-2C), estos genes son de vital importancia, ya que en la interacción patógeno-hospedero se da una relación de gen a gen y si es posible determinar los genes que se encuentran apagados es posible explicar esta subexpresión debida a la acción de los mecanismos de defensa de una variedad resistente de banano, como lo es calcutta 4, dentro de los genes se encontraron cuatro genes con homología con potenciales efectores, uno de ellos es un homólogo de glutaminasa, un homólogo de una Serine/threonine-protein quinasa, una oxigenasa del tipo Oxoglutarate iron-dependent y una proteína asociada a el transporte retrogrado endosomal (Resultados no mostrados).

Figura 3-2: A. Análisis de componentes principales de los datos del microarreglo. Componentes principales (PCs) 1 y 2 para 32.1 y 24.7 % de la varianza, respectivamente. Rojo, *Pseudocercospora fijiensis* 0 HPI; Amarillo, *Pseudocercospora fijiensis* 24 HPI; Verde, *Pseudocercospora fijiensis* 72 HPI; Azul, *Pseudocercospora fijiensis* 144 HPI. B. diagrama de Venn para el análisis de los genes diferencialmente expresados en los 4 tiempos post infección, en la que se puede observar la cantidad de genes expresados en varios tiempos simultáneamente. C. Heatmap de los genes diferencialmente expresados en los 4 tiempos posinfección.



3.3.2 Anotación funcional y clasificación

De las 731 secuencias identificadas con expresión diferencial, se encontró que en un total de 337 se presentaron resultados de Blast y 347 fueron identificadas con anotación funcional (Figura 3-3A). En la búsqueda de dominios a través de INTERPROSCAN, del total de genes diferenciales de *Pseudocercospora fijiensis* durante la interacción incompatible, 526 presentan algún dominio característico (Figura 3-3B) (Anexo 1); de estas secuencias con resultado por INTERPROSCAN de genes con resultados en in detalladamente el 42,33 % corresponde a dominios (309), el 24,11 % a familias (176), 0,41 sitios activos (3), 0,41 para repeticiones de dominios (3) y un 0,27 % para binding sites (2) (Figura 3-4).

Figura 3-3: Resultados cuantitativos del análisis por BLAST2GO de los genes diferencialmente expresados identificados mediante la técnica de microarreglos en la interacción *Musa acuminata* – *Pseudocercospora fijiensis*. A. Blast; B. Interproscan.

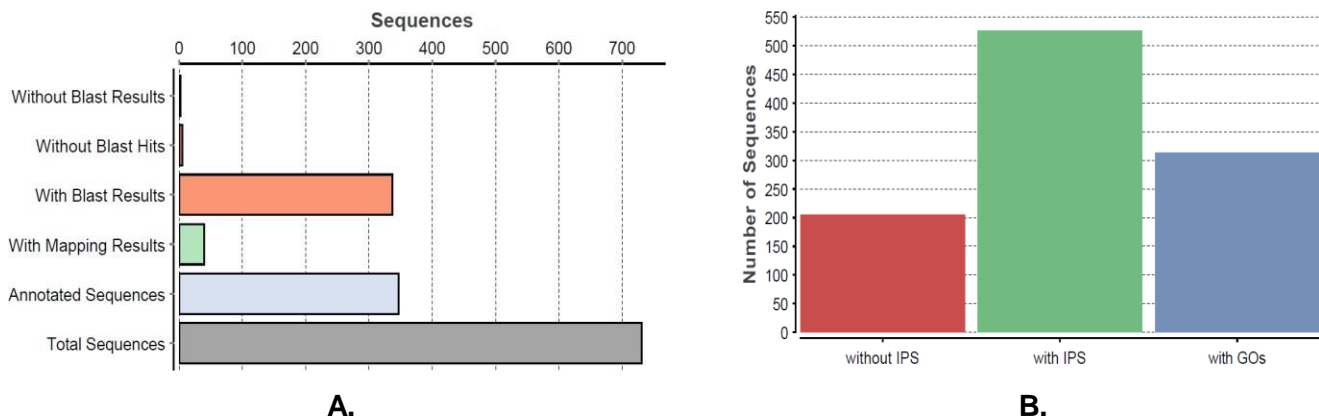
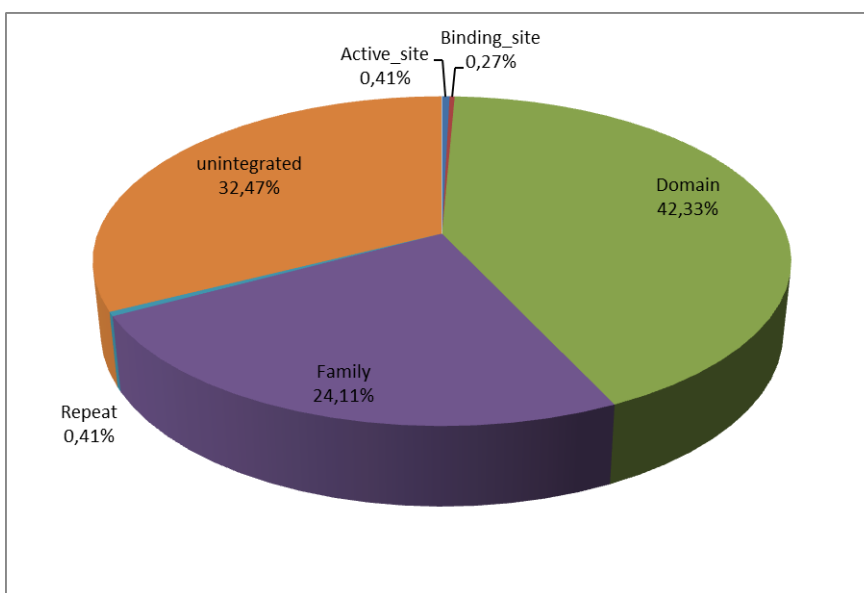
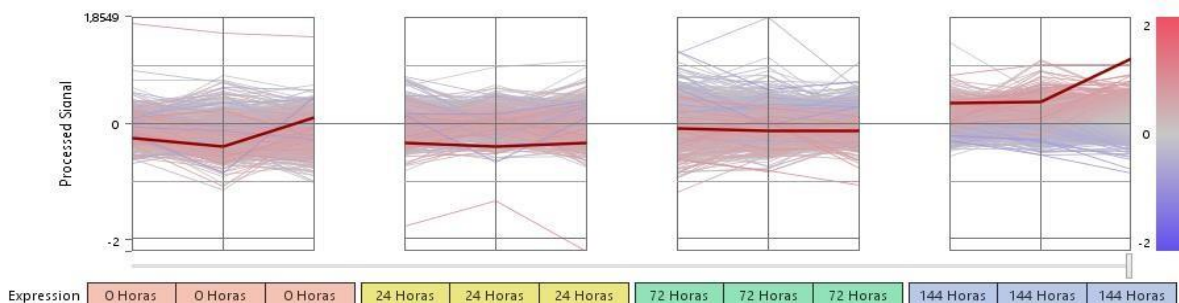


Figura 3-4: Distribución de los resultados cuantitativos por grupos del análisis por INTERPROSCAN en el programa BLAST2GO de los genes diferencialmente expresados identificados mediante la técnica de microarreglos en la interacción *Musa acuminata*–*Pseudocercospora fijiensis*.



La distribución en los diferentes tipos de familias dominios dio como resultado que de los genes diferencialmente expresados, la categoría más abundante es la correspondiente a genes unintegrated, seguidos de la familia del Citocromo P450 con 59 secuencias, este grupo de hemoproteínas han sido reportadas ampliamente en todos los grupos de seres vivos (Valencia-Quintana et al 2009), y para el caso particular de los hongos se han reportado casos en *Nectria haematococca* en el que proteínas de esta familia están relacionadas con la evasión de fitoalexinas de defensa en plantas (Valencia-Quintana et al 2009) y en otros casos se han reportado como claves en la resistencia a los triazoles (inhibidores de la demetilación del eburicol que es el sustrato de la enzima C₁₄ α demetilasa del citocromo P450 en la ruta metabólica de la síntesis de ergosterol en la membrana (Kuck y Vors, 2007), además de ello se han sugerido diferentes mecanismos de resistencia para los DMI como la pérdida de afinidad en el citocromo P450_{14DM}, defectos en el citocromo P450_{14DM} (Vicente 2006). Dentro de los genes diferencialmente expresados para esta familia llama la atención y es de interés la expresión tardía del gen CYP51A reportado por Canas-Gutiérrez et al en 2009, en el tiempo de 144 HPI (Figura 3-5).

Figura 3-5: Perfil de expresión del gen CYP51A de *Pseudocercospora fijiensis* durante la infección de plantas de *Musa acuminata* var. Calcutta 4 a diferentes tiempos de infección.



3.3.3 Identificación de genes asociados con el desarrollo de *P. fijiensis*

El análisis mediante Blast2Go, además de permitir la identificación de dominios característicos de familias génicas, permite la identificación por GenOntology de probables genes con funciones conocidas. En este proceso de los 726 genes diferencialmente expresados durante la interacción incompatible con tendencia la sobreexpresión tardía, se identificaron ocho posibles genes asociados con funciones como el desarrollo de ascosporas, desarrollo de pared celular, desarrollo de micelio y un gen asociado con patogénesis (Tabla 3-2).

Tabla 3-2: Genes asociados con el desarrollo del *Pseudocercospora fijiensis* identificados mediante microarreglos con expresión diferencial.

FUNCIÓN	CANTIDAD GENES	COD.
Desarrollo Ascosporas	1	Gen MF-DASC01
Pared Celular	2	Gen MF-DPCEL001 Gen MF-DPCEL002
Desarrollo de Micelio	4	Gen MF-DMC001 Gen MF-DMC002 Gen MF-DMC003 Gen MF-DMC004
Patogénesis	1	Gen MF-PAT001

3.4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las SSPs son proteínas pequeñas con menos de 200 aminoácidos y más de cuatro residuos de cisteína, además de la presencia de un péptido señal, han sido reportadas en varios patosistemas, con funciones variables desempeñando papeles importantes en las interacciones entre plantas y hongos como factores de virulencia muy comunes (Rep, 2005)

Entre los genes sub-expresados se encontró uno similar a glutaminasa-like, cuyo producto génico ha sido reportado como efector importante en el hongo dimorfo *Ustilago maydis*, junto a las proteínas disulphido Isomerasa y a una hidrolasa, se han encontrado sobre-expresadas después de la transición dimórfica y hasta el crecimiento filamentososo durante el desarrollo patogénico, ocurriendo esto por medio estimulación de la proteína de unión al GTP Rac1 (Böhmer et al. 2007; Bhadauria et al 2010). Estas proteínas han sido asociadas como activadores moleculares de diversos procesos, incluyendo la señalización celular, el tráfico vesicular y la organización del citoesqueleto. La sobreexpresión de estas proteínas se ha vinculado con el incremento de componentes necesarios para la construcción de la pared celular de las hifas (Mahlert et al., 2006). Este fenómeno podría estar directamente relacionado con interacciones compatibles. En el caso de incompatibilidad, los mecanismos de resistencia en Calcutta 4 podrían bloquear la expresión del gen glutaminasa-like. Esto podría limitar la estimulación de Rac1 y, por consiguiente, restringir el desarrollo de *P. fijiensis*, inhibiendo su crecimiento hifal adecuado. De manera conveniente se ha reportado que otro gen, codificante de una Serine/threonine-protein quinasa, tipo diverso de proteínas asociadas y dentro de ellas se han encontrado en el hongo filamentososo dimorfo *Neurospora crassa*, relacionadas con la regulación del crecimiento polarizado hifal, en el desarrollo sexual y asexual y en la interacción de células femeninas y masculinas en durante el apareamiento (Park, G. 2011); de esta manera se podría postular la idea de que en interacción incompatible *Musa - P. fijiensis* en la variedad Calcutta 4 se genera dentro de su respuesta, además de activar la respuesta hipersensible, se generan una serie de posibles factores de avirulencia que estén inhibiendo el desarrollo del patógeno por dos mecanismos, uno basado en la acción sinérgica de quitinasas y glucanasas en los primeros momentos de infección

contrarrestando el desarrollo del patógeno (Boller 1985; Torres et al 2012), y otro segundo mecanismo que estaría basado en la inhibición sistemática de proteínas dedicadas al desarrollo de nuevo micelio y restringiendo la reproducción del hongo y limitando la propagación de la enfermedad en el tejido foliar.

3.5 Conclusiones

Se pudieron determinar un total de 12 SSPs potenciales, los cuales podrían ser considerados como genes candidatos de importancia en los procesos de virulencia y patogenicidad de *P. fijiensis*. Adicionalmente se encontraron 7 genes candidatos asociados a los procesos de biogénesis de ascosporas, desarrollo de la pared celular y patogénesis, siendo claves a la hora de comprender la interacción *Musa - P. fijiensis*, ya que además de encontrar genes asociados con la inducción de muerte celular programada y con la activación de respuesta hipersensible, se encontró que otra estrategia puede estar fundamentada en la inhibición de rutas de señalamiento dirigidas hacia la síntesis de compuestos necesarios, para el desarrollo de las paredes celulares hifales. Además, se encontró una sobreexpresión tardía del gen *CYP51A*, gen importante en la resistencia de *P. fijiensis* a fungicidas azólicos. Es de vital importancia continuar con la evaluación de la funcionalidad de estos genes candidatos ya sea mediante el silenciamiento de estos genes o mediante la producción de nocaúts para estos genes y de esta manera confirmar su utilidad como blancos de control del patógeno que permitan el desarrollo de nuevas moléculas inhibitoras de las proteínas codificadas a partir de estos genes blanco.

Bibliografía

Álvarez, J. C., Rodríguez, H. A., Rodríguez-Arango, E., Monsalve, Z. I., & Arango, R. E. (2013). Characterization of a differentially expressed phenylalanine ammonia-lyase gene from banana Induced during *Mycosphaerella fijiensis* Infection. *Journal of Plant Studies*, 2(2), p35.

Bhadauria, V., Banniza, S., Wang, L. X., Wei, Y. D., & Peng, Y. L. (2010). Proteomic studies of phytopathogenic fungi, oomycetes and their interactions with hosts. *European journal of plant pathology*, 126(1), 81-95.

Beveraggi, A., X; Mourichon y G. Salle. (1993). Study of host-parasite interactions in susceptible and resistant bananas inoculated with *Cercospora fijiensis*, pathogen of black leaf streak disease. En: *Breeding Banana and Plantain for resistance to disease and pests*. J., Ganry, Editor., CIRAD, INIBAP: Montpellier, France., p 213- 220.

Bishop, JG; Dean, A.M; Mitchell-Olds, T. 2000. Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-patogen coevolution. En: *PNAS*. Vol. 97, No. 10. p 5322-5327.

Böhmer, M., Colby, T., Bohmer, C., Brautigam, A., Schmidt, J., & Boker, M. (2007). Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics*, 7, 675–685.

Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., & Vögeli, U. (1983). Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta*, 157, 22–31.

Cañas-Gutiérrez, G. P., Angarita-Velásquez, M. J., Restrepo-Flórez, J. M., Rodríguez, P., Moreno, C. X., & Arango, R. (2009). Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest management science*, 65(8), 892-899.

Churchill, A. C. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular plant pathology*, 12(4), 307-328.

Cools, H. J., Hawkins, N. J. and Fraaije, B. A. (2013), Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathology*, 62: 36–42. doi: 10.1111/ppa.12128

Foure, E. (1993). Characterization of the reactions of banana cultivars to *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in cameroon and genetic resistance. En: Breeding banana and plantain for resistance to disease and pests. (Ganry, J. ed) CIRAD, INIBAP, Montpellier, France. pp. 159-170.

Fullerton, R. A.; y Olsen T. L. Valmayor R. V.; Umali, B. E. y Bejosano C. P. (1991). Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. En: Banana Diseases in Asia and the Pacific. pp.105- 114. INIBAP, Montpellier.

Kema, G.H.J. (2006) The pesticide reduction plan for banana. In: Anais XVII Reunião Internacional ACORBAT (Soprano, E., Tcacenco, F.A., Lichtemberg, L.A. and Silva, M.C., eds), pp. 3–4. Joinville, Santa Catarina: Bananicultura: um negócio sustentável ACORBAT.

Kuck, H. K. and J. P. Vors.: “Sterol biosynthesis inhibitors,” in: Modern crop protection compounds. Fungicides vol 2. (Ed.) Krämer, W.; U. Schirmer. Wiley -Vch Verlag GmbH & Co., pp. 605-646, Alemania, 2007.

Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B., & Bölker, M. (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. Molecular microbiology, 59(2), 567-578.

Park, J., Lee, S., Choi, J., Ahn, K., Park, B., Park, J., ... & Lee, Y. H. (2008). Fungal cytochrome P450 database. BMC genomics, 9(1), 402.

Park, Gyungsoon, et al. Global analysis of serine-threonine protein kinase genes in *Neurospora crassa*. Eukaryotic cell, 2011, vol. 10, no 11, p. 1553-1564.

Rep, M. (2005). Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. FEMS microbiology letters, 253(1), 19-27.

Riveros, AE. (1992). Etude comparative de l'interaction hôte- parasite entre un cultivar sensible et un cultivar résistant a la cercosporiose noire du bananier. Faculte des Sciences Agronomiques de Gembloux: Belgique p77.

Romero, R. A., and T. B. Sutton. 1998. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of Black Sigatoka of banana, in Costa Rica. Plant Dis. 82: 931–934.

Rodriguez, H. A., Rodriguez, E., Falsarella, M., Mira, J. J., Kema, G. H. J., Arango, R. E., & Morales, J. G. (2013). Phytohormone modulation in *Musa Acuminata* during the interaction with the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. XX ACORBAT meeting, Fortaleza, Brazil, 09-13 September 2013

Sepúlveda, L., Vásquez, L. E., Paniagua, C. I., Echeverry, D., Hernández, C. A., Rodríguez, E., & Arango, R. (2009). The presence and spectrum of light influences the in vitro conidia production of *Mycosphaerella fijiensis* causal agent of black Sigatoka. Australasian Plant Pathology, 38(5), 514-517.

Stergiopoulos, I., & de Wit, P. J. (2009). Fungal effector proteins. Annual review of phytopathology, 47, 233-263.

Stergiopoulos, I., van den Burg, H. A., Ökmen, B., Beenen, H. G., van Liere, S., Kema, G. H., & de Wit, P. J. (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(16), 7610-7615.

Stergiopoulos, I., Cordovez, V., Ökmen, B., Beenen, H. G., Kema, G. H., & De Wit, P. J. (2014). Positive selection and intragenic recombination contribute to high allelic diversity in effector genes of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of the black leaf streak disease of banana. Molecular Plant Pathology, 15(5), 447-460.

Torres, J. M., Calderón, H., Rodríguez-Arango, E., Morales, J. G., & Arango, R. (2012). Differential induction of pathogenesis-related proteins in banana in response to *Mycosphaerella fijiensis* infection. *European journal of plant pathology*, 133(4), 887-898.

Valencia-Quintana, R., Sánchez-Alarcón, J., (2009). Gómez-Arroyo, S., Gómez-Olivares, J. L., & Kubiak, S. M. W. Los citocromos P450 en los 5 reinos de Margulis. *Ciencia en la frontera*,

Vicente, L. P. (2006). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka Negra en bananos: estado actual y perspectivas. *Control biológico*, 10(1), 55.

4. Capítulo 4: Evaluación funcional de genes codificantes para proteínas secretadas relacionadas con la patogénesis en *Pseudocercospora fijiensis*

4.1 INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*, es una de las principales enfermedades que afectan a los cultivos de banano y plátano en todo el mundo (Ploetz, R. 2000; Churchill A.C. 2011). A pesar de los esfuerzos realizados en el control de la enfermedad, esta sigue siendo una amenaza significativa para la producción de banano y representa un desafío constante para los agricultores y la industria. La comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la patogenicidad de *P. fijiensis* es esencial para el desarrollo de estrategias de control más efectivas y sostenibles. En este sentido, el estudio de los genes de patogenicidad se ha convertido en un área de investigación fundamental para abordar este problema (Weld et al. 2006).

Los estudios de genética en *P. fijiensis* han permitido identificar y caracterizar diversos genes relacionados con su patogenicidad y virulencia (Noar & Daub 2016a, Rodríguez et al. 2016; Noar & Daub 2016b). Se ha descubierto que varios genes codifican enzimas clave involucradas en la degradación de la pared celular de la planta huésped, lo que facilita la entrada del hongo en los tejidos vegetales (Stergiopoulos et al. 2010; Kantún-Moreno et al. 2013; Rodríguez-García et al. 2016). También se han identificado genes que codifican toxinas y proteínas que suprimen las defensas del huésped, permitiendo que el patógeno evite la respuesta inmune y se establezca con éxito (Portal et al. 2011). Estos hallazgos han proporcionado información valiosa sobre los mecanismos moleculares que *P. fijiensis* emplea para colonizar y causar daño en las plantas, lo que puede abrir nuevas

oportunidades para desarrollar medidas de control dirigidas específicamente a estos genes y proteínas.

La genética funcional ha desempeñado un papel fundamental en la comprensión de la biología de los organismos, y en particular, en el estudio de hongos, uno de los grupos más diversos en todos los seres vivos (Weld et al. 2006; Meyer V. 2008). Por lo tanto, el estudio de la función de los genes en hongos mediante la generación de nocaouts se ha convertido en una estrategia poderosa y esencial para descubrir las funciones específicas de los genes y su impacto en la biología fúngica. El enfoque principal de esta investigación se centra en la generación de nocaouts de *P. fijiensis* mediante la transformación fúngica mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, una técnica que permite interrumpir o eliminar específicamente la función de un gen en un organismo. La generación de nocaouts en hongos plantea desafíos únicos debido a su variabilidad morfológica, diversidad reproductiva y complejidad genética. Por lo tanto, se deben adaptar cuidadosamente estas estrategias a cada especie fúngica particular para obtener resultados confiables y significativos.

Además, la comprensión de los mecanismos de patogenicidad en hongos patógenos puede allanar el camino para el desarrollo de estrategias de control más eficientes y sostenibles para proteger los cultivos y la salud humana. El conocimiento adquirido a través de esta investigación será fundamental para abordar los desafíos globales relacionados con la sostenibilidad, la salud y la seguridad alimentaria en un mundo en constante cambio.

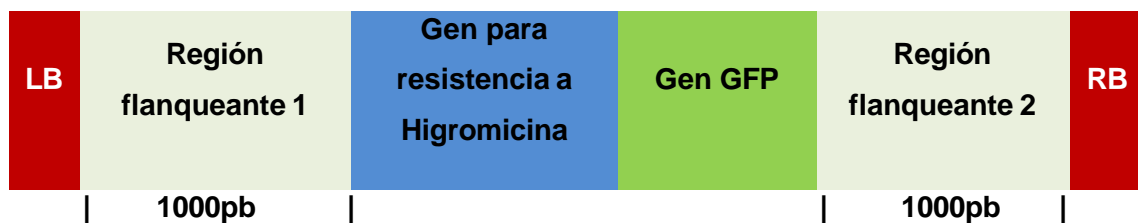
4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Construcción de vectores de transformación para *M. fijiensis*

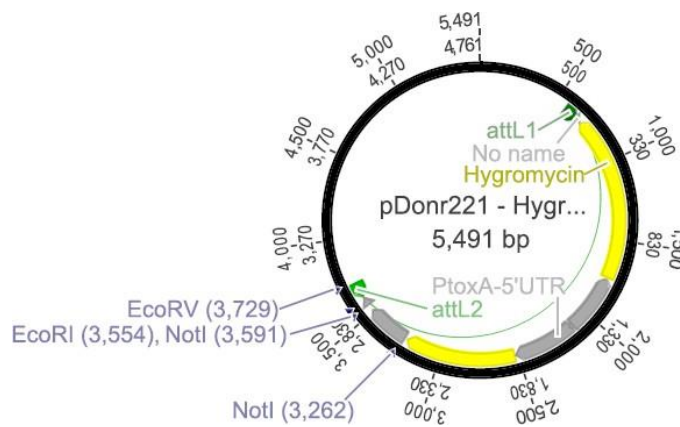
Para el análisis de funcionalidad de los genes que han sido planteados como candidatos importantes en el proceso de patogenicidad, es necesario el desarrollo de organismos con variantes anómalas del gene (nocaouts). La modificación en el microorganismo se da por

la inserción de material genético exógeno mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, microorganismo empleado en el desarrollo de plantas genéticamente modificadas y del cual se ha demostrado efecto similar sobre hongos filamentosos). Para la construcción de los vectores de transformación se empleó el sistema de clonación MultiSite Gateway® Pro Plus (Life Technologies), este sistema difiere de los sistemas convencionales que emplean enzimas de restricción en que la clonación se basa en la recombinación sitio específica del fago lambda. El vector de transformación contiene dos regiones de mil pares de bases flanqueantes a la región codificante del gene de interés, entre las dos regiones se encuentra un casete que otorga resistencia a higromicina y un gene de expresión de proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 4-1).

Figura 4-1: Estructura general del casete de transferencia para el desarrollo de nocauts de "*P. fijiensis*"



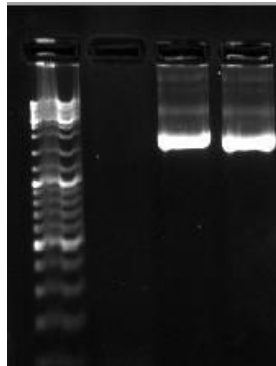
El casete que confiere resistencia a higromicina y que expresa la GFP fue obtenido en cooperación con la Universidad de Wageningen en el vector denominado pDONR 221 GFP-HYG; estos genes se encuentran flanqueados por las secuencias attL1 y attL2 (Figura 4-2), secuencias de reconocimiento para la clonación por recombinación, pero que difieren del sistema Gateway Pro, por esta razón se hizo necesario modificar por los extremos attL4 y attL3, esto se hizo mediante el diseño de primers específicos adaptados en sus extremos 3' con la secuencia de los extremos, el diseño de estos primers se llevó a cabo por medio del software online Primer3Plus (Tabla 4-1).

Figura 4-2: Diagrama esquemático del vector pDONR 221 GFP-HYG.**Tabla 4-1:** Primers diseñados para el reemplazo de los extremos attL1 y attL2 por los extremos attL4 y attL3.

Primer Forward (Pro-Hyggfp-FOR)	Primer Reverse (Pro-Hyggfp-REV)
5- GGG GAC AAC TTT TCT ATA CAA AGT TGT AGG TAC CGG GCC CCC CCT CGA GGT CGA -3	5- GGG GAC AAC TTT ATT ATA CAA AGT TGT TGG AGC TCC ACC GCG GTG GCG GCC GCT CTA -3

Posteriormente se realizó la amplificación por PCR del casete contenedor de los genes GFP y de resistencia a higromicina con los primers anteriormente descritos y empleando una DNA polimerasa de alta eficiencia (Platinum® Taq DNA Polimerasa - Invitrogen™). El programa de amplificación fue como se describe a continuación: desnaturalización inicial a 95°C por 1 minuto, seguido de 15 ciclos que inician con una desnaturalización por 30 segundos, anillamiento de primers a 65°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por tres minutos; finalmente se hace una extensión a 72°C por 10 minutos y finalmente se visualizó el producto en un gel de agarosa al 1% (Figura 4-3).

Figura 4-3: Amplificación por PCR del casete contenedor del gene de resistencia a higromicina y de expresión de GFP para su uso en el sistema de clonación MultiSite Gateway® Pro Plus.

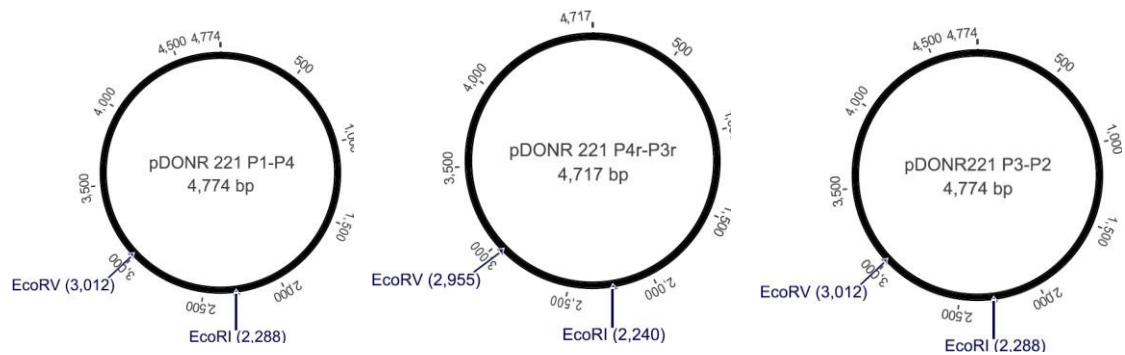


4.2.1.1 Clonación de secuencias flanqueantes

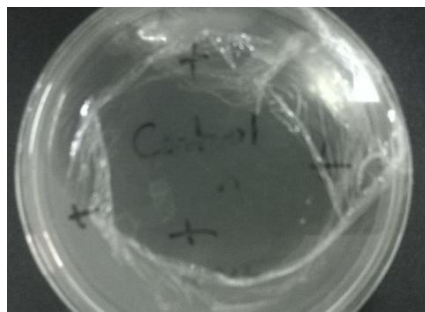
Paralelamente se realizó la clonación de los vectores portadores de las regiones flanqueantes del gene de interés. Estos vectores están denominados como pDONR 221 P1-P4 y pDONR 221 P3-P2 (Figura 4-4A). Estos vectores solo pueden ser clonados en la cepa de *E. coli* con características de *ccdB* survivor, el cual le permite sobrevivir en presencia del gene letal *ccdB*. La transformación bacteriana de *E. coli* se realizó por choque térmico, proceso que requirió de la bacteria electrocompetente tratada con cloruro de calcio. Un volumen de 50 microlitros de bacteria *E. coli* electrocompetente fue mezclada con 3 microlitros del plásmido y puesta en hielo por media hora y posteriormente incubada por 40 segundos a 42°C, tiempo después se transfirió el tubo a hielo por 5 minutos, seguido a la adición de 250 ml de medio SOC y puestos en incubación a 37°C por 1 hora. Finalmente, las bacterias son plateadas en medio LB sólido suplementado con kanamicina (50mg/L) por 24 horas, hasta la formación de colonias (Figura 4-4B). Se logró realizar la clonación de los vectores necesarios y con ellos se puede realizar la inserción de las secuencias de interés.

Adicionalmente a la amplificación del casete GFP-HYG con los terminales attL4 y attL3, se procedió al diseño de primers específicos para las regiones flanqueantes de los genes codificantes para la Scytalon deshidratasa y la SSP 85220 (Tabla 4-2), que contienen las secuencias de reconocimiento attL1, attL4, attL3 y attL2, necesarios para la construcción de los vectores finales de transformación.

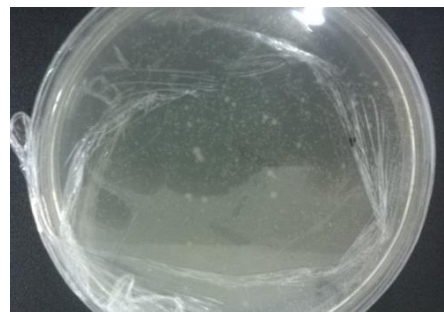
Figura 4-4: A. esquema de los vectores de clonación de kit MultiSite Gateway® Pro Plus clonados en *E. coli*; B. resultado de la transformación bacteriana de *E. coli* con los vectores de clonación para el kit MultiSite Gateway® Pro Plus.



A.



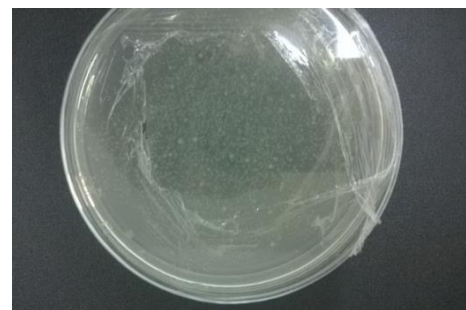
Control de transformación



pDONR 1-4



pDONR 4-3



pDONR 3-2

B.

Tabla 4-2: Primers diseñados para la clonación de las regiones flanqueantes de los genes codificantes de la Scytalon deshidratasa y la SSP 85220.

PRIMERS CLONACIÓN GATEWAY

MF85520L-For 5- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AGC ATT GCT GAC GGT CAT TC -3

MF85520L-Rev 5- GGG GAC AAC TTT GTA TAG AAA AGT TGG GTG GGT GTG TCG GAG GAT GAA GT -3

MF85520R-For 5- GGG GAC AAC TTT GTA TAA TAA AGT TGT AAC TAC ACT ACA CTA CGT CTG GAG GAA -3

MF85520R-Rev 5- GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT GCG CCT TCT GAT CAA GAC C -3

MFSDL-For 5- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT AAG ACT GTC GAG TAA TAC AGT TGG A -3

MFSDL-Rev 5- GGG GAC AAC TTT GTA TAG AAA AGT TGG GTG GCG GTA GTC TGT GGT GAT GT-3

MFSDR-For 5- GGG GAC AAC TTT GTA TAA TAA AGT TGT ACA AAT CAA CCC AGC TTT TCG-3

MFSDR-Rev 5- GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TTC GTG AGC AGA GAG AAG CA -3

Con el casete GFP-HYG previamente amplificado se procedió a realizar la clonación en el vector pDONR 221 P4-P3. Dicha clonación se realizó mediante una reacción de recombinación BP, la cual emplea a la enzima Clonasa BP II y una incubación a 25°C por una hora. Posteriormente se llevó a cabo la transformación de *E. coli* por medio de choque térmico, repitiendo el procedimiento mencionado con anterioridad. El sistema de clonación permite seleccionar las colonias transformadas fácilmente, ya que son las únicas que crecen en el medio PDA suplementado con kanamicina, debido a la pérdida del efecto del gene letal *ccdB*, la transformación fue positiva y se obtuvo un gran número de colonias (Figura 4-5), que deben ser confirmadas por digestión con enzimas de restricción y PCR con primers específicos para los genes HYG y GFP (Figura 4-6). Para confirmar mediante PCR se hizo necesario realizar la extracción de ADN plasmídico de las colonias de *E. coli* transformadas. Para ello se cumplió con el protocolo de mini preparación de plásmidos, que consiste en el tratamiento con SDS y NaOH, el cual rompe las células bacterianas; luego con la adición del acetato de potasio se cierra covalentemente el DNA plasmídico, mientras que el DNA cromosomal y las proteínas son atrapadas en un complejo formado entre el potasio y el SDS, de modo que estas se precipitan y el DNA plasmídico queda en el sobrenadante.

Figura 4-5: Resultados de la clonación del casete GFP-HYG previamente amplificado en el vector pDONR 221 P4-P3

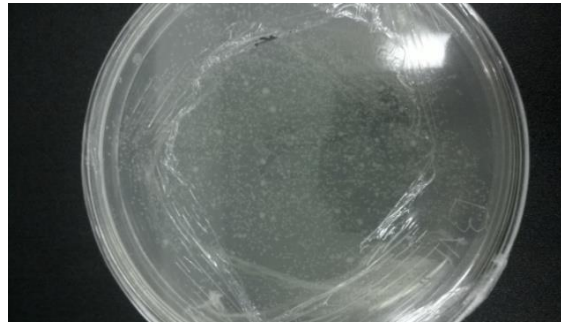


Figura 4-6: A. Primers diseñado para la confirmación del casete GFP-HYG en el vector pDONR 221 P4-P3. B. Diagrama de ubicación de los primers de confirmación del casete GFP-HYG.

PRIMER CONFIRMACIÓN

M13 Forward 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

M13 Reverse 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

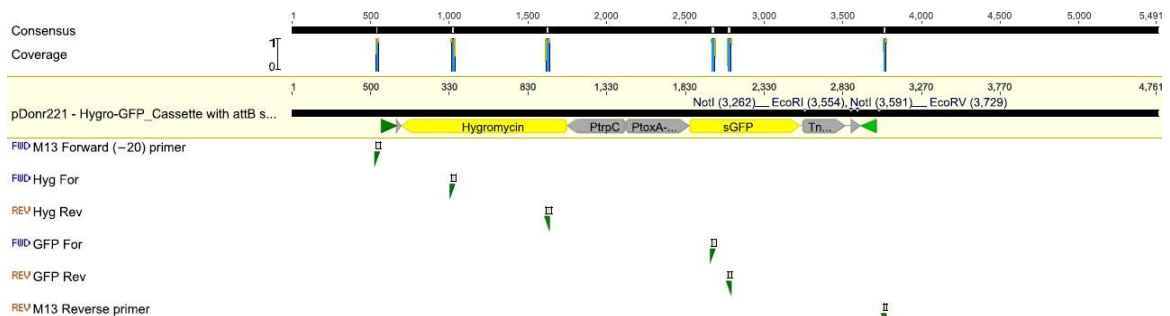
hphF5' CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3

hphR5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3'

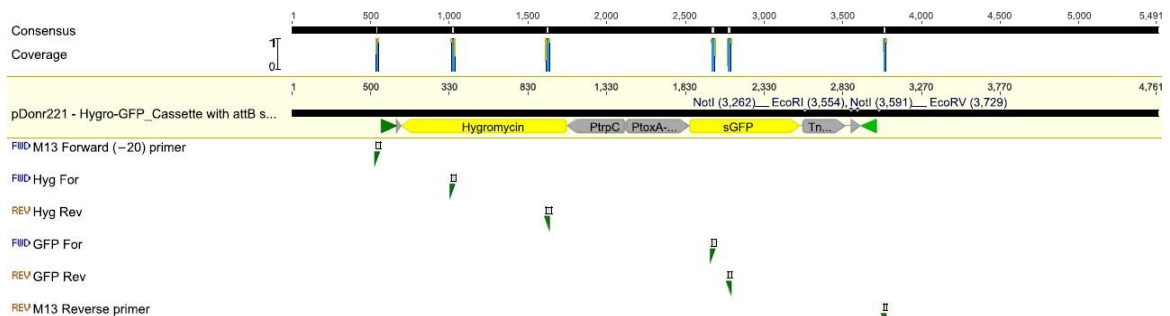
Q-GFP-F 5'-AGCTGACCCTGAAGTTCATCTG-3'

Q-GFP-R 5'-AAGTCGTGCTGCTTCATGTG-3'

A.



B.



Con los tres vectores generados por recombinación mediante Gateway: pPGW-GFP-HYG, pPGW-GFP-HYG-85220 y pPGW-GFP-HYG-SD, se procedió con la transformación bacteriana de *E. coli* mediante choque térmico, obteniéndose colonias transformadas para los tres vectores (Figura 4-7), posteriormente se realizó la extracción del ADN plasmídico de estas colonias bacterianas (Figura 4-8), se obtuvo material de buena calidad que fue empleado para su confirmación por PCR empleando los primers GFP, HYG y M13.

4.2.2 Desarrollo de nocaouts de *P. fijiensis* para genes relacionados con la patogenicidad

Con el fin de determinar la funcionalidad de los genes que han sido determinados mediante los análisis preliminares (secuenciación de genes y análisis de selección molecular) se adelantan ensayos que permitan la generación de nocaouts de *P. fijiensis*. La metodología empleada consiste en la transferencia genética de una versión anómala de un gen de interés, la cual será integrada al genoma del hongo por recombinación homóloga; la versión anómala es insertada por medio de *Agrobacterium tumefaciens*, microorganismo que ha sido ampliamente usado en la transformación genética de plantas. Los ensayos que se han adelantado han sido realizados con los vectores generados anteriormente (Tabla 4-3)

Tabla 4-3: Vectores generados que han sido empleados en los ensayos de generación de nocaouts de *P. fijiensis*.

Vectores
pPGW-GFP-HYG
pPGW-GFP-HYG-85220
pPGW-GFP-HYG-SD

Figura 4-7: Colonias bacterianas transformadas con los vectores de transformación para *P. fijiensis*.

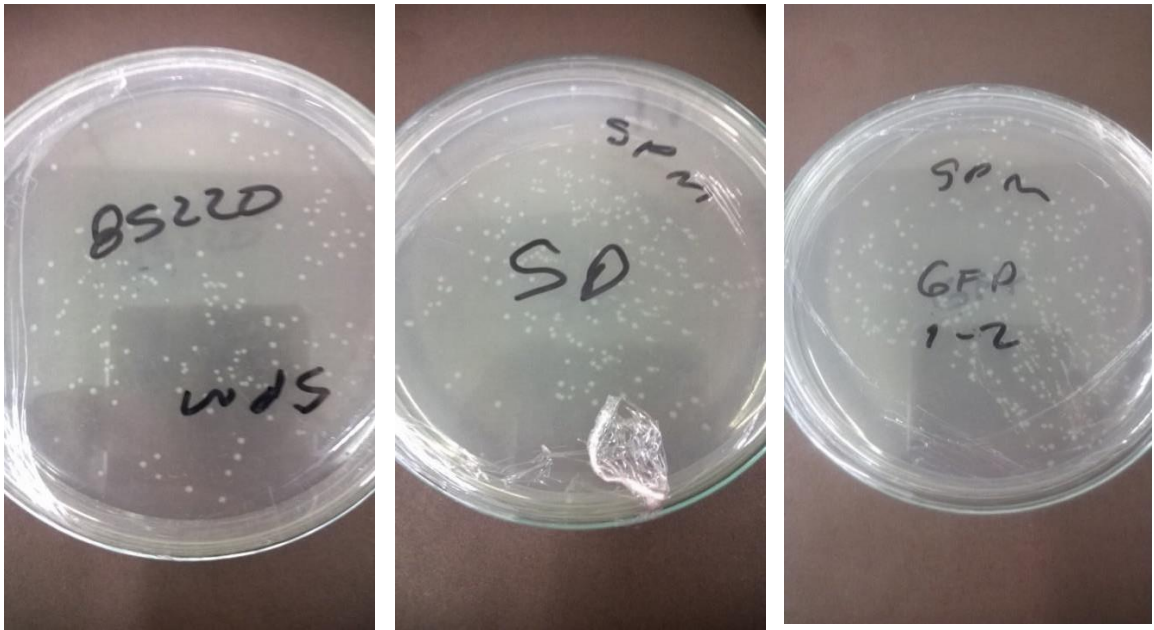
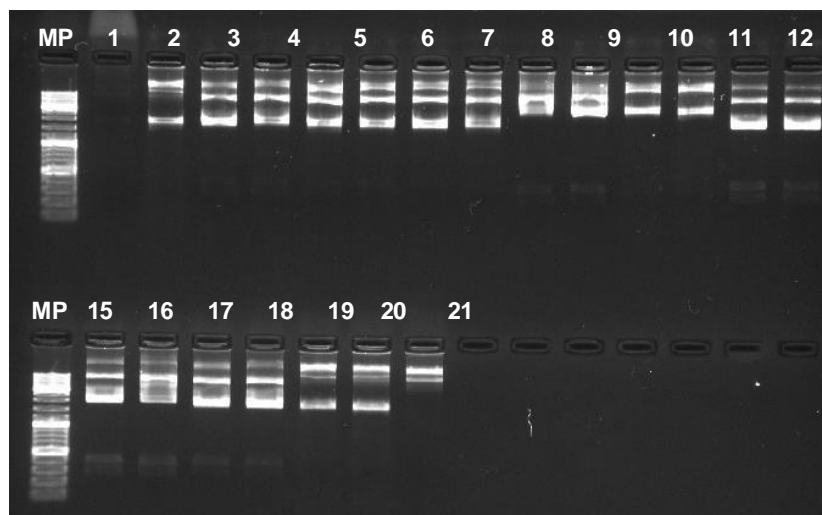


Figura 4-8: Extracción de ADN plasmídico de bacterias transformadas.

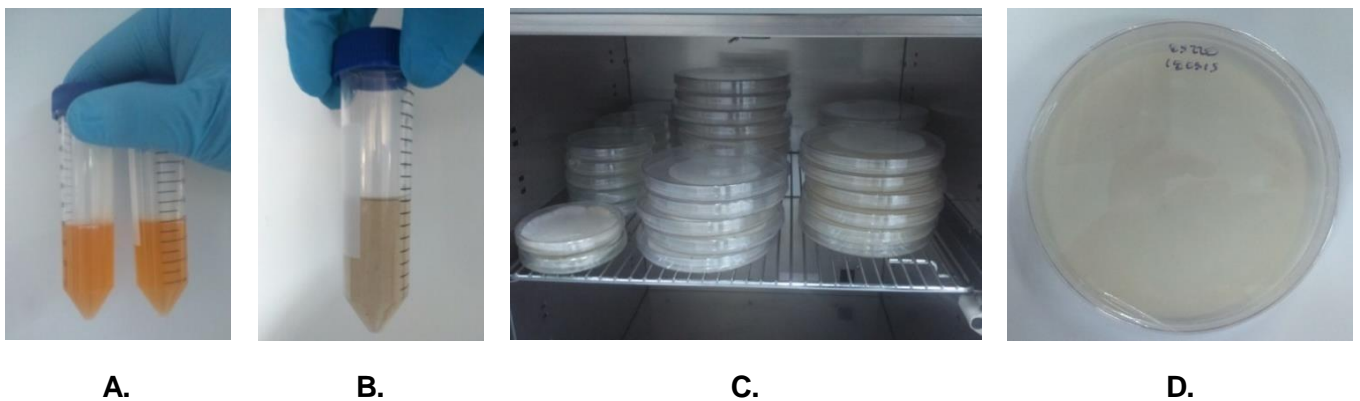


Para el primer ensayo se empleó el método suministrado por el Dr. Rafael Arango. Según este método, las cepas de *Agrobacterium* transformadas con los vectores de interés fueron cultivadas en medio PDA sólido suplementado con Rifampicina (50 mg/L) y Espectinomicina (100 mg/L) a 28 °C por 48 horas, posteriormente se tomó una colonia y se repicó en medio LB líquido suplementado con Rifampicina y espectinomicina en las concentraciones anteriormente indicadas por 48 horas a 28°C y a 200 rpm en una incubadora orbital. Luego de la incubación el cultivo fue centrifugado a 2800 rpm por 12 minutos y el medio de cultivo fue retirado; se adicionaron 20 ml de medio mínimo (MM) suplementado con los antibióticos de selección y se permitió nuevamente una incubación por 40 horas a 28°C y a 200 rpm. Al día siguiente se realizó un raspado superficial con un pincel de cerdas finas en cultivos de *P. fijiensis* de no más de 14 días de sembrado. El micelio fue resuspendido en medio de inducción (IM) para luego ser filtrado por dos membranas de gasa estéril.

El filtrado fue puesto en incubación por 24 horas a 28°C y a 150 rpm; tiempo después, se retiró de la incubadora y se preparó para el co-cultivo. El cultivo de *A. tumefaciens* que había sido puesto dos días atrás fue cuantificado hasta ajustar una OD₆₀₀ de 0.15, la concentración se ajustó con medio IM. Posteriormente, el cultivo fue puesto en incubación hasta obtener una OD₆₀₀ de 0.3; posteriormente, se mezclaron el cultivo de *Agrobacterium* y la suspensión miceliar en una proporción 1:1 vol/vol. La mezcla se puso en el vortex por 40 segundos, la solución resultante fue plateada en membranas de nylon, puestas en cajas de medio IM sólido sin suplementación, en oscuridad por 48 horas a 28 °C. Luego, las membranas fueron transferidas a cajas de Petri con medio PDA suplementado con Higromicina (50 mg/L) y cefotaxime (200 mg/L). El resultado fue evaluado luego de 15 y 30 días (Figura 4-9). Las colonias regenerantes fueron transferidas a medio PDA suplementado con Higromicina y posterior a 10 días de crecimiento fueron observados en el microscopio de fluorescencia Microscopio Fluorescencia Zeiss Axioplan 2 Imaging MOT y confirmados por PCR, para ello se extrajo ADN genómico de todos los eventos de transformación obtenidos para los dos genes mediante la metodología de extracción directa, la que consiste en macerar 50mg de micelio en 50 microlitros de agua ultrapura, para posteriormente centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto, para las reacciones de PCR se tomaron 3 microlitros del sobrenadante por reacción. Se procedió a realizar la

amplificación por PCR con los primers 85220-conf y SD-conf, con el programa de amplificación tal y como se describe a continuación: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos que inician con una desnaturalización por 30^o segundos, anillamiento de primers a 62°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por un minuto; finalmente se hace una extensión a 72°C por 10 minutos, los resultados de la amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1% empleando GelRed como agente intercalante;

Figura 4-9: Proceso de generación de nocaouts de *P. fijiensis*. A. Inoculo de *A. tumefaciens*; B. Suspensión miceliar; C. Co-cultivo; D. Regeneración.



4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Confirmación de colonias transformadas

Con las primeras colonias obtenidas a partir de la transformación con los vectores modificados, la extracción permitió la obtención de buena cantidad de ADN plasmídico de todas las colonias evaluadas (Figura 4-10). Posteriormente se confirmó por medio del corte con enzimas de restricción, generando fragmentos de 319 y 1425 pb (Figura 4-11).

Figura 4-10: Observación en gel de agarosa al 1% del ADN plasmídico de las colonias de *E. coli* transformadas con el vector pDONR 221 HYG-GFP PRO.

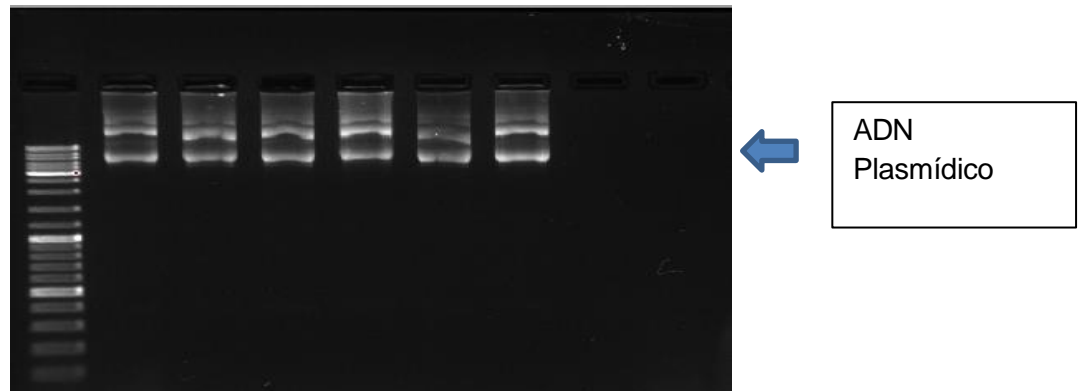
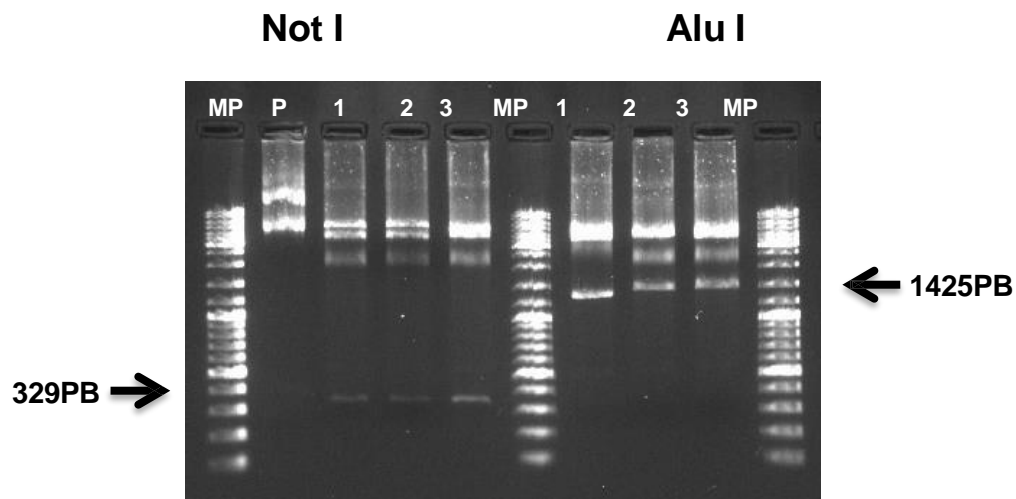


Figura 4-11: Confirmación por enzimas de restricción (NotI y AluI) de ADN plasmídico.



4.3.2 Ensayo de nocaouts de *P. fijiensis* para los genes 85220 y Scytalone deshidratasa

Con estos vectores se dio la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* del aislamiento C86, de esta transformación se obtuvieron 296 eventos de transformación en total para los dos genes, 152 para el gen SD y 144 para el gen 85220 (Figura 4-12). Estos eventos de transformación fueron transferidos a medio PDA fresco suplementado con higromicina (50mg/L) y observados mediante microscopia de fluorescencia para conocer la expresión del gen reportero codificante para proteína verde fluorescente (Figura 4-13).

Figura 4-12: Resultados de la transformación de *P. fijiensis* para la obtención de nocaouts para los genes SD y 85220.

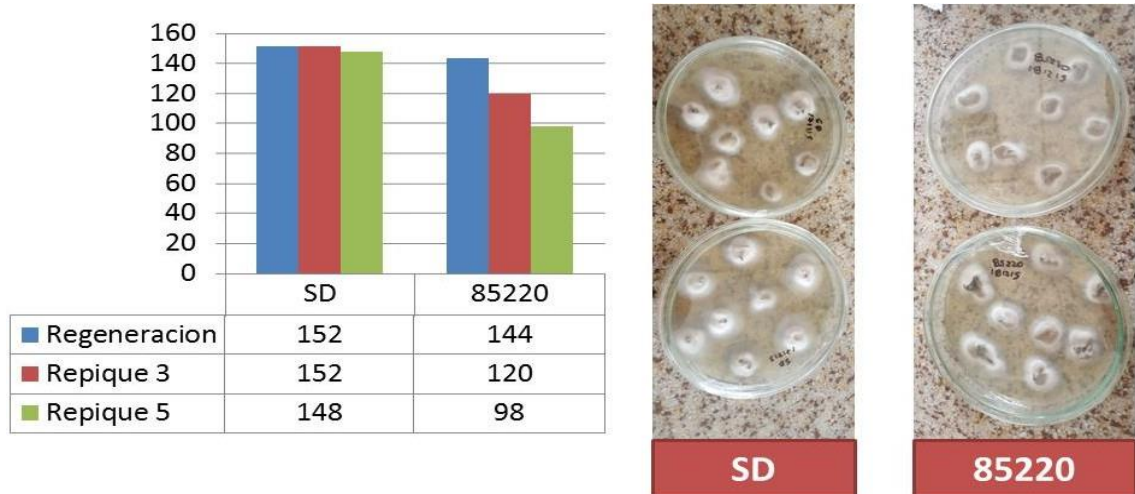
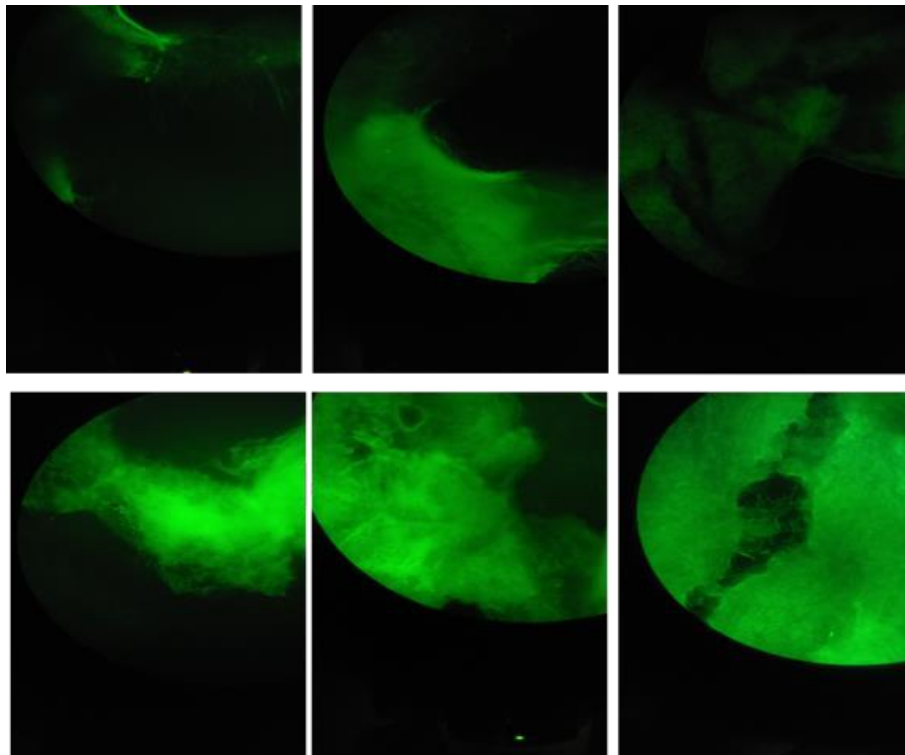


Figura 4-13: Observaciones en microscopio de fluorescencia de los eventos de transformación obtenidos en la generación de nocaouts de *P. fijiensis* para los genes SD y 85220.



En la evaluación de los caracteres morfológicos se encontró que para el caso del posible no-caut para el gen SD, se presentaba una disminución en la tonalidad de la colonia, esto debido a la participación del gen codificante para la Scytalon deshidratasa en la ruta biosintética de la melanina (Kubo et al. 1996; Kihara et al. 2004; Steiner & Oerke, 2007), pigmento característico de hongos y relacionado con el grado de virulencia en algunos hongos como *Bipolaris oryzae* y *Colletotrichum lagenarium* (Kubo et al. 1996; Kihara et al. 2004).

4.3.3 Confirmación por PCR de los no-cauts de *P. fijiensis*

La expresión de la proteína de verde fluorescente es garantía de éxito en el proceso de inserción del casete en el genoma de *P. fijiensis*, pero no asegura que dicha inserción sea específica en la posición del gen deseado, por ello se diseñaron cebadores específicos para confirmar mediante PCR la inserción en el gen blanco, para ello las secuencias son obtenidas mediante el ensamble del fragmento potencialmente insertado con las regiones flanqueantes del gen no-queado). se obtuvieron cuatro eventos positivos para el gen SD y 1 evento para el gen 85220 (Figura 4-14), resumiéndose en una eficiencia de transformación del 2,6 y 0,7 % respectivamente (Figura 4-15).

Figura 4-14: Resultados obtenidos en la confirmación por PCR de la inserción correcta y generación de no-cauts de *P. fijiensis* para los genes SD y 85220.

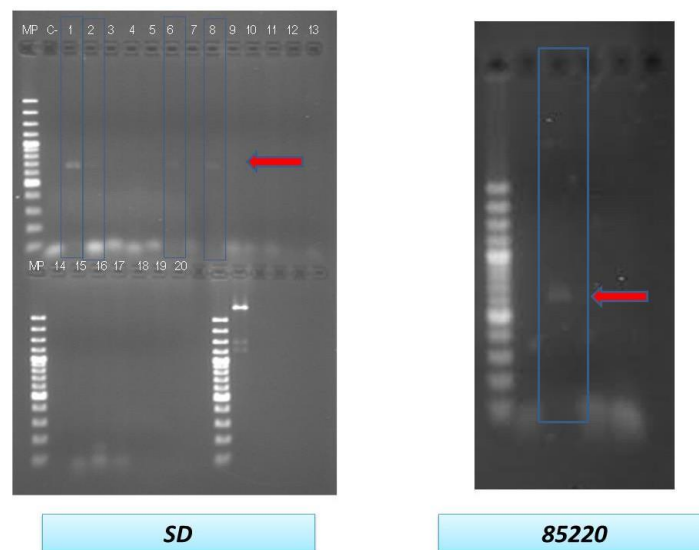
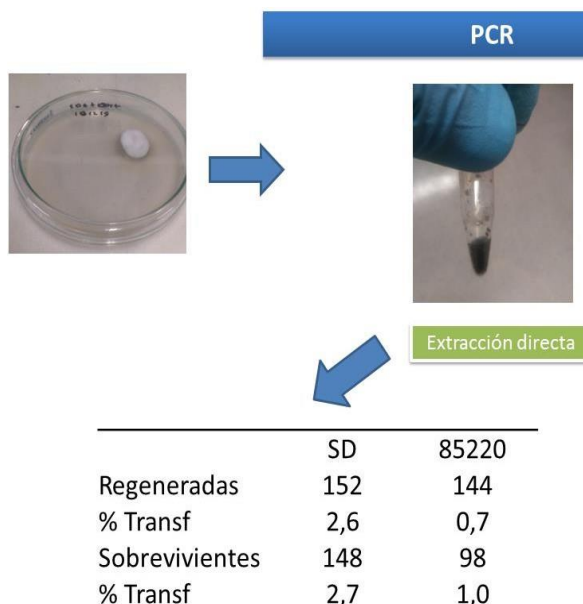


Figura 4-15: Resumen de los resultados obtenidos en la confirmación por PCR para los genes SD y 85220.



La baja eficiencia de transformación para la generación de nocaouts es un problema recurrente en hongos, debido a la inespecificidad de inserción del sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (Shao et al. 2015), problema que también es considerable en plantas y otros hospederos de *A. tumefaciens*, la adición de secuencias homologas flanqueantes puede mejorar de manera considerable la especificidad, pero para este estudio no fue posible evidenciarlo, adicionalmente no fue posible evaluar la expresión génica de las versiones noqueadas, debido a una baja tasa de sobrevivencia de los hongos obtenidos (0 %), una posible explicación es que para los nocaouts del gen 85220, no es posible determinar su función, ya que hasta este momento no hay reportes de homología funcional no estructural en ningún otro organismo y no es posible determinar la importancia vital de este gen dentro de *P. fijiensis*.

4.1 Conclusiones

La genética funcional ha sido fundamental para comprender la biología de los organismos, especialmente en hongos. La generación de nocaouts de *P. fijiensis* mediante transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es una estrategia poderosa y esencial para descubrir funciones específicas de los genes y su impacto en la biología del hongo. Sin embargo, la eficiencia de transformación sigue siendo un desafío debido a la inespecificidad de inserción del sistema. A pesar de las dificultades, la generación de nocaouts de *P. fijiensis* para genes relacionados con la patogenicidad podría abrir nuevas oportunidades para comprender mejor la biología del hongo y desarrollar estrategias de control más eficientes, este trabajo es uno de los primeros en el mundo empleando esta metodología sobre *P. fijiensis* con resultados positivos de transformación todavía se debe mejorar la metodología para así mejorar los índices de transformación y supervivencia de los aislamientos obtenidos.

Bibliografía

Churchill, A. C. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular plant pathology*, 12(4), 307-328.

Kantún-Moreno, N., Vázquez-Euán, R., Tzec-Simá, M., Peraza-Echeverría, L., Grijalva-Arango, R., Rodríguez-García, C., ... & Canto-Canché, B. (2013). Genome-wide in silico identification of GPI proteins in *Mycosphaerella fijiensis* and transcriptional analysis of two GPI-anchored β -1, 3-glucanosyltransferases. *Mycologia*, 105(2), 285-296.

Kihara, J., Moriwaki, A., Ueno, M., Tokunaga, T., Arase, S., & Honda, Y. (2004). Cloning, functional analysis and expression of a scytalone dehydratase gene (SCD1) involved in melanin biosynthesis of the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *Current genetics*, 45, 197-204.

Kubo, Y., Takano, Y., Endo, N., Yasuda, N., Tajima, S., & Furusawa, I. (1996). Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. *Applied and environmental microbiology*, 62(12), 4340-4344.

Meyer, V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi—progress, obstacles and future trends. *Biotechnology advances*, 26(2), 177-185.

Noar, R. D., & Daub, M. E. (2016). Transcriptome sequencing of *Mycosphaerella fijiensis* during association with *Musa acuminata* reveals candidate pathogenicity genes. *BMC genomics*, 17, 1-25.

Noar, R. D., & Daub, M. E. (2016). Bioinformatics prediction of polyketide synthase gene clusters from *Mycosphaerella fijiensis*. *PLoS One*, 11(7), e0158471.

Ploetz, R. (2000). Black sigatoka. *Pesticide Outlook*, 11(1), 19-23.

Portal, O., Izquierdo, Y., De Vleeschauwer, D., Sánchez-Rodríguez, A., Mendoza-Rodríguez, M., Acosta-Suárez, M., ... & Höfte, M. (2011). Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*–banana interaction. *Plant cell reports*, 30, 913-928.

Rodríguez, H. A., Rodríguez-Arango, E., Morales, J. G., Kema, G., & Arango, R. E. (2016). Defense gene expression associated with biotrophic phase of *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet infection in banana. *Plant disease*, 100(6), 1170-1175.

Rodríguez-García, C. M., Canché-Gómez, A. D., Sáenz-Carbonell, L., Peraza-Echeverría, L., Canto-Canché, B., Islas-Flores, I., & Peraza-Echeverría, S. (2016). Expression of MfAvr4 in banana leaf sections with black leaf streak disease caused by *Mycosphaerella fijiensis*: A technical validation. *Australasian Plant Pathology*, 45, 481-488.

Shao, C., Yin, Y., Qi, Z., Li, R., Song, Z., Li, Y., & Wang, Z. (2015). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Fungal Genetics and Biology*, 83, 19-25.

Steiner, U., & Oerke, E. C. (2007). Localized melanization of appressoria is required for pathogenicity of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 97(10), 1222-1230.

Stergiopoulos, I., Van Den Burg, H. A., Ökmen, B., Beenen, H. G., van Liere, S., Kema, G. H., & de Wit, P. J. (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), 7610-7615.

Weld, R. J., Plummer, K. M., Carpenter, M. A., & Ridgway, H. J. (2006). Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell research*, 16(1), 31-44.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se encontraron diferencias significativas en el tamaño de los genomas de los aislamientos de *P. fijiensis* secuenciados, asociadas con la abundancia de regiones altamente repetitivas, fenómeno reportado en otros hongos ascomicetos, sin afectar la cantidad de SSPs y proteínas secretadas demostrando la conservación de los mecanismos de patogenicidad.

Se evidencia una separación clara del origen filogenético de los aislamientos de las dos principales zonas productoras de banano en Colombia, Urabá con relación con aislamientos de Centroamérica y Suramérica; Santa Marta con relación con aislamientos de África, Oceanía y Asia, desmontando el efecto de las acciones humanas sobre el efecto fundador y una influencia directa del el flujo del material vegetal entre regiones productoras.

Se encontraron genes que pueden ser importantes en el proceso infectivo del hongo sobre plantas de banano, genes como las proteínas secretadas (SSPs), genes asociados con la síntesis de la melanina, proteasas secretadas, hidrolasas e hidrofobinas; estos genes pueden ser empleados en posteriores estudios funcionales y de mejoramiento genético de variedades comerciales de banano.

La metodología de interrupción génica mediante *Agrobacterium tumefaciens* puede llegar a ser útil para la evaluación funcional de genes en hongo, pero su baja eficiencia hace necesario el desarrollo de metodología que empleen sistema de edición génica.

5.2 Recomendaciones

Es importante avanzar con el estudio de otros grupos específicos de genes, ya que en el presente trabajo solo se evaluaron proteínas SSP y otras específicas, todavía se pueden análisis proteínas asociadas con fitness, metabolismo primario, secundario, receptores de membrana y otros genes funcionales.

Se debe mejorar la calidad del ensamble de los genomas, esto se puede realizar mediante el enriquecimiento de las presentes secuencias con otras obtenidas por técnicas de secuenciación de reads largos, como PacBio y Oxford Nanopore, para la determinación exacta de tamaño del genoma y en la comprensión precisa de su estructura, permitiendo que estos genomas puedan ser considerados genomas de referencia.

Se requiere de el establecimiento de una metodología precisa para la secuenciación del transcriptoma de *P. fijiensis* durante la infección de plantas de banano, aunque se han realizado trabajos previos, sus resultados no son reproducibles ni precisos, debido a la inexactitud en las cantidades de materia genético del hongo en las muestras procesadas.

Se considera la evaluación de otras metodologías de interrupción génica para la evaluación funcional de genes en *P. fijiensis*, ya que el método basado en recombinación homóloga es poco eficiente, por lo que se deben realizar ensayos con plataformas más específicas como CRISPR-CAS.

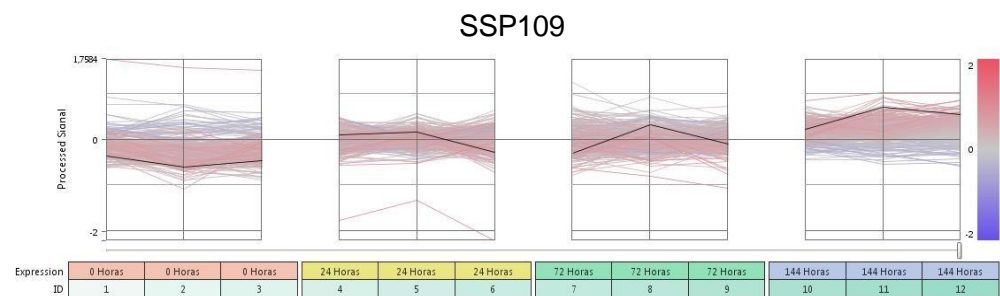
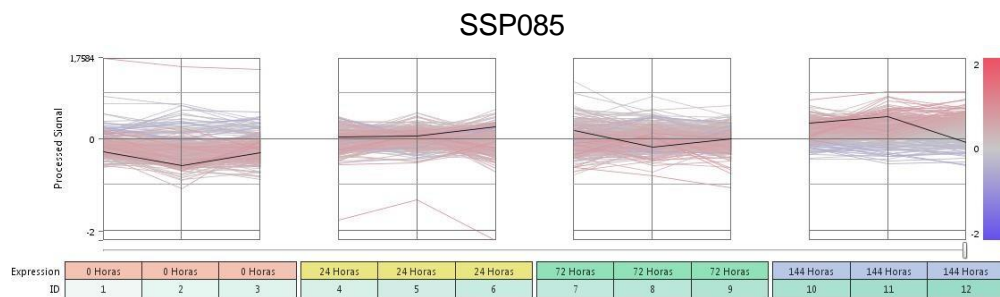
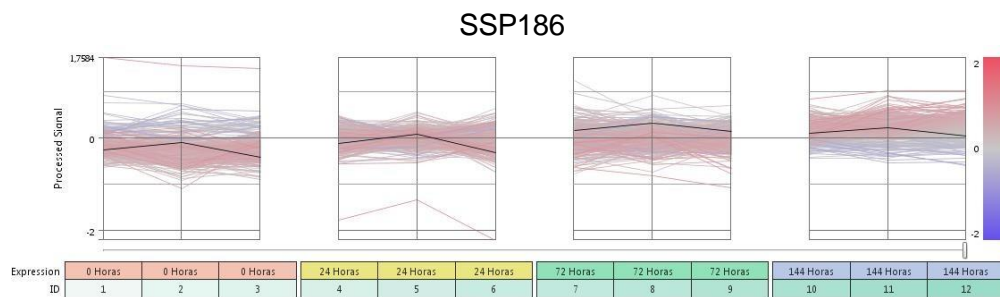
A. Anexo: Estadísticas finales de los ensamblajes genómicos de aislamientos del complejo Sigatoka.

B. Anexo: Genomas, transcriptomas y SSPs anotadas

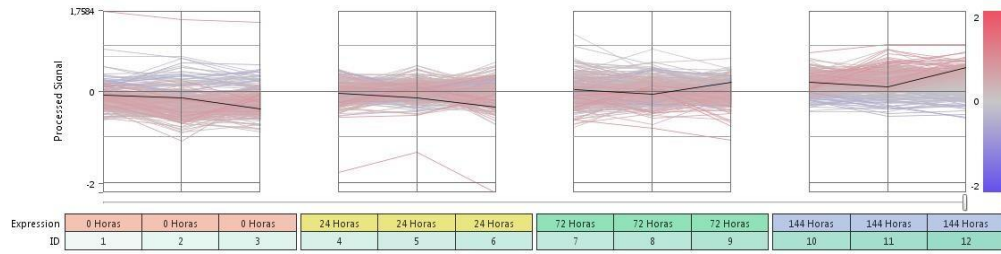
Para ver ir a:

- Genomas: https://drive.google.com/drive/folders/0B1cTtwejWhiQTGFOTF95RjBDWFE?resourcekey=0-dM-YZJxlv_akxSdP-GHkXQ&usp=drive_link
- Transcriptomas: https://drive.google.com/drive/folders/0B1cTtwejWhiQQzVlc3EzU19KQUU?resourcekey=0-ydiVOAweqwxU3wJ4QUR4rQ&usp=drive_link
- Secretomas: https://drive.google.com/drive/folders/0B-9kg_J3UZhwMFA5VDJHV2ZzeWc?resourcekey=0-g6PvVOLQHmDtCEVXNyw9JA&usp=drive_link

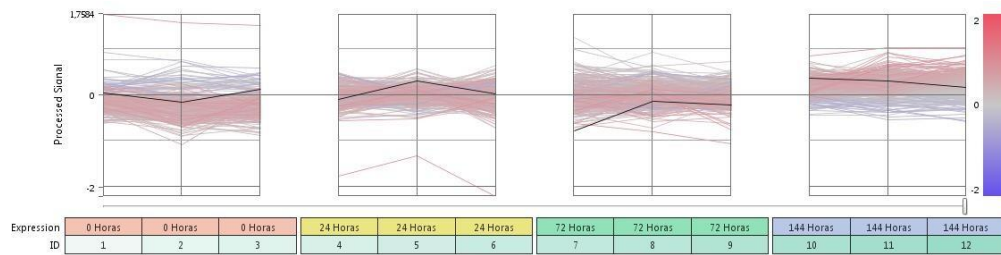
C. Anexo: Diagramas de expresión de las SSPs encontradas con expresión diferencial en el microarreglo.



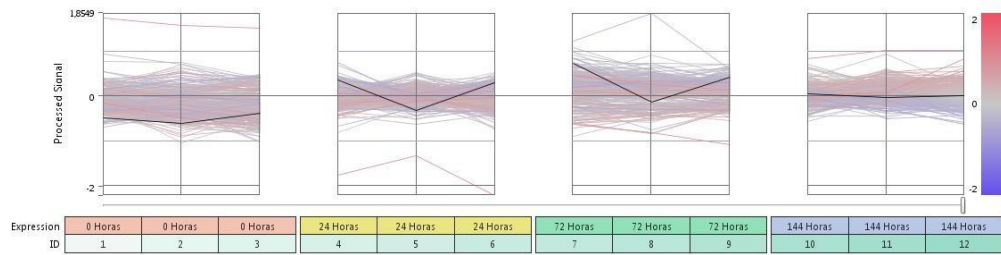
SSP070



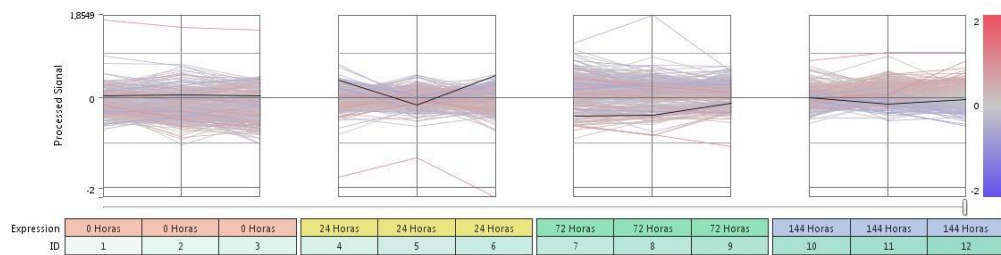
SSP222



SSP223



SSP149



D. Pipeline de análisis de genomas

