

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CAMPUS TUXTEPEC

“Evaluación de una estrategia para el control de los hongos fitopatógenos *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum* mediante biofungicidas basados en sRNAs”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

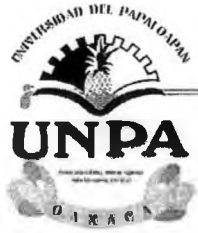
Ingeniera en Biotecnología

PRESENTA:

KARLA FLOR ESQUIVEL AGUILAR

Directora: Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México. 2022



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

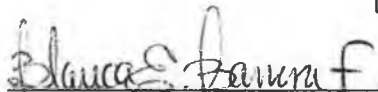
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 17 de agosto de 2022 a las 16:15 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Evaluación de una estrategia para el control de los hongos fitopatógenos *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum* mediante biofungicidas basados en sRNAs**" presentada por la alumna Karla Flor Esquivel Aguilar, con número de matrícula 16090166, aspirante al título de Licenciatura.

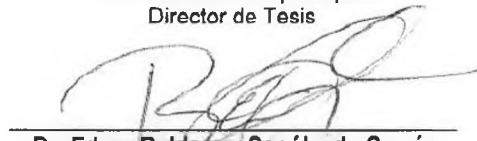
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.


Tuxtepec, Oaxaca, a 17 de agosto de 2022.

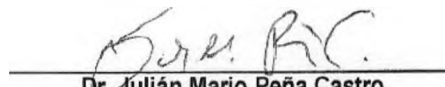
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis


Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Co-Director de Tesis


Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García
Profesor Investigador Asociado "C"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Edgar García López
Cátedra CONACyT-UNPA
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Julián Mario Peña Castro
Profesor Investigador Titular "B"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 19 de agosto de 2022

Oficio No. JCIB/2022/01
Asunto: Autorización de impresión de tesis

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna Karla Flor Esquivel Aguilar, titulado "Evaluación de una estrategia para el control de los hongos fitopatógenos *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum* mediante biofungicidas basados en sRNAs". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

- Dr. Miguel Ángel Peña Rico (Presidente, Universidad del Papaloapan)
- Dra. Edgar García López (Vocal, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García (Secretario, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Julián Mario Peña Castro (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Ariana Arlene Huerta Heredia (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

Terra uberrima, mens aperta
Duu Lo-tama, chl ji jú

UNPA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC
JEFATURA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA
Dra. Jacqueline Capataz
Jefa de Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arriaga
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan

UNPA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
Terra uberrima, mens aperta
Duu Lo-tama, chl ji jú
VICE-RECTORIA ACADEMICA

c.c.p. Dr. Blanca Estela Barrera Figueroa, Director de Asesoría y Seguimiento
c.c.p. Karla Flor Esquivel Aguilar, Alumna, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril SIN, Col. Ciudad Universitaria, Loma
Bonita, Oaxaca C.P.68400
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,
Tuxtepec, Oaxaca, C.P. 68301
Tel/Fax: 01 287 875 9240

Hoja de originalidad

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, bajo la dirección de la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, con el apoyo del Proyecto de Ciencia de Frontera-FORDECYT-PRONACES-CONACYT con número 552286.

Fragmentos del presente trabajo se presentaron en los siguientes congresos:

Esquivel-Aguilar, K. F., Santiago-Tapia, L. B., Solano-García, F., Peña-Castro, J. M., Barrera-Figueroa, B. E. "Design of dsRNA-based biofungicides for the control of plant pathogens *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum*, and *Geotrichum candidum*". México-USA del 8 al 10 de noviembre del 2021. XIX National Plant Biochemistry and Molecular Biology Congress. Obteniendo premio por participación destacada.

Esquivel-Aguilar, K. F., Santiago-Tapia, L. B., Solano-García, F., Peña-Castro, J. M., Barrera-Figueroa, B. E. "Identificación de genes DCL en hongos fitopatógenos de la región del Papaloapan". CDMX del 6 al 8 de mayo del 2019. 2do Congreso Estudiantil de Biotecnología IPN. Obteniendo primer lugar en concurso de carteles científicos.

Esquivel-Aguilar, K. F., Santiago-Tapia, L. B., Solano-García, F., Peña-Castro, J. M., Barrera-Figueroa, B. E. "Identificación molecular de hongos fitopatógenos de la cuenca del Papaloapan y propuesta de diseño de un biofungicida utilizando la proteína Dicer como blanco". Oaxaca el 11 de septiembre del 2018. Expociencias Oaxaca. Obteniendo segundo lugar a nivel regional y participación a nivel estatal.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo y la Dra. Jacqueline Capataz Tafur por compartir equipos usados en el desarrollo de este trabajo. Al Dr. Lucio Abel Vázquez por el apoyo en el análisis estadístico. Al Dr. José Abad Zavaleta y la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia por su apoyo brindado durante el proceso de principio a fin.

A Laura Beatriz Santiago Tapia, egresada de la Maestría en Biotecnología en 2019 por haberme permitido ser partícipe de su trabajo de tesis antecesor al mío y por su amistad.

A Maximiliano López Morales, estudiante de la Maestría en Biotecnología por su ayuda brindada, su amistad, apoyo y consejos. A Fernando Solano García, compañero de la Licenciatura por su paciencia, ayuda y conocimientos.

A los miembros del equipo Fungi y Plantae: Eduardo, Mayra, Sari, Nacho y Sofi por su compañía y ayuda en el laboratorio.

A mi psicólogo Emmanuel Toledo Aguilar y a mi entrenador y amigo Eugenio Hernández Bolaños por ayudarme física y mentalmente a terminar este trabajo.

A la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa y al Dr. Julián Mario Peña Castro por haberme aceptado a formar parte del Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Laboratorio de Biología Molecular desde el 2018 y proporcionarme los conocimientos y habilidades para la elaboración de esta tesis, además de su apoyo incondicional en las altas y bajas durante todo el proceso.

DEDICATORIA

A mis padres Flor y Juan por educarme como lo hicieron y nunca exigirme académicamente a ser alguien que no era.

A mi tía Rosita, por ser como una segunda madre y haberme acompañado en todos los escalones de mi vida.

A mi hermana Angélica, porque sí y a mi novio Joss por estar ahí.

RESUMEN

México es un país exportador de una gran variedad de alimentos, entre los que destacan los frutos tropicales como el plátano, piña, naranja, sandía, melón y papaya. En la región del Papaloapan se producen muchos de ellos. No obstante, las condiciones climáticas promueven el desarrollo de enfermedades causadas por hongos. Se ha estimado que los hongos son responsables del 5-10% de las pérdidas, no solo en México sino en todos los países en desarrollo. Por lo anterior, se requieren estrategias efectivas para proteger a los frutos tropicales de la infección por hongos patógenos. Una estrategia de última generación para la protección vegetal se basa en el uso de RNAs pequeños (sRNAs), los cuales se aplican mediante aspersion y se diseñan para silenciar, mediante el mecanismo de RNA de interferencia (RNAi) a genes esenciales para la vida del patógeno o para su virulencia.

En el presente trabajo, se planteó el objetivo de diseñar y evaluar biofungicidas basados en sRNAs dirigidos al silenciamiento de genes Dicer-like (DCL), los cuales son esenciales en procesos básicos y en el ciclo de la infección. Para esto, se identificaron y validaron experimentalmente las secuencias de genes que codifican para la proteína DCL en los hongos fitopatógenos *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum*. Se realizó la selección de regiones de baja similitud de los genes DCL entre los hongos y su respectiva planta huésped, y se prepararon construcciones con las que se llevó a cabo la síntesis de sRNAs. Finalmente, se evaluó la actividad de los sRNAs como biofungicidas mediante bioensayos *in vitro* de inhibición de la germinación de esporas en medio de cultivo. De acuerdo con los resultados, los sRNAs aplicados no mostraron actividad biofungicida consistente en los bioensayos *in vitro*. Por otra parte, se realizaron pruebas preliminares *in vivo* sobre otros frutos, obteniendo resultados similares. Estos resultados indican la posibilidad de que DCL no sea esencial para la germinación de esporas en estos hongos, y que se requiere realizar modificaciones en las metodologías para la evaluación de la actividad *in vitro* e *in vivo* del biofungicida, de tal forma que pueda explorarse el efecto durante diferentes etapas del proceso de infección. Esta información será útil para explorar a futuro las posibilidades del uso de biofungicidas basados en dsRNAs, dirigidos al silenciamiento de genes DCL, para el control de las infecciones causadas por estos hongos en frutos tropicales.

ABSTRACT

Mexico produces and exports a big variety of tropical fruits, among them, banana, pineapple, orange, watermelon, melon, and papaya. Most of these fruits are produced in the Papaloapan region, where the weather conditions promote the development of fungal diseases. It has been estimated that fungi are responsible for 5-10% of losses, not only in Mexico, but in all the developing countries. Due to this, effective strategies are required for protection of tropical fruits. A last generation strategy for plant protection is based on the use of small RNAs (sRNAs), which are applied in spray and are designed for silencing, through the interference RNA (RNAi) mechanisms, essential genes for pathogen life or virulence.

This work aimed to design and evaluate sRNA-based biofungicides directed to silence Dicer-like (DCL) genes, which are essential for basic processes and for the infection cycle. For this, the sequences of DCL genes were identified and experimentally validated in the plant pathogens *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum*. Then, regions of low similarity between DCL genes from the pathogens and their respective host plant were selected and used to obtain constructs for the synthesis of sRNAs. Finally, the activity of sRNAs as biofungicides was evaluated in *in vitro* assays of spore germination in culture media. According to the results, the applied sRNAs did not show consistent biofungicide activity. On the other hand, preliminary *in vivo* assays using tomato fruits, and papaya leaves and fruits, showed similar results. This indicates the possibility that DCL is not essential for germination of spores in these pathogens, and that it is required to modify the methods for the evaluation of activity of biofungicides, in such way that the effects can be explored along the different stages of the infection process. This information will be useful to explore in the future the possibilities of using dsRNA-based biofungicides directed to the silencing of DCL genes, for the control of infections caused by these fungal pathogens in tropical fruits.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1.1 Crecimiento demográfico y la demanda de alimentos	18
1.2 Producción agrícola en el estado de Oaxaca	18
1.3 Pérdida y desperdicio de alimentos y las infecciones por hongos	19
1.4 Estrategias tradicionales de protección vegetal	21
1.4.1 Control genético mediante plantación mixta	21
1.4.2 Control biológico mediante el uso de antagonistas	22
1.4.3 Control químico mediante agroquímicos convencionales	22
1.5 Estrategias biotecnológicas modernas de protección vegetal basadas en el uso de RNA interferente (RNAi)	23
1.5.1 El RNA interferente (RNAi)	23
1.5.2 Estrategia HIGS o silenciamiento génico inducido por el huésped	25
1.6 Los genes DCL como candidatos de la estrategia SIGS	27
1.7 <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Fusarium incarnatum</i> y <i>Geotrichum candidum</i> como patógenos ...	29
1.7.1 <i>Rhizopus oryzae</i>	29
1.7.2 <i>Fusarium incarnatum</i>	31
1.6.3 <i>Geotrichum candidum</i>	32
2.- JUSTIFICACIÓN	35
3.- HIPÓTESIS	36
4.- OBJETIVOS	37
5.1 General	37
5.2 Particulares	37
5.- DIAGRAMA EXPERIMENTAL	38
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1 Material biológico	39
6.1.1 Crecimiento de hongos en medio de cultivo	39
6.1.2 Extracción de ADN genómico por el método fenol-cloroformo	39
6.2 Identificación de DCLs	40
6.2.1 Búsqueda de genes DCL de <i>Rhizopus oryzae</i>	40
6.2.2 Predicción de genes DCL1 y DCL2 en <i>Fusarium incarnatum</i>	40
6.2.3 Predicción de gen DCL1 en <i>Geotrichum candidum</i>	40
6.3 Diseño de biofungicidas	41

6.3.1	Diseño de oligos para amplificación de genes DCL.....	41
6.3.2	Amplificación de DCL's con la enzima Phusion High-Fidelity.....	42
6.3.3	Electroforesis de ADN.....	42
6.3.4	Purificación con perlas (beads) magnéticas.....	43
6.4	Construcción y síntesis de dsRNAs.....	43
6.4.1	PCR <i>overlap</i> (superposición) para fusión de genes DCL1 y DCL2 DE <i>F. incarnatum</i> ..	43
	45
6.4.3	Ligación del producto de PCR al vector pGEM®-T Easy (Promega).....	47
6.4.4	Transformación de células químicamente competentes de <i>E. coli</i>	47
6.4.5	Secuenciación.....	48
6.4.6	Síntesis de ldsRNA y sdsRNA	48
6.5	Bioensayos de actividad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	50
6.5.1	Bioensayos <i>in vitro</i> de germinación de esporas en placas.....	50
6.5.2	Bioensayos <i>in vitro</i> de germinación en portaobjetos.....	50
6.5.3	Bioensayos <i>in vivo</i>	51
6.5.4	Análisis estadístico.....	51
7.-	RESULTADOS.....	52
7.1	Identificación y confirmación de genes DCL en los hongos de interés	52
7.1.1	Búsqueda de DCL1 en <i>Rhizopus oryzae</i>	52
7.1.2	Predicción de DCL1 y DCL2 en <i>Fusarium incarnatum</i>	52
7.1.3	Predicción DCL1 en <i>Geotrichum candidum</i>	53
7.2	Selección de zonas para el diseño de biofungicidas dirigidos a genes DCL en los hongos <i>R. oryzae</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>G. candidum</i>	55
7.3	Construcción y confirmación para la síntesis de sRNAs <i>in vitro</i>	66
7.4	Bioensayos.....	76
7.4.1	Efecto de biofungicidas de sRNAs sobre la germinación de esporas <i>in vitro</i>	77
7.4.1.1	Análisis estadístico de resultados	81
7.5.3	Bioensayos <i>in vivo</i>	86
8.-	DISCUSIÓN	88
8.-	CONCLUSIONES.....	95
9.	PERSPECTIVAS	96
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	97
	ANEXOS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pérdidas y desperdicios mundiales de alimentos, basado en la FAO 2011 (Lipinski et al., 2013) Traducción propia.....	20
Figura 2. Mecanismo de interferencia de RNA (RNAi) mediado por microRNAs y siRNAs. Modificado de Akbar et al., 2022.	24
Figura 3. Movimiento de sRNAs entre plantas y hongos durante la interacción planta-patógeno. Modificado de Cai et al., 2021.....	25
Figura 4. Estructuras típicas de proteínas DCL de insectos, hongos y plantas tomadas de la base de datos pFam.	28
Figura 5. A. Colonia en agar papa dextrosa después de una incubación de 7 días; B. esporangio y esporangióforo; C. Columela; D. esporangiosporas; E. rizoides (Kwon et. al., 2011).....	30
Figura 6. Colonia de <i>Fusarium</i> sp. en PDA (d), y las características morfológicas de <i>Fusarium</i> sp. (e–i). Las flechas indican clamidosporas (e) y macroconidios (i); Cp, conidióforos, Hp, hifa, Mc, macroconidios y Ph, fialida (Wonglom & Sunpapao, 2020).....	32
Figura 7. d) Aislado GC2201 incubado en cultivo YMA durante 5 días a 20 °C. e) Ramificación dicotómica de hifas hialinas del aislado GC2201. F) Arthroconidios encadenados derivados de hifas del aislado GC2201 (Horita et. al., 2015).	34
Figura 8. Diagrama experimental.....	38
Figura 9. Proceso de Overlap PCR para fusión de genes DCL1 y DCL2 de <i>F. incarnatum</i>	45
Figura 10. Proceso de adición de secuencias de promotor T7 en ambos extremos de la secuencia DCL.....	46
Figura 11. ADN genómico de <i>R. oryzae</i> (Ro), <i>F. incarnatum</i> (Fi) y <i>G. candidum</i> (Gc). Gel de agarosa 1 % con Buffer TAE.....	54
Figura 12. Ilustración representativa del gen DCL1 del hongo <i>Rhizopus oryzae</i> y sus dominios de acuerdo a la base de datos funRNA. En flechas azules se indica la zona escogida para amplificar la zona de 500 pb para la producción de dsRNA.....	56
Figura 13. Alineamientos de secuencia de aminoácidos de DCL1 de <i>R. oryzae</i> y DCL4, DCL1 de <i>Carica papaya</i> . En cuadros rojos se muestran las zonas de mayor similitud, siendo estas, secuencias pertenecientes a los dominios ribonucleasa III.	56
Figura 14. Alineamientos de secuencia de aminoácidos de DCL1 de <i>R. oryzae</i> y DCL1, DCL2, DCL3 y DCL4 de <i>Cucumis melo</i> . En la imagen superior los tres cuadros rojos representan zonas homólogas que pertenecen a la secuencia del dominio Helicasa C-terminal y el brazo conector a Dicer dsRNA-Binding fold. En la imagen inferior se señala en cuadros rojos las zonas homólogas pertenecientes a los dos dominios Ribonucleasa III.	57
Figura 15. Alineamientos de secuencia de aminoácidos de DCL1 de <i>R. oryzae</i> y DCL1, DCL2 y DCL3 de <i>Ananas comosus</i> . En la imagen superior los cuatro cuadros rojos representan zonas homólogas que pertenecen a la secuencia del dominio Helicasa C-terminal y el brazo conector a Dicer dsRNA-Binding fold. En la imagen inferior se señala en cuadros rojos las zonas homólogas pertenecientes a los dos dominios Ribonucleasa III.	58
Figura 16. En la imagen superior ilustración representativa del gen DCL1 del hongo <i>F. incarnatum</i> y sus dominios de acuerdo a pFam. En flechas azules se indica la zona escogida para amplificar la zona de 250 pb para la producción de dsRNA. En la imagen inferior alineamientos de secuencias de aminoácidos entre el gen DCL1 predicho para <i>F. incarnatum</i> contra los DCL1 y	

DCL4 de Carica papaya. Los cuadros rojos superiores representan zonas homólogas pertenecientes al brazo conector entre los dominios Dicer dsRNA-binding fold y Ribonucleasa III, mientras que los últimos cuatro representan zonas homólogas pertenecientes a ambos dominios Ribonucleasa III que DCL1 de <i>F. incarnatum</i> predicho posee de acuerdo a pFam	59
Figura 17. En la imagen superior ilustración representativa del gen DCL2 del hongo <i>F. incarnatum</i> y sus dominios de acuerdo a pFam. En flechas azules se indica la zona escogida para amplificar la zona de 250 pb para la producción de dsRNA. En la imagen inferior alineamientos de secuencias de aminoácidos del gen DCL2 predicho para <i>F. incarnatum</i> contra DCL1 y DCL4 de Carica papaya. Las zonas con mayor similitud se encuentran señaladas con recuadros rojos y los tres representan área posterior al último dominio predicho de acuerdo a pFam para DCL2 de <i>F. incarnatum</i>	60
Figura 18. Ilustración representativa del gen DCL1 del hongo <i>G. candidum</i> y sus dominios. En flechas azules se indica la zona escogida para amplificar la zona de 500 pb para la producción de dsRNA.	61
Figura 19. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de DCL1 predicho de <i>G. candidum</i> y DCL1 y DCL4 de Carica papaya. El recuadro representa homología en una zona sin dominios al final del gen (arriba). Alineamientos de DCL1 predicho de <i>G. candidum</i> y DCL1, DCL2, DCL3 Y DCL4 de Cucumis melo. Los cuadros rojos representan zonas de mayor similitud entre secuencias, los primeros dos están ubicados en el dominio Dicer dsRNA-binding fold y el último pertenece al dominio Helicasa C-terminal (abajo).....	61
Figura 20. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes DCL en el patosistema <i>R. oryzae</i> : <i>C. papaya</i>	62
Figura 21. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes DCL en el patosistema <i>R. oryzae</i> : <i>A.comosus</i>	63
Figura 22. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes DCL en el patosistema <i>R.oryzae</i> : <i>C.melo</i>	63
Figura 23. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de gen DCL1 en el patosistema <i>F.incarnatum</i> : <i>C.papaya</i>	64
Figura 24. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de gen DCL2 en el patosistema <i>F.incarnatum</i> : <i>C.papaya</i>	64
Figura 25. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes DCL en el patosistema <i>G.candidum</i> : <i>C.melo</i>	65
Figura 26. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes DCL en el patosistema <i>G.candidum</i> : <i>C.papaya</i>	65
Figura 27. Resultados de la amplificación de DCL de los hongos <i>Rhizopus oryzae</i> (RoDCL1) (500 pb), <i>Fusarium incarnatum</i> (FiDCL1, FiDCL2) (ambos de 250 pb) y <i>Geotrichum candidum</i> (GcDCL1) (500 pb) visualizados en gel de agarosa al 1% con buffer TAE.....	66
Figura 28 Constructo de 500 pb producto de overlap PCR para fusión de DCL1 y DCL2 del hongo <i>F. incarnatum</i> visualizado en gel de agarosa al 1% y buffer TAE.	67
Figura 29. Resultados de la adición de los promotores T7 a ambos extremos de las secuencias DCL de los hongos <i>R. oryzae</i> (T7 Ro), <i>F. incarnatum</i> (T7 Fi) y <i>G. candidum</i> (T7 Gc) visualizados en geles de agarosa al 1% y buffer TAE todos los resultados muestran un aumento en el peso molecular, tal como se esperaba (536 pb).	68
Figura 30. Digestiones de plásmidos con la enzima NotI de las colonias transformadas Ro1, Ro3, Ro4 y Ro5 del hongo <i>R. oryzae</i> visualizados en gel de agarosa al 1% y buffer TAE. Las bandas tienen un peso molecular de entre 500-600 pb como se esperaba (536 pb)	69

Figura 31. PCR de colonia con primers T7 y las colonias Fi1, Fi2, Fi3, Fi4, Fi5 y Fi6 como molde del hongo <i>F. incarnatum</i> visualizados en gel de agarosa al 1% y buffer TAE. Los resultados muestran bandas del peso molecular esperado (536 pb).	70
Figura 32. PCR de colonia con primers T7 y las colonias Gc1, Gc2, Gc3, Gc4 y Gc5 del hongo <i>G. candidum</i> . visualizados en gel de agarosa 1% y buffer TAE. Los resultados muestran bandas del peso molecular esperado (536 pb).....	70
Figura 33. Alineamientos de secuencias DCL de <i>R. oryzae</i> obtenidas por secuenciación (Ro1DCL1 y Ro5DCL1) y de la base de datos funRNA (RoDCL1_funRNA). En amarillo se muestran las diferencias entre ellas.	72
Figura 34. Alineamientos de secuencias DCL de <i>F. incarnatum</i> obtenidas por secuenciación (Fi1DCL1-2 y Fi2DCL1-2) y por predicción (FiDCL1-2_prediction). En amarillo se muestran las diferencias de cambio de pares de bases y en amarillo la duplicación de la secuencia perteneciente al primer reverso en Fi1.....	73
Figura 35. Alineamientos de secuencias DCL de <i>G. candidum</i> obtenidas por secuenciación (Gc2DCL1 y Gc4DCL1) y predicha (GcDCL1_prediction). En amarillo se muestran los cambios de pares de bases entre ellas.	74
Figura 36. Síntesis de ldsRNA para los hongos <i>G. candidum</i> y <i>R. oryzae</i> antes y después de la purificación de acuerdo con el procedimiento del kit MegaScript y de forma tenue se puede lograr observar los sdsRNA de cada uno. Gel de agarosa al 1% y buffer TBE.....	75
Figura 37. Síntesis de ldsRNA para el hongo <i>F. incarnatum</i> antes y después de purificar y de manera tenue los sdsRNA. Gel de agarosa al 1% con buffer TBE.	76
Figura 38. Resultados del bioensayo de inhibición de la germinación de esporas de <i>R. oryzae</i> (5×10^3 esporas) tratadas con 0, 0.25, 0.5 y 1 μg de sRNAs largos (ldsRNAs) y cortos (sdsRNAs) en un volumen final de 25 μL	78
Figura 39. Resultados del bioensayo de inhibición de la germinación de esporas de <i>G. candidum</i> (5×10^3 esporas) tratadas con 0, 0.25, 0.5 y 1 μg de sRNAs largos (ldsRNAs) y cortos (sdsRNAs) en un volumen final de 25 μL	79
Figura 40. Resultados del bioensayo in vitro de germinación de esporas de <i>F. incarnatum</i> (5×10^3 esporas) en portaobjetos, bajo tratamiento con ldsRNA (800 ng). No se logró visualizar cambios en número y morfología de macroconidias y clamidosporas a diferentes objetivos (el experimento se realizó por triplicado en tres experimentos independientes).	85
Figura 41. Resultados de los bioensayos in vivo de la actividad fungicida de sRNAs largos (ldsRNAs) a concentración de 0 ng (Control) y 800 ng(ldsRNAs) sobre <i>Fusarium incarnatum</i> (1×10^4 esporas) en (A) frutos de papaya, (B) frutos de jitomate, y (C) hojas de papaya, en los días post-inoculación indicados (dpi).	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Posición nacional y volumen de producción anual de frutas en el estado de Oaxaca (SIAP, 2019).	19
Tabla 2. Hongos fitopatógenos y algunos ejemplos de genes objetivo en los que se ha probado la efectividad de SIGS.	27
Tabla 3. Características morfológicas del hongo patógeno <i>Rhizopus oryzae</i> (obtenida y modificada de Kwon et al., 2011).	30
Tabla 4. Características morfológicas del hongo patógeno <i>Fusarium incarnatum</i> (obtenida y concentrada de Wonglom & Sunpapao, 2020).	31
Tabla 5. Características morfológicas del hongo <i>Geotrichum candidum</i> (elaborada con información de Hafeez et al., 2015).	33
Tabla 6. Frutas tropicales a los que <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Fusarium incarnatum</i> y <i>Geotrichum candidum</i> infectan (Santiago-Tapia, 2019).	41
Tabla 7. Secuencias de primers diseñados para la amplificación de genes DCL en <i>R. oryzae</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>G. candidum</i>	41
Tabla 8. Componentes para master mix de PCR con la enzima Phusion de Thermo Scientific....	42
Tabla 9. Programa de PCR de gradiente para la amplificación de genes DCL.	42
Tabla 10. Primers complementarios para Overlap PCR de DCL1 y DCL2 de <i>F. incarnatum</i>	44
Tabla 11. Programa para Overlap PCR de DCL1 y DCL2 de <i>F. incarnatum</i> en termociclador	44
Tabla 12. Primers con secuencia de promotor T7 para <i>R. oryzae</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>G. candidum</i> .46	
Tabla 13. Preparación de reacciones de ligación en pGEM T Easy.	47
Tabla 14. Preparación de reacciones de síntesis de RNAi.....	49
Tabla 15. Preparación de reacciones de digestión con Rnasa III.	49
Tabla 16. Información de genes DCL de especies de <i>Fusarium</i>	52
Tabla 17. Dominios de los genes DCL1 y DCL2 de <i>F. incarnatum</i> de acuerdo a PFam HMMER. ...	53
Tabla 18. Dominios presentes en los genes DCL de los hongos <i>R. oryzae</i> , <i>F. incarnatum</i> y <i>G. candidum</i>	54
Tabla 19. Número de colonias provenientes de esporas germinadas en tratamiento en placa con ldsRNA en <i>R. oryzae</i>	80
Tabla 20. Número de colonias provenientes de esporas germinadas en tratamiento en placa con sdsRNA en <i>R. oryzae</i>	80
Tabla 21. Número de colonias provenientes de esporas germinadas en tratamiento en placa con ldsRNA en <i>G. candidum</i> analizadas con Image J.	80
Tabla 22. Número de colonias provenientes de esporas germinadas en tratamiento en placa con sdsRNA en <i>G. candidum</i> analizadas con Image J.	81
Tabla 23. Análisis de varianza para respuesta transformada en bioensayos in vitro en placa de <i>Rhizopus oryzae</i>	82
Tabla 24. Agrupación utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para tipo de dsRNA en <i>R. oryzae</i>	82
Tabla 25. Agrupación utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para concentración de tratamiento en <i>R. oryzae</i>	82
Tabla 26. Agrupación utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para interacción Tipo*Concentración en <i>R. oryzae</i>	82
Tabla 27. Análisis de Varianza para datos de bioensayo in vitro en placa de <i>G. candidum</i>	83

Tabla 28. Agrupación utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para tipo de dsRNA en <i>G. candidum</i>	83
Tabla 29. Agrupación utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para concentración en <i>G. candidum</i>	83
Tabla 30. Agrupación utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para interacción Tipo*Concentración en <i>G. candidum</i>	84

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Crecimiento demográfico y la demanda de alimentos

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas se estima que la población mundial aumentará en 2,000 millones de personas en los próximos 30 años, pasando de los 7,700 millones actuales a los 9,700 millones en 2050, pudiendo llegar a un pico cerca de 11,000 millones para 2100 (ONU, 2019). Este crecimiento demográfico se traduce en una mayor demanda de alimentos por parte de la población. El estudio de perspectivas agrícolas llevado a cabo por la OCDE-FAO proyecta que las demandas de productos agrícolas continuarán creciendo durante la próxima década (OECD, 2019).

1.2 Producción agrícola en el estado de Oaxaca

Debido a las diferencias geográficas, climáticas y de densidad de población, algunas partes del mundo son más adecuadas para producir alimentos y productos agrícolas que otras. México figura entre los principales países cuando de exportación agrícola se trata, debido a la calidad y variedad de sus productos, logrando consolidar un comercio internacional con saldo favorable (OECD, 2019).

En el estado de Oaxaca la actividad agrícola registra una de las más variadas producciones del país, y su notable calidad lo posiciona como un referente internacional; tan solo durante el año 2019 registró un valor de producción de 19,095,507.01 miles de pesos (SIAP, 2019).

Los cultivos destinados a la producción de frutas comprenden un área de 59 mil hectáreas del campo oaxaqueño y cada año agrícola se destinan en todo el país un total de 384 mil hectáreas de tierra para agricultura, lo que sitúa al estado de Oaxaca entre las entidades de México con más aportación agrícola al volumen nacional (Oaxaca.gob, 2021). En la tabla 1 se muestran los cultivos de frutas principales de acuerdo al el volumen de producción que aporta al país.

Tabla 1.- Posición nacional y volumen de producción anual de frutas en el estado de Oaxaca (SIAP, 2019).

Posición	Fruta	Volumen (toneladas)
1	Papaya	314,713
2	Piña	139,867
3	Limón	280,170
5	Mango	188,675
7	Melón	16,054
8	Plátano	62,311
8	Sandía	45,722
10	Naranja	54,826

Los Distritos de Desarrollo Rural de Tuxtepec y la Costa aportan 58% del valor de la producción total del Estado, cosechando 18.4 millones de toneladas. En la región del Papaloapan destacan el plátano, piña, naranja, sandía, melón y papaya (Oaxaca.gob, 2021).

1.3 Pérdida y desperdicio de alimentos y las infecciones por hongos

El Grupo de Alto Nivel de Expertos en seguridad alimentaria y nutrición (High Level Panel of Experts o HLPE por sus siglas en inglés) definen la pérdida y desperdicio de alimentos como la disminución de la masa de alimentos destinados originalmente al consumo humano, independientemente de la causa y en todas las fases de la cadena alimentaria, desde la cosecha hasta el consumo (HLPE, 2014). En un estudio, la FAO estimó que cada año se pierde o desperdicia alrededor de un tercio de los alimentos del mundo (FAO, 2011).

Estas pérdidas y desperdicios repercuten negativamente en la economía y en el medio ambiente. Económicamente, representan una inversión desperdiciada que puede reducir los ingresos de los agricultores y aumentar los gastos de los consumidores. Desde el punto de vista ambiental, la pérdida y el desperdicio de alimentos provocan una serie de impactos, incluidas las emisiones innecesarias de gases de efecto invernadero y el uso del agua y tierra de manera ineficiente, lo

que a su vez puede provocar la disminución de los ecosistemas naturales y los servicios que brindan (Lipinski *et. al.*, 2013).

Mundialmente, de un total de 1.3 billones de toneladas de productos agrícolas, el nivel más elevado de pérdidas y desperdicios se registra para las frutas y hortalizas con un porcentaje del 44% (Figura 1; Lipinski *et. al.*, 2013), lo que indica la importancia de minimizar su pérdida y desperdicio.

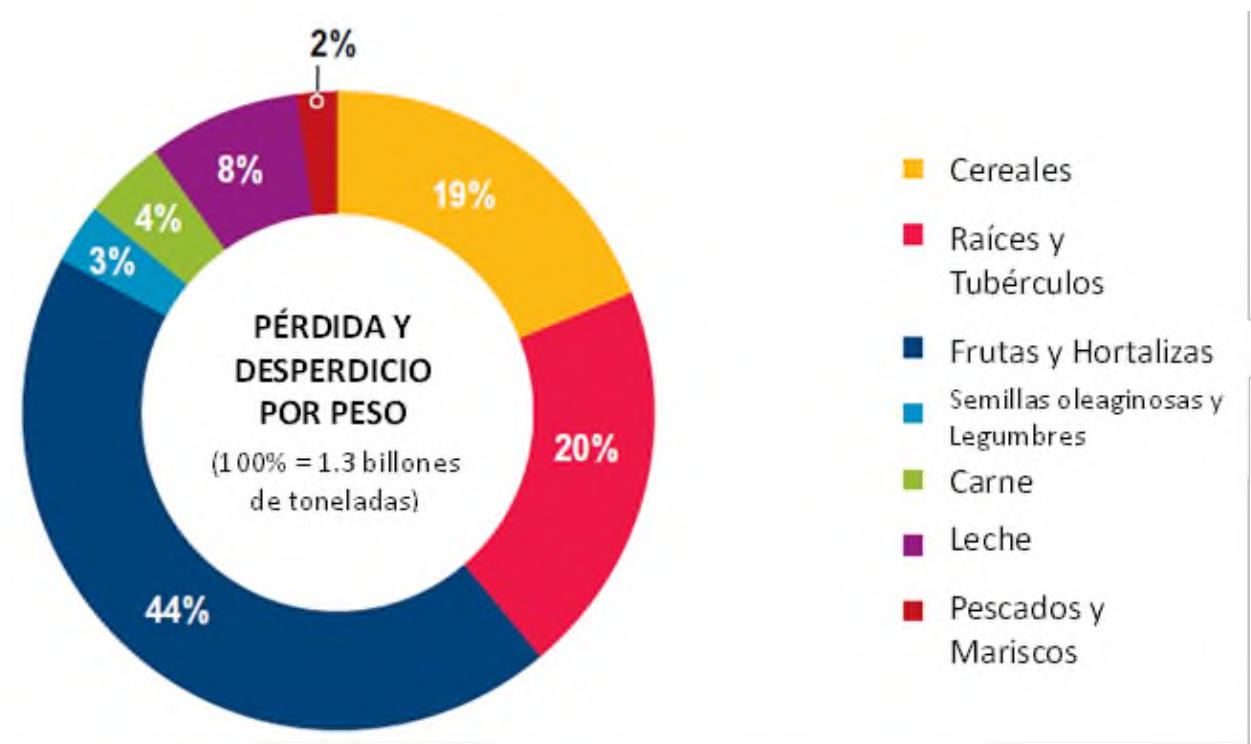


Figura 1. Pérdidas y desperdicios mundiales de alimentos, basado en la FAO 2011 (Lipinski *et al.*, 2013)
Traducción propia.

Se estima que los hongos son responsables del 5-10% de todo el desperdicio y pérdida de alimentos en los países en desarrollo (Snyder Churey & Worobo, 2019). Como se mencionó anteriormente, éstas pueden ocurrir en cualquiera de las fases de la cadena alimentaria: producción y cosecha, manipulación y almacenamiento, procesamiento y embalaje, distribución y mercado y finalmente consumo. Es en las fases de cosecha y de manipulación inicial, así como de almacenamiento, que las frutas y hortalizas son más susceptibles a contraer infecciones

fúngicas, proliferando y contaminando al producto, provocando desde la merma hasta la insatisfacción del consumidor (Snyder, Churey, & Worobo, 2019).

Los hongos filamentosos, comúnmente denominados “mohos” dentro de la industria alimentaria son la causa más común del deterioro de alimentos en toda la cadena de suministro, en todos los sectores alimentarios, e incluso están asociados con el deterioro de productos altamente procesados y de alta estabilidad (Lipinski *et. al.*, 2013). Un ejemplo de ello es la enfermedad de moho gris provocada por el hongo filamentoso *Botrytis cinerea* en fresas.

Por lo tanto, proteger a las frutas y hortalizas de las infecciones por hongos patógenos desde las etapas de cultivo es necesario para disminuir las mermas en su comercialización. Además de garantizar la inocuidad alimentaria al representar un riesgo potencial para la salud puesto que algunos hongos en descomposición producen micotoxinas que son peligrosas, tales como los géneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Penicillium* (Dukare *et. al.*, 2018).

1.4 Estrategias tradicionales de protección vegetal

Para evitar más pérdidas y desperdicios debido a infección por hongos, los productores agrícolas han implementado una serie de estrategias que permiten la protección de sus cultivos, tales como la plantación mixta, uso de antagonistas y uso de agroquímicos convencionales.

1.4.1 Control genético mediante plantación mixta

Este tipo de control requiere la búsqueda, desarrollo y empleo de cultivos resistentes como estrategias para limitar la infección por hongos. Con la plantación mixta se pretende ralentizar, o incluso, obstaculizar la propagación de un patógeno debido a la diversidad genética de los cultivos mixtos. De esta manera, si evolucionaran nuevas cepas capaces de superar la resistencia de las plantas, éstas no podrían desarrollar apropiadamente su virulencia. Caso contrario a si se tratara de una plantación de monocultivos. Este concepto representa el uso de barreras físicas y moleculares contra las infecciones patógenas (Kettles & Luna, 2019).

Sin embargo, el uso de plantaciones mixtas presenta desafíos importantes para la cadena alimentaria, ya que los diferentes cultivos pueden presentar necesidades distintas de nutrientes, acceso a la luz solar, temporalidad y otras consideraciones prácticas (Kettles & Luna, 2019).

1.4.2 Control biológico mediante el uso de antagonistas

Se ha investigado el potencial de los antagonistas microbianos aislados de una diversidad de hábitats naturales, para la supresión de enfermedades durante el cultivo y en la poscosecha. Todos los sistemas de biocontrol implican una interacción tripartita entre los antagonistas microbianos, el patógeno y el huésped, afectados por las condiciones ambientales. Se han sugerido varios modos para las propiedades antifúngicas de los antagonistas microbianos, incluida la competencia por los nutrientes y el espacio, el micoparasitismo, la secreción de antibióticos antifúngicos y metabolitos volátiles e inducción de resistencia del huésped (Dukare *et. al.*, 2018). Independientemente del modo de acción, es importante considerar las interacciones que se establecen entre los organismos involucrados y garantizar que éstas no tengan consecuencias negativas en la calidad de los productos.

1.4.3 Control químico mediante agroquímicos convencionales

Los agroquímicos utilizados para inhibir o eliminar específicamente enfermedades causadas por hongos son un tipo de pesticidas conocidos como fungicidas. Los fungicidas son a menudo una parte vital del manejo ya que controlan muchas enfermedades de manera satisfactoria. Especialmente cuando las prácticas culturales no proporcionan un control adecuado de enfermedades, los cultivos resistentes a patógenos no están disponibles, o no son aceptados en el mercado, o ciertos cultivos de alto valor tienen una tolerancia extremadamente baja a los síntomas de la enfermedad (McGrath, 2016).

Sin embargo, pocos fungicidas son efectivos contra patógenos después de haber infectado una planta; la mayoría de ellos tienen una capacidad limitada cuando la enfermedad fúngica se encuentra en un estado avanzado, y a pesar de que su actividad antivirulenta sea dirigida y específica contra el patógeno. Esto también implica un alto riesgo de desarrollar resistencia al

fungicida, volviéndolo menos efectivo o incluso inefectivo. Asimismo, las legislaciones que rodean el uso convencional de fungicidas serán considerablemente más estrictas en el futuro ya que el uso de los Límites Máximos de Residuos (MRL por sus siglas en inglés, límites de residuos que pueden ser encontrados en alimentos) hace que el uso de este tipo de químicos no sea aceptado. Esto significa que la industria agrotecnológica necesita ajustarse rápidamente a nuevos estándares y protocolos, así como desarrollar nuevos productos capaces de proteger a sus cultivos (Kettles & Luna, 2019).

1.5 Estrategias biotecnológicas modernas de protección vegetal basadas en el uso de RNA interferente (RNAi)

1.5.1 El RNA interferente (RNAi)

Para superar los obstáculos ya mencionados, se han desarrollado nuevas tecnologías basadas en moléculas de RNA pequeños (sRNAs) conocidas como RNA interferente o RNAi. El mecanismo de acción del RNAi es un proceso conservado e integral de regulación génica presente en todos los organismos eucariotas, que actúa a través del silenciamiento génico a nivel postranscripcional, es decir, el silenciamiento a nivel de RNA mensajero (RNAm).

En la Figura 2 se muestra el mecanismo de acción de microRNAs y siRNAs, dos tipos de RNAs pequeños (sRNAs) que regulan el silenciamiento génico postranscripcional en eucariotas. El silenciamiento génico postranscripcional en plantas (PTGS) comienza con el procesamiento inicial o la escisión de un RNA precursor de doble cadena (dsRNA; Fig. 2A) en dúplex cortos de pequeños RNA de interferencia (siRNA; Fig. 2C) de 21 a 24 nucleótidos (nt) mediante una enzima similar a la RNAsaIII llamada Dicer (DCL; Fig. 2B). Los sRNA de doble cadena se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC por sus siglas en inglés) que inicialmente desenrolla el siRNA, generando así una cadena antisentido (o guía) que se empareja con secuencias diana complementarias de RNA mensajero (RNAm) dentro de un complejo conocido como Argonauta (AGO; Fig. 2D) causando su degradación o la inhibición de su traducción (Werner *et. al.*, 2020). Por esta razón, los siRNA son efectores del control negativo de la expresión de los genes (Fig. 2E).

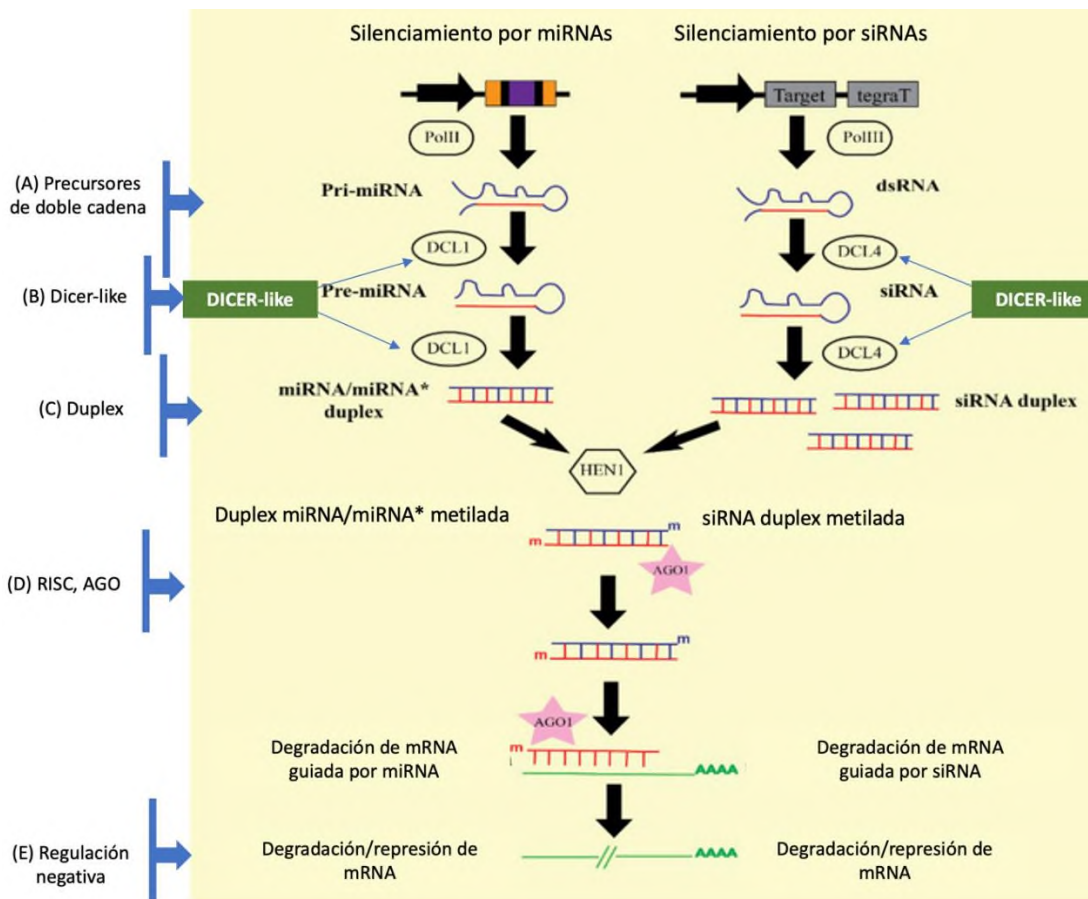
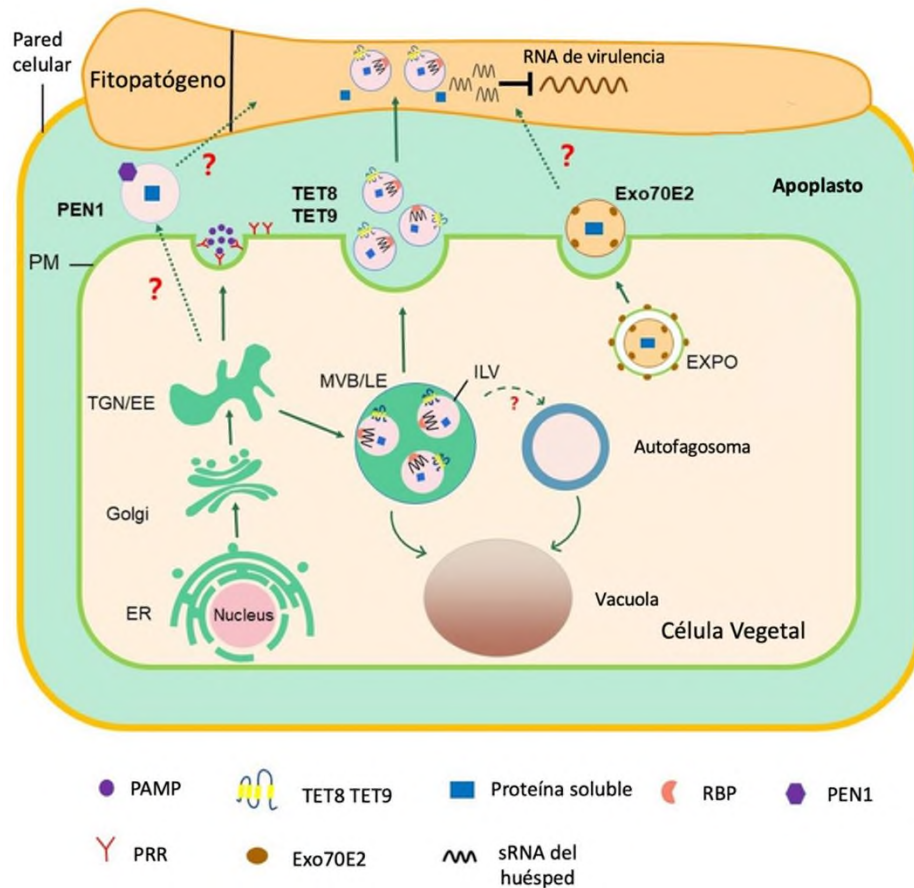


Figura 2. Mecanismo de interferencia de RNA (RNAi) mediado por microRNAs y siRNAs. Modificado de Akbar et al., 2022.

Estudios demuestran que durante la interacción planta-hongo, ocurre un fenómeno bidireccional denominado “cross-kingdom RNAi”, donde la planta envía hacia el hongo sRNAs que tienen por objeto disminuir su virulencia, y al mismo tiempo, el hongo envía sRNAs hacia la planta para suprimir su defensa y respuesta inmune (Figura 3; Wang et al., 2016). Se ha demostrado que los sRNAs se transportan entre planta y patógeno mediante vesículas extracelulares (He et al., 2021).

Este fenómeno de interacción entre hongo-planta, mediado por siRNAs, es la base de dos estrategias biotecnológicas para la protección de cultivos. Dichas estrategias son Silenciamiento Génico Inducido por el Huésped (Host-Induced Gene Silencing o HIGS por sus siglas en inglés) y Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (Spray-Induced Gene Silencing o SIGS por sus siglas en inglés).



EE: early endosome; ER: endoplasmic reticulum; EVs: extracellular vesicles; EXPO: exocyst-positive organelle; MVB/LE: multivesicular body/late endosome; ILV: intraluminal vesicle; PAMP: pathogen-associated molecular pattern; PEN1: Penetration 1; PM: plasma membrane; PRR: pattern recognition receptor; RBPs: RNA binding protein; TGN, trans-Golgi network.

Figura 3. Movimiento de sRNAs entre plantas y hongos durante la interacción planta-patógeno. Modificado de Cai et al., 2021.

1.5.2 Estrategia HIGS o silenciamiento génico inducido por el huésped

La estrategia HIGS aprovecha el efecto silenciador de los sRNAs en organismos que interactúan entre sí e implica la expresión por parte del huésped de construcciones generadoras de sRNAs dirigidos en contra de genes patógenos, parásitos o simbiontes asociados (Knip *et. al.*, 2014).

Sin embargo, esto significa que para que las plantas puedan producir dichos sRNAs, deben modificarse mediante transformación genética. Los organismos modificados genéticamente

(OGMs) continúan siendo un tema de controversia para los consumidores, por lo que se necesita de soluciones efectivas que sean amigables con el ambiente para controlar las enfermedades de las plantas causadas por patógenos que utilizan efectos de sRNAs.

1.5.3 Estrategia SIGS de silenciamiento génico inducido por aspersión

La estrategia de SIGS es más reciente que HIGS. Su eficacia se evaluó en el trabajo de Koch *et al.* (2016) sobre el hongo *Fusarium graminearum* que infecta a la planta de cebada y ocasiona la enfermedad conocida como “necrosis de la cebada” (Koch *et al.*, 2016), donde se demostró el efecto de silenciamiento inducido por RNAs largos no codificantes (lncRNAs) que tenían como blanco los tres genes CYP51 del hongo. Estos genes están involucrados en la síntesis de ergosterol, uno de los componentes específicos de la membrana celular fúngica. Dichos dsRNAs, al ser aplicados vía aspersión a la planta, lograron reducir el desarrollo del patógeno en las hojas de cebada. De igual manera, en el mismo año Wang *et al.* (2016) demostraron que al aplicar de manera externa dsRNAs y sRNAs que tenían por blanco los genes codificantes de la proteína Dicer-like, DCL1 y DCL2, de *Botrytis cinerea*, redujeron la enfermedad del “moho gris” en vegetales, frutas y pétalos de flores (Wang *et al.*, 2016). Estos estudios demuestran que la estrategia SIGS es efectiva para el control de enfermedades fúngicas y posee características deseables en los biofungicidas de nueva generación, como ser amigables con el ambiente, además que resuelve el problema del uso de OGMs.

A partir de las investigaciones pioneras de 2016, en los años siguientes continuaron las demostraciones de la efectividad de SIGS, ampliando el repertorio de hongos fitopatógenos y de genes blanco con potencial para su aplicación biotecnológica. En la Tabla 2 se enlistan algunos de los hongos fitopatógenos y genes objetivos que se han investigado a la fecha.

Tabla 2. Hongos fitopatógenos y algunos ejemplos de genes objetivo en los que se ha probado la efectividad de SIGS.

Hongo fitopatógeno	Genes objetivo	Referencia
<i>Fusarium sp</i> y <i>Mycosphaerella sp</i>	AC y subunidad α - β DNAPol	Mumbanza <i>et al.</i> , 2013
<i>Fusarium graminearum</i>	CYP51	Koch <i>et al.</i> , 2016; Koch <i>et al.</i> , 2019.
<i>Botrytis cinerea</i> y <i>Verticillium sp</i>	DCL1 y DCL2	Wang <i>et al.</i> , 2016
<i>Fusarium culmorum</i>	FcCYP51A-1B y 1C	Koch <i>et al.</i> , 2018
<i>Fusarium asiaticum</i> y <i>Fusarium tricinctum</i>	Myosina 5	Song <i>et al.</i> , 2018
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Tioredoxina reductasa	McLoughlin <i>et al.</i> , 2018
<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	ATC, 40S ribosomal protein S16, y proteína glicin-cleavage system H	Hu <i>et al.</i> , 2020
<i>Plasmopara viticola</i>	DCL1 y DCL2	Haile <i>et al.</i> , 2021
<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Aspergillus niger</i>	VPS51, DCTN y SAC	Qiao <i>et al.</i> , 2021
<i>Verticillium dahliae</i>	DCL1 y DCL2	Qiao <i>et al.</i> , 2021
<i>Fusarium graminearum</i>	DCL1 y DCL2	Werner <i>et al.</i> , 2020
<i>Phytophthora infestans</i>	GPB1, Hmp1, Cut3, Endo3	Kalyandurg <i>et al.</i> , 2021
<i>Botrytis cinerea</i>	Slt2-Type MAP Kinase	Spada <i>et al.</i> , 2021
<i>Magnaporthe oryzae</i>	MoDES	Sarkar y Roy-Barman <i>et al.</i> , 2021
<i>Phytophthora capsici</i>	Efectores RXLR	Cheng <i>et al.</i> , 2022
<i>Phytophthora infestans</i>	Sorbitol deshidrogenasa, hsp90, TEF1- α , Fosfolipasa D, HAM34-like	Sundaresha <i>et al.</i> , 2022
<i>Fusarium culmorum</i>	TRI5	Tretiakova <i>et al.</i> , 2022

AC: Adenilato ciclasa; DNAPol: DNA polimerasa; CYP51 (A, B, C): Cytochrome P450 lanosterol C-14a-demethylase; DCL1-2: Dicer-like 1 y 2; VPS51: Vacuolar protein sorting; DCTN: Dinactina; SAC: Supresor de Actina; GPB1: Subunidad Beta de la proteína G; Hmp1: Proteína de membrana específica de haustorio; Cut3: Cutinasa; Endo3: Endo-1,3(4)- β -glucanasa; Slt2: Map Kinasa tipo Slt2; TEF1- α : Factor de elongación de la traducción, HAM34-like: proteína glucosilfosfatidilinositol-serina ácida-treonina-like. TRI5: Tricodieno sintasa. MoDES: Supresor de la defensa de la planta. ATC: Acetyl-CoA acyltransferase

1.6 Los genes DCL como candidatos de la estrategia SIGS

Entre los blancos de silenciamiento más efectivos en las aplicaciones de SIGS se encuentran los genes Dicer-like o DCL. Estas proteínas forman parte de la ruta de biogénesis de los RNAs

pequeños (Figura 2) por lo que son necesarias en los patógenos para producir RNAs pequeños que, no solo son esenciales para la virulencia (Figura 3) sino además para una amplia gama de procesos celulares vitales, como la regulación de la germinación, el desarrollo y la respuesta a estímulos ambientales. De esta manera, la supresión de la actividad de los DCLs en los hongos bloquearía la producción de dsRNAs necesarios para regular el desarrollo y la virulencia, y por tal razón, estos genes se han consolidado como objetivos para la protección vegetal mediante la estrategia SIGS como se ha demostrado contra los patógenos *Botrytis cinerea* y *Verticillium sp* (Wang *et al.*, 2016), *Fusarium graminearum* (Werner *et al.*, 2020), *Plasmopara viticola* (Haile *et al.*, 2021), y *Verticillium dahliae* (Qiao *et al.*, 2021) (Tabla 2).

Las proteínas DCL poseen secuencias características que incluyen un dominio helicasa, un dominio de dimerización y dos dominios con actividad RNasa III, entre otros. La estructura de DCLs típicos de varios organismos se muestra en la Figura 4.

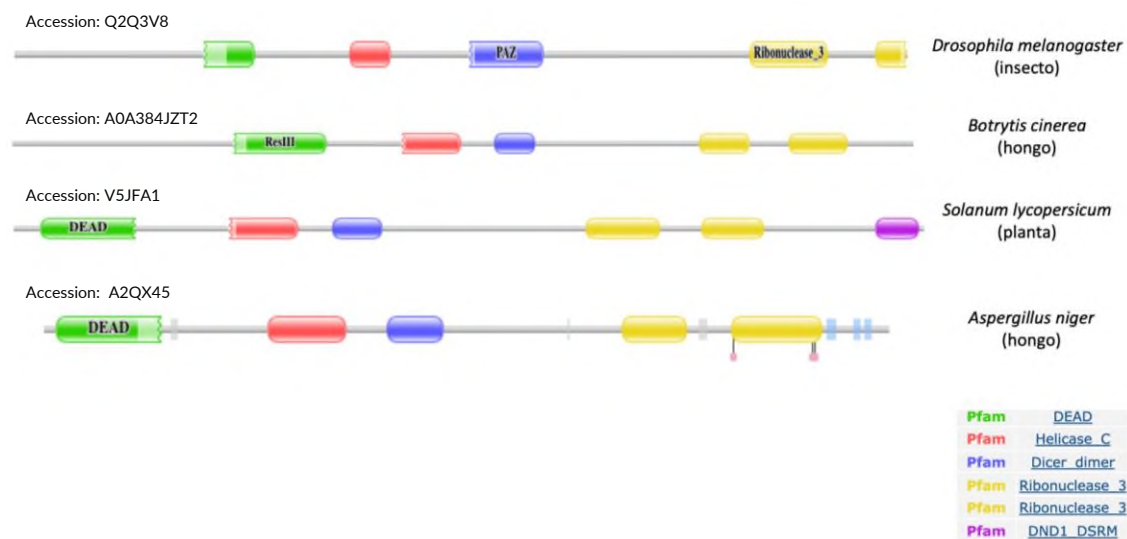


Figura 4. Estructuras típicas de proteínas DCL de insectos, hongos y plantas tomadas de la base de datos pFam.

A las primeras demostraciones de la aplicación de SIGS en el control de fitopatógenos, se han sumado nuevos estudios que han ampliado la lista de especies sobre las cuales resulta efectiva la estrategia de silenciamiento. Entre éstas se encuentran especies de suma importancia económica

como *Magnaporthe oryzae*, así como diversas especies de *Fusarium* y de *Phytophthora*, que afectan plantas de cultivo como hortalizas, solanáceas y cereales.

No obstante, aún son escasos los estudios enfocados en la aplicación de SIGS sobre patógenos de cultivos tropicales como la naranja, el café, el cacao, la piña y la papaya. Algunos patógenos importantes en frutos tropicales, principalmente en la etapa poscosecha son *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum*, mismos que se describen a continuación.

1.7 *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum* como patógenos

1.7.1 *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae es un hongo patógeno que en cultivos agrícolas provoca una enfermedad conocida como “podredumbre blanda” que infecta frutos en etapas precosecha y poscosecha, por lo que afecta el rendimiento y calidad de estos. Sus características morfológicas principales se muestran en la Tabla 3.

El primer síntoma de podredumbre blanda es una apariencia empapada de agua y las partes infectadas posteriormente se desintegran en una masa blanda de células desorganizadas que se desprenden, seguido de un rápido ablandamiento y desintegración del tejido infectado. Se forma un micelio blanco que cubre la fruta gradualmente con esporangióforos y esporangios grises con forma de mechón de pelo (Kwon *et. al.*, 2011; Figura 5).

Tabla 3. Características morfológicas del hongo patógeno *Rhizopus oryzae* (obtenida y modificada de Kwon et al., 2011).

Característica	Color	Forma	Tamaño
Colonia	Gris parduzco a gris negruzco	-	-
Esporángio	-	Globoso	3-10 μm de diámetro
Esporángiospora	-	Subgloboso, limoniforme	4-10 μm de longitud
Esporangióforo	-	-	7-20 μm de diámetro
Columela	-	Globoso, subgloboso	9-120 μm de diámetro

La enfermedad de podredumbre blanca provocada por *Rhizopus oryzae* se ha reportado en manzana, plátano, camote (Kwon et. al., 2011, 2012), pera (Khokhar et. al., 2019), papaya (Cruz-Lachica, 2017), melón y piña (Santiago-Tapia, 2019).



Figura 5. A. Colonia en agar papa dextrosa después de una incubación de 7 días; B. esporangio y esporangióforo; C. Columela; D. esporangiosporas; E. rizoides (Kwon et. al., 2011).

1.7.2 *Fusarium incarnatum*

Fusarium incarnatum es un hongo patógeno con un rango variado de huéspedes a infectar. Este es capaz de producir micotoxinas como fumonisina, deoxinivalenol y zearalenona. Estos químicos inducen la apoptosis a un nivel celular y son responsables de ciertos síntomas clínicos tales como vómito y diarrea en humanos (Wonglom & Sunpapao, 2020).

En frutas, *Fusarium incarnatum* es conocido por provocar podredumbre en la etapa de poscosecha en melón (Wonglom & Sunpapao, 2020), piña (Stępień, 2013; Santiago-Tapia, 2019), papaya (Santiago-Tapia, 2019), y plátano (Kamel, 2016), afectando el tejido cuando éste ya presenta heridas previas (Wonglom & Sunpapao, 2020). Los signos externos visibles de la enfermedad provocada por *F. incarnatum* se aprecian como micelio blanco similar al algodón. Sus características morfológicas se describen en la Tabla 4 y Figura 6.

Tabla 4. Características morfológicas del hongo patógeno *Fusarium incarnatum* (obtenida y concentrada de Wonglom & Sunpapao, 2020).

Característica	Color	Forma	Tamaño	N° de Hifas
Colonia en PDA*	Blanco denso a durazno	Parecido al algodón	-	-
Macroconidio	-	Ligeramente curvo, afilado en el ápice	18-39 μm de longitud	3-5
Microconidio	-	Ovoide, hialina, unicelular, no septada	-	-
Clamidospora	-	Globosa	5-10 μm de diámetro	-

*Agar Papa Dextrosa

También se ha reportado que la infección por *F. incarnatum* causa marchitez en flores como el clavel (Camacho-López *et al.*, 2014), provocando también la denominada enfermedad de “pata prieta” en la jamaica (Ortega-Acosta *et al.*, 2015).

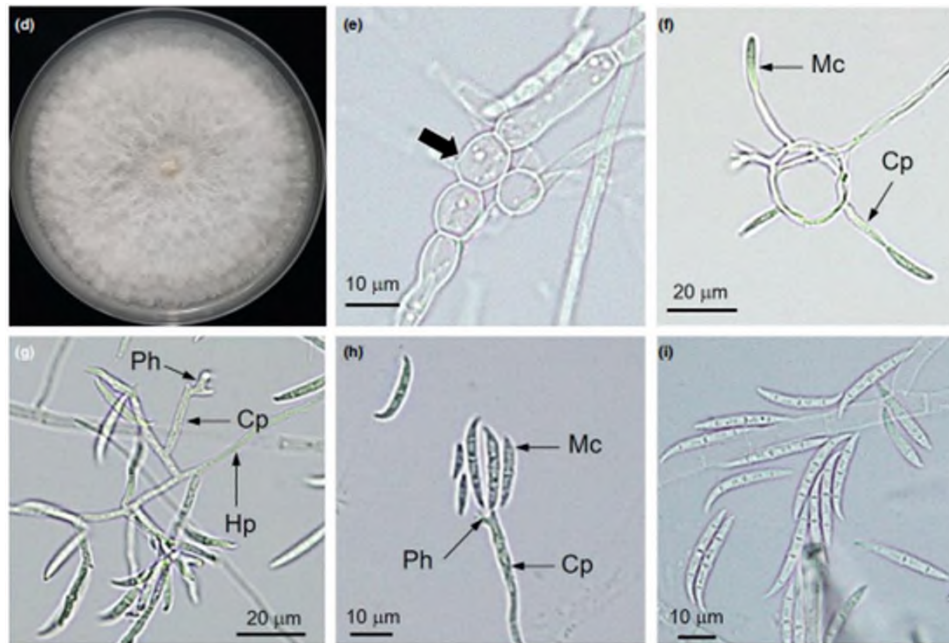


Figura 6. Colonia de *Fusarium sp.* en PDA (d), y las características morfológicas de *Fusarium sp.* (e–i). Las flechas indican clamidosporas (e) y macroconidios (i); Cp, conidióforos, Hp, hifa, Mc, macroconidios y Ph, fialida (Wonglom & Sunpapao, 2020).

1.6.3 *Geotrichum candidum*

Geotrichum candidum es un hongo filamentoso parecido a una levadura. Es un organismo ubicuo que se encuentra en una variedad de hábitats que incluyen aire, agua, ensilaje y suelo y también en alimentos como la leche, el queso y los productos lácteos fermentados (Thornton *et al.*, 2010).

Como fitopatógeno, *G. candidum* causa una enfermedad denominada “Podredumbre agria” en distintas frutas y vegetales durante la etapa de poscosecha, cuya infección ocurre cuando los productos se encuentran magullados o presentan heridas, ya sea en frutas maduras o inmaduras que se encuentren gravemente dañadas. Los síntomas incluyen una descomposición blanda, acuosa y marrón con una capa delgada de crecimiento micelial blanco en la superficie de la fruta. La pudrición puede llegar al hueso de algunas frutas y consumirla por completo. La fruta podrida,

debido a esta enfermedad, presenta un olor característico, que va desde la levadura hasta el vinagre (Yaghmour *et. al.*, 2012). Las características morfológicas del hongo se muestran en la Tabla 5 y Figura 7.

Tabla 5. Características morfológicas del hongo *Geotrichum candidum* (elaborada con información de Hafeez *et al.*, 2015).

Característica	Color	Forma	Tamaño
Colonias	Blancas	No aéreas	-
Conidióforos	-	-	-
Conidios	-	Unicelulares, artroporosos, terminales aéreos, hialinos y sub-globosos	4.5-12.5 X 2-5 μm
Clamidosporas	-	Subglobosas	4-5.3 μm

La podredumbre agria causada por *G. candidum* ha sido reportada en frutas y verduras como tomate (Thornton *et. al.*, 2010), durazno, nectarina (Yaghmour *et al.*, 2012), níspero (Hafeez *et. al.*, 2015), zanahoria (Horita, 2015), papaya y melón (Santiago-Tapia, 2019).

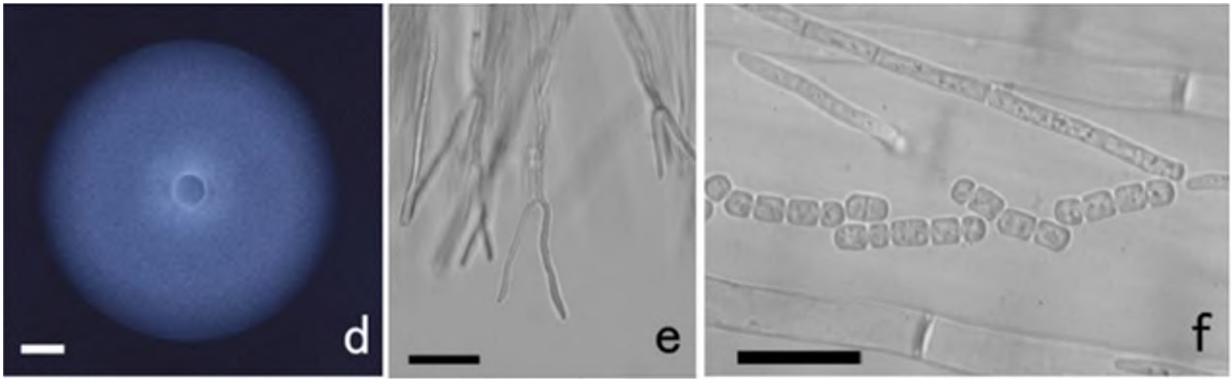


Figura 7. d) Aislado GC2201 incubado en cultivo YMA durante 5 días a 20 °C. e) Ramificación dicotómica de hifas hialinas del aislado GC2201. f) Arthroconidios encadenados derivados de hifas del aislado GC2201 (Horita et. al., 2015).

2.- JUSTIFICACIÓN

La región del Papaloapan se ubica como productora y proveedora importante de frutos tropicales como la piña, la papaya, la naranja y el plátano. Debido a las condiciones climáticas prevalecientes en la región, los cultivos y sus productos se encuentran expuestos al ataque de hongos patógenos en diversos puntos de la cadena de producción y de distribución.

Dentro del amplio grupo de hongos fitopatógenos que se han aislado en la Cuenca del Papaloapan, se encuentran *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum*. En el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan se han identificado molecularmente a partir de aislamientos obtenidos de los frutos de papaya, melón, piña y plátano provenientes de mercados locales (Santiago-Tapia, 2019).

Aunque existen diversas estrategias para el control de fitopatógenos basadas en el uso de compuestos fungicidas de origen sintético, se requiere el desarrollo de nuevas tecnologías que no contaminen y provean un control eficiente de las infecciones para minimizar las pérdidas económicas que estos organismos ocasionan en la producción agrícola.

La estrategia SIGS, basada en el silenciamiento de genes fúngicos a través de la actividad de RNAs pequeños (sRNAs), ha surgido como una alternativa biotecnológica de última generación amigable al ambiente y con gran potencial de aplicación en una variedad de cultivos y productos agrícolas. No obstante, al tratarse de una biotecnología reciente, solo se ha explorado en un número limitado de hongos que no incluye a los fitopatógenos tropicales previamente mencionados.

En este trabajo, se realizaron estudios de diseño y evaluación de sRNAs para proponer estrategias de diseño de biofungicidas para el control de los hongos *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum* en papaya, plátano, melón y piña.

3.- HIPÓTESIS

Los biofungicidas basados en sRNAs dirigidos al silenciamiento de genes DCL fúngicos serán efectivos para el control de la germinación y el desarrollo de los hongos fitopatógenos *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum*, en bioensayos *in vitro*.

4.- OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la efectividad de biofungicidas basados en sRNAs dirigidos al silenciamiento de genes DCL, sobre el control del crecimiento y desarrollo de los hongos fitopatógenos *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum*, en bioensayos *in vitro*.

5.2 Particulares

5.2.1 Identificar DCLs en los hongos de interés en bases genómicas existentes o *de novo*, y confirmar sus secuencias.

5.2.2 Diseñar biofungicidas basados en sRNAs para el silenciamiento de genes DCL en los hongos de interés.

5.2.3 Preparar construcciones para la síntesis de sRNAs *in vitro*.

5.2.4 Evaluar la efectividad de biofungicidas basados en sRNAs en el control del crecimiento y desarrollo de los hongos identificados, mediante bioensayos *in vitro*.

5.- DIAGRAMA EXPERIMENTAL



Figura 8. Diagrama experimental

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

6.1.1 Crecimiento de hongos en medio de cultivo

Las cepas aisladas, identificadas y almacenadas a -80 °C en un trabajo previo (Santiago-Tapia, 2019) fueron cultivadas en medio PDA (Potato Dextrose Agar; Dibico[®]) para *R. oryzae* y *F. incarnatum*, y en medio YEG (20 g/L glucosa, 5 g/L extracto de levadura, 15 g/L agar) para *G. candidum*, e incubadas a 25 °C durante 7 días.

6.1.2 Extracción de ADN genómico por el método fenol-cloroformo

Se recolectó el micelio de los hongos mediante el raspado con una espátula y se depositó en un mortero, luego con nitrógeno líquido se trituró con el mortero hasta obtener un polvo fino (evitando que se humedeciera). Una vez triturado, se tomó un volumen de 200 µl y se depositó en un tubo de 1.5 mL. Se agregaron 600 µL de solución de lisis (Anexo 1), se agitó con ayuda del vórtex por 15 s y se incubó por 10 min a 80 °C en el termobloque. Posteriormente, se añadieron 700 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló en el vórtex por 15 s, luego se centrifugó a una velocidad de 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se separó y se colocó en tubos nuevos y se agregó el doble del volumen de sobrenadante recuperado de alcohol puro y 10 % de acetato de sodio 3 M con respecto al volumen del sobrenadante. Se mezcló en el vortex durante 15 s y se dejó incubando a -20 °C durante 2 h.

Pasadas las 2 h de incubación se centrifugó el microtubo a 10,000 rpm durante 20 min, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 80 % frío, se mezcló en el vortex y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 40 µL de agua desionizada tratada con DEPC, estéril y tratada por luz UV.

6.2 Identificación de DCLs

6.2.1 Búsqueda de genes DCL de *Rhizopus oryzae*

La secuencia DCLs de *R. oryzae* para la elaboración del constructo se tomó de la base de datos funRNA (<http://funrna.riceblast.snu.ac.kr/index.php?a=view>) que es una plataforma de genómica comparativa de todo el reino fúngico para genes putativos que codifican Argonauta, Dicer y RdRP (Choi *et al.*, 2014).

6.2.2 Predicción de genes DCL1 y DCL2 en *Fusarium incarnatum*

Las secuencias candidatas de DCLs de *F. incarnatum* se obtuvieron por predicción a partir de secuencias DCL de hongos genéticamente cercanos depositados en funRNA y UniProt (<https://www.uniprot.org/>), empleando inicialmente una búsqueda con tBLASTn del NCBI contra la base de secuencias traducidas disponibles para *F. incarnatum*. Las secuencias resultantes de DCL1 y DCL2 se emplearon para realizar la identificación de dominios característicos de DCL mediante el programa de predicción de genes múltiples en secuencias de ADN genómico FGENESH+

(<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind>)

contra los DCL de mayor similitud, para posteriormente verificar la presencia de dominios característicos mediante Pfam HMMER (<http://pfam.xfam.org/>).

6.2.3 Predicción de gen DCL1 en *Geotrichum candidum*

Al no contar con anotaciones de DCLs en especies del género *Geotrichum*, se procedió a realizar la predicción de DCL mediante especies de géneros cercanos siguiendo la misma estrategia utilizada para los genes de *F. incarnatum*. *Pseudozyma antarctica* fue el hongo utilizado en la predicción de DCL cuya secuencia se encontró depositada en UniProt.

6.3 Diseño de biofungicidas

6.3.1 Diseño de oligos para amplificación de genes DCL

Para el diseño de oligos se utilizó el software SnapGene y la zona elegida para amplificar se ubicó de acuerdo con zonas de baja homología procurando que ambos tuvieran temperaturas de alineamiento cercanas y un tamaño de entre 20-24 pb en el alineamiento de cada DCL contra los DCL de las frutas a las que cada hongo infecta (Tabla 6), según lo reportado por Santiago-Tapia (2019). Los oligos diseñados para cada DCL se observan en la Tabla 7 y para *R. oryzae* y *G. candidum* amplifican un área de 500 pb, mientras que para DCL1 y DCL2 de *F. incarnatum* amplifican un área de 250 pb. La información sobre las secuencias DCL de las frutas se encuentran en el Anexo 6.

Tabla 6. Frutas tropicales a las que *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum* infectan (Santiago-Tapia, 2019).

Hongo	Fruta tropical que infecta
<i>Rhizopus oryzae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Papaya • Piña • Melón
<i>Fusarium incarnatum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Papaya
<i>Geotrichum candidum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Papaya • Melón

Tabla 7. Secuencias de oligos diseñados para la amplificación de genes DCL en *R. oryzae*, *F. incarnatum* y *G. candidum*.

Oligo	Secuencia 5' - 3'	Tm °C
RoDCL1F	CTGGAGCGACAATCACAAAGCAAA	68
RoDCL1R	AGGTGGCACCTCTTGATCATCA	68
FiDCL1F	CTTGGACAGCGAAATTGCAACAC	68
FiDCL1R	GATCGAAAGCTGCCAATACCGG	68
FiDCL2F	AATCTTACATCCAACGCCGCG	68
FiDCL2R	TCGAGATGTTGGCGAGCATTTTC	68
GcDCL1F	CTGCTAATGCAGGTCGAGTCATT	66
GcDCL1R	AATCAACAATGAGGTCCTCCGC	66

6.3.2 Amplificación de DCL's con la enzima Phusion High-Fidelity

Para realizar la amplificación de las regiones seleccionadas de DCLs, se prepararon reacciones de PCR de acuerdo con la Tabla 8. El programa de PCR empleado se encuentra en la Tabla 9, donde además se especifica el empleo de un gradiente con la finalidad de determinar la temperatura de alineamiento óptima para cada par de oligonucleótidos. Para cada evento de PCR se incluyó un control negativo sin ADN.

Tabla 8. Componentes para master mix de PCR con la enzima Phusion de Thermo Scientific.

Componente	Volumen (20 µl)
HF 5X Buffer (B05185 New England)	4
dNTP's (N044L New England)	1
Oligo Forward (10 µM) *	0.5
Oligo Reverse (10 µM) *	0.5
Templado (DNAg 50-250 ng)	1
Phusion Polymerase (ThermoScientific)	0.5
ddH ₂ O + DEPC	9.5

**R. oryzae* DCL1: RoDCL1F y RoDCL1R. **F. incarnatum* DCL1: FiDCL1F y FiDCL1R. **F. incarnatum* DCL2: FiDCL2F y FiDCL2R. **G. candidum* DCL1: GcDCL1F y GcDCL1R.

Tabla 9. Programa de PCR de gradiente para la amplificación de genes DCL.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	5 min	1
Desnaturalización	98	20 s	30
Alineación	66-68	20 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1
	4	∞	

6.3.3 Electroforesis de ADN

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% (Anexo 1) con buffer de TRIS acetato y EDTA (TAE), o bien, con TRIS, borato y EDTA (TBE) a una concentración 1X (Anexo 1) y se corrieron a 110 volts durante 45 min. Pasado el tiempo, el gel se sumergió en una solución con bromuro de etidio a una proporción 0.02 µL/mL durante 1-2 min aproximadamente y se colocó

de nuevo en la cámara de electroforesis durante 5 min más. La documentación de los geles se realizó en un transiluminador de UV (Ingenius Syngene Bio Imaging).

6.3.4 Purificación con perlas (beads) magnéticas

A un microtubo de 1.5 mL se agregó la cantidad necesaria de beads (Agencourt[®] AMPure[®] XP) y del producto de PCR a purificar (a un volumen 2:1 beads-muestra) y se incubó por 5-10 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo se colocó el microtubo en el magneto durante 5 min o hasta que todas las beads se observaron adheridas a la pared del tubo y se eliminó el sobrenadante con la ayuda de la micropipeta (sin mover del magneto). Se agregaron 200 µL de etanol frío al 70% y se incubó por 1 min fuera del magneto a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado. Se dejó secar el etanol residual en el magneto sobre una sanita y una vez seco se agregaron 20 µL de ddH₂O + DEPC y se pipeteó 10 veces, posteriormente se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para finalmente volver a colocar el tubo en el magneto y coleccionar el sobrenadante (producto de PCR purificado).

6.4 Construcción y síntesis de dsRNAs

6.4.1 PCR *overlap* (superposición) para fusión de genes DCL1 y DCL2 DE *F. incarnatum*

La fusión de las secuencias DCL1 y DCL2 de *F. incarnatum* se realizó mediante la amplificación por separado de cada secuencia con sus respectivos oligos y posterior purificación. Enseguida se realizó otra PCR con los oligos complementarios indicados en la Tabla 10, con temperatura de alineamiento de 68 °C. Los productos se purificaron y se mezclaron en concentraciones equimolares en un microtubo y se incubaron por 5 min a 95°C para desnaturalizar las hebras, luego se redujo la temperatura a 24 °C durante 1 h para propiciar su hibridación como se indica en la Figura 6. Luego se agregaron 10 µL de mix con polimerasa y 10 µL de producto DCL1-DCL2 que se incubó durante 10 min para que se pudieran rellenar con nucleótidos los espacios y se pudiera formar un fragmento completo de la unión DCL1-DCL2. Finalmente se llevó a cabo una PCR de punto final con la polimerasa Maxima Probe de alta fidelidad. El proceso se realizó en el

termociclador con el programa indicado en la Tabla 11 (a partir de la hibridación de DCL1 y DCL2 complementarios). El resumen del proceso se encuentra ilustrado en la Figura 9.

Tabla 10. Oligos complementarios para Overlap PCR de DCL1 y DCL2 de *F. incarnatum*.

Oligo	Secuencia 5'-3'	Tm °C
Fi_2FRC_1R (para DCL1)	CGCGGCGTTGGATGTAAGATTGATCGAAAGCTGCCAATACCGG	87.6
Fi_1RRC_2F (para DCL2)	CCGGTATTGGCAGCTTTCGATCAATCTTACATCCAACGCCGCG	87.6

Tabla 11. Programa para Overlap PCR de DCL1 y DCL2 de *F. incarnatum* en termociclador

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Hibridación	24	60 min	1
Incubación	68	10 min	1
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	30
Alineamiento	68	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1
	4	∞	

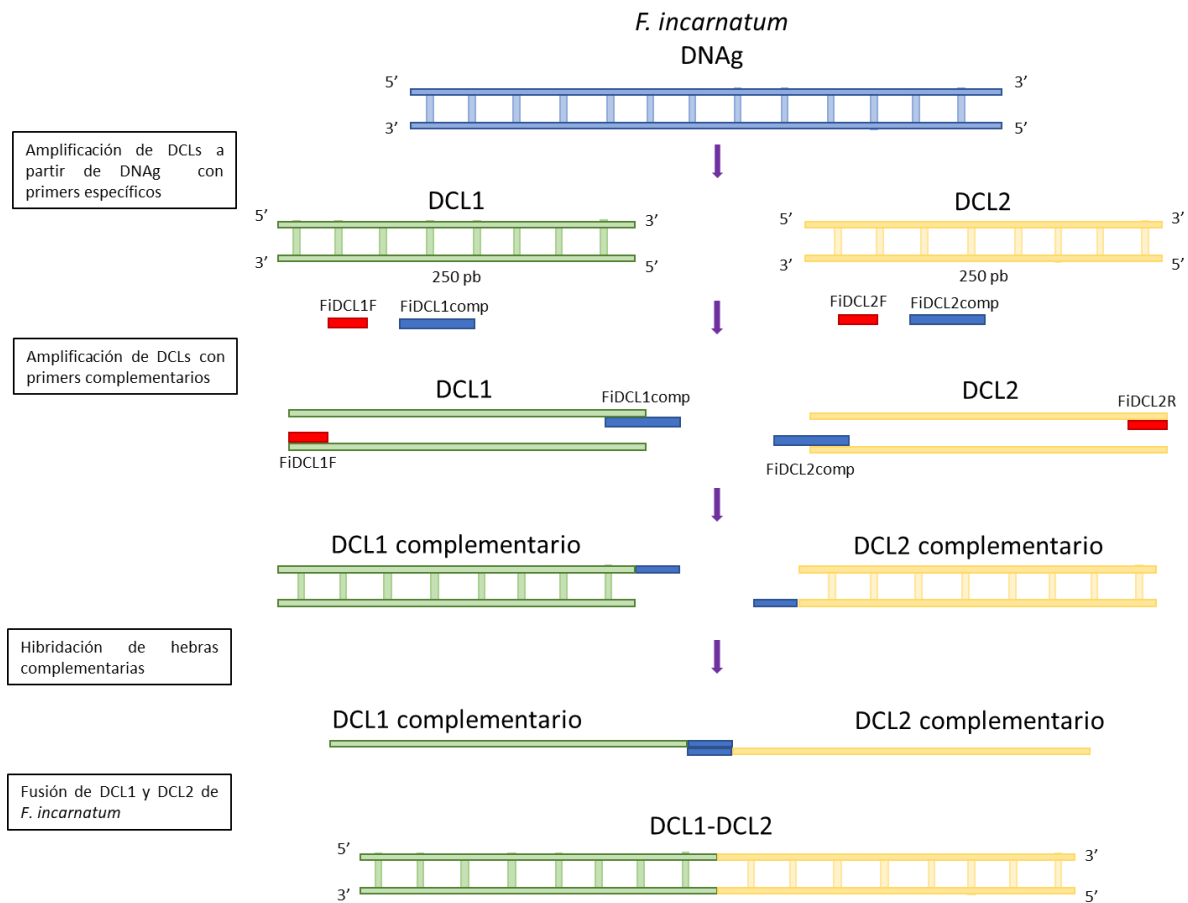


Figura 9. Proceso de Overlap PCR para fusión de genes DCL1 y DCL2 de *F. incarnatum*.

6.4.2 Adición de secuencias T7

La secuencia T7 se añadió a ambos extremos de la secuencia de DCL (Figura 10) mediante una PCR de gradiente y oligos específicos diseñados con SnapGene señalados en la Tabla 12, y utilizando las mismas temperaturas de alineamiento indicadas en el punto 6.3.2 de amplificación de DCL's

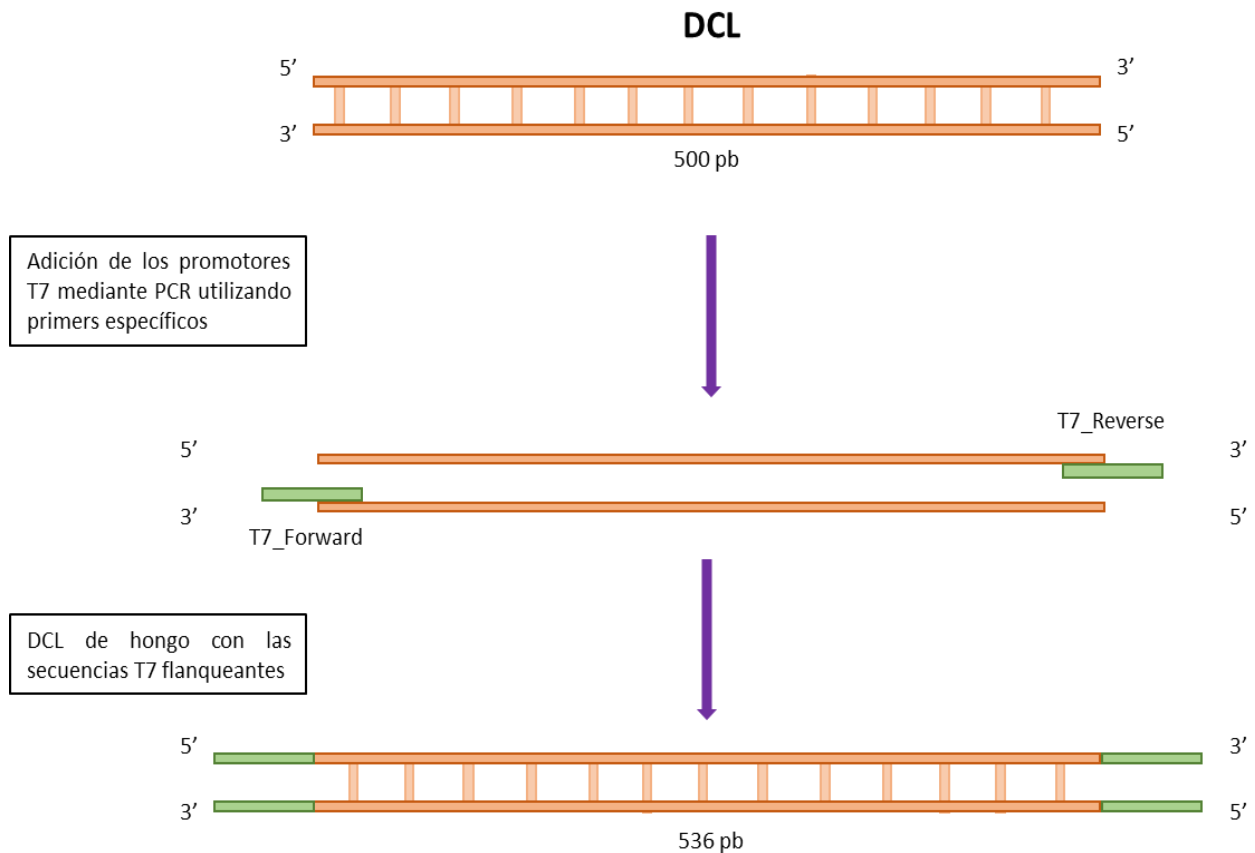


Figura 10. Proceso de adición de secuencias de promotor T7 en ambos extremos de la secuencia DCL.

Tabla 12. Oligos con secuencia de promotor T7 para *R. oryzae*, *F. incarnatum* y *G. candidum*.

Oligo	Secuencia 5' - 3'	Tm °C
T7RoDCL1F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTGGAGCGACAATCACAAAGCAAA	80.4
T7RoDCL1R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGTGGCACCTCTTGATCATCA	79.7
T7FiDCL1F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTGGACAGCGAAATTGCAACACT	79.8
T7FiDCL2R	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCGAGATGTTGGCGAGCATTTTC	80.2
T7GcDCL1F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTGCTAATGCAGGTCGAGTCATT	78.3
T7GcDCL1R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAATCAACAATGAGGTCACTCCGC	79.4

6.4.3 Ligación del producto de PCR al vector pGEM®-T Easy (Promega)

Los productos obtenidos en la sección anterior se purificaron y se ligaron en el vector pGEM T Easy (Anexo 2). Las reacciones de ligación se llevaron a cabo de acuerdo con las especificaciones de la Tabla 13.

Tabla 13. Preparación de reacciones de ligación en pGEM T Easy.

Componente	Volumen (µL)
H ₂ O	1
2X Rapid ligation buffer	2.5
Vector pGEM T Easy (50 ng)	0.5
Producto de PCR (DCL+T7)	0.5-1.5
T4 DNA ligase	0.5

El tubo con la mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente por una hora y posteriormente en refrigeración durante toda la noche.

6.4.4 Transformación de células químicamente competentes de *E. coli*

Las ligaciones en el vector pGEM-T Easy se usaron para transformar a células químicamente competentes de *E. coli* mediante choque térmico (Anexo 2). Para esto, se siguieron las instrucciones del manual One Shot Top 10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Brevemente, un vial con células competentes de *E. coli* almacenado a -80 °C se colocó en hielo donde se permitió descongelar dentro de una campana de flujo laminar por aproximadamente 5 min. Al término se agregó 2.5 µL del producto de ligación en las paredes de vial cerca de la superficie de la solución de células. Se mezcló dando golpes suaves a la base del vial. El vial se dejó incubar en hielo durante 30 minutos. Pasados los primeros 15 minutos se volvió a mezclar la alícuota con golpes suaves en el tubo. Después de los 30 minutos se realizó un choque térmico en un termoblock a una temperatura de 42 °C por 30 s.

Transcurridos los 30 s el vial se regresó al hielo y se le adicionó 250 µL de medio LB o medio SOC y se incubó a 37 °C por una hora con agitación a 250 rpm en una incubadora con agitador

mecánico (New Brunswick Scientific). Al término de la incubación se plaquearon 50, 100 y 150 μL del producto en cajas de Petri con medio sólido LB suplementado con IPTG, X-Gal y ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después del plaqueo las cajas se incubaron toda la noche a 37 °C, y al siguiente día se incubaron a 4 °C en un refrigerador por dos horas con el objetivo de diferenciar claramente las células transformadas de color blanco y células azules no transformadas.

Las colonias blancas (células con el inserto) se seleccionaron y se picaron con la punta de un palillo estéril para sembrarse en una caja con medio LB sólido previamente etiquetada para la ubicación de cada clona seleccionada. El mismo palillo que fue usado para la inoculación y se introdujo en un tubo con 5 mL de medio LB adicionado con ampicilina. La caja se incubó a 37 °C por 24 h. Los tubos se incubaron a 37 °C con agitación a 195 rpm durante toda la noche.

Posteriormente fueron analizadas por PCR de colonia (Anexo 2) con los oligonucleótidos de la tabla 12 para verificar que el constructo correcto fue introducido, y una vez confirmado se extrajo plásmido para su secuenciación (Anexo 2). Alternativamente, se confirmó la construcción mediante digestión del plásmido con la enzima NotI (New England BioLabs), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.4.5 Secuenciación

Los productos de PCR purificados se cuantificaron con ayuda de un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y fueron enviados a secuenciar en calidad de servicio a la unidad de secuenciación LANGEBIO en el CINVESTAV-Irapuato, mediante la metodología Sanger. Una vez obtenido el archivo de secuenciación, se realizó el análisis de la secuencia obtenida con el programa SnapGene.

6.4.6 Síntesis de ldsRNA y sdsRNA

Para la síntesis de ldsRNA se utilizó el kit MEGAscriptTM RNAi de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones se prepararon como se especifica en la Tabla 14, y se

incubaron durante 1 h a 37 °C. Al término, los productos se purificaron y se analizó su concentración en un equipo Nanodrop. Los productos de esta reacción se identificaron como RNAs largos de doble cadena o ldsRNA.

Tabla 14. Preparación de reacciones de síntesis de RNAi.

Componente	Volumen (µL)
H₂O	Aforar a 20 µL
DNA con T7 en los extremos	Variable, hasta 2 µg
10X T7 reaction buffer	2
ATP solution	2
CTP solution	2
GTP solution	2
UTP solution	2
Mezcla enzimática T7	2

Para la síntesis de RNAs cortos o sdsRNAs, se prepararon reacciones de digestión empleando 10 µg de ldsRNA (10 µg) y la enzima ShortCut RNase III (New England Biolabs), de acuerdo a la Tabla 15. Las reacciones se incubaron a 37 °C por 20 minutos. Al término se adicionaron 10 µL de solución de EDTA al 10X para detener la reacción. El producto se purificó agregando a la reacción 110 µL de solución de acetato de sodio 3 M, 2 µL de glicógeno y 330 µL de etanol absoluto.

Tabla 15. Preparación de reacciones de digestión con Rnasa III.

Componente	Volumen (µL)
H₂O	c.b.p. 100
10X buffer de reacción	10
ldsRNA (reacción previa)	10 µg
ShortCut Rnase III	10
10X MgCl₂	10

Después de mezclar por inversión, la reacción se incubó a -20°C por 2 horas para después centrifugar por 20 min a 13,000 rpm en una centrífuga refrigerada (PicoFresco, ThermoScientific). La pastilla precipitada se lavó dos veces con etanol al 70%, se dejó secar y se eluyó en 30 µL de agua libre de RNasa.

El producto se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop, ThermoScientific) y se analizó en un gel de agarosa al 1% junto al producto sin digerir (RNAs de doble cadena largos) obtenido previamente.

6.5 Bioensayos de actividad *in vitro* e *in vivo*

6.5.1 Bioensayos *in vitro* de germinación de esporas en placas

Los bioensayos de germinación de esporas en placas se realizaron con la metodología descrita por Mumbanza *et al.* (2013). Brevemente, en un microtubo de 1.5 mL se agregaron 10 μ L de la suspensión (Anexo 2) de esporas (5×10^5 esp/mL) y 15 μ L de ldsRNA o sdsRNA para alcanzar la concentración final de 1, 0.5, 0.25 y 0 μ g/25 μ L finales, y se dejaron incubando por 24 h a 28 °C en una incubadora. Se realizaron 3 réplicas por cada concentración en 3 experimentos independientes. Al término de la incubación se adicionaron 1.5 mL de agua destilada estéril y se plaquearon con ayuda de un asa de vidrio 50 μ L de la suspensión en cajas de Petri con medio (PDA para *R. oryzae* y *F. incarnatum* y YEG para *G. candidum*).

Se contaron y registraron el número de colonias desarrolladas con un contador de mano (Hand Tally Counter SXH5136) o con el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

6.5.2 Bioensayos *in vitro* de germinación en portaobjetos

El efecto de los dsRNA largos también fue evaluado siguiendo la metodología de Duaniss-Assaf *et al.* (2022). Brevemente, en un portaobjeto se colocaron 10 μ L de esporas suspendidas (5×10^3 esporas) en medio de cultivo líquido (PDB) y se incubó durante 24 h en condiciones húmedas a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación se agregaron 40 μ L de ldsRNA (20 ng/ μ L) al tiempo cero, a las 4h y a las 8 h, se dejaron transcurrir 24 h de incubación en las mismas condiciones y se observó al microscopio utilizando azul de lactofenol como colorante de contraste.

6.5.3 Bioensayos *in vivo*

Los bioensayos de actividad fungicida *in vivo* se realizaron sobre frutos de papaya, jitomate y hojas de papaya. Primeramente, se limpió superficialmente el área con una sanita seca, luego con una punta destilada estéril se hicieron pequeñas heridas en el lugar de la inoculación para así permitir una mejor entrada de dsRNA, se agregaron 20 µl de dsRNA (40 ng/µL) para el tratamiento o agua destilada estéril para el control, y se dejó incubando durante 24 h. Al día siguiente se agregaron 20 µl de suspensión de esporas (5×10^5 esp/mL) y se observó el desarrollo durante los días posteriores.

6.5.4 Análisis estadístico

Para evaluar la actividad de los dsRNA en los bioensayos *in vitro* de germinación de esporas en placa se realizó un ANOVA para determinar las diferencias entre los factores (2 niveles, concentración y tipo de dsRNA) y su interacción, y prueba de Tukey para la comparación múltiple de medias con un 95% de confianza con ayuda del software de análisis estadístico Minitab.

7.- RESULTADOS

7.1 Identificación y confirmación de genes DCL en los hongos de interés

El primer objetivo del presente trabajo consistió en identificar DCLs en los tres hongos de interés: *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum*, y *Geotrichum candidum*, así como realizar la confirmación de sus secuencias.

7.1.1 Búsqueda de DCL1 en *Rhizopus oryzae*

Para el caso del hongo *Rhizopus oryzae* se encontró una secuencia DCL reportada en la base de datos (funRNA). Además de considerar esta secuencia, y en virtud de que para varios hongos se conocen 2 genes DCL, se realizó un intento para encontrar un segundo DCL en el genoma de *R. oryzae*, en caso de que existiera, de acuerdo a la metodología de predicción utilizada en el punto 7.1.2 pero no se obtuvo resultado en la búsqueda por similitud con genes DCL. El DCL1 de *R. oryzae* posee los dominios característicos de la proteína Dicer (Tabla 18) y la región tiene un tamaño de 3,720 nucleótidos. Su secuencia se presenta en el Anexo 3.

7.1.2 Predicción de DCL1 y DCL2 en *Fusarium incarnatum*

Para el caso de *F. incarnatum*, no se encontraron genes reportados de DCL, por lo que se procedió a la predicción de éstos de acuerdo con lo indicado en el punto 6.2.2. Se encontraron DCLs para especies relacionadas como *F. fujikuroi*, *F. graminearum*, y *F. oxysporum*, entre otras (Tabla 16).

Tabla 16. Información de genes DCL de especies de *Fusarium*.

Especies	Base de datos
<i>F. fujikuroi</i>	funRNA
<i>F. graminearum</i>	funRNA
<i>F. oxysporum</i>	funRNA
<i>F. solani</i>	funRNA
<i>F. verticilloides</i>	funRNA
<i>F. coffeatum</i>	UniProt

A partir de las secuencias de las especies de *Fusarium* se logró predecir a DCL1 (4,533 nt) en el genoma de *F. incarnatum*, que contiene los dominios principales de Dicer. Adicionalmente se predijo a DCL2 (2,427 nt) que cuenta con dos dominios (Tabla 17). Dichas secuencias se presentan en el Anexo 4.

Tabla 17. Dominios de los genes DCL1 y DCL2 de *F. incarnatum* de acuerdo a PFM HMMER.

Gen	Dominios en Pfm
<i>F. incarnatum</i> DCL1	<ul style="list-style-type: none"> • DEAD/DEAH box helicase • Helicase conserved C-terminal domain • Dicer dimerisation domain • Ribonuclease III domain • Ribonuclease III domain
<i>F. incarnatum</i> DCL2	<ul style="list-style-type: none"> • Helicase conserved C-terminal domain • Dicer dimerisation domain

7.1.3 Predicción DCL1 en *Geotrichum candidum*

Geotrichum candidum es un hongo con escasa anotación genómica en las bases de datos. La especie más cercana para la cual se tiene reporte de DCL es *Pseudozyma antarctica*. A partir de dicha secuencia se predijo el gen DCL1 en el genoma de *G. candidum*, que tiene una longitud de 4,500 pb y contiene solamente dos dominios helicasa de la proteína Dicer (Tabla 18), pero carece de los dominios RNasa III. Esto puede ser debido a la poca información reportada en bases de datos para *Geotrichum* spp. y sus géneros más cercanos (*Saccharomyces* spp., *Naumovozyma* spp., *Endomyces* spp., *Phaloasus* spp., etc), sin embargo, se optó por utilizar esa secuencia y continuar con la metodología posterior. La secuencia potencial de DCL1 de *Geotrichum candidum* se presenta en el Anexo 5.

En la Tabla 18 se enlistan a modo de resumen los dominios encontrados en las secuencias de DCL identificadas o predichas en los hongos de interés en este trabajo.

Tabla 18. Dominios presentes en los genes DCL de los hongos *R. oryzae*, *F. incarnatum* y *G. candidum*.

Dominio	<i>Rhizopus oryzae</i> DCL1	<i>Fusarium incarnatum</i> DCL1	<i>Fusarium incarnatum</i> DCL2	<i>Geotrichum candidum</i> DCL1
Helicase C-terminal	Presente	Presente	Presente	Presente
Dicer double-stranded RNA-binding fold	Presente	Presente	Presente	-
DEAD/DEAH box	-	Presente	-	Presente
Ribonuclease III	Presente	Presente	-	-

Una vez identificados los genes DCL, se procedió a extraer DNA genómico de los tres hongos con la finalidad de emplearlos como molde en reacciones de PCR y validar la presencia de los genes DCL identificados. La confirmación de los DCLs se realizó mediante la amplificación de los DCLs, toda vez que se seleccionaron las zonas para el diseño de los biofungicidas de sRNAs y se sintetizaron los oligonucleótidos para la amplificación. Los resultados se muestran más adelante. En la Figura 11, se presentan los ADNs genómicos extraídos a partir de los cultivos puros de los hongos de interés, los cuales muestran buenas características de integridad y peso molecular.

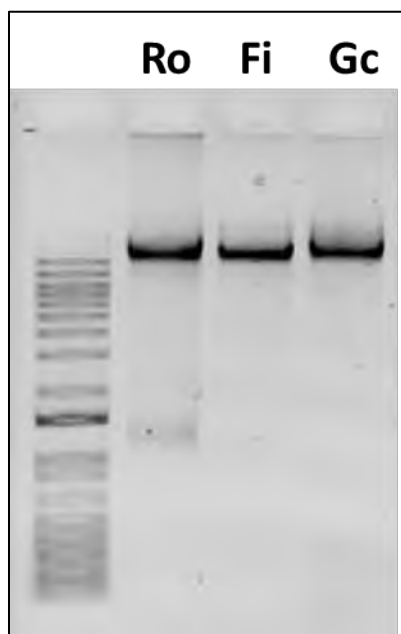


Figura 11. ADN genómico de *R. oryzae* (Ro), *F. incarnatum* (Fi) y *G. candidum* (Gc). Gel de agarosa 1 % con Buffer TAE.

7.2 Selección de zonas para el diseño de biofungicidas dirigidos a genes DCL en los hongos *R. oryzae*, *F. incarnatum* y *G. candidum*

Dando cumplimiento al segundo objetivo del presente trabajo, a partir de las secuencias de DCL identificadas se ubicaron las zonas más adecuadas para el diseño de los biofungicidas de sRNAs. Una de las características deseables en un biofungicida es la ausencia de efectos de silenciamiento en genes fuera del objetivo. Para ubicar las zonas adecuadas se realizaron alineamientos múltiples entre las proteínas DCL de los hongos y los genes DCL de las plantas.

El DCL del hongo *R. oryzae* se analizó con respecto a los DCLs de las plantas que infecta, como es el caso de la papaya, el melón y la piña. En todos los casos se observó que la menor homología se ubica en las regiones comprendidas entre el dominio helicasa C-terminal e incluyendo a Dicer dsRNA-Binding fold. En la Figura 12 se muestra un esquema de la estructura del DCL reportado en *R. oryzae*. En las Figuras 13, 14 y 15 se indican los alineamientos de DCL y las zonas seleccionadas para la síntesis del biofungicida de los patosistemas (papaya) *Carica papaya*:*R. oryzae*, (melón) *Cucumis melo*:*R. oryzae* y (piña) *Ananas comosus*:*R. oryzae*, respectivamente.

Para el caso de *F. incarnatum*, se realizaron alineamientos con el genoma de la papaya (*Carica papaya*). En los alineamientos se observó la menor similitud entre DCL1 de *F. incarnatum* y los DCL de papaya en la zona que abarca el dominio DEAD/DEAH box, helicasa C-terminal y Dicer dsRNA-Binding fold (Figura 16), mientras que para el DCL2 la zona con menor similitud se encuentra en la región espaciadora de los únicos dos dominios que posee, Helicasa C-terminal y Dicer dsRNA-Binding fold (Figura 17). Dicha región se seleccionó para el diseño del biofungicida.

G. candidum infecta a papaya y melón de acuerdo con (Santiago-Tapia, 2019). En la Figura 18 se esquematiza la estructura de su DCL presuntivo. Acorde a los análisis de cada patosistema, la menor similitud entre los DCLs de las plantas huésped se ubica entre los dominios DEAD/DEAH box y helicasa C-terminal, por lo que estos sitios son aptos y se seleccionaron para el diseño del biofungicida (Figura 19).

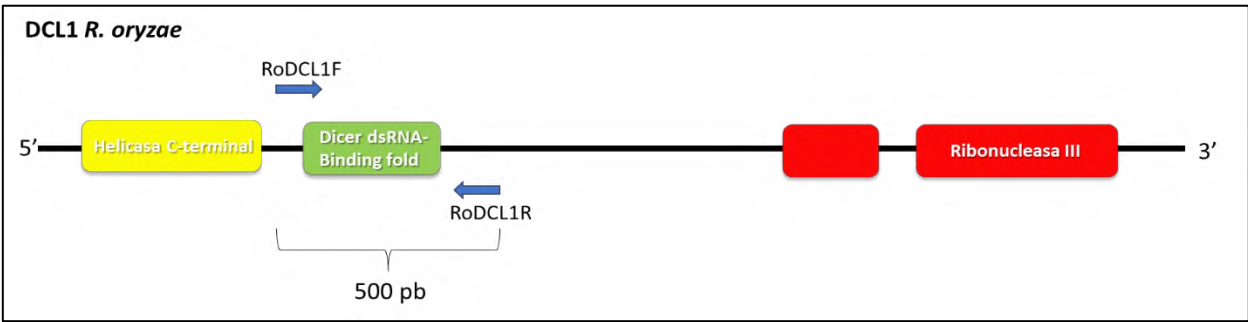


Figura 12. Ilustración representativa del gen DCL1 del hongo *Rhizopus oryzae* y sus dominios de acuerdo a la base de datos funRNA. En flechas azules se indica la zona escogida para amplificar la zona de 500 pb para la producción de dsRNA.

DCL1_R.oryzae	410	KKTHDDQVEPVDAAEATMETNAEQGTSVNGLIEKMT-----QKTSNNNNVFNQEMQD	462
C.papaya_DCL4_UP	1	-----DNDRIYRFG--LFLKDFPIEADRMELDLHLARRRSVLTTLPAQVTEF	49
C.papaya_DCL1_N..	642	KCVDSGVSKDFLIQVSDP--AVLFGNQDAEVLMSMDLFIARRMITKASLFRGAICI	699
DCL1_R.oryzae	463	VEKIKETEVEVKDTEV---EEIEDAEELGEGPFSCWFTILEVLPDGGKFEGRNRRRCLV	519
C.papaya_DCL4_UP	50	DE-----DEILQAQHPQEMCFK	66
C.papaya_DCL1_N..	700	TER--QLASLKNFHVRLMSIVLDVDVPESTTP---WDPTKA-----VLFVPUV	742
DCL1_R.oryzae	520	T---KKFFIELP--QKLFPHNQPFVVMRVIKTELVLDKCEILL---LSDYVMSLMKEL	571
C.papaya_DCL4_UP	67	V-----LDRKRLIPDFVP-----EBSLSKSS	91
C.papaya_DCL1_N..	743	GDKSVDFPKEIDWDLVDEITRADAWTFPQRARFDVYVLTGNTERTLGSDRREYGGKLRNG	802
DCL1_R.oryzae	572	MNKDYHCFVVDIPVYVPLIKNCEQAKFEDLSADEL---KMDVWDQUNAFKER-----	622
C.papaya_DCL4_UP	92	F---SFLLLPVIW-----LSD-----EHAMIDWQITRTCLSSPVEFKTL	128
C.papaya_DCL1_N..	803	MAFGQKCHP---TNGRGA-----VAQFVVKASGLIFRNNAFEMQKVDLSK-----	846
DCL1_R.oryzae	623	-----TNKPLILSEMSDPSF--I-IDNSDYSLRVLITDURYEMNPQSAVPSGF	669
C.papaya_DCL4_UP	129	ANDIEKEILCSDVHLQLANGCWSTSDVENSLSVYATHKKIFVFTVHVHERNGHSPFNRS	188
C.papaya_DCL1_N..	847	-----GELMADGLANVQGLVGGKIVTAAHSGKRIVVDSIRYMTAHSFPRKE	894
DCL1_R.oryzae	670	D-IREAGYFPIIDYVRLGDKFVINDYDCEMIEVERLKRGMDFHPGGIM-----PA	720
C.papaya_DCL4_UP	189	A-----SMTQIWEITFGIHLK-FPCQALAKPLFILRMLHNRRKEN-----SES	234
C.papaya_DCL1_N..	895	GYLGLQVSYADYYKRYGVLLK-RERLIRGGVSYCKMLSPRFHSEALECECE	953
DCL1_R.oryzae	721	RSKGPARTVWVQSTQYVFNASVYI--AMLMIFSIITRIDSLELCYDSRARYDL----	773
C.papaya_DCL4_UP	235	QELDEYFVDFPELQKRLIGSKDIGSSLLEPSMHLLENLDAIELRYVLVSFSEG	294
C.papaya_DCL1_N..	954	TLDKTYVVFPELDFVHPLPGSLVR--GQRLESIMRVSMSLAIQIINDIIOY----	1006
DCL1_R.oryzae	774	-PITDEYLEAYDMSASMEVDYERLETLDGSLKRFIATIRVYINFFPSNEGELHHLIR	832
C.papaya_DCL4_UP	295	AEVTANRLEELITKQQRFSLEBLEILGDAFLKFAVGRREFLMNDTLDGEGELTRKSN	354
C.papaya_DCL1_N..	1007	-FVHASKLEALASQETECYERALELGDAYLWVVSRTFELKYVQKHGQITMHOQ	1065
DCL1_R.oryzae	833	VVCHRALYRAKRLKRYRVTSCAENRRHWPPHFTSTADNA--DTM-----	877
C.papaya_DCL4_UP	355	VVNTNIAKVRIRSNLQVKKRDLDFQCFALGYPCFNICNKEIEMAHMSQVRS--D--	410
C.papaya_DCL1_N..	1066	MVSNMUYQVYLSKGLQVYIQADRFAPSPMAAPGVLPDFDED--TKEDLDFQEKLLTEDK	1123
DCL1_R.oryzae	878	-----EELKHKLSKMLADIVESLSAYLSSLEGCLHTAI	915
C.papaya_DCL4_UP	411	-----TASQFNASEVRCCKGHWLHKMLADVVERLPSAFLUDCGFTGATA---	456
C.papaya_DCL1_N..	1124	AGTNLHDDDDYEDGEREDGELESDSSSYVLSKMLADVVERLPSYVYVGGKMAANH---	1180
DCL1_R.oryzae	916	QMQIPFDQIEKNSDFNVAFEESR--KA-VPPRAEVKALRMLELPKIQVLVDREPKPLV	973
C.papaya_DCL4_UP	457	-----ELMIGIEUDFDISQVSNACFASKYKFLAGYDVAAREKLLIYVTHKGLL	503
C.papaya_DCL1_N..	1181	-----LMIHIGIWESEDPETIECVRPTTVFESILRSVDFDALEGALNIFKDWGLL	1232
DCL1_R.oryzae	973	VEALTHASLPNSTPFCYQRLSELDGDIEDFVIRYVETKFPDAEFGQIETEMDSQVSHV	1032
C.papaya_DCL4_UP	509	ICAFINPSSYNNHGSGCYQRLSELDGALLDYLITSYVSVVPLKPGHLDDLSLSVSNKA	568
C.papaya_DCL1_N..	1233	VEALTHASRPSSGSLCYQRLSELDGALLDYLITRHEVFMETLPPGGLDLSAAAVNEN	1292
DCL1_R.oryzae	1033	EOITCLNNGLKHKMIHYSGKIVRAVNTLEEEVQELKDTGKAVGEYWADMMIPIVLSDVVE	1092
C.papaya_DCL4_UP	569	EANIAVNQSNKTLCDVRSSEDAENKYVDFVM---RPSSETQLFAPACPAALGSLVE	624
C.papaya_DCL1_N..	1293	EARVAVKHKLHMRHGSALEKQIDFVVEVQGELSKPGFNSFLGDMCRASVVEGIVE	1352
DCL1_R.oryzae	1093	SMLGAVTVDAKFDLSPCAAL----FDKNEVPIFDANVTPELVRIHFMKRLITDLQAFGC	1147
C.papaya_DCL4_UP	625	SCFGAILLDSGFNLDYAMKML-----SELDPIRSLPT----LQSPRELOELCOOSYNN	675

Figura 13. Alineamientos de secuencia de aminoácidos de DCL1 de *R. oryzae* y DCL4, DCL1 de *Carica papaya*. En cuadros rojos se muestran las zonas de mayor similitud, siendo estas, secuencias pertenecientes a los dominios ribonucleasa III.

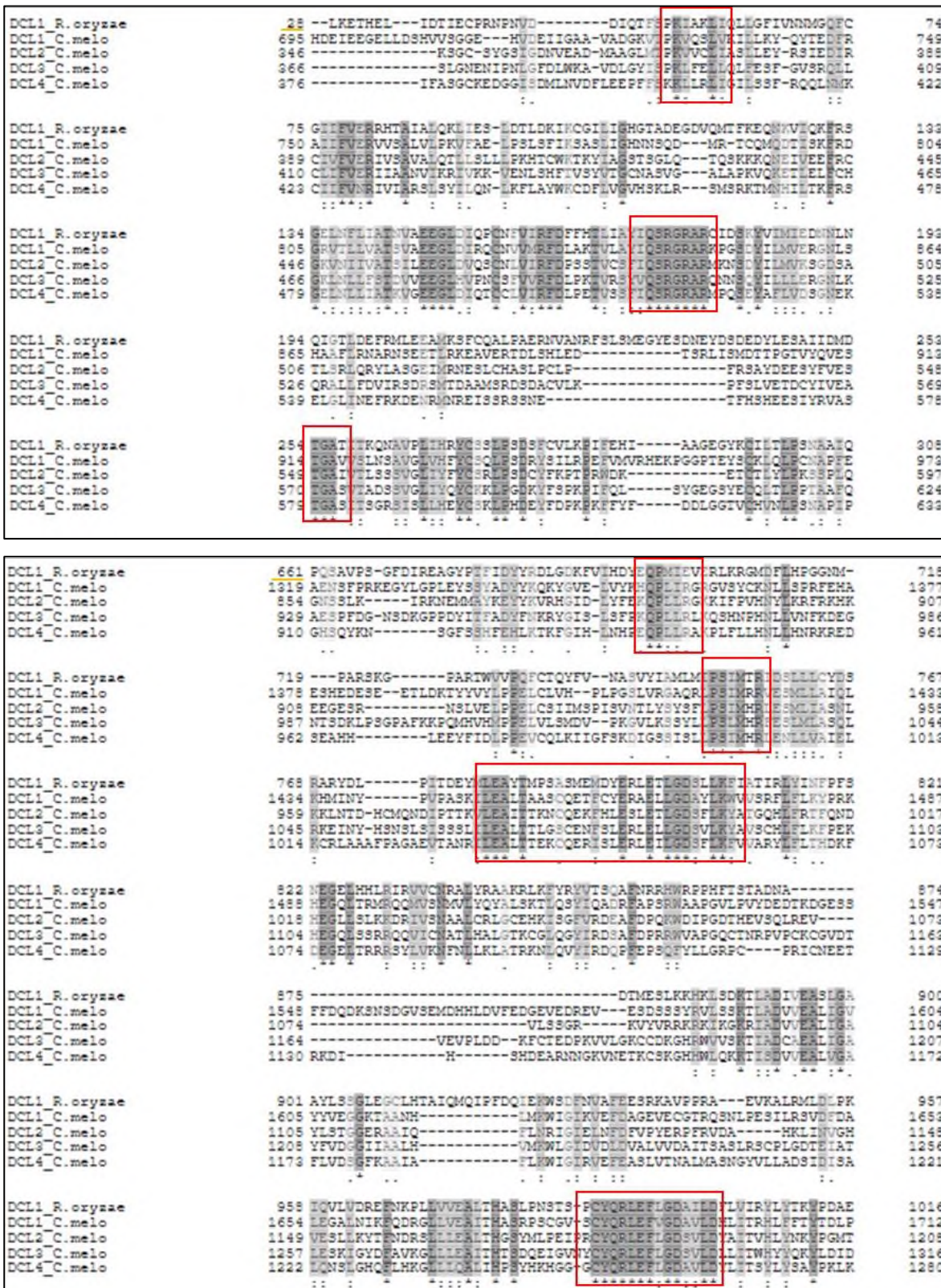


Figura 14. Alineamientos de secuencia de aminoácidos de DCL1 de *R. oryzae* y DCL1, DCL2, DCL3 y DCL4 de *Cucumis melo*. En la imagen superior los tres cuadros rojos representan zonas homólogas que pertenecen a la secuencia del dominio Helicasa C-terminal y el brazo conector a Dicer dsRNA-Binding fold. En la imagen inferior se señala en cuadros rojos las zonas homólogas pertenecientes a los dos dominios Ribonucleasa III.

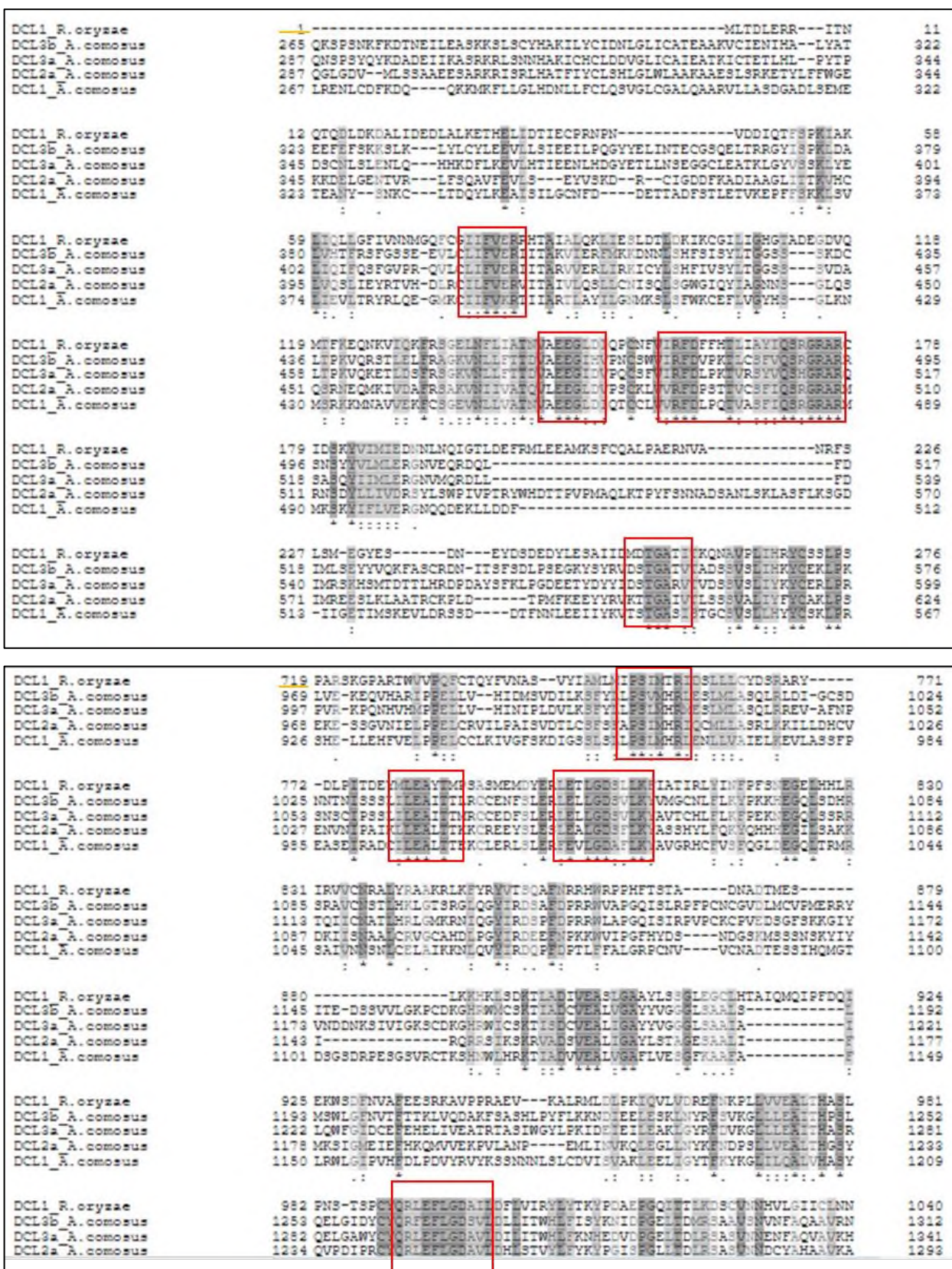
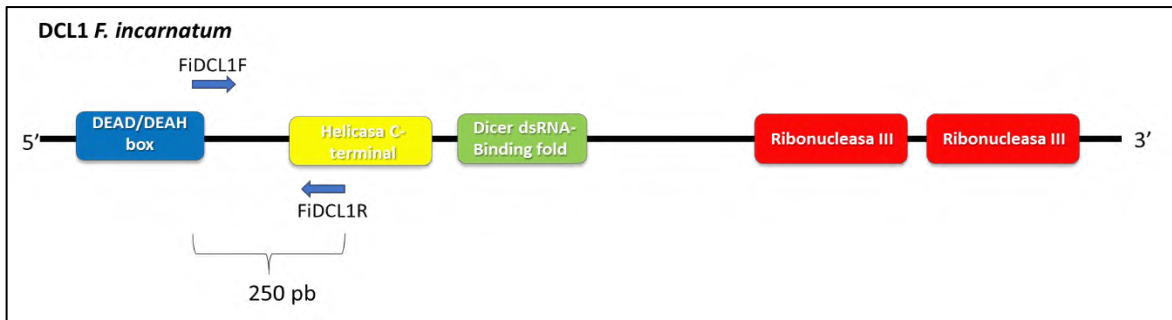
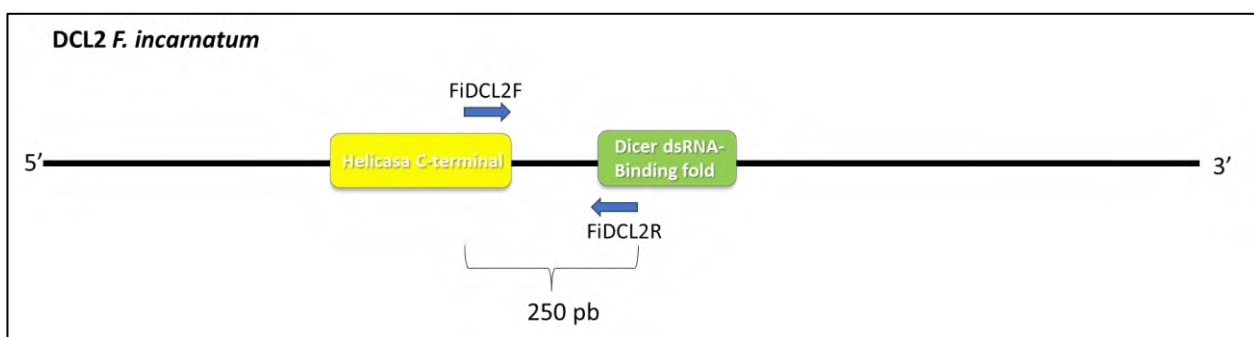


Figura 15. Alineamientos de secuencia de aminoácidos de DCL1 de *R. oryzae* y DCL1, DCL2 y DCL3 de *Ananas comosus*. En la imagen superior los cuatro cuadros rojos representan zonas homólogas que pertenecen a la secuencia del dominio Helicasa C-terminal y el brazo conector a Dicer dsRNA-Binding fold. En la imagen inferior se señala en cuadros rojos las zonas homólogas pertenecientes a los dos dominios Ribonucleasa III.



DCL1_F.incarnatum	784	REALPQLPFVPLFFGNGRSGVAELSC-----SQDPLSHTAHQAEGLAA	826
C.papaya_DCL4 UP	1	DPNDRIYRKFGLFLKDFLPIEA-DRMELDLHLARRRSVLTLLIPAGVTEEDKDEILQAQH	59
C.papaya_DCL1_N..	651	DPFLTQVSDFAVLEGGWQLDRAEV-LSMSMDLPIARAMITKASLVFRGAICTERTQLASLKN	709
DCL1_F.incarnatum	827	ITLKIIFDDDFSKK-VEAAE-----QFVYLLAPLARG--SHEAPQIDWDTIHL	871
C.papaya_DCL4 UP	60	QEMCEKVVLDKRNKLIIDFVPLESGLSKSSFFSFFVLLSFWILD-DEHAMTIDWDTIRT	118
C.papaya_DCL1_N..	710	SHVRLMSIULVDV-VEPSTTTF-----DFTRAVLQVDFVGGKRSVDFPFEDIDWIDVE	760
DCL1_F.incarnatum	872	VKEKEFL-DWNNAPDFFVDFKVVLDYDGGKRLI-----	905
C.papaya_DCL4 UP	119	CLSSPVFKTLANDIE-----KELIC-----	128
C.papaya_DCL1_N..	761	ITRAD---AMTIFLRRAR-----PDVYLGTMERTGGDRREYGFQKLRNGMAGFQKCHPT	812
DCL1_F.incarnatum	906	-----KSIDK-----	910
C.papaya_DCL4 UP	139	-----SDVHLQLANGCWSTSDVENSIVYATHKK	166
C.papaya_DCL1_N..	813	YGIRGAVACFDVVKASGLIPNRNAFEMQKRVDSKGLMMAAGLANVQDLVGKIVTAAHSG	872
DCL1_F.incarnatum	911	-----TKMPSDPTFEGVPEFRRAYRSAEPTIKKEYSNSFFGKSRKTRVWSDDQ	958
C.papaya_DCL4 UP	167	IFVYVIVVWHERNGH-----SYNRSBA-----SSHMTQIWEITFGIHLHPEDQ	209
C.papaya_DCL1_N..	873	KRFYVDSIRYDMTATSFFRKEGYLGLQ-----YSSYA-DYKQVYGVULLFKRS	922
DCL1_F.incarnatum	959	FVVRRELISIRRMILD-EFQV-----DEEVNDCPUIIEEL-----M	994
C.papaya_DCL4 UP	210	DLKRAPPLTILRNLEHMKPEN-----SSQELDEYFVDLPELQQLKILGFSKDIGSS	263
C.papaya_DCL1_N..	923	SLIRGGVSYPCNLSLRFHSEALECECEITLDITYVDFPELQCFVHPLP--GSLVRG	990
DCL1_F.incarnatum	995	VSPFPAIHRIDISALIALDACEVEFELSP-----PAIDLEEMTKSDNDTDEHDKQKQINF	1048
C.papaya_DCL4 UP	264	LSLLESMGHLNLELVKELKYVLSVSEGAEVTAHRIEELATC-----	309
C.papaya_DCL1_N..	981	ACRLSIRGAVVSMELIQLKDIIDYPUH-----ASVLEELER-----	1020
DCL1_F.incarnatum	1049	QAGMGSNVRLLEPLDGSFLKATTTIATSTRKPKGDCLYMVERMLLYCQNLNFTAVDCK	1108
C.papaya_DCL4 UP	310	KQERFSLERLEITLGDAPLKAIVGRRLEILLHDTLQEGELTRKSNVUNNINLAVAIRSN	369
C.papaya_DCL1_N..	1021	SQQETFCYERALLGDAYLKVVRFRFLKLYPKHGGQLTRKQQMUSIMVLYVYALSKG	1080
DCL1_F.incarnatum	1109	PEVIRSLAEDRRIWYDPLTLIK---GE-----A-----	1134
C.papaya_DCL4 UP	370	QVYKRDQLDPCQFFALGYPCFNICNIEIEM-----AIHSQYRSDTAS	413
C.papaya_DCL1_N..	1081	QSMIQADRAPSRAAPGVLPFIF--EDTKEDLFDQEKLLTEDKAGTNLHDDDDYEDGER	1138
DCL1_F.incarnatum	1135	-----LKARKKQSEA-----LADVCEKSLGAYLSKDDKGMMAVAVTQMARSKRHSIV	1187
C.papaya_DCL4 UP	414	QNASSEVRCRSGHWHHITLADVVEALVGFLLVDCGFKGATAFLRWIGIEVDFDSDQVS	473
C.papaya_DCL1_N..	1139	-EDGELESDBSSYVLS-----LADVVEALISYYVVEGGKNAANHLRWIGIQVESDPPEED	1197
DCL1_F.incarnatum	1188	TFDDYVAFKVPDWMQKANSNANQRLVQKVEERAGYHETSAPLEPRTFPIFYYSGQVSP	1247
C.papaya_DCL4 UP	474	N-ACFASKIY-----KPLAGYIDVLALEKLEIYRTHKGLIQEPIFPIYVYN-THGGG	523
C.papaya_DCL1_N..	1198	---CAVRPTTPES-----ILRSVDFDALGAINIRKDWGLVUEVITHAARP-SSGIS	1247
DCL1_F.incarnatum	1248	HQGRLEFLGDALLDMAVVEYDQNFPLADQWLTTEHGMAMUSNFFLGCCLQVRLNLRHML	1307
C.papaya_DCL4 UP	524	CVORLEFLGDALLDVLTISYVFSVFNPKRGHLDLRLSLSVSNKAFANIAVQNSFNKFL	583
C.papaya_DCL1_N..	1248	CVORLEFLVGDALDHLITRHLIFMTDLPLGRLDLSAAANNENEARVAVHKLHLHR	1307
DCL1_F.incarnatum	1308	ANYAIESSEYRDYVIELEAAEERARKEAEQEGISMMDFWRNKPPKRAYASVWEALVGA	1367
C.papaya_DCL4 UP	584	CSRSLSDAIKYIDFWIRPSSST-----QLFGAPKCPKALGDLVESCFA	629
C.papaya_DCL1_N..	1308	HSSSALEKQKRFDFKRWGELSKRGFN-----SFLGSDCKAERVLGDIIVESIAGA	1357

Figura 16. En la imagen superior ilustración representativa del gen DCL1 del hongo *F. incarnatum* y sus dominios de acuerdo a pFam. En flechas azules se indica la zona escogida para amplificar la zona de 250 pb para la producción de dsRNA. En la imagen inferior alineamientos de secuencias de aminoácidos entre el gen DCL1 predicho para *F. incarnatum* contra los DCL1 y DCL4 de *Carica papaya*. Los cuadros rojos superiores representan zonas homólogas pertenecientes al brazo conector entre los dominios Dicer dsRNA-binding fold y Ribonucleasa III, mientras que los últimos cuatro representan zonas homólogas pertenecientes a ambos dominios Ribonucleasa III que DCL1 de *F. incarnatum* predicho posee de acuerdo a pFam



DCL2_F.incarnatum	487	NLLPINEGATKE-----ED-KGKLP-----NFELLFNPWIQVSGKWISDTDKW	528
C.papaya_DCL4_UP	1	-----	0
C.papaya_DCL1_N..	576	MLLPDKGSGEVEKVDQNDQDGLPGIARHREFYFEGVADILKGEWILSGRDCDDSELH	635
DCL2_F.incarnatum	529	LYAYEFIDHENV---AFLR-----FQIAL-----FEE-----	552
C.papaya_DCL4_UP	1	-----DNDRIYRKFGFLKDPFPEADRMELDLHLARRRSVLTTLIPAG	45
C.papaya_DCL1_N..	636	LYMYAVKCVDSGVSKDFLTQVSDFAVLEGNQLDAEVLMSMDLFIARAMITKASLVFRG	695
DCL2_F.incarnatum	553	-----LRPRDIT	560
C.papaya_DCL4_UP	46	VTEFDKDEILQAGHQEMCFKVLDRKLIIPDFVPLESGSLSKSFFSPYLLLEVINWLD	104
C.papaya_DCL1_N..	696	AICITERQLASLKNFHVRLMSIVLDV-DVEPSTTFWD-----PTKAYLFVAVVGDKS	746
DCL2_F.incarnatum	561	VYPREEGTWTIKCTSIIRISINDELLALPDHTSTLLAMHFGHRKWKVEDSDMVIVK-----	614
C.papaya_DCL4_UP	105	DEHAMIIDVQTIRICLS-----P-----	123
C.papaya_DCL1_N..	747	VDPFKEIDLDLVEITR-----ADAWTNPLQARAPDVVYLGTE	784
DCL2_F.incarnatum	615	-----IYGIKDSRDQIGSIPFGE---SPYVIDGDSAKRILVRS-----	651
C.papaya_DCL4_UP	124	-----VFKTIA-----NDIEE-----	135
C.papaya_DCL1_N..	785	RTLGGDRREYGGKLR---NGMFGQKCHFTYGIKGAVALFDVVKASGLIPNRNAFEMQ	840
DCL2_F.incarnatum	652	-----INRPFITKTIERRKPRVEDVRHPFYEYENAP	682
C.papaya_DCL4_UP	136	-ILCSDVHLQLANGCWSTSDVENSIVYATHWIKIFYVWTVVHE---RNGHSPYNRSS--	188
C.papaya_DCL1_N..	841	KVDLSKGLMMDGLANVQDLVQKIVTAHSGKRFVDSI---RYDMTA---ETSFPR	892
DCL2_F.incarnatum	683	EEEYLDVLQWRRARDFLHAVR-----SDQTASSC-----	711
C.papaya_DCL4_UP	189	-----ASSMQTQINETFGIHLEHFEQPMKAKPLFILRNLLHNRKPE-----NSE	233
C.papaya_DCL1_N..	893	KEGYLGLPQYSYADYYKQKYVELLFRKREPLIRGRGVSCKNLLSFRFEHSEALECCE	952
DCL2_F.incarnatum	712	---SPPFRWVLSISQATVUVUSFR--VVELGMLPSTIHELEIQIALESSTILARVU-----	745
C.papaya_DCL4_UP	234	SQELDENFVDFPELQQLKILGFSKDGSSLSLPSMGMHLENLVATEKPVLSVSVFSE	293
C.papaya_DCL1_N..	953	ETLDKTYVVFPELQCFVHPFPGS--LVRGARLSTIMRQVSMIATKCHDIDYPUH-----	1009
DCL2_F.incarnatum	766	--ITDLQLVVCNISAAPSAINFADYERLEFLGDSIKKPCVIQAYSE-----	809
C.papaya_DCL4_UP	294	GAEVTahrILEALTIKCCERSLERLEILGDAFLKFAVGRRLFLHDTLDEGELTRKRS	353
C.papaya_DCL1_N..	1010	----ASKILEALTAASCCITLVERLELQDAVYKMWLSRFLELKYFQKHEGQLTRMQ	1064
DCL2_F.incarnatum	810	-----	809
C.papaya_DCL4_UP	354	NVUNNTNLAKVAIRSNLQVYKRDQLFDPCQFFALGYPCPNICNKEIEM-----	401
C.papaya_DCL1_N..	1065	QMVSNMVLVQYALSKGLQSYIQADRFAFSPRWAAPGVLPF--FDEDTKEDLFDQEKLLTED	1122

Figura 17. En la imagen superior ilustración representativa del gen DCL2 del hongo *F. incarnatum* y sus dominios de acuerdo a pFam. En flechas azules se indica la zona escogida para amplificar la zona de 250 pb para la producción de dsRNA. En la imagen inferior alineamientos de secuencias de aminoácidos del gen DCL2 predicho para *F. incarnatum* contra DCL1 y DCL4 de *Carica papaya*. Las zonas con mayor similitud se encuentran señaladas con recuadros rojos y los tres representan área posterior al último dominio predicho de acuerdo a pFam para DCL2 de *F. incarnatum*.

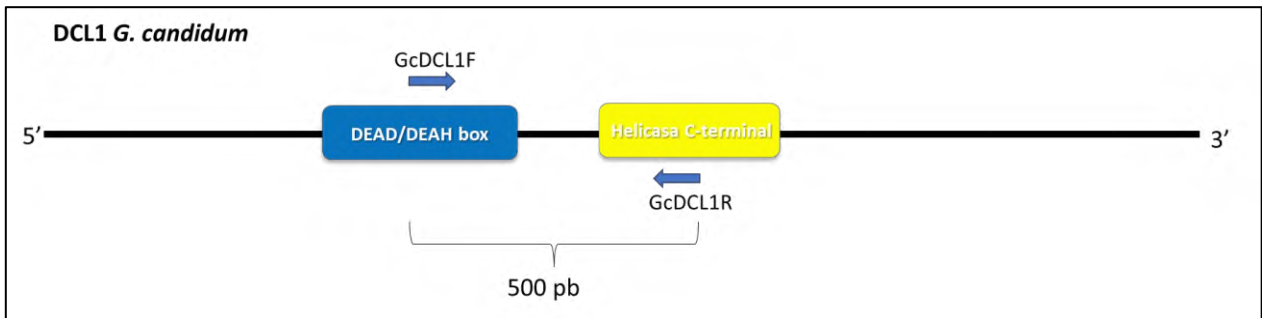


Figura 18. Ilustración representativa del gen DCL1 del hongo *G. candidum* y sus dominios. En flechas azules se indica la zona escogida para amplificar la zona de 500 pb para la producción de dsRNA.

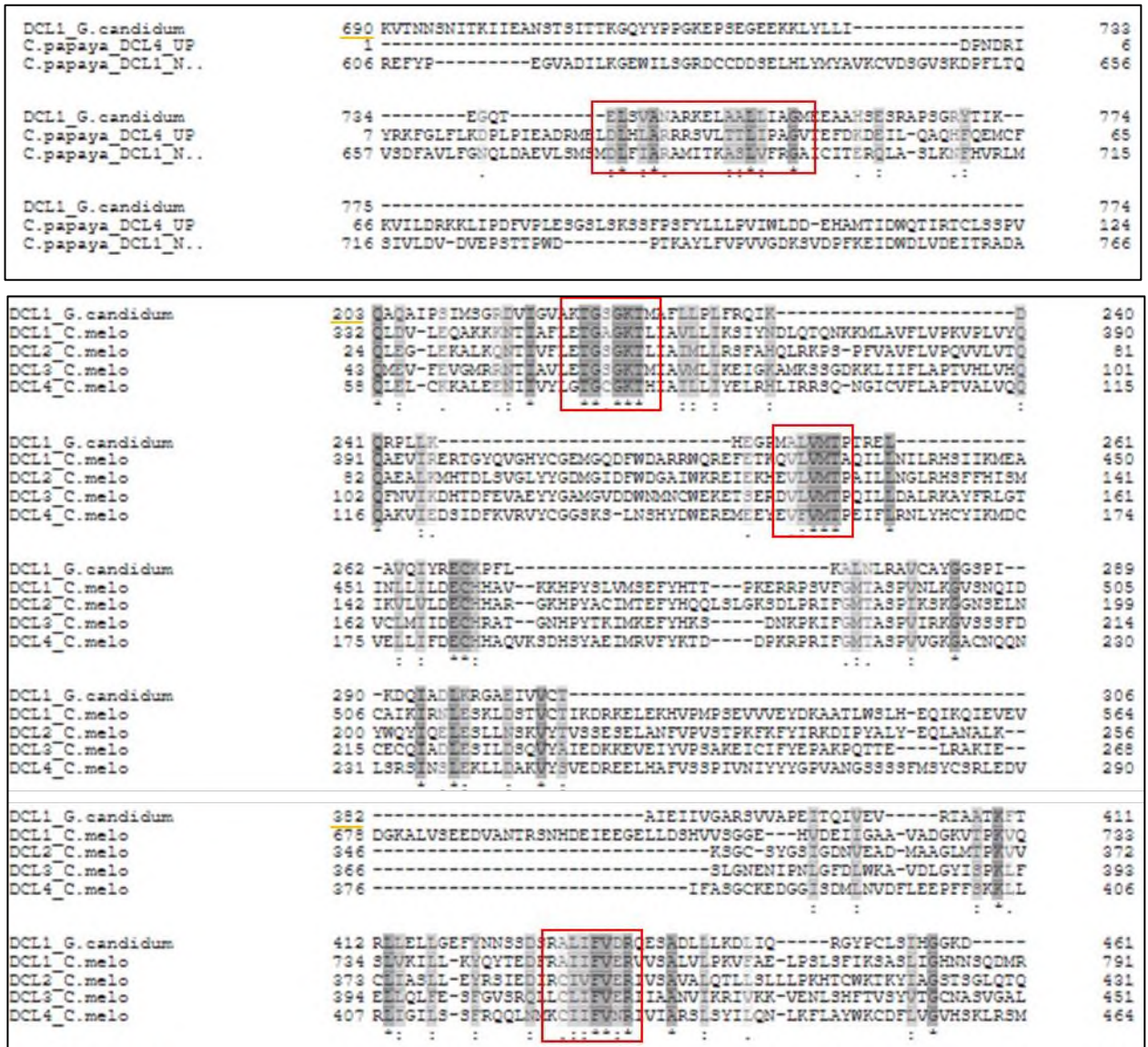


Figura 19. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de DCL1 predicho de *G. candidum* y DCL1 y DCL4 de *Carica papaya*. El recuadro representa homología en una zona sin dominios al final del gen (arriba). Alineamientos de DCL1 predicho de *G. candidum* y DCL1, DCL2, DCL3 Y DCL4 de *Cucumis melo*. Los cuadros rojos representan zonas de mayor similitud entre secuencias, los primeros dos están ubicados en el dominio Dicer dsRNA-binding fold y el último pertenece al dominio Helicasa C-terminal (abajo).

Los alineamientos de proteínas DCL entre los hongos y sus plantas huésped permitieron visualizar regiones de alta conservación de aminoácidos que deben evitarse en el diseño de los RNAs pequeños. Al mismo tiempo, se identificaron regiones de baja similitud de aminoácidos que pueden ser adecuadas para el diseño, sin embargo, la interacción que promueve el silenciamiento postranscripcional ocurre a nivel de nucleótidos, por lo que es importante examinar estas regiones para confirmar que existe una baja similitud de bases.

En las Figuras 20, 21 y 22 se muestran los alineamientos de las regiones de DCL escogidas para los patosistemas de *R. oryzae* con las frutas que infecta respectivamente y se observa que no hay similitudes en bases que puedan afectar el silenciamiento específico de DCL del hongo. Para *F. incarnatum* se muestra el alineamiento de las secuencias DCL del patosistema con *C. papaya* para las secuencias predichas de DCL1 (Figura 23) y DCL2 (Figura 24), se observa de igual manera poca similitud de bases. En *G. candidum* (Figura 25 y 26) se obtiene el mismo resultado para los patosistemas con *C. melo* y *C. papaya*.

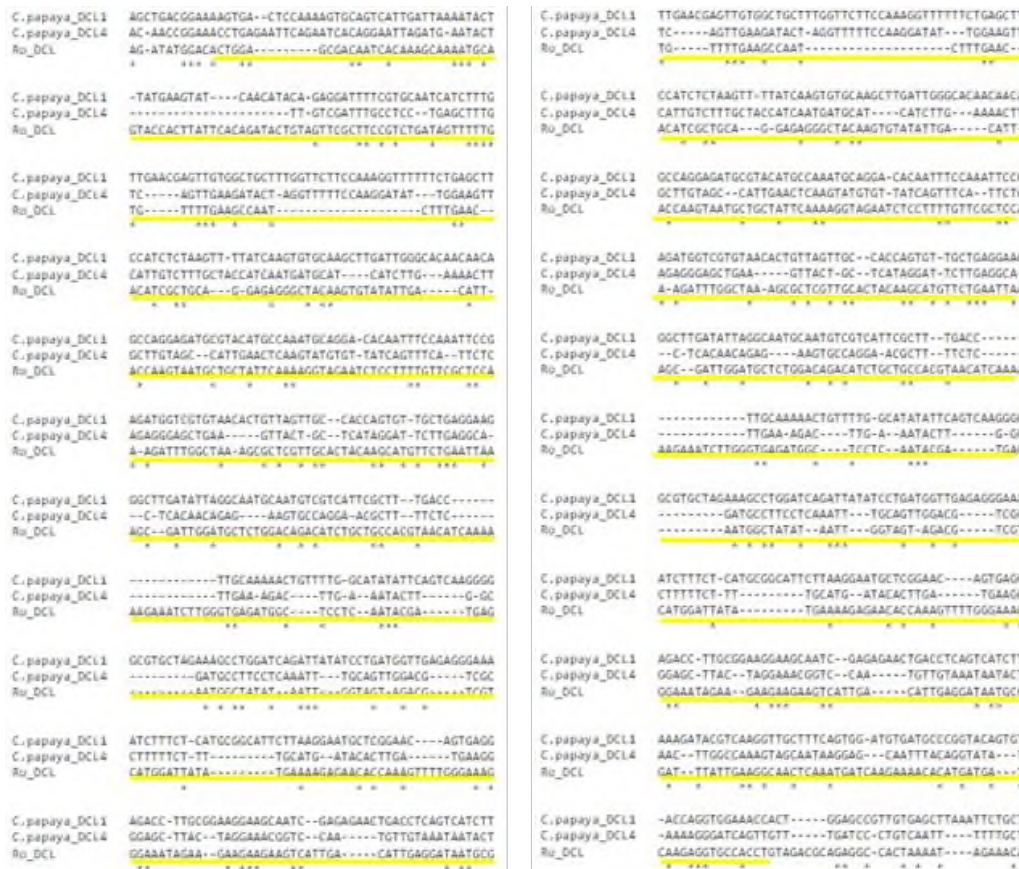


Figura 20. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes DCL en el patosistema *R. oryzae*:*C. papaya*.

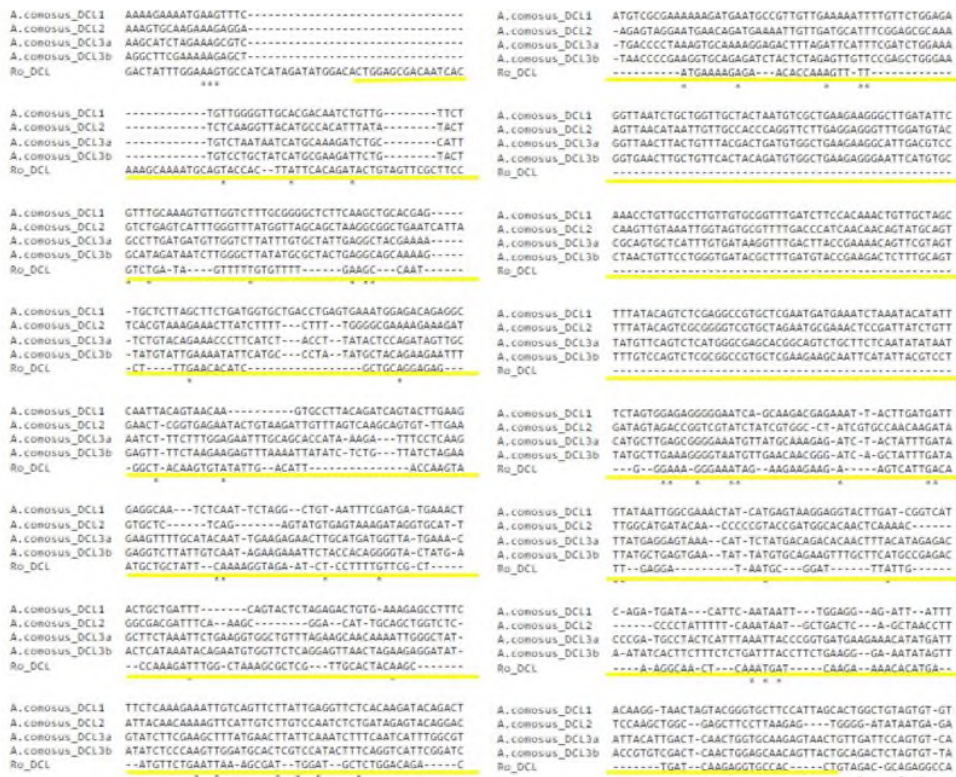


Figura 21. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes DCL en el patosistema *R. oryzae:A.comosus*.

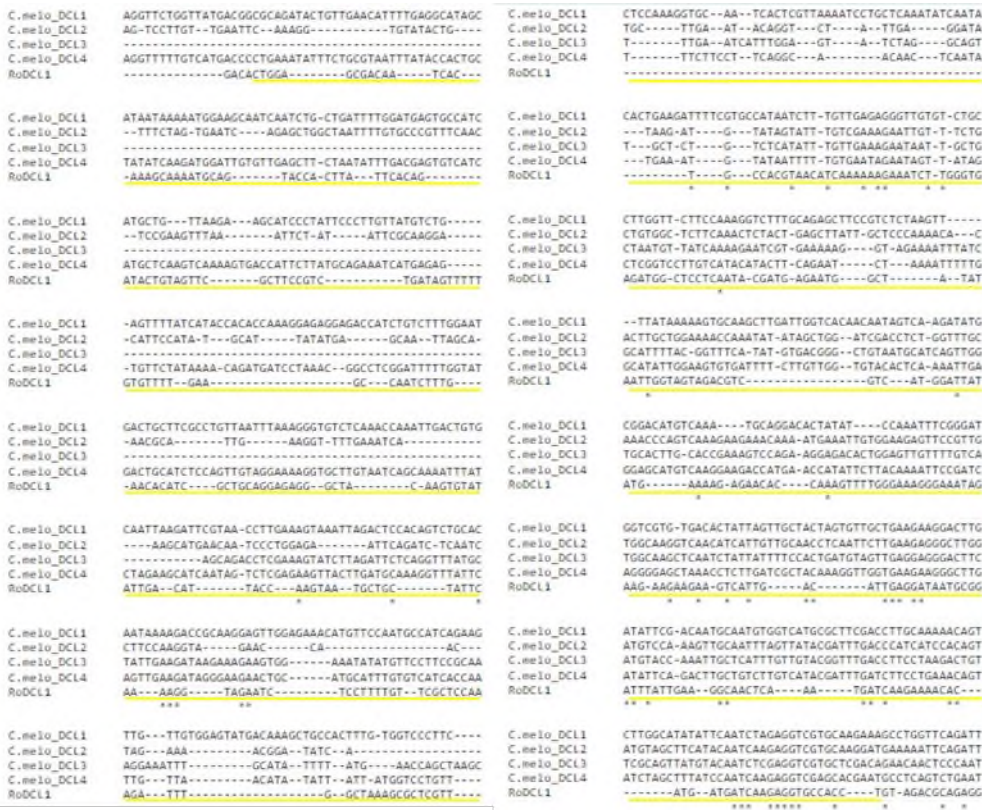


Figura 22. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes DCL en el patosistema *R.oryzae:C.melo*.



Figura 23. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de gen DCL1 en el patosistema *F.incarnatum*:*C.papaya*.



Figura 24. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de gen DCL2 en el patosistema *F.incarnatum*:*C.papaya*.

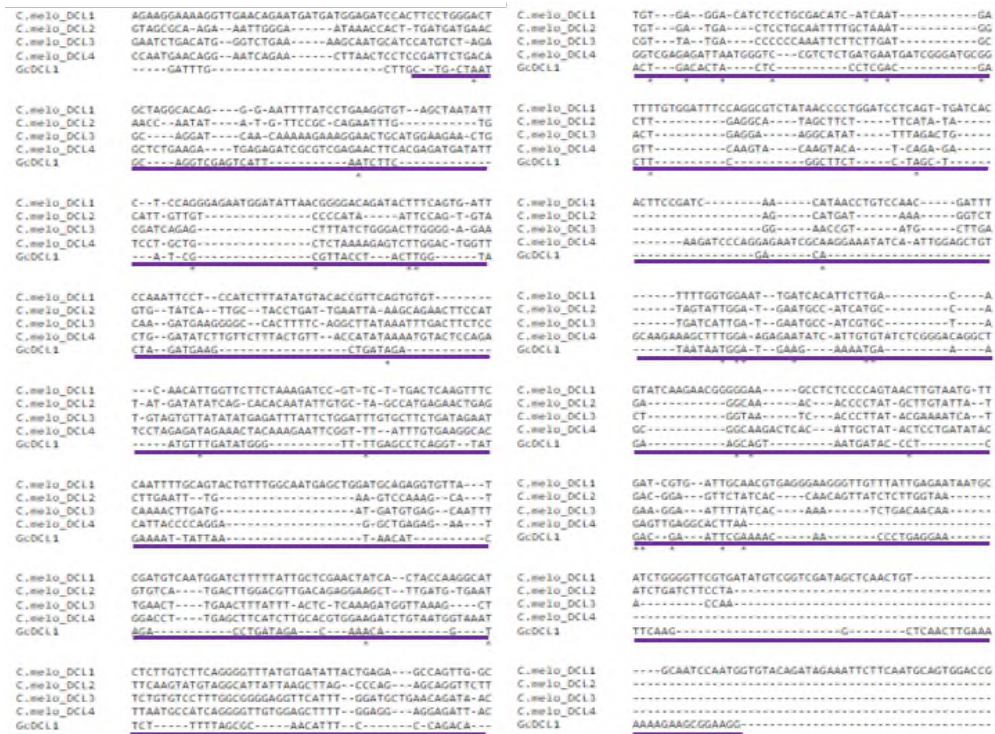


Figura 25. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes DCL en el patosistema *G.candidum*:*C.melo*.

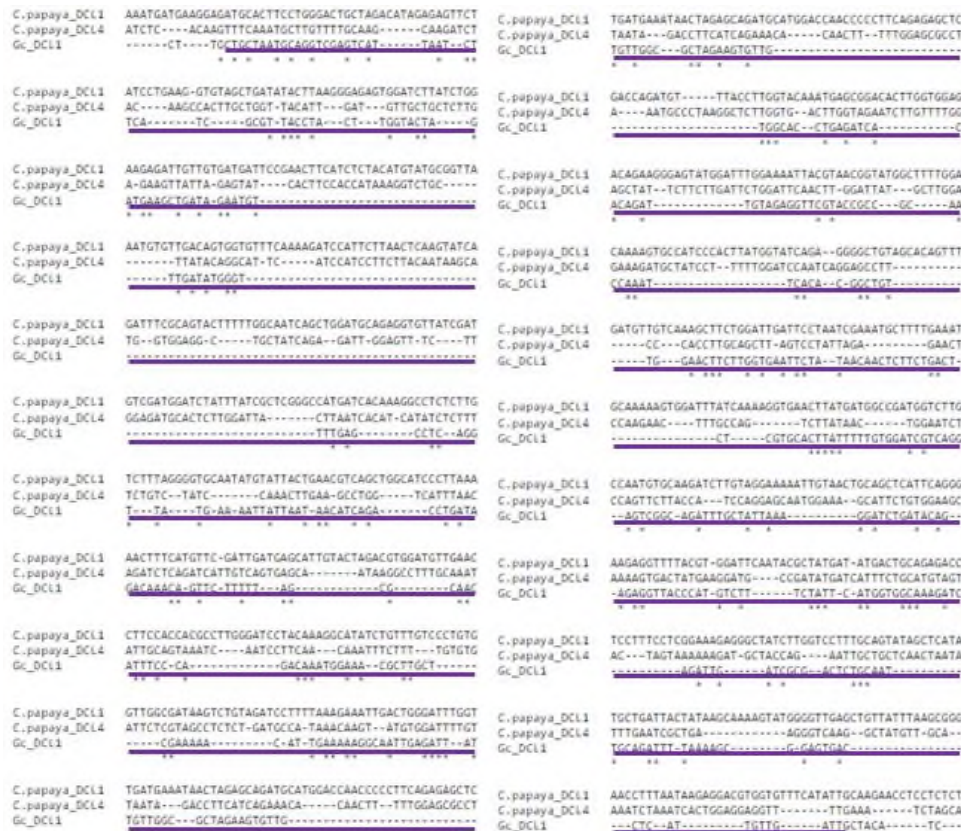


Figura 26. Alineamientos de secuencias nucleotídicas de genes DCL en el patosistema *G.candidum*:*C.papaya*.

7.3 Construcción y confirmación para la síntesis de sRNAs *in vitro*

Para dar cumplimiento al tercer objetivo de este trabajo, y adicionalmente para confirmar la secuencia de los DCLs a partir de DNA genómico, se llevó a cabo la amplificación de los genes DCL1 de *R. oryzae*, DCL1 y DCL2 de *F. incarnatum* y DCL1 de *G. candidum*, de acuerdo con lo especificado en el punto 6.3.2. Los resultados de la PCR se revelaron por electroforesis (Figura 27). Los productos de PCR amplificados a partir del gen DCL1 de *R. oryzae* (*Ro*) y *G. candidum* (*Gc*) poseen un peso molecular de 500 pb como se esperaba, así como DCL1 y DCL2 de *F. incarnatum* (*Fi*) con 250 pb cada uno, respectivamente. Con estos resultados se procedió a realizar la construcción de fusión de los dos DCLs de *F. incarnatum*.

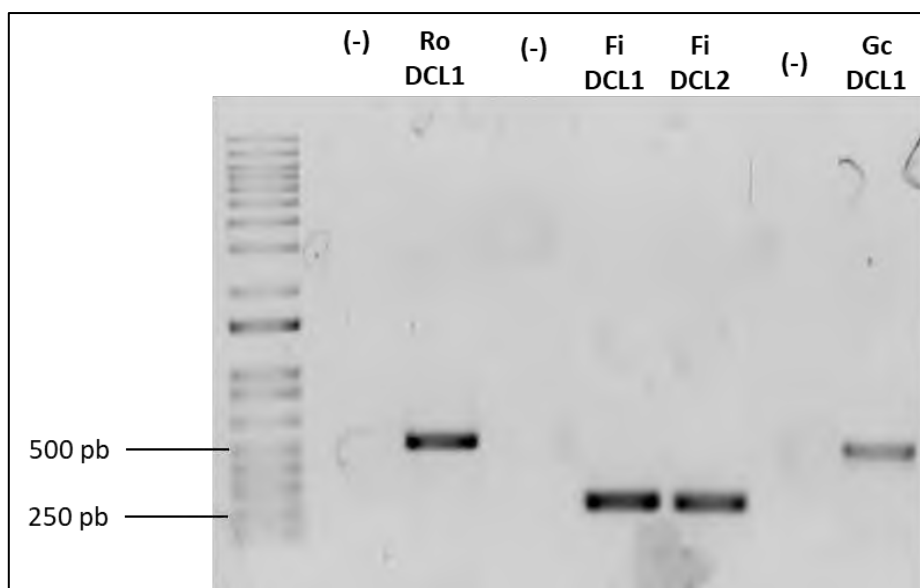


Figura 27. Resultados de la amplificación de DCL de los hongos *Rhizopus oryzae* (*RoDCL1*) (500 pb), *Fusarium incarnatum* (*FiDCL1*, *FiDCL2*; ambos de 250 pb) y *Geotrichum candidum* (*GcDCL1*; 500 pb) visualizados en gel de agarosa al 1% con buffer TAE.

Para la fusión en un solo constructo de 500 pb de DCL1 y DCL2 de *F. incarnatum* se llevó a cabo una Overlap PCR de acuerdo con lo especificado en el punto 6.4.1. En la Figura 28 se muestra el resultado de la fusión. A partir de los fragmentos de 250 pb, se logró obtener el producto fusionado de 500 pb.

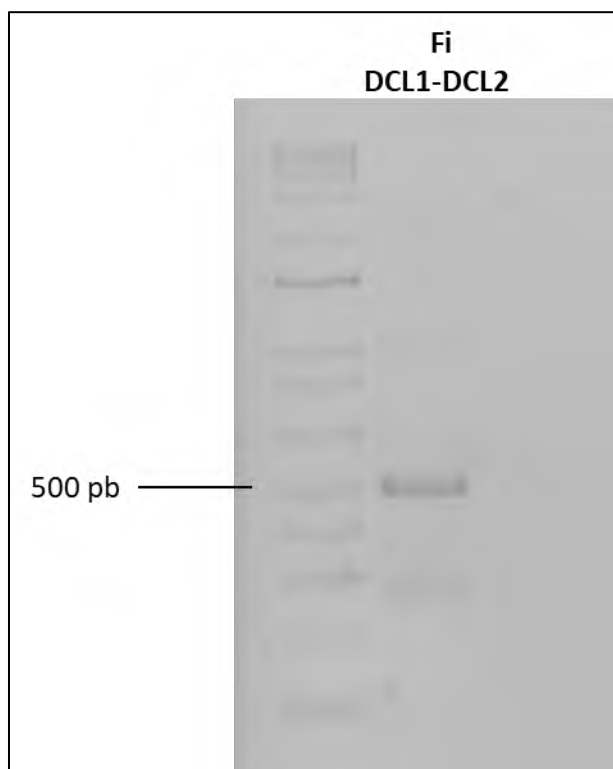


Figura 28 Constructo de 500 pb producto de overlap PCR para fusión de DCL1 y DCL2 del hongo *F. incarnatum* visualizado en gel de agarosa al 1% y buffer TAE.

Posteriormente, a los productos únicos de DCL1 obtenidos de *R. oryzae* y *G. candidum*, así como al producto fusionado de *F. incarnatum*, se agregaron en ambos extremos las secuencias del promotor T7 mediante PCR, empleando los oligonucleótidos que se especifican en la Tabla 12. Los resultados de la adición del promotor T7 se muestran en la Figura 29, donde se observa el aumento del peso molecular, tal como se esperaba debido a la adición en ambos extremos del producto de fusión, para obtener un producto de 536 pb.

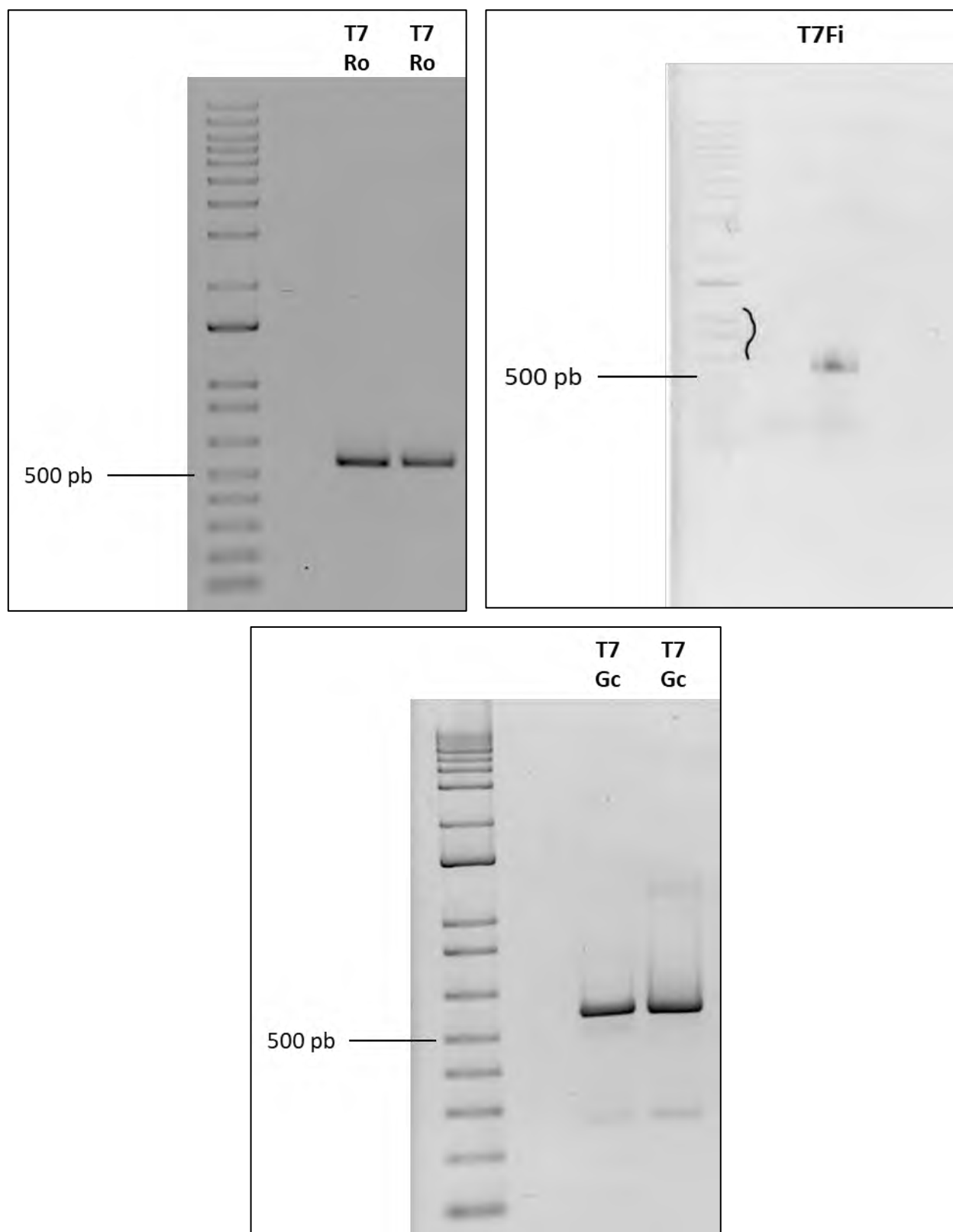


Figura 29. Resultados de la adición de los promotores T7 a ambos extremos de las secuencias DCL de los hongos *R. oryzae* (T7 Ro), *F. incarnatum* (T7 Fi) y *G. candidum* (T7 Gc) visualizados en gels de agarosa al 1% y buffer TAE todos los resultados muestran un aumento en el peso molecular, tal como se esperaba (536 pb).

Con la finalidad de conservar las construcciones flanqueadas por T7 y confirmar por secuenciación la identidad de los productos, se realizó su clonación y transformación en *E. coli*. Una vez que se obtuvieron clonas de *E. coli* transformantes presuntivas, se realizó la confirmación preliminar de la presencia de las construcciones mediante digestión del plásmido con la enzima NotI para *R. oryzae* (Figura 30) y mediante PCR de colonia para *F. incarnatum* (Figura 31) y *G. candidum* (Figura 32). Los procedimientos se encuentran especificados en el Anexo 2. Para los tres hongos se obtuvo una correcta transformación al observarse bandas del peso molecular esperado para cada una de las colonias analizadas.

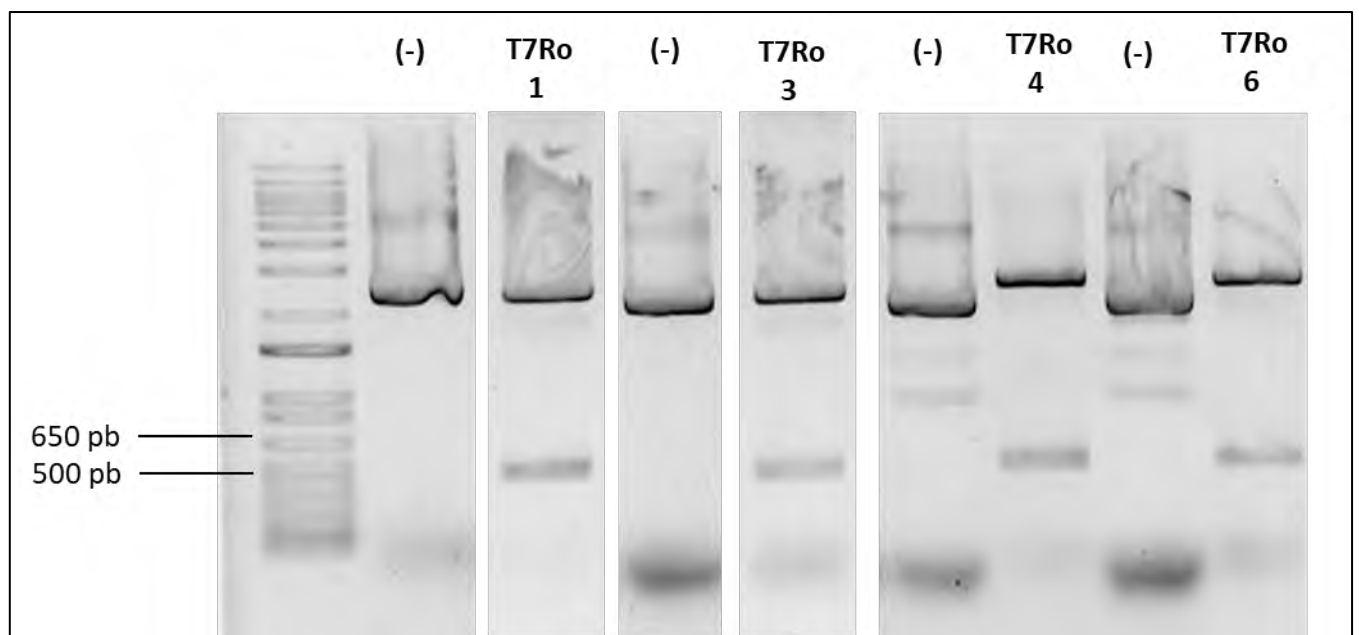


Figura 30. Digestiones de plásmidos con la enzima NotI de las colonias transformadas Ro1, Ro3, Ro4 y Ro5 del hongo *R. oryzae* visualizados en gel de agarosa al 1% y buffer TAE. Las bandas tienen un peso molecular de entre 500-600 pb como se esperaba (536 pb) .

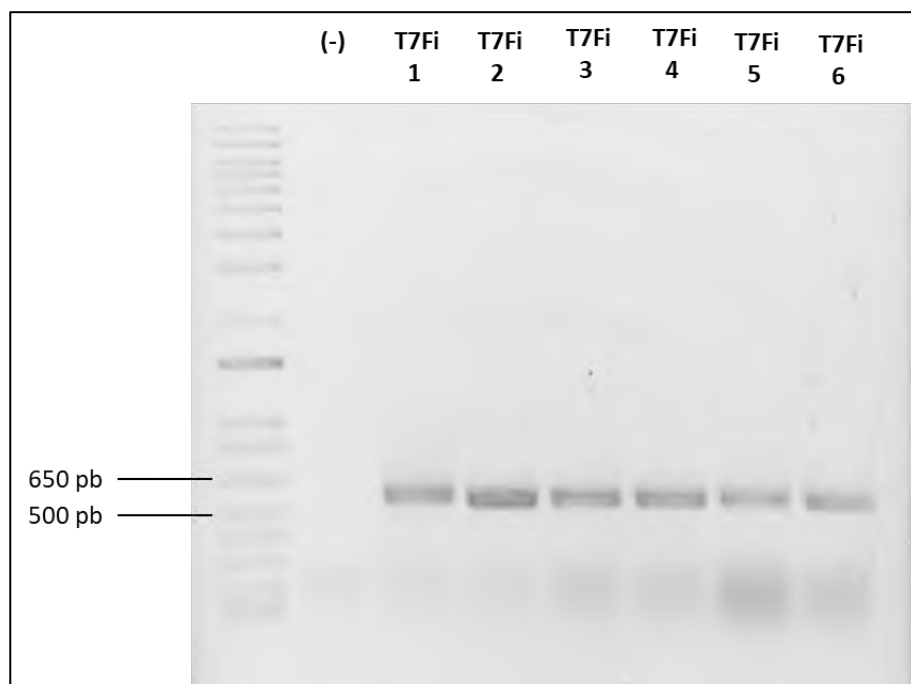


Figura 31. PCR de colonia con primers T7 y las colonias Fi1, Fi2, Fi3, Fi4, Fi5 y Fi6 como molde del hongo *F. incarnatum* visualizados en gel de agarosa al 1% y buffer TAE. Los resultados muestran bandas del peso molecular esperado (536 pb).

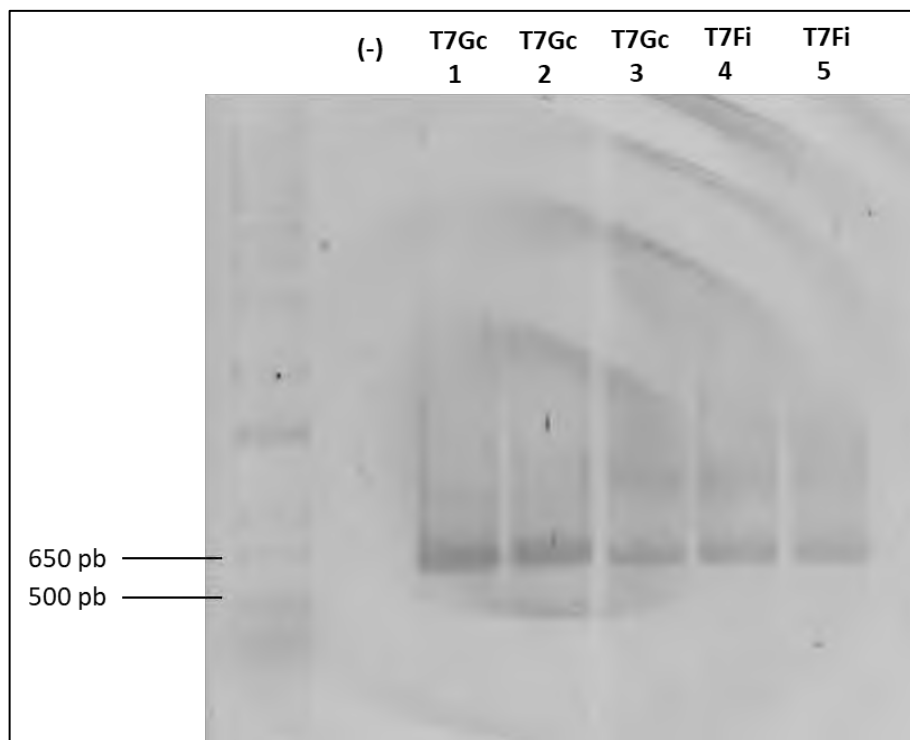


Figura 32. PCR de colonia con primers T7 y las colonias Gc1, Gc2, Gc3, Gc4 y Gc5 del hongo *G. candidum*. visualizados en gel de agarosa 1% y buffer TAE. Los resultados muestran bandas del peso molecular esperado (536 pb).

Después de verificar que la transformación fue realizada correctamente y que las colonias blancas analizadas contuvieran el constructo mayor de 500 pb de bases esperado, dos muestras de plásmido por cada hongo, obtenidas de colonias bacterianas independientes, se enviaron a secuenciar por ambos extremos a la unidad de secuenciación LANGEBIO en el CINVESTAV-Irapuato.

Los electroferogramas recibidos de la secuenciación fueron analizados y limpiados para eliminar las zonas de los extremos con poca especificidad, luego con ayuda del software SnapGene se verificó que la secuencia de DCL tuviera los extremos T7 y para las dos secuencias de los tres hongos estos las contenían. Después se hicieron alineamientos con la herramienta de T-Coffee (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>) del EMBL-EBI para comparar las secuencias de bases de datos y predichas con las secuencias recibidas.

El alineamiento entre el DCL1 de *R. oryzae* de funRNA y los DCL1 de las colonias Ro1 y Ro5 que se secuenciaron mostró similitud casi del 100%, se encontraron cambios en dos bases (Figura 33), esto sin considerar los extremos con las secuencias del promotor T7 que se encuentran a ambos extremos del gen. Sin embargo, estas diferencias pertenecen al brazo conector entre el dominio Dicer dsRNA-Binding fold y el primer dominio Ribonucleasa III por lo que no implican un cambio en la funcionalidad del gen.

Para *F. incarnatum* se mandaron a secuenciar las colonias Fi1 y Fi2 y se alinearon en conjunto con la unión DCL1-DCL2 de los genes predichos anteriormente. Los resultados mostraron cambios de bases nucleotídicas que pertenecen a brazos conectores (Figura 34) entre el dominio DEAD/DEAH box y helicasa C-terminal de DCL1 y los dominios helicasa C-terminal y Dicer dsRNA-Binding domain de DCL2, además Fi1 presenta 21 pb adicionales en el extremo 3' pertenecientes al oligo reverso.

El alineamiento de DCL1 predicho para *G. candidum* y las secuencias de las colonias Gc2 y Gc4 mostraron múltiples cambios de bases (Figura 35), este resultado se puede deber a la falta de

secuencias DCL conocidas del género *Geotrichum* y sus géneros cercanos que llevaron a la predicción de DCL1 con especies lejanamente emparentadas.

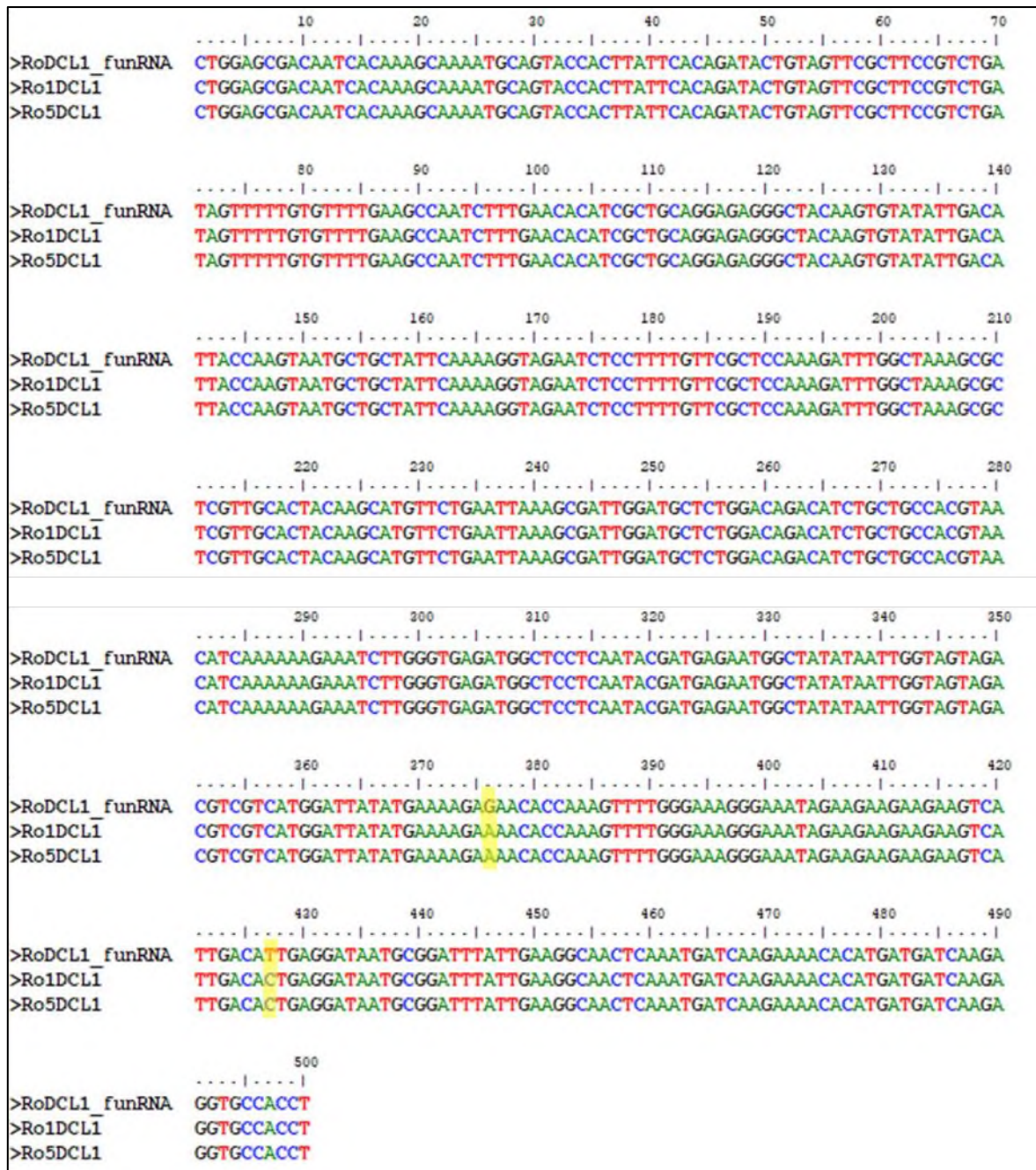


Figura 33. Alineamientos de secuencias DCL de *R. oryzae* obtenidas por secuenciación (Ro1DCL1 y Ro5DCL1) y de la base de datos funRNA (RoDCL1_funRNA). En amarillo se muestran las diferencias entre ellas.

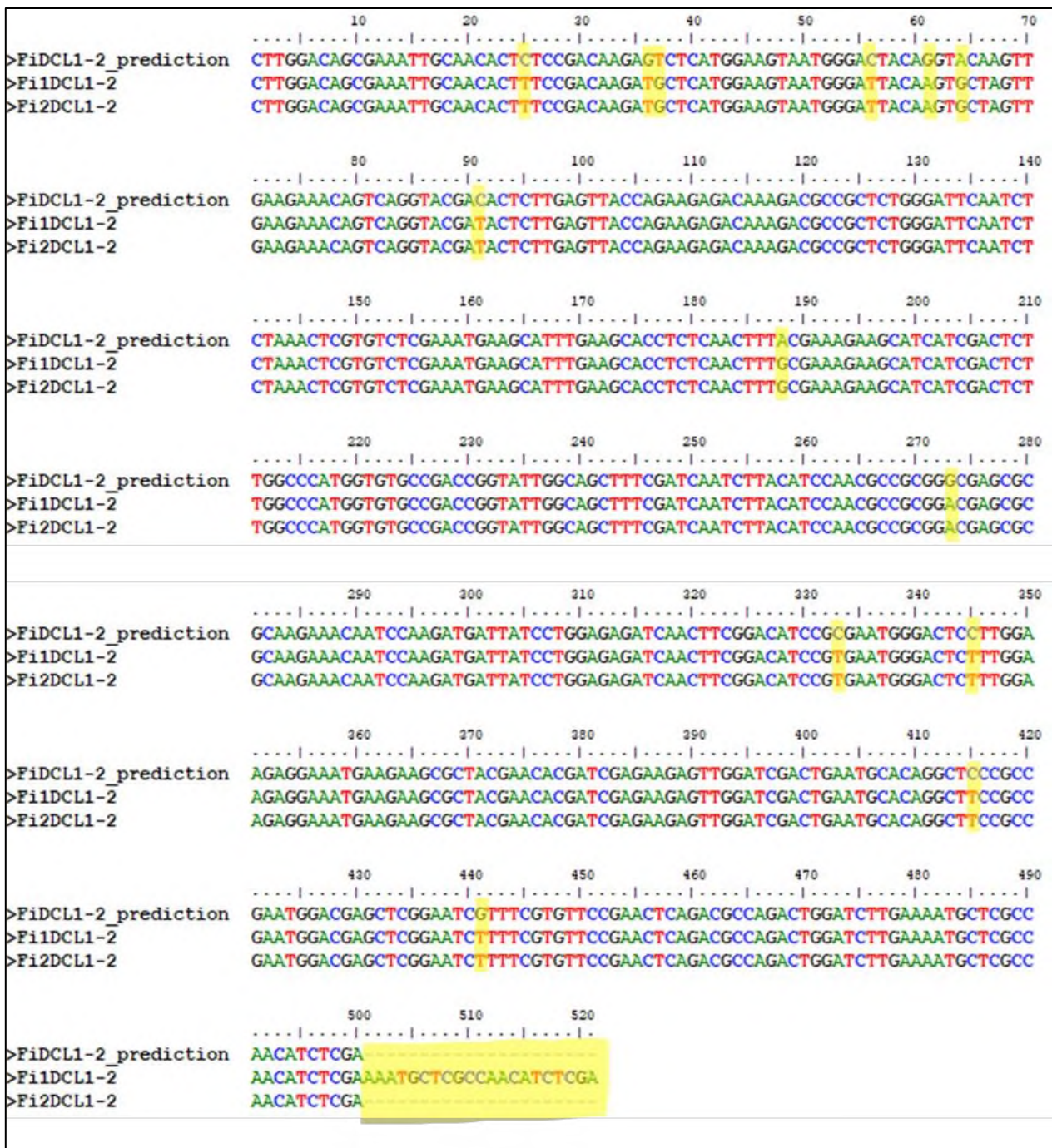


Figura 34. Alineamientos de secuencias DCL de *F. incarnatum* obtenidas por secuenciación (Fi1DCL1-2 y Fi2DCL1-2) y por predicción (FiDCL1-2_prediction). En amarillo se muestran las diferencias de cambio de pares de bases y en amarillo la duplicación de la secuencia perteneciente al primer reverso en Fi1.

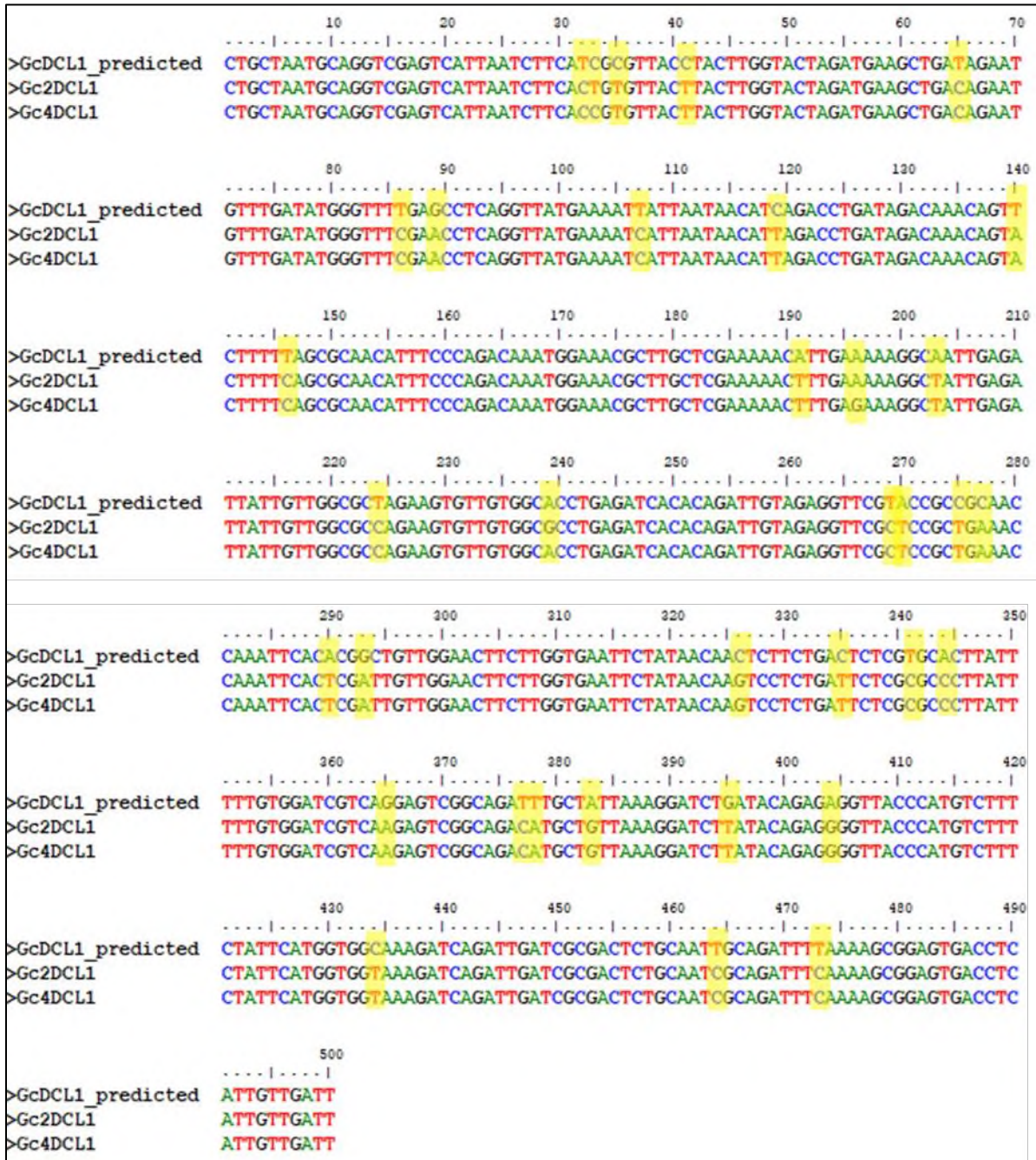


Figura 35. Alineamientos de secuencias DCL de *G. candidum* obtenidas por secuenciación (*Gc2DCL1* y *Gc4DCL1*) y predicha (*GcDCL1_prediction*). En amarillo se muestran los cambios de pares de bases entre ellas.

Los resultados de secuenciación permitieron validar la identidad de los productos amplificados como parte de genes DCL de los hongos respectivos, salvo algunas diferencias de bases que son atribuibles a polimorfismos naturales. Sin embargo, estas diferencias son importantes de tener en cuenta para el diseño de los sRNAs biofungicidas, ya que reflejan la secuencia presente en el hongo que se aisló por Santiago-Tapia (2019) y que se trabajó en esta investigación, y por lo tanto la secuencia que deberá ser interferida por los sRNAs.

Para los tres hongos se realizó la síntesis de RNAs de cadena larga (ldsRNAs) y cortos (sdsRNAs), obteniendo buenos rendimientos y concentraciones mayores a los 700 ng/ μ L para cada uno. Luego, 10 μ L de ldsRNA fueron digeridos con la enzima ShortCut RNase III para la generación de sdsRNA donde se obtuvieron concentraciones óptimas para la realización de los bioensayos superiores a los 100 ng/ μ L.

Los productos de síntesis de ldsRNA antes y después de purificar, así como los sdsRNA, fueron visualizados por electroforesis (Figuras 36 y 37). Dado que la composición de los productos es

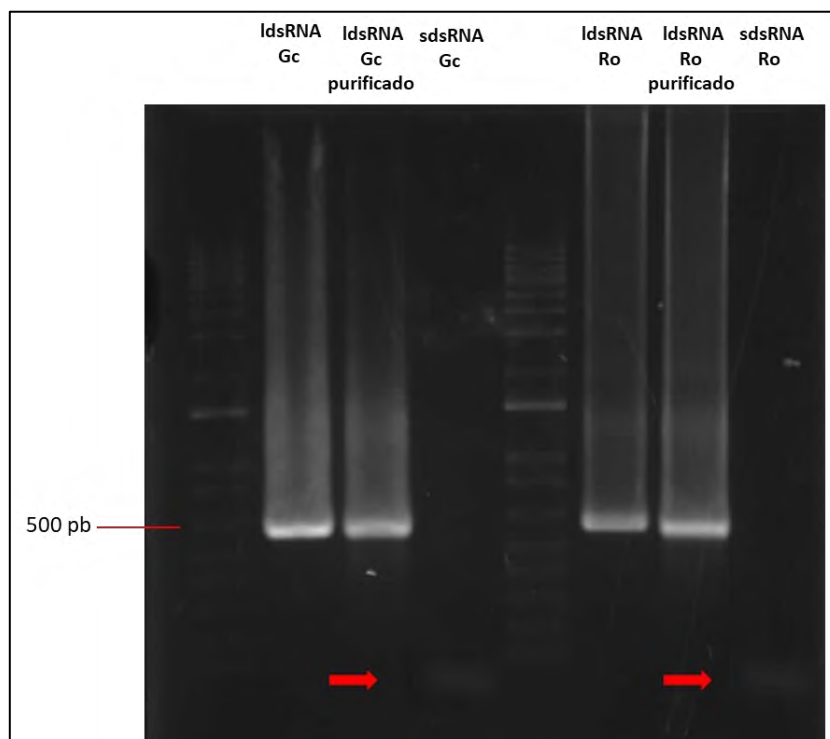


Figura 36. Síntesis de ldsRNA para los hongos *G. candidum* y *R. oryzae* antes y después de la purificación de acuerdo con el procedimiento del kit MegaScript y de forma tenue se puede lograr observar los sdsRNA de cada uno. Gel de agarosa al 1% y buffer TBE

RNA de doble cadena, se utilizó como marcador de peso molecular el mismo que es utilizado para muestras de DNA, esperando que el dsRNA migre un poco más lento a comparación del DNA.

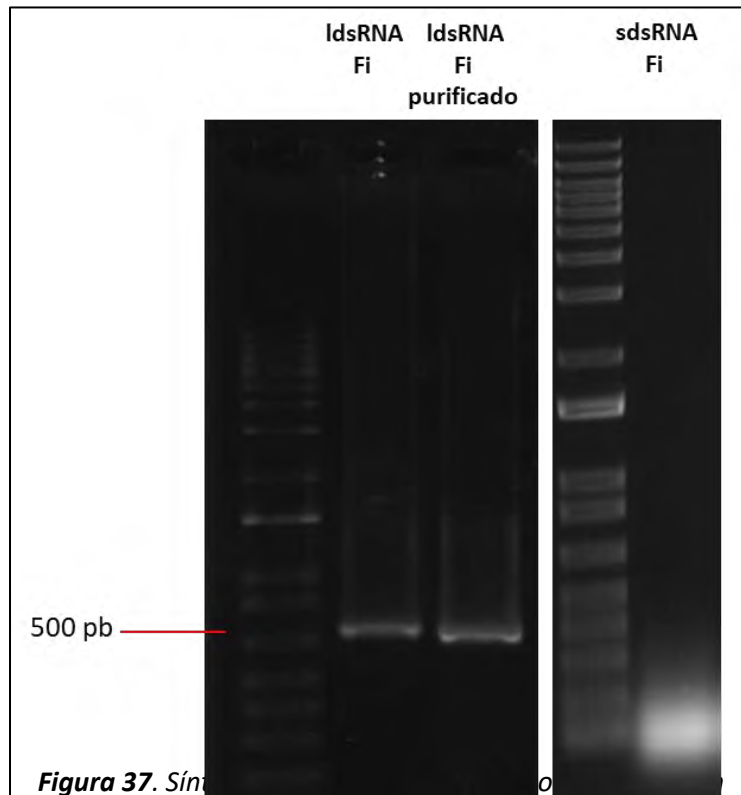


Figura 37. Síntesis de dsRNA antes y después de purificar y de manera tenue los sdsRNA. Gel de agarosa al 1% con buffer TBE.

7.4 Bioensayos

El objetivo final del presente trabajo fue evaluar la actividad de los biofungicidas de sRNAs sobre el desarrollo de los hongos seleccionados. Los efectos significativos en la reducción de desarrollo de los hongos a causa de un fungicida pueden ser amplios, afectando desde su capacidad de germinación hasta la alteración del crecimiento del micelio y la muerte total del hongo. En este trabajo se evaluaron dos efectos posibles, el primero sobre la germinación de las esporas *in vitro*, y el segundo sobre su capacidad de infectar órganos vegetales pretratados con sRNAs en bioensayos *in vivo*.

7.4.1 Efecto de biofungicidas de sRNAs sobre la germinación de esporas *in vitro*

Los experimentos se llevaron a cabo primariamente en cajas con medio de cultivo, de acuerdo con el punto 6.5.1 de la sección de Materiales y Métodos. Esta metodología se realizó para los hongos *R. oryzae* y *G. candidum*. En la Figuras 38 y 39 se muestran las placas del bioensayo con *R. oryzae*.

En *R. oryzae* se lograron cuantificar las esporas germinadas (Tabla 19 y 20), sin embargo, el crecimiento del hongo fue rápido y con consistencia algodonosa que se expandía en toda la caja, lo que limitó las observaciones un poco antes de que cubriera por completo la caja de Petri, a las 24h de germinación. Para *G. candidum* el número de esporas germinadas fue abundante por lo que se utilizó el software Image J para el conteo. Los resultados se muestran en las Tablas 21 y 22.

A partir del número de colonias desarrolladas, se observa que no existen diferencias que demuestren que los tratamientos con ldsRNA y sdsRNA en *R. oryzae* y *G. candidum* inhiban o disminuyan la germinación de esporas y el desarrollo de colonias. Esto se pueden deber probablemente a que el tipo de bioensayo utilizado no sea el adecuado ya que en el medio el hongo tiene los nutrientes ideales para su crecimiento y esto puede contribuir a que los efectos de los dsRNA no sean determinantes.

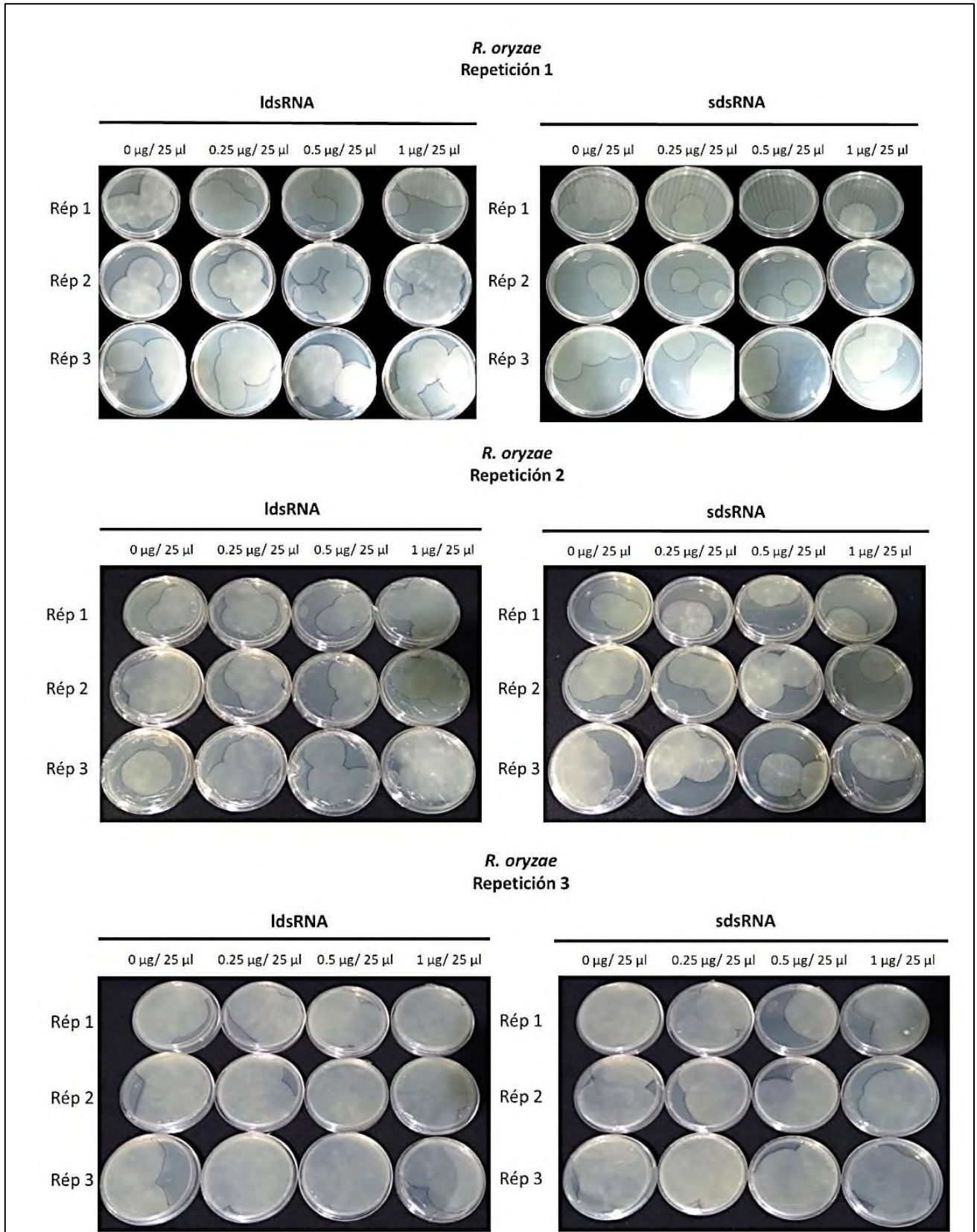


Figura 38. Resultados del bioensayo de inhibición de la germinación de esporas de *R. oryzae* (5×10^3 esporas) tratadas con 0, 0.25, 0.5 y 1 μg de sRNAs largos (*IdsRNAs*) y cortos (*sdsRNAs*) en un volumen final de 25 μL .

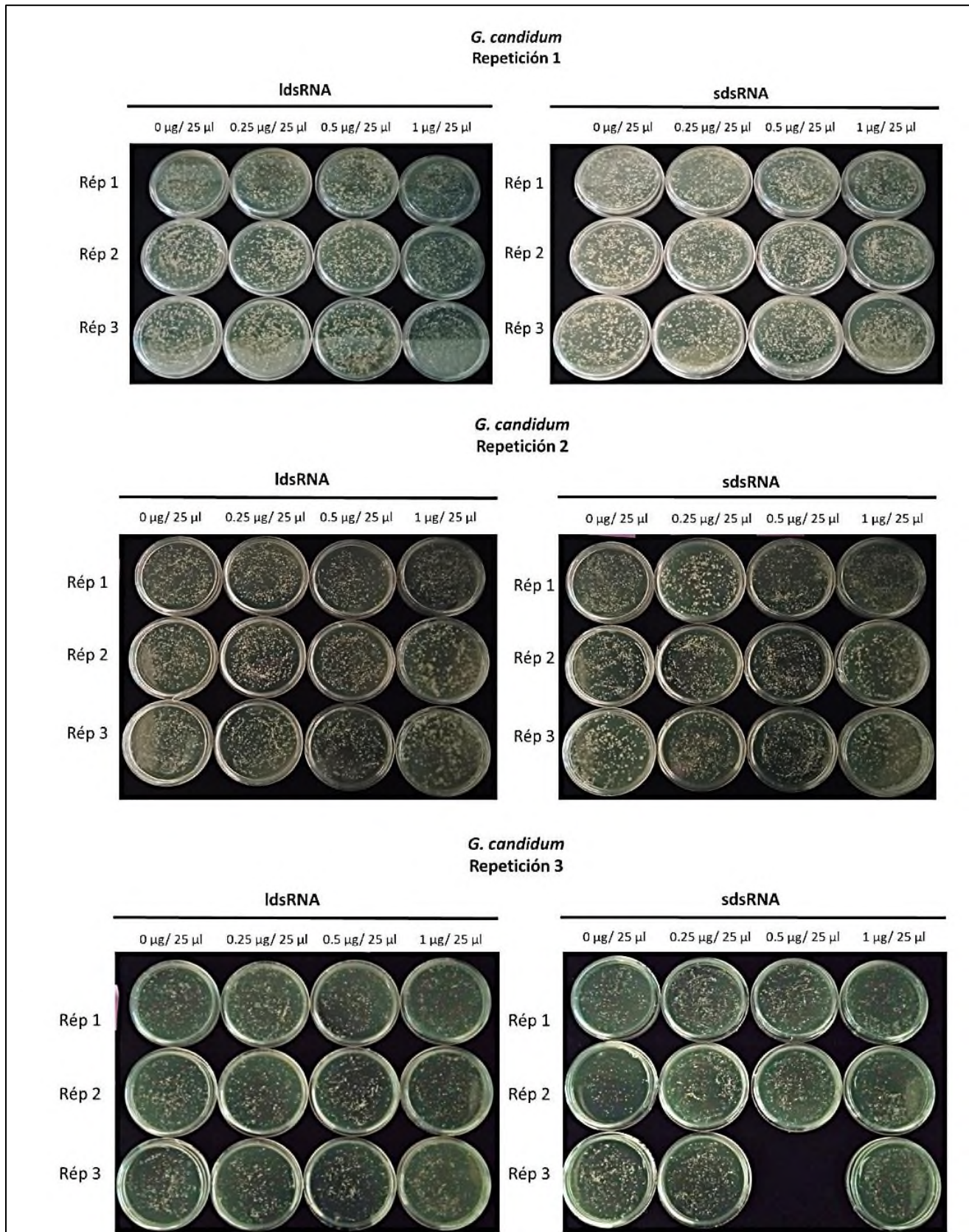


Figura 39. Resultados del bioensayo de inhibición de la germinación de esporas de *G. candidum* (5×10^3 esporas) tratadas con 0, 0.25, 0.5 y 1 μg de sRNAs largos (*ldsRNAs*) y cortos (*sdsRNAs*) en un volumen final de 25 μl .

Tabla 19. Número de colonias provenientes de esporas germinadas en tratamiento en placa con *ldsRNA* en *R. oryzae*.

ldsRNA	Repetición 1				Repetición 2				Repetición 3			
	Control	0.25 µg	0.5 µg	1 µg	Control	0.25 µg	0.5 µg	1 µg	Control	0.25 µg	0.5 µg	1 µg
Rép 1	5	6	5	6	3	4	2	5	4	5	6	4
Rép 2	3	3	7	7	5	4	3	3	3	4	5	3
Rép 3	4	6	5	7	1	4	3	3	2	3	5	3

Tabla 20. Número de colonias provenientes de esporas germinadas en tratamiento en placa con *sdsRNA* en *R. oryzae*.

ldsRNA	Repetición 1				Repetición 2				Repetición 3			
	Control	0.25 µg	0.5 µg	1 µg	Control	0.25 µg	0.5 µg	1 µg	Control	0.25 µg	0.5 µg	1 µg
Rép 1	6	3	1	2	2	2	2	1	2	4	2	2
Rép 2	2	2	2	2	4	4	4	1	3	3	5	3
Rép 3	5	4	3	4	5	3	2	3	4	4	2	4

Tabla 21. Número de colonias provenientes de esporas germinadas en tratamiento en placa con *ldsRNA* en *G. candidum* analizadas con Image J.

ldsRNA	Repetición 1				Repetición 2				Repetición 3			
	Control	0.25 µg	0.5 µg	1 µg	Control	0.25 µg	0.5 µg	1 µg	Control	0.25 µg	0.5 µg	1 µg
Rép 1	660	510	546	614	527	450	612	631	493	636	417	538
Rép 2	668	648	515	623	520	613	567	566	515	480	608	510
Rép 3	577	650	635	667	550	622	571	595	481	521	523	572

Tabla 22. Número de colonias provenientes de esporas germinadas en tratamiento en placa con sdsRNA en *G. candidum* analizadas con Image J.

IdsRNA	Repetición 1				Repetición 2				Repetición 3			
	Control	0.25 µg	0.5 µg	1 µg	Control	0.25 µg	0.5 µg	1 µg	Control	0.25 µg	0.5 µg	1 µg
Rép 1	551	477	614	561	658	426	566	686	604	452	590	624
Rép 2	484	642	710	624	540	616	639	472	489	629	675	548
Rép 3	650	510	587	658	438	645	706	455	544	578	647	557

7.4.1.1 Análisis estadístico de resultados

Para el caso de *R. oryzae*, se realizó en ANOVA con el modelo lineal general del software Minitab con los datos obtenidos mediante conteo manual (Tabla 19 a 22). Los datos por sí solos no cumplían con la distribución normal necesarias para llevar a cabo el análisis por lo que fueron transformados con la opción del programa “λ óptimo”. Los valores p obtenidos (Tabla 19) indicaron que el tipo de dsRNA y la interacción con la concentración tienen un efecto significativo sobre la inhibición con un $p=0.000$ y $p=0.026$ respectivamente, mientras que la concentración no mostró valores significativos. La comparación por parejas de Tukey obtenidos para tipo de dsRNA con un 95% de confianza indicó diferencias significantes entre las medias de ldsRNA y sdsRNA (Tabla 20). Para concentración no hubo diferencias (Tabla 21), mientras que la comparación de parejas para la interacción Tipo de dsRNA-Concentración señala que los sdsRNA con concentración de 1 µg se colocan en un grupo independiente (C) y con la media de crecimiento más baja (2.31944), sin embargo, el grupo C se encuentra agrupado junto con A y B en los tratamientos control de RNA tanto largos como cortos (Tabla 22), por lo que tomando en cuenta los resultados del experimento en general, se puede decir que estos datos no demuestran diferencias significativas en la efectividad de los dsRNA acorde a sus concentraciones y tipo.

Tabla 23. Análisis de varianza para respuesta transformada en bioensayos in vitro en placa de *Rhizopus oryzae*.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipo	1	1.9463	1.94634	14.97	0.000
Concentración	3	0.1359	0.04530	0.35	0.790
Tipo*Concentración	3	1.2824	0.42745	3.29	0.026
Error	64	8.3206	0.13001		
Total	71	11.6852			

Tabla 24. Agrupación utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para tipo de dsRNA en *R. oryzae*.

Tipo	N	Media	Agrupación		
L	36	4.05628	A		
S	36	2.83986			B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 25. Agrupación utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para concentración de tratamiento en *R. oryzae*.

Concentración	N	Media	Agrupación
0.25	18	3.70001	A
0.00	18	3.35680	A
0.50	18	3.35236	A
1.00	18	3.28254	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 26. Agrupación utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para interacción Tipo*Concentración en *R. oryzae*.

Tipo*Concentración	N	Media	Agrupación		
L 0.50	9	4.41832	A		
L 1.00	9	4.41246	A		
L 0.25	9	4.27072	A	B	
S 0.00	9	3.52451	A	B	C
L 0.00	9	3.19317	A	B	C
S 0.25	9	3.17021	A	B	C
S 0.50	9	2.43332		B	C
S 1.00	9	2.31944			C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Para el caso de *G. candidum* se realizó el ANOVA con el modelo lineal general en el programa Minitab con los datos obtenidos mediante el conteo automático de esporas germinadas en placa con ayuda del software ImageJ (Tabla 17 y 18). Los valores de p obtenidos (Tabla 23) demostraron que tanto la concentración como el tipo de dsRNA y su interacción no tienen efecto sobre la germinación al tener valores mayores a $p > 0.05$ por lo que la H_0 es aceptada y H_a rechazada, se realizó también la prueba de Tukey con un 95% de confianza y todas las medias analizadas comparten el mismo grupo (Tabla 24, 25, 26) por lo que estas no son significativamente diferentes, en conjunto esta información confirma lo que se observó cualitativamente en las placas del bioensayo *in vitro* sobre la efectividad de los constructos (ldsRNA y sdsRNA) en la inhibición del crecimiento y desarrollo de las esporas.

Tabla 27. Análisis de Varianza para datos de bioensayo *in vitro* en placa de *G. candidum*.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración	3	21283	7094	1.42	0.244
Tipo	1	2462	2462	0.49	0.485
Concentración*Tipo	3	30309	10103	2.03	0.119
Error	64	319247	4988		
Total	71	373301			

Tabla 28. Agrupación utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para tipo de dsRNA en *G. candidum*.

Tipo	N	Media	Agrupación
S	36	579.222	A
L	36	567.528	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 29. Agrupación utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para concentración en *G. candidum*.

Concentración	N	Media	Agrupación
0.50	18	596.000	A
1.00	18	583.389	A
0.25	18	561.389	A
0.00	18	552.722	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 30. Agrupación utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para interacción Tipo*Concentración en *G. candidum*.

Concentración*Tipo	N	Media	Agrupación
0.50 S	9	637.111	A
1.00 L	9	590.667	A
1.00 S	9	576.111	A
0.25 L	9	570.000	A
0.50 L	9	554.889	A
0.00 L	9	554.556	A
0.25 S	9	552.778	A
0.00 S	9	550.889	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Dado que los resultados observados en los bioensayos *in vitro* en placa para *R. oryzae* y *G. candidum* no mostraron ser efectivos, y asumiendo que posiblemente las esporas encuentren ventajas para la germinación debido a la riqueza y abundancia del medio de cultivo, se decidió optar por un bioensayo que emplea pequeños volúmenes de medio de cultivo líquido para el análisis de la efectividad de los dsRNA en *F. incarnatum* siguiendo la metodología especificada en el punto 6.5.3.

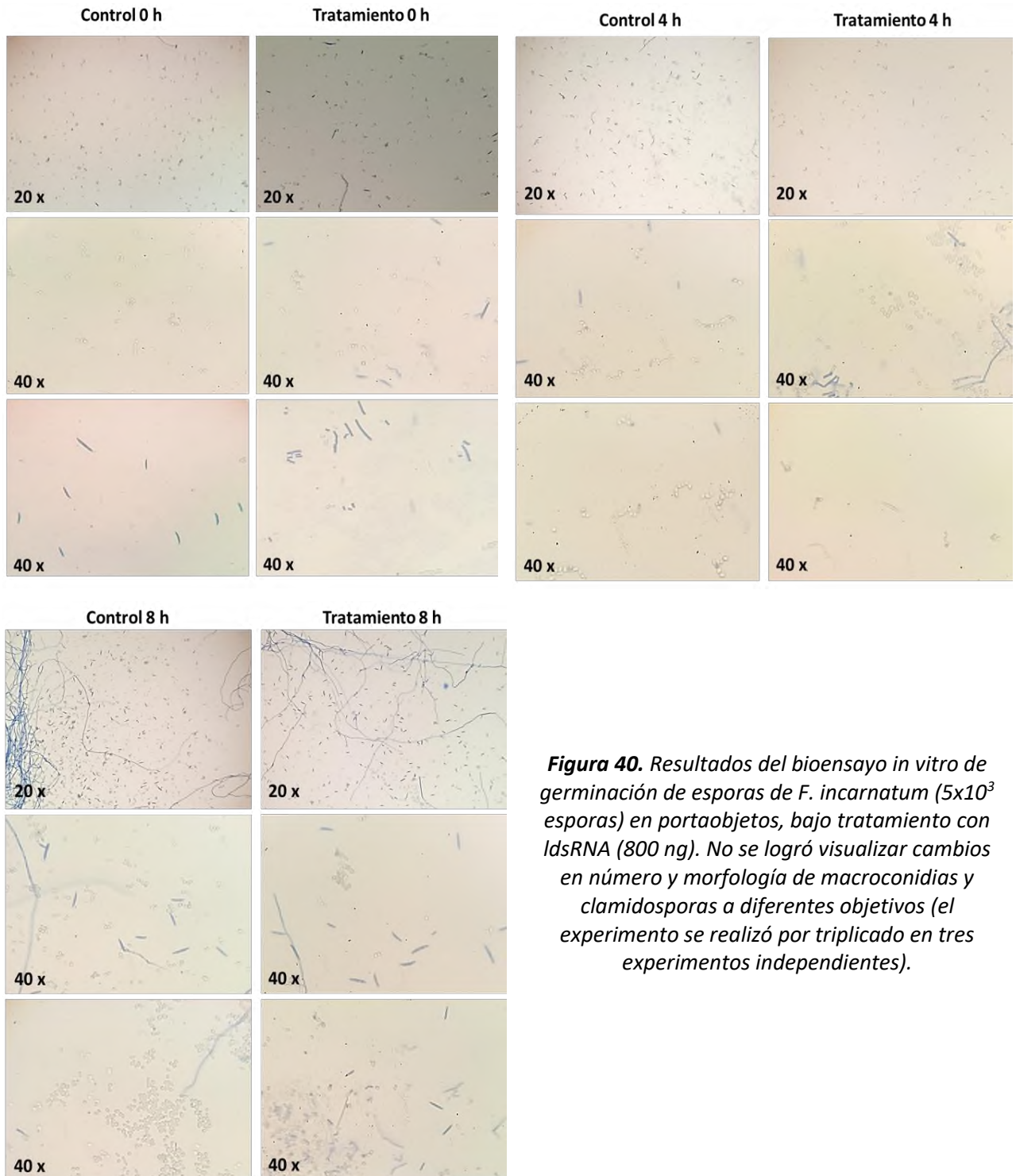


Figura 40. Resultados del bioensayo *in vitro* de germinación de esporas de *F. incarnatum* (5×10^3 esporas) en portaobjetos, bajo tratamiento con *ldsRNA* (800 ng). No se logró visualizar cambios en número y morfología de macroconidias y clamidosporas a diferentes objetivos (el experimento se realizó por triplicado en tres experimentos independientes).

Los resultados cualitativos no mostraron diferencias entre los tratamientos y los controles. En los distintos tiempos del experimento (0, 4 y 8h), se observaron clamidosporas abundantes y macroconidias usualmente teñidas de azul en cada una de las réplicas (Figura 40), sin embargo, no se observó ningún tipo de inhibición o alteración morfológica evidente.

7.5.3 Bioensayos *in vivo*

Con la finalidad de evaluar la efectividad del biofungicida basado en dsRNA en *F. incarnatum*, y de acuerdo con los antecedentes de patogenicidad reportados por Santiago-Tapia (2019), donde *F. incarnatum* fue aislado e identificado como uno de los principales hongos que infectan al fruto de la papaya (*Carica papaya*), por lo que este patosistema fue evaluado mediante ensayos *in vivo* siguiendo lo especificado en el punto 6.5.3.

Los resultados obtenidos no resultaron exitosos al no lograrse establecer la infección con el uso de esporas tanto en frutos y hojas como en el patosistema *C.papaya-Fusarium* (Figura 41). Las muestras vegetales resultaban infectadas por hongos distintos al de interés antes de que se lograran observar las características principales de infección de *F. incarnatum*.

En el análisis de varianza (ANOVA) en este trabajo la Hipótesis nula (Ho) hace referencia a que ninguno de los tratamientos tiene efecto sobre la inhibición de la germinación de esporas, mientras que la Hipótesis alternativa (Ha) hace referencia a que al menos uno de los tratamientos está teniendo efecto. Hasta este punto del trabajo, los resultados mostraron la validez de la hipótesis nula.

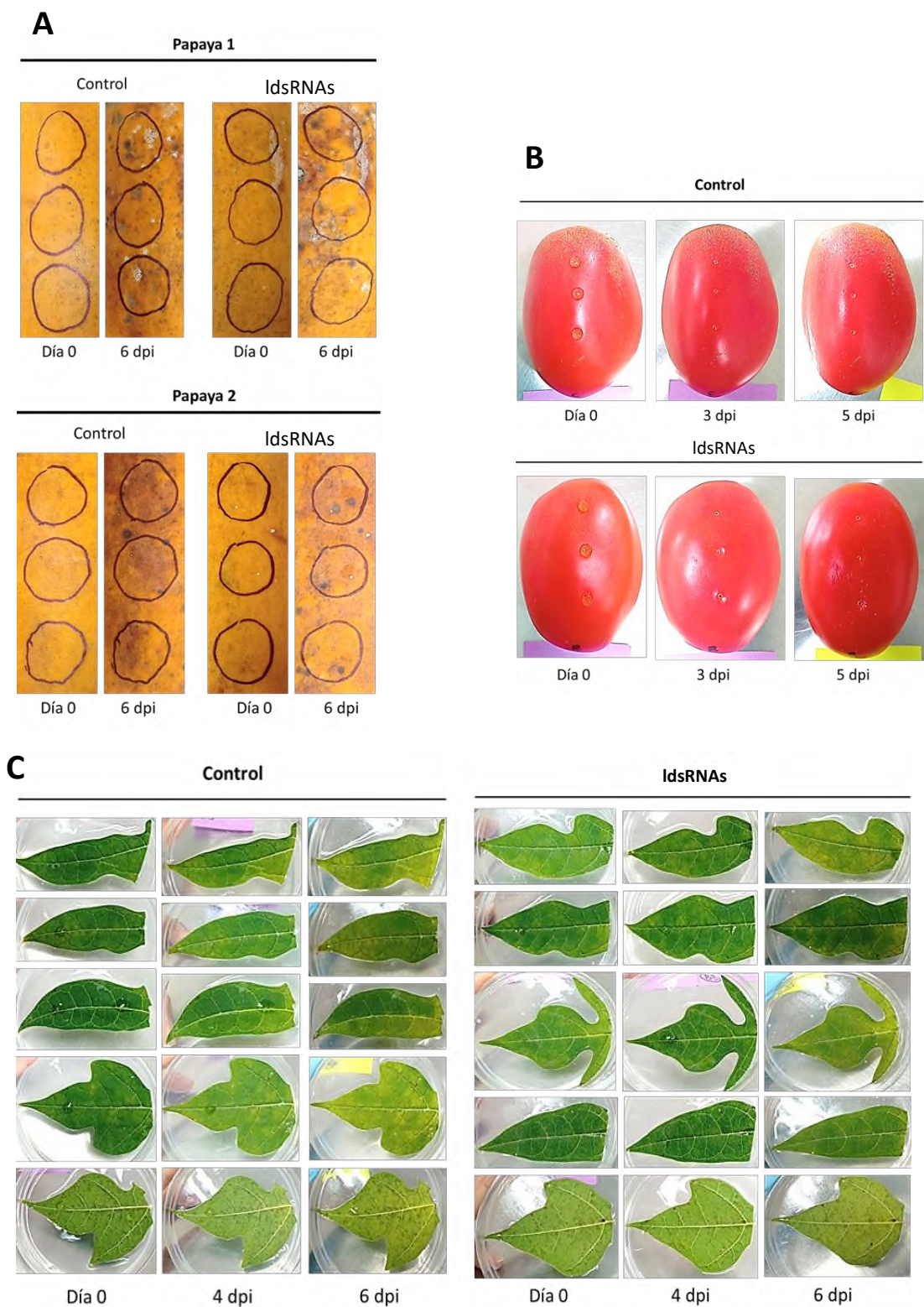


Figura 41. Resultados de los bioensayos in vivo de la actividad fungicida de sRNAs largos (IdsRNAs) a concentración de 0 ng (Control) y 800 ng (IdsRNAs) sobre *Fusarium incarnatum* (1×10^4 esporas) en (A) frutos de papaya, (B) frutos de jitomate, y (C) hojas de papaya, en los días post-inoculación indicados (dpi).

8.- DISCUSIÓN

El silenciamiento génico es un proceso natural que las células emplean para reprimir la expresión de genes a distintos niveles, por ejemplo, a nivel transcripcional mediante cambios en la estructura de la cromatina, o a nivel postranscripcional a través de la degradación de transcritos e inhibición de la síntesis de proteínas (Qi, 2019). En ambos tipos de silenciamiento se encuentran involucradas pequeñas moléculas de RNA de doble cadena (dsRNAs) cuya función es interferir con la transcripción y la traducción de los genes, y por tanto se les conoce también como RNA de interferencia o RNAi. Pero el silenciamiento génico va más allá del interior celular: estos mecanismos no solo actúan en las células que generan los dsRNAs, sino que los dsRNAs pueden transportarse y ser entregados en otras células para silenciar genes de otros organismos (Wang *et al.*, 2016). Este es el principio de lo que se conoce como entrecruzamiento de reinos o en inglés, cross-kingdom RNAi, que se establece durante la interacción entre plantas y patógenos, entre plantas e insectos, entre plantas y nemátodos, y entre plantas y organismos benéficos.

El silenciamiento génico, además de cumplir funciones naturales importantes en los organismos, se ha convertido en los últimos años en una herramienta de investigación y desarrollo biotecnológico. El RNAi se ha empleado en diversos sistemas para suprimir la expresión de genes de los que se desea indagar alguna función biológica (López-Dolz *et al.*, 2020), o bien, como estrategia prospectiva para tratar enfermedades humanas (Levanova y Poranen, 2018), o proteger a las plantas del ataque de patógenos (Iqbal *et al.*, 2020). Además de esto, se ha reportado que los dsRNAs pueden ser tomados del ambiente, por lo que el potencial de uso del RNAi se ha ampliado y simplificado. Una de estas estrategias, basadas en la aplicación externa de dsRNAs, es el Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS, por sus siglas en inglés), que ha demostrado efectividad en la protección de plantas contra hongos patógenos (Tabla 2 y referencias ahí citadas).

En este trabajo se evaluó la estrategia SIGS dirigida a los genes codificantes de la proteína Dicer-Like (DCL), la cual cumple un papel importante en el mecanismo del RNAi, a fin de reducir la virulencia de los hongos *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum* y *Geotrichum candidum* en la infección de frutos tropicales de importancia económica en la región del Papaloapan. Para

demostrar una prueba de concepto y señalar el potencial de la tecnología basada en RNAi contra hongos fitopatógenos de frutos tropicales en el periodo poscosecha, primariamente se identificaron los genes DCL empleando bases de datos y predicciones.

Con excepción de *R. oryzae*, que cuenta con un DCL identificado y depositado en las bases de datos, los hongos de interés no tienen reportes de secuencia de DCL, así que se predijeron con ayuda de diferentes herramientas bioinformáticas. El hongo *F. incarnatum*, a pesar de provenir de un género amplio y conocido, no cuenta con genes DCL identificados. Mientras que *G. candidum* no posee información genómica de su mismo género. Sin embargo, y con base en las secuencias de DCL de hongos filogenéticamente cercanos se lograron predecir y aislar dos genes DCL para *F. incarnatum* (Figura 16 y 17) y uno para *G. candidum* (Figura 18).

La estructura básica de los genes DCL presenta dominios característicos que se conservan en los organismos eucariotas. Estos dominios son una helicasa DEAD, helicasa C-terminal, dominio dicer de unión a dsRNA y dos dominios Ribonucleasa III. El gen DCL1 obtenido de la base de datos funRNA para *R. oryzae* posee los dominios Helicasa C-terminal, Dicer dsRNA-Binding fold y los dos dominios Ribonucleasa III. En *F. incarnatum* se predijeron los genes DCL1 y DCL2, con los dominios DEAD/DEAH box, Helicasa C-terminal, Dicer dsRNA-Binding fold y los dos dominios Ribonucleasa III para DCL1, mientras que para DCL2 solo se identificaron los dominios Helicasa C-terminal y Dicer dsRNA-Binding fold. Por otra parte, se logró predecir a DCL1 en *G. candidum*, encontrando solo los dominios DEAD/DEAH box y Helicasa C-terminal. Cabe señalar que la información genómica disponible para el género *Geotrichum spp.* y sus géneros más cercanos (*Saccharomyces spp.*, *Naumovozyma spp.*, *Endomyces spp.*, *Phalloasus spp.*, etc) es escasa y este puede ser un factor que limita la confiabilidad de la secuencia predicha, por lo que se requieren más investigaciones para la obtención de información molecular del género *Geotrichum spp.* y sus cercanos y de esta forma se pueda realizar una predicción más certera.

Uno de los factores más importantes a considerar en el diseño de una estrategia SIGS es la región del gen a partir de la cual se sintetizarán los dsRNAs. Primariamente, se estableció que las regiones de diseño deberían mostrar baja similitud con los DCLs de la planta huésped, ya que, al

codificar proteínas conservadas entre reinos, la selección de una región de alta similitud podría traer por efecto el silenciamiento simultáneo de los DCLs de la planta y del patógeno, situación que no sería favorable para la planta. Por lo tanto, y tal como se realizó en trabajos publicados previamente (McLoughlin *et al.*, 2018; Werner *et al.*, 2020; Nerva *et al.* 2020), se llevaron a cabo alineamientos de las secuencias nucleotídicas de los DCLs de los patógenos con los DCLs de sus huéspedes respectivos. Las zonas de menor similitud resultaron ser aquellas que se encuentran fuera de los dominios funcionales de los DCLs, es decir, las regiones espaciadoras. Por tal razón estas regiones se emplearon para el diseño de los dsRNAs.

Adicionalmente, es importante que se realice una buena selección de longitud de la región de síntesis de dsRNAs. Höfle *et al.*, (2019) probaron el diseño de dsRNAs de longitudes que iban desde los 400 pb hasta los 1500 pb, y encontraron que para la aplicación de SIGS, la longitud de las construcciones de dsRNAs interfiere con la toma de dsRNAs por parte del hongo, y que los dsRNAs de menor longitud producen el mayor nivel de inhibición de la infección fúngica. Adicionalmente, si bien un diseño mayor de 500 pb podría proveer una mayor cantidad de siRNAs y por lo tanto aumentaría la efectividad en el silenciamiento del gen o genes objetivo (Höfle *et al.*, 2019), al usar secuencias más largas también se podría promover que los siRNAs generados tengan mayores posibilidades de silenciar a blancos no deseados. Por todo lo anterior, en el presente trabajo se estableció una región de 500 pb como longitud estándar para el diseño de los dsRNAs, fusionados o individuales. Para el caso de genes DCL únicos, se seleccionaron zonas de 500 pb, mientras que, para más de un gen, se seleccionaron zonas de aproximadamente 250 pb y se fusionaron en una sola molécula, esto considerando que la fusión de genes es altamente efectiva, principalmente si se trata de eliminar la función de varios genes pertenecientes a la misma familia y que por lo tanto tendrán redundancia funcional.

La correcta amplificación de las zonas seleccionadas en las construcciones se confirmó mediante secuenciación. Como resultado, la secuencia amplificada a partir de DNA genómico obtenido de *R. oryzae* para el gen DCL1 presentó diferencias en dos pares de bases correspondientes al brazo conector entre el dominio Dicer dsRNA-Binding fold y el primer dominio de Ribonucleasa III (Figura 33) por lo que estos cambios no implican una modificación relevante. En los genes

fusionados por *overlap* PCR DCL1-DCL2 de *F. incarnatum* se presentó una mayor cantidad de cambios en pares de bases pertenecientes a áreas entre el dominio DEAD/DEAH box y helicasa C-terminal (Figura 34), de igual manera, estos no representan un peligro en la funcionalidad del gen al pertenecer a zonas no conservadas que podrían ser modificadas debido a presiones en el ambiente como la temperatura, patógenos, pH, etc. En DCL1 de *G. candidum* (Figura 35) se presentó un número mayor de modificaciones entre la secuencia predicha y la obtenida por secuenciación y puede deberse a la poca información que fue encontrada para realizar la predicción de este, sin embargo, al igual que con los genes DCL de *R. oryzae* y *F. incarnatum*, estos caen en zonas no conservadas que no representan un cambio en la función de la proteína Dicer. Además, es importante considerar que los cambios que se encontraron en las secuencias confirmadas experimentalmente estarán representados en los dsRNAs, lo que garantizará la complementariedad necesaria para promover el silenciamiento génico.

Una vez seleccionadas las regiones de diseño y confirmadas las construcciones, se sintetizaron dsRNAs para los bioensayos *in vitro*. En estos bioensayos se probó la actividad de los dsRNAs sobre la germinación de esporas en placa (Mumbanza *et al.*, 2013) y en portaobjetos (Duaniss-Assaf *et al.*, 2022). Los resultados cualitativos obtenidos del bioensayo en placa de los hongos *R. oryzae* y *G. candidum* no mostraron diferencias en el crecimiento y germinación de las esporas tanto en el control como en los tratamientos a diferentes concentraciones de dsRNA (Figuras 38 y 39).

El análisis estadístico ANOVA en *R. oryzae* mostró que la concentración de dsRNA en los tratamientos no tienen valores significativos ($p=0.912$) indicando que no determinan el efecto de inhibición de la germinación de las esporas, mientras que el tipo de dsRNA (ldsRNA o sdsRNA) sí tiene efectos significativos con un valor $p=0.000$ y un valor $p=0.026$ para la interacción Tipo de dsRNA-Concentración. Sin embargo, de acuerdo con la Tabla 23 del análisis de comparación de Tukey y los resultados observados en placa, se concluye que los datos obtenidos no demuestran diferencias significativas entre ellas, mientras que en *G. candidum* el ANOVA (Tabla 27) no mostró diferencias en cuanto a tipo de dsRNA y concentración y se confirmó con la agrupación en el análisis de Tukey.

El bioensayo en portaobjetos tampoco mostró diferencias en la germinación o en la morfología del hongo, y en lo que corresponde a las pruebas *in vivo* con *F. incarnatum*, la imposibilidad de establecer la infección en los distintos órganos probados (fruto papaya, hoja de papaya y jitomate), no permitió observar efectos de los ldsRNAs sobre el desarrollo del hongo.

Aunque los bioensayos *in vitro* e *in vivo* no permitieron obtener conclusiones claras sobre la actividad de los dsRNAs, se deben considerar las posibles causas antes de descartar el potencial de los biofungicidas basados en RNAi sobre estos hongos. Por una parte, se ha demostrado que no todos los hongos son capaces de aceptar RNAs ambientales (Qiao *et al.*, 2021), lo cual implica que la eficiencia de SIGS depende de esa capacidad, la cual varía en gran medida entre los fitopatógenos (Walker *et al.*, 2018; Yang & Zhang, 2019). Teniendo esto en cuenta, no se puede concluir sobre la efectividad de las construcciones de dsRNA dirigidos al silenciamiento de DCL de los hongos estudiados como negativa, al contrario, sería necesario elucidar de alguna manera si *R. oryzae*, *F. incarnatum* y *G. candidum* poseen esta capacidad y con cuánta eficiencia lo hacen.

La pared celular fúngica es esencial para la viabilidad, la patogenicidad y la regulación del intercambio de material con el ambiente externo, esto debido a que la abundancia relativa y las estructuras químicas de los principales componentes de la pared celular difieren entre distintos hongos (Yang & Zhang, 2019) afectando las propiedades viscoelásticas y la eficiencia de absorción de dsRNA de la pared celular. Sin embargo, Walker *et al.* (2018) demostraron que la pared celular de los patógenos fúngicos de mamíferos *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* permite la captación de vesículas de liposomas. Estos hallazgos sugieren que la pared celular fúngica es deformable y viscoelástica para permitir el paso de vesículas y moléculas grandes, como el RNA.

Aún si la capacidad de captación de RNA por parte del hongo fuera mínima, diferentes autores coinciden en que el RNAi es más eficiente si se capta al máximo a través de los tejidos de la planta. En SIGS, el RNA puede ser absorbido de dos formas, ya sea por el hongo a partir de la superficie de la planta, o directamente por la planta, siendo procesado en siRNA y luego transferido al hongo a través del mecanismo de entrecruzamiento de reinos (Sarkar *et al.*, 2021, Jahan *et al.*, 2015, Govindarajulu *et al.*, 2015). Dichas capacidades están limitadas en los bioensayos *in vitro*, donde

la planta no se encuentra presente y por lo tanto no contribuye a la transferencia de los siRNAs hacia el hongo.

Otro aspecto que debe considerarse es la elección de Dicer-like como gen objetivo del silenciamiento en la estrategia SIGS. La selección de genes objetivo es uno de los aspectos críticos para el éxito de la estrategia SIGS ya que esto determinará las cualidades de la actividad fungicida. Por ejemplo, al seleccionar genes que sean específicos para la especie patógena se garantiza una acción específica sobre el patógeno en cuestión, o bien, al seleccionar genes de gran relevancia para el proceso de infección o para procesos vitales generales del patógeno se promueve la precisión y efectividad de la actividad fungicida. En una de las primeras investigaciones del uso de RNAs pequeños contra hongos se seleccionaron como blanco de silenciamiento a proteínas de señalización (adenilato ciclasa) y de replicación (DNA polimerasa), las cuales son esenciales para los procesos vitales en todos los organismos (Mumbanza *et al.*, 2013). Posteriormente se eligieron blancos de silenciamiento a las proteínas involucradas en la síntesis de ergosterol, que además son el blanco molecular de antifúngicos químicos sistémicos. Tal es el caso de los genes CYP51, con la evaluación de la actividad antifúngica de dsRNAs contra el patógeno *Fusarium graminearum* (Koch *et al.*, 2016). Otros blancos de silenciamiento más recientes incorporan a componentes de las vesículas extracelulares importantes para el transporte de RNAs pequeños entre planta y patógeno, por ejemplo, VPS51 (Tabla 3).

Por su parte, el gen Dicer-like, el cual fue seleccionado para este trabajo, ha sido probado con éxito en diversos hongos como *Botrytis cinerea* (Wang *et al.*, 2016), *Plasmopara viticola* (Haile *et al.*, 2021), *Fusarium graminearum* (Werner *et al.*, 2020) y *Verticillium dahliae* (Qiao *et al.*, 2021) mediante la tecnología SIGS, demostrando que es capaz de proveer la defensa contra estos patógenos. No obstante, cabe señalar que los hongos analizados en estos trabajos han sido ampliamente estudiados a nivel molecular, contando con información genómica depositada en bases de datos, además de que sus patosistemas están bien establecidos y caracterizados. Por lo anterior, el abordaje de la estrategia SIGS en hongos con poca información disponible, en patosistemas tropicales que no se han estudiado previamente con respecto a SIGS, se encuentra

limitado, y por lo tanto requiere que se den los primeros pasos hacia la exploración del potencial de esta estrategia en dichos patosistemas, tales como los llevados a cabo en este trabajo.

Para fortalecer la propuesta de SIGS como solución para la protección vegetal se deberán analizar en primer lugar las posibles soluciones que permitieran corroborar si las construcciones de dsRNA para el control *R. oryzae*, *F. incarnatum* y *G. candidum* son adecuados para el silenciamiento de los genes codificantes de la proteína DCL mediante la optimización de la metodología de los bioensayos *in vitro* e *in vivo* así como la verificación de DCL como blanco prevaleciente. Las aportaciones de este trabajo son sustanciales para este objetivo, ya que se pudieron identificar secuencias antes desconocidas para DCL en los hongos *F. incarnatum*, *G. candidum* y *R. oryzae*, y se elaboraron las construcciones de dsRNA y sRNA, abriendo puertas para su investigación como propuestas para el uso de la estrategia SIGS en patosistemas tropicales.

8.- CONCLUSIONES

Con el uso de bases de datos genómicos y de herramientas de comparación y predicción, se obtuvieron las secuencias putativas de genes DCL en los patógenos tropicales *F. incarnatum*, *Geotrichum candidum* y *Rhizopus oryzae*, las cuales contienen los dominios característicos de las proteínas DCL.

Mediante el análisis de alineamiento entre secuencias de DCL de los hongos y sus plantas huésped respectivas, se seleccionaron regiones de baja similitud para el diseño de dsRNAs. A través de métodos de PCR se obtuvieron construcciones que contienen a los DCL identificados flanqueados con la secuencia del promotor T7 adecuadas para la síntesis de dsRNAs.

Las secuencias de DCL fueron confirmadas por secuenciación de las construcciones, identificando diferencias de bases entre las secuencias reales de DCL y las secuencias predichas que aparentemente no representan cambios en la funcionalidad, ya que se encuentran fuera de los dominios funcionales de la proteína.

Los bioensayos cualitativos de germinación de esporas en placa de los hongos *R. oryzae* y *G. candidum* no mostraron diferencias en la germinación de las esporas tanto en el control como en los tratamientos a diferentes concentraciones de dsRNA. El análisis estadístico ANOVA mostró que ni la concentración ni el tipo de dsRNAs (cortos o largos) en los tratamientos determina el efecto de inhibición de la germinación de las esporas en ambos hongos.

El bioensayo en portaobjetos tampoco mostró diferencias en la germinación o en la morfología del hongo, y en lo que respecta a las pruebas *in vivo* con *F. incarnatum*, la imposibilidad de establecer la infección en los distintos órganos probados no permitió observar efectos de los dsRNAs sobre el desarrollo del hongo.

Los resultados obtenidos aportan información al identificar secuencias antes desconocidas en los hongos analizados, así como materiales útiles para la síntesis de biofungicidas de dsRNAs que serán empleados en las pruebas de SIGS sobre hongos fitopatógenos de cultivos tropicales.

9. PERSPECTIVAS

- Es necesario demostrar la actividad de los dsRNAs diseñados para la protección vegetal contra los patógenos *Rhizopus oryzae*, *Fusarium incarnatum*, y *Geotrichum candidum* mediante pruebas de PCR cuantitativa que confirmen el silenciamiento efectivo de los genes DCL en el patógeno como prueba directa del efecto a nivel molecular.
- Se requiere realizar una selección adecuada de la metodología para los bioensayos *in vitro* e *in vivo*, al igual que su optimización, contando con un sistema confiable y cuantificable de la infección, que permita obtener conclusiones claras sobre la actividad de los dsRNAs diseñados.
- Por otra parte, de no resultar efectivo el biofungicida al silenciar a DCL, se propone explorar el uso de otros genes importantes en los patógenos, como los involucrados en la síntesis de ergosterol o en la formación de vesículas de intercambio de sRNAs entre planta y patógeno, basado en los resultados que previamente se han obtenido en aplicaciones de SIGS sobre otros hongos patógenos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Akbar, S. W. (2022). RNA Interference: Promising Approach to Combat Plant Viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10)(5312).
- Camacho-López, M. D.-S.-M. (2014). Fusarium spp. asociadas a clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) en Baja California, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1409-1415.
- Cheng, W. L. (n.d.). RNAi-Based Gene Silencing of RXLR Effectors Protects Plants Against the Oomycete Pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35(6), 440-449.
- Choi, J. K.-T.-H. (2014). funRNA: a fungi-centered genomics platform for genes encoding key components of RNAi. *BMC Genomics*.
- Cruz-Lachica, I. &.-Z. (2017). Identificación de hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) en México. *Mexican Journal of Phytopathology*, 397-417, DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1611-3.
- Duaniss-Assaf D., G. O. (2022). Double-stranded RNA targeting fungal ergosterol biosynthesis pathway controls *Botrytis cinerea* and postharvest grey mould. *Plant Biotechnology Journal*, 226-237.
- Dukare, A. S. (2018). Exploitation of microbial antagonists for the. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*., doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235>.
- FAO. (2011). *Food loss and waste*. Retrieved from <http://www.fao.org/platform-food-loss-waste/flw-data/en/>
- Govindarajulu, M. E. (2015). Host-induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy mildew of lettuce. *Plant Biotechnology Journal*., 13, 875–883.
- Hafeez, R. A. (2015). First report of *Geotrichum candidum* from Pakistan causing postharvest sour rot in loquat (*Eriobotrya japonica*). *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(6), 1737-1740.
- Haile, Z. M. (2021). . Double-Stranded RNA Targeting Dicer-Like Genes Compromises the Pathogenicity of *Plasmopara viticola* on Grapevine. *Frontiers in Plant Science*(12).
- He, B. C. (n.d.). RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nature plants*, 7(3), 342-352.
- HLPE. (2014). *Las pérdidas y el desperdicio de alimentos en el contexto de sistemas alimentarios sostenibles*. Roma.
- Horita, H. &. (2015). Sour rot of carrot caused by *Geotrichum candidum* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, DOI 10.1007/s10327-015-0638-3.
- Hu, D. C. (2020). Reduction of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean through host-and spray-induced gene silencing. *Molecular plant pathology*, 21(6), 794-807.
- Iqbal, S. F.-N. (2020). Attempt to silence genes of the RNAi pathways of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* results in diverse responses including increase and no change in expression of some genes. *Frontiers in Plant Science*(11), 328.
- Jahan, S. A. (2015). Plant-mediated gene silencing restricts growth of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of Experimental Botany*, 66, 2785–2794.
- Kalyandurg, P. B. (2021). Spray-induced gene silencing as a potential tool to control potato late blight disease. *Phytopathology*®, 111(12), 2168-2175.

- Kamel, M. C. (2016). Etiological agents of crown rot of organic bananas in Dominican Republic. *Postharvest Biology and Technology*, 112–120, doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.06.002.
- Kettles, G. J. (2019). Food security in 2044: How do we control the fungal threat? . *Fungal Biology*(123), 558-564, doi:https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.04.006.
- Khokhar, I. J. (2019). First report of *Rhizopus oryzae* causing postharvest fruit rot on pear in China.
- Knip, M. C.-C. (2014). Trans-kingdom Cross-Talk: Small RNAs on the Move. *PLoS Genet*, 10(9), doi:10.1371/journal.pgen.1004602.
- Koch, A. B. (2016). An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying Long dsRNAs Involves a Plant Passage and is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. *PLoS Pathogens*, 12(10), doi:10.1371/journal.ppat.1005901.
- Koch, A. H. (2019). SIGS vs HIGS: a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium* FgCYP51 genes in infected host and non-host plants. *Molecular Plant Pathology*, 20(12), 1636-1644.
- Koch, A. S. (2018). RNA-based disease control as a complementary measure to fight *Fusarium* fungi through silencing of the azole target Cytochrome P450 Lanosterol C-14 α -Demethylase. *European Journal of Plant Pathology*, 152(4), 1003-1010.
- Kwon, J. K. (2011). First Report of *Rhizopus oryzae* as a Postharvest Pathogen of Apple in Korea. *Mycobiology*, 140-142, https://doi.org/10.4489/MYCO.2011.39.2.140.
- Kwon, J. K. (2011). First Report of *Rhizopus oryzae* as a Postharvest Pathogen of Sweet Potato in Korea. *The Plant Pathology Journal*, doi.org/10.5423/PPJ.DR.01.2011.0019.
- Kwon, J. R. (2012). Soft Rot of *Rhizopus oryzae* as a Postharvest Pathogen of Banana Fruit in Korea. *Mycobiology*, 40(3), 214-216, https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.3.214.
- Levanova, A. &. (2018). RNA Interference as a Prospective Tool for the Control of Human Viral Infections. *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2018.02151
- Lipinski, B. H. (2013). *World Resources Institute*, https://www.wri.org/publication/reducing-food-loss-and-waste.
- Liu G, K. G. (2021). Extracellular Vesicles: Emerging Players in Plant Defense Against Pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 12:757925.
- López-Dolz, L. S. (2020). Fine-tune control of targeted RNAi efficacy by plant artificial small RNAs. *Nucleic acids research*, 48(11), 6234–6250. doi:https://doi.org/10.1093/nar/gkaa343
- McGrath, M. T. (2016). *APS*. Retrieved from What are fungicides?: https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Pages/Fungicides.aspx#:~:text=Fungicides%2C%20herbicides%20and%20insecticides%20are,be%20adequately%20controlled%20by%20fungicides
- McLoughlin, A. G. (2018). Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports*, 8(1), 1-14.
- Mumbanza, F. M. (2013). In vitro antifungal activity of synthetic dsRNA molecules against two pathogens of banana, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, 69(10), 1155-1162.

- Nerva, L. S. (2020). Double-stranded RNAs (dsRNAs) as a sustainable tool against gray mold (*Botrytis cinerea*) in grapevine: Effectiveness of different application methods in an open-air environment. *Biomolecules*, *10*(2), 200.
- Oaxaca.gob. (2021). *Productos agrícolas oaxaqueños en el ranking nacional de economía*. Retrieved from <https://www.oaxaca.gob.mx/comunicacion/22-productos-agricolas-oaxaqueños-en-el-ranking-nacional-economia/>
- OECD. (2019). *El futuro de la alimentación y la agricultura*. Retrieved from <https://www.oecd.org/agriculture/entendiendo-el-sistema-alimentario-global/el-futuro-de-la-alimentacion-y-la-agricultura/>
- ONU. (2019). *Organización de las Naciones Unidas*. Retrieved from <https://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html#:~:text=Se%20espera%20que%20la%20poblaci%C3%B3n,de%2011.000%20millones%20para%202100>
- Ortega-Acosta, S. A.-M.-I.-E.-R. (2015). Distribución y Frecuencia de Organismos Asociados a la Enfermedad “Pata Prieta” de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* *33* (2).
- Qi, T. G. (2019). Host-Induced Gene Silencing: A Powerful Strategy to Control Diseases of Wheat and Barley. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(1), 206. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms20010206>
- Qiao, L. L.-F. (n.d.). Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal*, *19*(9), 1756–1768.
- Santiago-Tapia, L. B. (2019). Diseño de biofungicidas compuestos de sRNAs pequeños sintéticos contra hongos patógenos de frutos tropicales. *Tesis de maestría, Universidad del Papaloapan, San Juan Bautista, Tuxtepec Oaxaca*.
- Sarkar, A. &.-B. (2021). Spray-Induced Silencing of Pathogenicity Gene MoDES1 via Exogenous Double-Stranded RNA Can Confer Partial Resistance against Fungal Blast in Rice. *Frontiers in Plant Science*(12).
- Secretaría de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019). *Atlas Agroalimentario*. Retrieved from Atlas Agroalimentario.
- SIAP. (2019). Retrieved from <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Snyder, A. B. (2019). Association of fungal genera from spoiled processed foods. *Food Microbiology*, 211-218.
- Song, X. S. (2018). A myosin5 dsRNA that reduces the fungicide resistance and pathogenicity of *Fusarium asiaticum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *150*, 1-9.
- Spada, M. P. (2021). Silencing of the Slr2-type MAP kinase Bmp3 in *Botrytis cinerea* by application of exogenous dsRNA affects fungal growth and virulence on *Lactuca sativa*. *International journal of molecular sciences*, *22*(10)(5362).
- Stępień, L. K. (2013). Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. *Journal of Applied Genetics*, *367–380*, DOI 10.1007/s13353-013-0146-0.
- Sundaresha, S. S. (2022). Spraying of dsRNA molecules derived from *Phytophthora infestans*, along with nano clay carriers as a proof of concept for developing novel protection strategy for Potatoe late blight. *Pest Management Science*.
- Thornton, C. R. (2010). Detection of the sour-rot pathogen *Geotrichum candidum* in tomato fruit and juice by using a highly specific monoclonal antibody-based ELISA. *International Journal of Food Microbiology*, *143*, 166–172, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.012.

- Tretiakova, P. V. (2022). Successful Silencing of the Mycotoxin Synthesis Gene TRI5 in *Fusarium culmorum* and Observation of Reduced Virulence in VIGS and SIGS Experiments. *Genes*, *13*(3), 395.
- Walker, L. S. (2018). The viscoelastic properties of the fungal cell wall allow traffic of. *MBio*.
- Wang, M. W. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, *2*, DOI: 10.1038/NPLANTS.2016.151.
- Werner BT, K. A. (2021). *Fusarium graminearum* DICER-like-dependent sRNAs are required for the suppression of host immune genes and full virulence. *PLoS ONE*, *16*(8). doi://doi.org/10.1371/journal.pone.0
- Werner, B. T. (2020). RNA-Spray-Mediated Silencing of *Fusarium Graminearum* AGO and DCL Genes Improve Barley Disease. *Frontiers in Plant Science*, *11*, doi: 10.3389/fpls.2020.00476.
- Wonglom, P. &. (2020). *Fusarium incarnatum* is associated with postharvest fruit rot of muskmelon (*Cucumis melo*). *Journal of Phytopatology*, DOI: 10.1111/jph.12882.
- Yagmour, M. A. (2012). Biology and sources of inoculum of *Geotrichum candidum* causing sour rot of peach and nectarine fruit in California. *Plant Disease*, *204-210*, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0391>.
- Yang P, Y. S.-Y.-N.-S.-J.-B.-C. (2021). Application of Double-Strand RNAs Targeting Chitin Synthase, Glucan Synthase, and Protein Kinase Reduces *Fusarium graminearum* Spreading in Wheat. *Frontiers in Microbiology*, *12*:660976.
- Yang, J. a. (2019). Chitin synthesis and degradation in fungi: biology and enzymes. *Targeting chitin-containing organisms*, *1142*, 153–167.

ANEXOS

ANEXO 1.- PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

1. Solución de lisis

En un tubo falcon de 14 ml se mezclan 0.5 ml de TRIS (50 mM, pH 7.5), 1 ml de EDTA (50 mM, pH 8), 3 ml de SDS al 3%, 0.1 ml de mercaptoetanol y 54 ml de agua desionizada y agitar suavemente.

2. Gel de agarosa al 1%

En un matraz de 250 ml mezclar 100 ml de buffer TAE o TBE 1x y 1 g de agarosa, la mezcla se debe calentar en microondas durante varios segundos hasta que se observe una consistencia transparente y libre de grumos.

3. Buffer TAE 50X

Disolver 121 g de TRIS, 50 ml de EDTA 0.5 M y 22.55 g de ácido acético en agua desionizada, se afora a 500 ml y se verifica el pH a 8.0. Para preparar 100 ml de TAE 1X se toman 2 ml de TAE 50X y se mezclan con 98 ml de agua desionizada.

4. Buffer TBE 10X

Disolver 108 g de TRIS, 40 ml de EDTA 0.5 M y 55 g de ácido bórico en agua desionizada, se afora a 1000 ml y se verifica el pH a 8.0. Para preparar 100 ml de TBE 1X se toman 10 ml de TBE 10X y se mezcla con 90 ml de agua desionizada.

5. Solución I

En un tubo falcon de 14 ml agregar 1432.5 µl de agua desionizada seguido de 30 µl de EDTA, disolver uniformemente y añadir 37.5 µl de TRIS HCl. Almacenar a 4 °C y al usarlo colocarlo en hielo.

6. Solución II

En un tubo falcon de 14 ml agregar 2340 μ l de agua desionizada seguido de 60 μ l de NaOH 10 N, al final añadir 600 μ l de SDS 1%. Preparar al momento de utilizar y no colocar en hielo al usarlo.

7. Solución III

En tubo falcon de 14 ml agregar 570 μ l de agua desionizada seguido de 1200 μ l de acetato de potasio 5 M, disolver uniformemente y añadir 230 μ l de ácido acético glacial. Almacenar a 4 °C y colocar en hielo al usarlo.

8. Medio de cultivo LB sólido

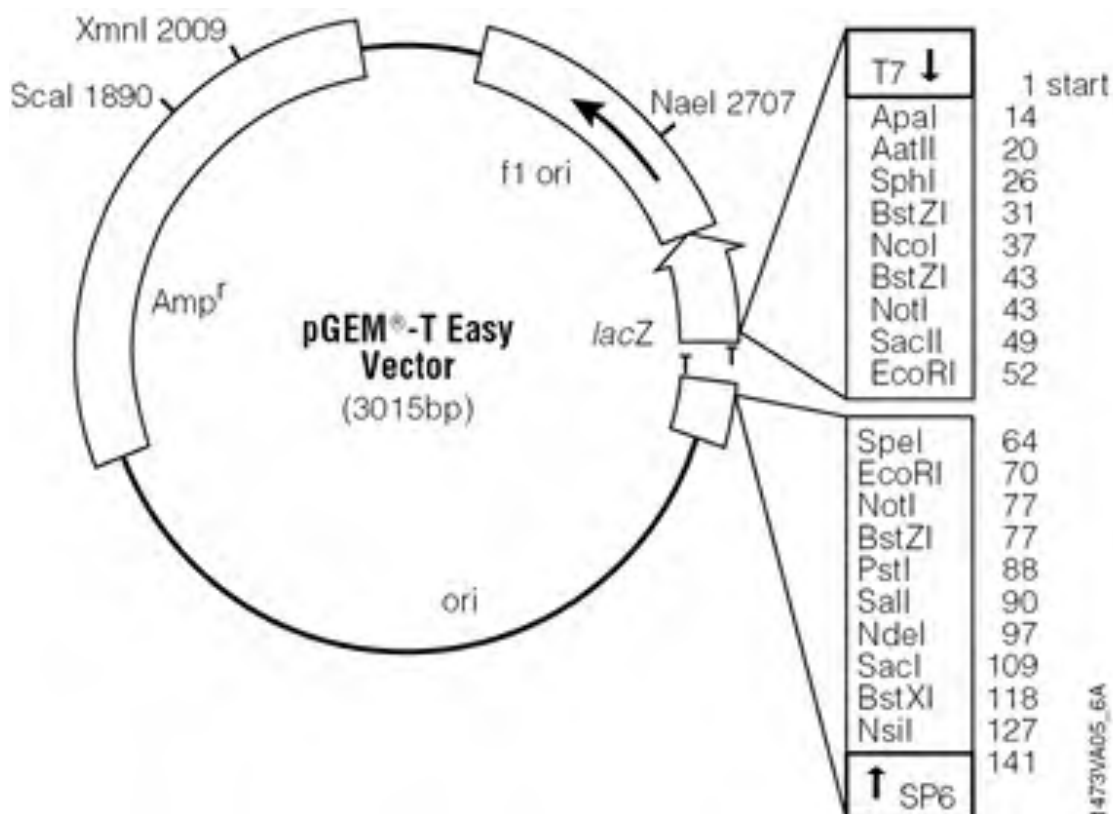
Para 500 ml agregar en un matraz 2.5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona de caseína, 5g de de NaCl y 7.5 g de agar bacteriológico. Disolver vigorosamente con la flama de un mechero de Bunsen, en una parrilla con una barra magnética o en el microondas hasta que el líquido quede cristalino, esterilizar y mientras el medio continúe líquido y tibio agregar antibiótico (ampicilina o estreptomycin) en una relación 1:100 (1 μ l de antibiótico por cada 100 μ l de medio de cultivo).

9. Medio de cultivo LB líquido

Para 200 ml agregar 1 g de extracto de levadura, 2 g de peptona de caseína y 2 g de NaCl, disolver vigorosamente y esterilizar.

ANEXO 2. PROTOCOLOS

1. Vector pGEM-T Easy



2. Transformación de células químicamente competentes de *E. coli*

Se descongeló en hielo un vial con células químicamente competentes de *E. coli* por cada transformación y dentro de la campana de flujo laminar se añadieron 2.5 µl de la ligación previa (10 pg – 100 ng) y se mezcló suavemente. Se incubó por 30 min en hielo y transcurrido este tiempo se llevó a cabo un choque térmico a las células a 42 °C por 30 s en el termobloque. Luego, se colocó el tubo en hielo durante 2 min y en campana se añadieron 250 µl de medio líquido LB. Se colocó el vial a 37 °C durante 1 h a 225 rpm en la incubadora con agitación.

Durante el tiempo de incubación se colocó en cajas Petri con medio LB sólido y el antibiótico de selección 100 µl de IPTG y con ayuda de un asa de Digralesky de vidrio se esparció hasta que el

medio absorbió el líquido, luego se colocaron 20 µl de X-Gal y se esparció de igual manera (esto se repitió para tres cajas Petri en total).

Una vez terminada la incubación, en las cajas Petri preparadas previamente se plaquearon con el asa de vidrio 50 µl, 100 µl y 150 µl de células competentes y se incubaron durante toda una noche a 37 °C. Se seleccionaron las colonias blancas desarrolladas para analizar por PCR de colonia.

Las indicaciones para la elaboración del medio LB líquido y sólido se encuentran en el Anexo 1.

3. PCR de colonia para análisis de células transformadas

Una forma efectiva y más rápida para analizar si la transformación se llevó a cabo de la manera correcta fue realizando un análisis de colonia mediante PCR, esta consistió en una PCR normal utilizando los componentes necesarios (tabla X) para llevarla a cabo exceptuando el molde, donde, con la ayuda de un palillo estéril se barrió la colonia a analizar (asegurándose de tomar una cantidad considerable) y este fue introducido en un microtubo de PCR con la mix preparada previamente y se agitó rigurosamente para que el contenido del palillo se desprendiera y quedara depositado en el microtubo, luego se llevó al termociclador utilizando las condiciones indicadas en la tabla X.

Componente	Volumen (µl)
DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo Scientific)	10
Primer Forward 10 µM (T7 + DCL)*	0.5
Primer Reverse 10 µM (T7 + DCL)*	0.5
Templado	-
ddH ₂ O + DEPC	8

*Los primers que se utilizaron fueron los T7 específicos diseñados para introducir la secuencia T7 al molde de DCL, ya que el vector pGEM-T Easy contiene en su secuencia a T7 y podría provocar que se obtengan secuencias de tamaño diferente al esperado haciendo el análisis obsoleto.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 s	30
Alineación	51	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1
	4	∞	

4. Extracción de plásmido

El día previo a la extracción, en tubos de vidrio estériles con tapa se colocaron 5 ml de medio LB líquido con antibiótico y con la mitad de un palillo estéril se barrió ligeramente la colonia blanca desarrollada a partir de la transformación y se colocó dentro del tubo de vidrio, esto se llevó a cabo las veces necesarias dependiendo de las colonias que se decidieron analizar y se incubaron a 37 °C a 225 rpm durante toda la noche.

Las bacterias se recolectaron en microtubos de 1.5 ml por decantación y centrifugación a 13,000 rpm durante 2 min vaciando gentilmente el sobrenadante en el tubo y repitiendo hasta terminar los 5 ml de medio (dejando al pellet lo más seco posible). El pellet bacteriano se resuspendió en 100 µl de Solución I y se agitó rigurosamente con ayuda del vórtex, después a cada suspensión se agregaron 200 µl de la Solución II recién preparada y se mezcló por inversión (sin el vórtex) y se colocó en hielo. Se añadieron 150 µl de la Solución III, se mezcló por inversión y se colocó en el hielo durante 5 min, después se centrifugó el ligado bacteriano a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C y el

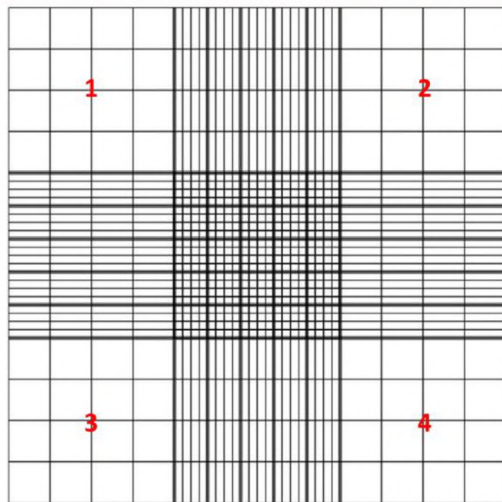
sobrenadante se transfirió a tubos nuevos. Dentro de la campana de flujo se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo, se mezcló en el vórtex y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min a 4 °C, luego se transfirió la capa superior acuosa a un tubo nuevo.

La precipitación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente, se mezcló con el vórtex y se dejó reposar 2 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 12,000 rpm (se observó un sedimento blanco en el fondo del microtubo). El sobrenadante se descartó por aspiración gentil y se dejó secar el tubo sobre una sanita. Se añadió 1 ml de etanol al 70% al pellet y se mezcló, se recuperó el ADN por centrifugación a 12,000 rpm durante 2 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante, se dejó secar el tubo para remover trazas de etanol y finalmente se resuspendió el precipitado con 30 µl de agua DEPC y 1 µl de RNase y se incubó a 37 °C durante 30 min.

Las indicaciones para la preparación de las Soluciones I, II y III se encuentran en el Anexo 1.

5. Cuantificación de esporas

Se tomaron 5 ml de solución Tween 80 al 0.05% o PDB (Potato Dextrose Broth) y se agregaron directamente a las colonias desarrolladas en las cajas con medio PDA o YEG tratando de cubrir lo más que se pudiera del micelio con la solución y se recuperó el líquido (ahora con esporas) en tubos Eppendorf estériles y se almacenaron a 4 °C. El conteo se realizó con la ayuda de un hematocitómetro (cámara de Neubauer) analizando los cuadrantes 1, 2, 3 y 4 indicados en la imagen. Se contaron las esporas en ambas unidades cuadradas del hematocitómetro y se repitieron 3 veces, se tomaron las medias de cada cuadrante y los datos obtenidos fueron introducidos en la aplicación Cells Calculator v2.2, obteniendo así, las cantidades de esporas de cada suspensión.



Cuadrantes utilizados para el conteo de esporas en cámara de Neubauer

ANEXO 3.- SECUENCIA DE DCL1 de *Rhizopus oryzae* ENCONTRADA EN LA BASE DE DATOS FUNRNA.

>DCL1_ *Rhizopus_oryzae* (nt)

ATGCTGACTGACCTTGAAAGACGGATTAATAACACAAGATTTGGATAAAGATGCTTTGATCGATG
AAGATTTGGCACTCAAGGAAACGCACGAGTTGATTGATACCATTGAATGTCCTCGTAATCCTAACGTAGA
TGATATACAACTTTCTCACCAAGATCGCTAAACTGATCCAACACTTGGCTTTATTGTGAATAACATGG
GGCAATTTTGTGGTATTATTTTCGTTGAACGAAGACATACAGCAATTGCTCTTCAGAAGCTGATCGAGTC
ATTGGACACACTCGATAAGATCAAGTGCGGCATCTTGATTGGTCACGGCACAGCAGATGAAGGCGACGT
ACAGATGACCTTTAAAGAACAAAACAAAGTGATTCAAAAATTGAGATCGGGAGAATTGAATTTTCTTATT
GCTACTAATGTCGCTGAAGAAGGTTTGGATATCCAACCTTGTAACCTTTGTTATTAGATTTGATTTCTTTCAT
ACGCTAATTGCCTATATTCAGTCAAGAGGAAGAGCTCGATGTATCGATTCAAATATGTGATCATGATTG
AAGACAATAATTTGAATCAAATTGGCACCTTGATGAATTTAGAATGTTGGAAGAGGCGATGAAGAGCT
TTTGCCAAAGCTTTGCCTGCTGAAAGAAACGTAGCTAATAGGTTCTCGCTAAGCATGGAAGGATACGAATC
TGATAATGAATACGACTCTGATGAAGACTATTTGGAAAGTGCCATCATAGATATGGACACTGGAGCGAC
AATCACAAGCAAATGCAGTACCACTTATTCACAGATACTGTAGTTCGCTCCGCTCTGATAGTTTTTGT
GTTTTGAAGCCAATCTTTGAACACATCGCTGCAGGAGAGGGCTACAAGTGATATTGACATTACCAAGTA
ATGCTGCTATTCAAAGGTAGAATCTCCTTTGTTGCTCCAAAGATTTGGCTAAAGCGCTCGTTGCACTA
CAAGCATGTTCTGAATTAAGCGATTGGATGCTCTGGACAGACATCTGCTGCCACGTAACATCAAAAAAG
AAATCTTGGGTGAGATGGCTCCTCAATACGATGAGAATGGCTATATAATTGGTAGTAGACGTCGTCATG
GATTATATGAAAAGAGAACACCAAAGTTTTGGGAAAGGAAATAGAAGAAGAAGAGTCATTGACATT
GAGGATAATGCGGATTTATTGAAGGCAACTCAAATGATCAAGAAAACACATGATGATCAAGAGGTGCCA
CCTGTAGACGCAGAGGCCACTAAAATAGAAACAAATGCTGAGCAAGGCACATCTCTTTCGAATGGCTTA
ATCGAGAAGAATATTCAAAAAACCTCAAATAATAACGTTCCAAATGGTGAACACCAAGATGTCGAGAAA
ATTAAGAAACTGAGGAGGTCAAAGACACCGAGGTTGAAGAAATTGAAGATGCCGAGGAAGAATTGGG
TGAAGGGCCTTTCTCTTGCTGGTTCACTATCCTGGAGGTCCTTATGCCAGATGGTAAATTCGAAGGCAGA
AACTATCGTCGTATGTGCTTTGTTACCAAAAAGCCTTTTATCGAGCTCCACAGTTGAAGCTATTCCACAA
GAATCAACCGTTTGTGTTAACTTGCCTGTCATTAAGACCGAATTGGTATTGGATAAAGAGTGTATCCTG
CTTCTTTCGACTATATGATGAGTCTGATGAAAGAATTGATGAACAAAGATTACCACTGCCCTGTAGTTG
ATATCCCTTACTATATTGTTCCCTGATCAAAAACCTGCGAGCAAGCCAAGTTTGAAGATCTCTCTGCTGAT
GAACTAAAAATATGGTGGACTGGGATCAGGTTAATGCCTTCAAGGAACGTACGAACAAACCGTTGATT
TTGTCTGAAATGAGCGATCCTTCTGATTTTATTATTGACAACCTGACTACTCTCTCGATATTTAATA
ACAGATGTTGATATGACATGAATCCTCAAAGTGCAGTCCCTTCAGGCTTCGACATTTCGGAAGCCGGAT
ATCCTACATTTATAGACTATTATCGTGATCTTGGCGATAAATTTGTCATCCACGACTACGAGCAGCCGATG
ATAGAAGTGAACGACTTAAAAGAGGAATGGACTTTTTGCATCCAGGCGGTAACATGCCCGCTCGGTCA
AAAGGGCCTGCACGTAATTGGGTTGTTCTCAATTCTGTACCCAATACTTTGTAAATGCTAGTGTATAT
AGCCATGTTGATGATACCCTCAATAATGACACGAATTGATTCACCTTTTACTCTGCTATGATTCACGTGCAA
GATACGATTTGCCATTAATGATGAATATATGCTTGAAGCATATACTATGCCCTCCGCAAGTATGGAGAT
GGACTATGAAAGATTAGAAACACTTGGAGACTCTTTATTGAAATTCATTGCTACTATTCGTTTATATATCA
ATTTCCCTTTCAGTAATGAAGGTGAACTTCACCATTTACGTATTCGTGTTGTTTGAATAGAGCTCTTAC
AGAGCTGCAAAGCGTCTAAAATTTTACCGTTATGTGACCAGTCAAGCATTTAATCGTCGGCACTGGCGTC
CACCTCACTTACAAGTACTGCAGATAATGCAGATAAATGGAGAGTCTCAAGAAACACAAATTATCTGA
CAAGACATTGGCTGATATTGTAGAAGCATCGCTTGGTGCAGCTTATTTAAGCAGTGGACTCGAAGGCTGT
CTTCATACTGCCATTCAAATGCAAATTCCTTTTGTATCAAATCGAGAAGTGGTCCGATTTTAAACGTAGCCTT

TGAAGAATCTCGAAAAGCAGTTCCTCCTCGCGCTGAAGTCAAAGCGCTTCGTATGTTAGACTTACCAAAG
ATTCAGGTACTIONGTAGATCGAGAGTTCAATAAGCCTTTATTAGTTGTAGAAGCCCTGACGCATGCAAGTT
TACCTAATTCAACCTCACCATGTTATCAACGCCTTGAATTTCTGGGTGATGCCATTTTGGATTTCTGGTTA
TTCGATACTGTATACTAAATACCCTGATGCCGAACCTGGTCAAATTAACCTTAAAAGATTGATGCGTC
AATAATCATGTGCTAGGCATTATCTGTTTAAACAACGGTCTTACAAGCACATTATACATTATTCTGGAAA
ACTTGTAGAGCCATCAATACACTGGAAGAAGAAGTCCAAGAATTAAGGACTGGTAAAGCAGTGGG
TGAATATTGGGCTGATATGAATATACCCAAAGTTTTGTCCGATGTGGTTGAAAGTATGCTGGGTGCAGTG
TTTGTTGATGCCAAA TTTGACTTGTACCCTGTGCAGCATTGTTTGACAAGTGGTTTGTGCCTATTTTCGAT
GCAAACGTTACACCAGAACTTGTTTCGTATTATCCTATGCGTAAATTGCTTACTGATTTACAAGCATTGG
TTGCGAAGGATTTATGCTTAGAAATCATTCAACTGGAGAAAGTGGCCCTACAAGTCAAAAATGTGTTATT
TTTCTCCATGATAAGTCTTAGCTTGTGGAGCAGATTGGAATATTAAGTGGCAAGAAGACGTGCGGCA
GAAAAAGCCAGTCAAAGATTGGAAGATGAGCCAGGATTATTGGAGTCTGTCTGTAAGTGCAGAAATTTCT
TACATCAAAAGAGGTCTGTTACCAGAGAAAGAAACAAGAATATTGATGAGGATAGTGACACGAACTTG
AGTTAA

Helicase, C-terminal (172-669)

Dicer double-stranded RNA-binding fold (787-1,059)

Ribonuclease III (2,660-2,763) (2,851-3,405)

>DCL1_ *Rhizopus_oryzae* (aa)

MLTDLERRITNQTQDLKDALIDEDLALKETHELIDTIECPNPNVDDIQTFSFKIAKLIQLLGFIVNMMGQFCG
IIFVERRHTAIALQKLIESLDTLTKIKCGILIGHGTADEGDVQMTFKEQNKVIQKFRSGELNFIATNVAEEGLDI
QPCNFVIRDFHHTLIAYIQSRGRARCIDSKYVIMIEDNNLNQIGTLDEFRLMEEAMKSFQALPAERNVANRF
SLSMEGYESDNEYDSDYDYLESAIIDMDTGATITKQNAVPLIHRYCSSLPSDFSFCVLPKPIFEHIAAGEGYKCILT
LPSNAAIQKVESPFVRSKDLAKALVALQACSELKRLDALDRHLLPRNIKKEILGEMAPQYDENGYYIGSRRRHGL
YEKRTPKFWEREIEEEEVIDIEDNADLLKATQMIKTHDDQEVPPVDAEATKIETNAEQGTSLSNGLIEKNIQKT
SNNNVPNGEHQDVEKIKETEVEVKDTEVEEIEADAEEELGEGPFSCWFTILEVLMPDGKFEGRNYRRMCLVTKKP
FIELPQLKLFHKNQPFVNLRVIKTELVDKECILLSDYMMSLMKELMNKDYHCPVVDIPYYIVPLIKNCEQAK
FEDLSADELKNMVDWDQVNAFKERTNKPLILSEMSDPSDFIIIDNSDYSRLYLITDVRDMMNPQSAVPSGFDIR
EAGYPTFIDYYRDLGDKFVIHDYEQPMIEVERLKRGMDFLHPGGNMPARSKGPARTWVVPQFCTQYFVNAS
VYIAMLMIPSIMTRIDSLLL CYDSRARYDLPITDEYMLEAYTMPASMEMDYERLETLGDSLLKFIATIRLYINFP
FSNEGELHHLRIRVVCNRYLYRAAKRLKFYRYVTSQAFNRRHWRPPHFTSTADNADTMESLKKHKLSDKTLA
DIVEASLGAAYLSSGLEGCLHTAIQMQUIPFDQIEKWSDFNVAFEESRKAVPPRAEVKALRMLDLPKIQVLVDRE
FNKPLLVEALTHASLPNSTSPCYQRLEFLGDAILDFLVIRYLYTKYPDAEPGQITTLKDSCVNNHVLGIIICLNG
LHKHIIHYSGKLVRAINTLEEEVQELKDTGKAVGEYWADMNIPKVLSDVVESMLGAVFVDAKFDLSPCAALFD
KWFVPIFDANVTPELVRIHPMRKLLTDLQAFGCEGFMLRNHSTGESGPTSQKCVIFLHDKSLACGADWNIKV
ARRRAAEKASQRLEDEPGLLESVCNCRISYIKRGLLPEKETKNIDEDSDTNLS

Helicase C-terminal (58-223)

Dicer dsRNA-binding fold (263-353)

RNase III (778-906) (955-1103)

ANEXO 4.- SECUENCIAS DE DCL PREDICHAS PARA *Fusarium incarnatum*.

>DCL1_ *Fusarium incarnatum* (nt)

Sequence ID: RBBZ01000090.1:19774-24531

Secuencia codificante FGENESH

ATGGTCGTGCAACACGAGGATCCGTCTCCAGTACGGCCTCCGATGGACATGACCACTGCCAAAAGAAGAAGAGAG
TCGTCAAGGGGAGGTCTGTGATCTCATAGCCGATCTACCTGCTGTTCCACTGGAAGAAGACGTCGATGAAGTTGATC
ACAGTGATTTCGGAAGATGAAGATGACCAAGGCGTTCCGATATCGCCTGACAGTCAAGCCTTCCAAAGCCAGACGCA
TCACCCAACGGCAACGCGCTGGCCAAAAAGCTTTGCAAGATTTTGAAGACAGTCTCAGGAAGAAGCCTATGCGA
ATCCTGGCAAAAAGGACATTCGGCCAAGCCGCTTCTATCAGTCTTCGCCCCCACCCGATCGAGGATATCAAACAGA
ACTCTCCGAAATCGCCAAGGGGAAAAACATCATCGTGGTTTTACCTACAGGTTCCGGCAAAACCAAATCGCTGCT
AACTTGCTCGTGCATTGCCTTCGAGAAGAAGTAGAATCTCGCAGTGTCCGCAACCCCAAGAAAGTGGCATTCTTCT
TAGTGGAAAAGGTTGCCCTCTGTGAGCAGCAATACCACGCTCTAAGAACTCCGTGGGAGGCCATCCGATCGGGA
TATTTACAGGCCACTCCAAGGGCGTGAAAAAGACCAAGAGCTACTGGGACGCTCAATTCAGTGACAACGCCGCTCG
TGCTCTGACTGCCACATTCTACTCGACTGTCTCAACAACGCCTTCATTACCATGGACCGCATCCATCTCCTCATTTT
TGACGAAGCGCATCATGCAAAGAAGAAACACGATTACGCGGAGATTATGAGAAGATACTATTCACTATTTCGCAA
GAGCGAAAGGCCTCGAGTTCTCGGATTGACTGCTTCCCCTGTGGATTCCAAGACTACTGACGTGAGAGAATTTTCC
CGTAAACTTGAAAGAATCTTGACAGCGAAATTGCAACACTCTCCGACAAGAGTCTCATGGAAGTAATGGGACTAC
AGGTACAAGTTGAAGAACAGTCAGGTACGACACTCTTGAATTACCAGAAGAGACAAAGACGCCGCTCTGGGATT
CAATCTCTAAACTCGTGTCTCGAAATGAAGCATTGAAGCACCTCTCACTTTACGAAAGAAGCATCATCGACTCTT
GGCCCATGGTGTGCCACCGGTATTGGCAGCTTTCGATCACTGAAAACGAGACAAAACGGCTTAGCGACAGGACC
AAAGCGGCTTTTGTGGCAATACAGAGCACGCATTGGCAAGACTGGATAAAGCAAGAGATGCCGTTACAGCAGGTC
CGAGAGGTTGTTGCAGCCACAAGTTTGACACGATTACCCCTGGATCCAAAGATTTGTCTTCCAAGGTGAAATGCC
TGCATGAAATTTCTGGTTCATGCCTTCACTGATAATGCGACACGCTGCATTGTTTTGTTGACCAAAGACACACA
GCATGCTTGCTTGCAGCTTTATAACCAGGCGTCAATGGCAATCCCAGGGATGACTGCCGGGTATATGCAAAGCT
CGGTGCTCAATAATTTACGGAACAGGATCAATTGCCTTTTTGCGACGTCAGTGGCAGAAGAGGGGAATTGATGT
TCCCGAGTGTGGCCTTTGTGTTGATTTCGACCTCTACAGCTCAGTCATTCAATATGTACAGTCCAAAGGACGCGCCA
GGTTGAACTTTTCGCGTTTCATCACCATGTTGGAGGATGGCAACATGAAGCAAGTCCGCGTTATAAAGCAAGCATT
GAGAGATGTAACAGCTGTCCAAAAGTTTTGTCTCGCGCAACCTGAAGACCGCAAGTTGCAAGACGAGACATGGGT
TGAAGGGATGGAGGAACAGATCGAGCGGATGAGCTACCATGTGTACGAAACCAACACAGGAGCGCGTCTACAT
TCCCTTCTAGCCTCGAAGTGTGGCCAGATTTGCTGCGACCTTACATACAGGTGATGGTTTAAACGCCAAAGCCGAG
TATCACGTTTACAAGGCGAGGACACAGTATATCGCCACTGTTAACCTCCCGCAAACCTCTCCTCTCGTCTCCAGTC
AGGTTACCCACAGCGTAGCAAGATTCTGGCCAAGTGTCTGCGGCTTTCGAAGCCTGCAAGAAACTCATTGCGGGG
AAACACATCGATGATCATCTCCAGCCCAAGTTCATAAAA CAAGCCCACAAAATGCGCAACGCTCGTGTGGGAATTA
GCCCCAACAAGAAGGCCGAGCATGATATGCGTCTAAGGCCCAACATTTGGAGTTCTGTGGGAGCATGGATGGACT
TTTACCCGACAACGATTACTCTCAACATGAAATCTGGACAAGAAAGAGAAAAGCAGACCGTTGATCCTTCTTTCTCGC
AAAGCTCTCCGACGTTACCTCCAGTTCCTTGTCTTCGGCAACGGACGCTCAGGTGTGCTGAGCTGTCATGCTC
CCAAGACCCTCTTAGTATAACTGCACATCAAGCTGAAGGACTAGCTGCTTTCACACTGAAGATCTTTGATGATATTT
TCAGCAAAAAGTTTGAAGCAGCCTGCGAACAATTTCCCTATCTTCTCGCACCTTTGGCAAAGGGCAGCCACGAAGC
ACCACAAATCGATTGGGATAAATCCACCTTGCAAAGAGAAGGAGTTTCTCGACTGGAATAATGCACCAGATGAT
TTCTTTGTCGACAAGTTTGTAGTTGATCTCTATGATGGAGGGCGCAAACCTTATCCTCAAAGGTATCGACAAGACCAA

GAAGCCCTCCGATCCTACACCAGAGGGTGTACCAGAGCCGAGGTCTCGTGCTTACAGGTCTGCGGAACCGACTATC
AAGGAATACAGCAACAGCTTTTTTGGTAAGTCCCGAAAAACGCGAGTATGGAGCGACGACCAGCCTGTCGTGAGA
GCAGAGCTCCTCTCACTACGACGAAATCTGCTGGATGAATTTACAGGTCGATGAGGAAGTTAACAAAGACTGCTTCG
TCATTCTGGAGCCGCTCAACGTGTCGCCCTCCCGCAATCATTACAGAATAGATTCCGCTCTAATAGCTCTCGAT
GCGTGTGAAGTTTTCGAACTCTCCATCCCACCTGCTCTAGCTCTCGAAGCAATGACCAAGGACAGCGACAACACTG
ATGAGCATGACAAGCAACAGATCAACTTCCAAGCTGGTATGGGTTCCAACTATGAACGGCTGGAATTTCTCGGGGA
CTCTTTTCTCAAGATGGCCACCACAATCGCTATCTTTACACGAAAGCCCAAAGGCGATGAATGCCTATACCATGTTG
AGCGCATGTTGCTCATTGCAATCAAAAACCTTTCAACACTGCTGTGACTGCAAACTCCCAGAGTATATTCGATCCC
TGGCATTGATAGACGAACCTGGTACCCCGATCTCACACTGATCAAGGGGAAGGCTCTGAAAGCAAAGAAAAAAC
AAAGCTTGGCCGACAAAACCATCGCAGATGTTTGTGAAGCTCTCATTGGTGCTGCATATCTCTCGAGCAAGGATGA
CAAGATGAACATGGCTGTCAAAGCTGTGACACAGATGGCCCGATCAAAGCGTCACTCAATGGTGACCTTTGATGAT
TACTATGCCGCGTTCAAGGTTCCAGATTGGCAGAAGGCTAATTCAAACGCCAACCAACGCAGACTGGTGCAGAAG
GTAGAAGAAGCCATCGGATATCATTCAAATCAGCGCCGTTGCTCGAAAAGTGC GTTCACCCATCCGTCTTACTTA
TTCCGGGAGCGTGCCACATTACAACGCCTCGAGTTTCTGGGAGATGCCCTCCTTGATATGGCCGTTGTCGAGTAC
CTATATATGAATTTCCACTTGCAAGTCCCGAGTGGTTGACTGAGCACAAAATGGCGATGGTATCCAACCATTTCTT
GGGTTGCTCTCGTCAAGCTCAACCTACACCACCACCTTCTAGCCAAATTACGCGATTTTCAGCAGCGAGATTCGAG
ATTATGTGATCGAACTTGAGGCAGCTGAAGAGGAGGCTCGCAAAGAAGCAGAACAAGAAGGAATTTCCATGCGC
ATGGACTTTTGGCGCAACATCAAACCGCCACCCAAGGCATACGCAGACTCGGTTGAGGCACTCGTCGGTGCCATGT
TTGTGGACTCTAAATTCGACTATTCTGTCGTTGAGAAGTTTTTACCGAGTACATTGTCCATACTTCGAAGACATGT
CCCTCTATGATACCTTTGCAAACAAACACCCTGTTACGATTCTTACCAAGATTATGCAACAGCAGGTTGGTTGCAA
GCGTGGTCTGTGGCGTCAAGAGTCGTGGTTCCGGATGCTGAACGGGGTATGGATGTTGCGACCGAGAATGATGTG
CGGAGTGGCTTTATAGCACATGAAGTGGTTATCACAAGCTATGTTTCAGCAGTGGATGGTCAGGCAAGATGAAG
GCTGCAGAGCTAGCAATCGAGCTGCTCGAGTCTTTGGTGGAGATATGACAGCGGCGAGGAAGCGTCTAGGTTGC
GACTGTGATATTGGGGTTGATGATGTGGAGATTGACCATGGGACGGCT

DEAD/DEAH box helicase (122-299 aa) (364-897 pb)

Helicase conserved C-terminal domain (450-559 aa) (1348-1677 pb)

Dicer dimerisation domain (635-722 aa) (1903-2166 pb)

Ribonuclease III domain (1057-1164 aa) (1250-1373 aa) (3169-3492 pb) (3748-4119 pb)

>DCL1_ *Fusarium incarnatum* (aa)

MVVQHEDPSPVRPPMDMTTAKRRRESSGEVCDLIADLPAVPLEEDVDEVDHSDSEDEDDQGVRYRLTVKPS
KARRITQRQRAGQKALQDFARQSQEEAYANPGKRTFGQAASISLRPPPDRGYQTELSEIAKGNIIIVLPTGS
GKTKIAANLLVHCLREEVESRSVGNPKKVAFFLVEKVALCEQQYHALKNSVGGHPIGIFTGHSKGVKKTksyw
DAQFSDNAVVLCTAHILLDCLNNAFITMDRIHLLIFDEAHAKKKHDYAEIMRRYYFTIRKSERPRVLGLTASPV
DSKTTDVREFSRKLERILDSEIATLSDKSLMEVMGLQVQVEETVRYDTLELPEETKPLWDSISKLVSRNEAFA
PLNFTKEASSTLGPWCADRYWQLSITENETKRLSDRTKAAFVGNTEHALARLDKARDAVQQVREVVAHKF
DTITPGSKDLSSKVKCLHEILVHAFTTDNATRCIVFDQRHTACLADLYNQASMAIPGMTAGYMQSSVLNMF
TENRINCLFATSVAEEGIDVPECGLCVRFDLYSSVIQYVQSKGRARELSRFITMLEDGNMKQVRVIKQALRDV
TAVQKFLAQPEDRKLQDETWVEGMEEQIERMSYHYETNTGARLTFPSLELLARFAATLHTGDGLNAKAE

YHVYKARTQYIATVNL PQNSPLVSQSGYPQRSKILAKCSAAFEACKLIAGKHIDDHLQPKFIKQAHKMRNAR
VGISPNKKA EHDMLRPNIWSSV GAWMDFYPTITLNMKSGQERESRPLILLSRKALPQLPPVPLFFGNRS
GVAELSCSQDPLSITAHQA EGLAAFTLKIFDDIFS KKFEEACEQFPYLLAPLAKGSHEAPQIDWDTIHLVKEKEFL
DWN NAPDDFFVDK FVVDLYDGG RKLILKGIDKTKKPSDPTPEGVPEPRSRAYRSAEPTIKEYSNSFFGKSRKTR
VWSDDQPVVRAELLSLRNLLDEFQVDEEVNKDCFVILEPLNVSPFP AIIHRIDSALIALDACEVFELSIPPALALE
AMTKDSDNTDEHDKQQINFQAGMGSNYERLEFLGDSFLKMATTIAIFTRKPKGDECLYHVERMLLICNQNLF
NTAVDCKLPEYIRSLAFDRRTWY PDLTLIKGKALKAKKKQSLADKTIADVCEALIGAAYLSSKDDKMNMAVKA
VTQMARSKRHSMTVFD DYYAAFVDPDWQKANSNANQRRLVQKVEEAIGYHFKSAPLLES AFTHPSYTYSGS
VPHYQRLEFLGDALLDMAVVEYLYMNFPLADPQWLTEHKMAMVSNHFLGCLCVKLNLHHLLANYAIF SSEI
RDYVIELEAAEEEEARKEAEQEGISM RMDFWRNKPPPKAYADSVEALVGAMFVDSKFDYSVVEKFFTEYIVPY
FEDMSLYDTFANKHPVTILTKIMQQV GCKAWSVASRVVVPDAERGMDVATENDVRS GFIAHEVVITSYVS
SSGWSGKMKAAELAIELLESFGGDMT AARKRLGCD CDIGVDDVEIDHGTA

DEAD/DEAH box helicase (122-299 aa)

Helicase conserved C-terminal domain (450-559 aa)

Dicer dimerisation domain (635-722 aa)

Ribonuclease III domain (1057-1164 aa) (1250-1373 aa)

>DCL2_ *Fusarium_ incarnatum* (nt)

Sequence ID: RBBZ01000021.1:30005-32479

Secuencia codificante FGENESH

ATGGTCAACTTTTACCATGAGAAGAAGATTGCAGGCATGCCTGTGCCTGCCATTTTGGGTCTGACGGCAA
GTCCAGTACAGTCTAAATCGAGACGAGATGAGATTCGAGAGCTCGAGATCACCATGGATGCGAGATGTG
TTACGCCTACGGTTAATCGCAAAGAGTTACTAGAACACGTCAACAAGCCTGACTTACATAGGGTACTCTA
CCATGTTGAGGAGCGTTCAGCTCTAACCCCTTGATGCAGGCTCTGCAGTCAGAATACTCGAGTATGAAC
CTCGCTCAAGATCCCATATTGCTAAGCTGCAAGATCGTATCGTTAAGAGCGCGAGTGGTCATGCTGAGT
TGCAAAGGGTGATTGCGAAACACGACACTTTCTGCAAACCAGATGAAAAAGCTCTGGAGCAAAGTA
AGGATATTCTCGAAGAGCTAGGACCCTGGGCGGCAGACCAGTATATCTCAGAGCTGGTCAGTCTCTTTCT
AGAAAGAGTCGACGCACCGACTACATACACCGACA ACTGGTCCAACGAAGACAGAACGATTTGGCAGG
ACACTTACGCCGATCGTAGTGATGCAGACAAACTCGGACTGCCCTGCACAGGTAACCTGACTGATAA
AGCTAACAAAGTTGATCCACGA ACTTCTTGCAAGCAACAAGGATACAGTCAGTATCATCTTCGTCAAATCG
CGCGCCGCGGTTAATGTCCTTTGCGCAATATTGAAAAACCATAACAAAATTCAACAGCGGTACCGTGTG
GTTCTGTAGTAGGGTCTGCAGCTTATGAGACACGCAAAAAGAACGTATACGAACACCCTACAGGTGATA
GTAACGAAATACTGGCCGCTTTCAGATCAGGCGCCATCAATCTTCTAGTTTCGACGAGTGTGCTCGAGGA
AGGCATTGATGTTGCAGCATGTA ACTTGGTAATCTGCTTCGACGAAACGACAACACTCAAATCTTACATC
CAACGCCGCGGGCGAGCGCGCAAGAAACAATCCAAGATGATTATCTGGAGAGATCAACTTCGGACATC
CGCGAATGGGACTCCTTGGAAGAGGAAATGAAGAAGCGCTACGAACACGATCGAGAAGAGTTGGATCG
ACTGAATGCACAGGCTCCCGCCGAATGGACGAGCTCGGAATCGTTTCGTGTTCCGAACTCAGACGCCAG

ACTGGATCTTGAAAATGCTCGCCAACATCTCGAACACTTTTGGCATAAAGTTTTCCGCCGAGCGTACGTG
GACGTAAGGCCTGTCTATGTGTTCCAGAAGGAAATATCTGAGAACGGAGTACCGACGTTTCAGTGCAACA
GTGACACTACCATCAGCCTTGCCATATGATCTACGCAAGTTCCAGGGGAAAGGAGGATGGATGTCTGAA
AAGAACGCCATGAAAGATGCGGCCTTCCGCGCTTACTATGGATTATACCGGGCAGGACTTGTTAGTGAC
AATCTTCTGCCATAAACGAGGGCGCAACCAAGAGGAAGACAAGGGGAAGTTACCAAACCCTGAACTT
CTCTTCAATCCATGGATTCAAGTTTCGCAAAAATGGATTTTCAGACACTGATAAATGGCTTTATGCTTATGA
GTTTATCGACCACGAGAATGTTGCACCGCTTCGTTTCCAGATTGCTCTCCCTATTGAGCTGCCTCGTCCCC
GAGATATCACAGTCTATCCCAGAGAAGAGGGAAACATGGACAATCAAATGTACCTCAATCCGAAGCATCT
CCAACGACGAACTTTTAGCCTTGCCAGATCATAATCGACCTTTTGGCAATGCATTCGGACATCGCTGG
AAAGTTGAAGATTCTGACCATGTGATCAAGGTTATCTATGGGATCAAGGATCTTTCACGGGACCAGATA
GGATCTATTCCCTTCGGAGAAAGTCCATACTACATAGATGGTGACTCTGCAAAGCGAATCCTGGTTCGGG
ATTCCACTAATGCACCGTTTATCTATACTAAGACCATTGAAAAGAAACCTCGGTATGAGGATGTCCGGCA
TCCATTCTATGAATACGAAAACGCTCCGGAAGAAGAGTATCTGGATGTTCTTCAATGGACGCGCAGAGC
GGATTTCCCTCCACGCAGTGAGGTCTGACCAGACTGCGAGTTCCTGCTCCAAGCCCTACCGCTGGGTA
CCTATTTTCGCAAGCCACAGTTGACGTGGTTTACCACGAGTCGTTGAGTTGGGCATGCTGATCCCTTCGA
TCATTCATGAGCTAGAAATCCAGCTAATCGCGTTGGAATTGTCTTCGACACTTTTGGCTCGTGTGGTATC
ACAGACTTGCAAGTTGGTAGTTCAAGCCATCAGTGCCCCAGTGCCATAGAGCCTGTTGACTACGAGCGTC
TTGAGTCTTGGGTGATTCAATCTTGAAGTTTTGCACCGTTATTCAAGCCTACTCTGAG

Helicase conserved C-terminal domain (622-1005 pb)

Dicer dimerisation domain (1198-1485 pb)

>DCL2_ *Fusarium incarnatum* (aa)

MVNFYHEKKIAGMPVPAILGLTASPVQSKSRRDEIRELEITMDARCVTPVNRKELLEHVNKPDLHRVLYHVEERSALTPL
MQALQSEYSSMNLAQDPHIAKLQDRIVKSASGHAE LQRVIAKHDTFSQNMKKLWSKSKDILEELGPWAADQYISELV
SLFLERVDAPTTYTDNWSNEDRTYLAGHLRRIASDADKGLPCTGNLTDKANKLIHELLAANKD TVSIIFVKSRAAVNVLC
AILKNHTQIQQRVYRVS VVGSAAAYETRKKNVYEHPTGDSNEILAAFRSGAINLLVSTSVLEEGIDVAACNLVICFDETTLLK
SYIQRGRARKKQSKMIILERSTSDIREWDSLEEEMKKRYEHDRELDRLNAQAPAEWTSSESFRVPNSDARLDLENARQ
HLEHFCDKVFRRAYVDVRPVYVFQKEISENGVPTFSATVTLPSALPYDLRKFQGGKGGWMSEKNAMKDAAFRAYYGLYR
AGLVSDNLLPIN EGATKEEDK GKLPNPELLFNPWIQVSQKWISD TDKWLYAYEFIDHENVAPLRFQIALPIELPRPRDITVY
PREEGTWTIKCTSIRSISNDELLALPDHTSTLLAMHFGHRWKVEDSDHVIVIKDLSRDQIGSIPFGESPPYIDGDSAKR
ILVRDSTNAPFIYTKTIEKKPRYEDVRHPFYEYENAPEEYLDVLQWTRRADFLHAVRSDQTASSCSKPYRWVLPISQATV
DVVSPRVVELGMLIPSIHLELEIQLIALELSSTLLARVGITDLQLVVQAI SAPSAIEPVDYERLEFLGDSILKFCTVIQAYSE

Helicase conserved C-terminal domain (208-495 aa)

Dicer dimerisation domain (400-495 aa)

ANEXO 5.-SECUENCIA DE DCL PREDICHA PARA *Geotrichum candidum*

>DCL1_*Geotrichum_candidum* (nt)

Sequence ID: QVQA01000040.1 (85,500-90,000)

Secuencia codificante FGENESH

AAAAATATTTTCAAACCTCTAACAATGTCTAAAAGTGCACCCGTTTCAAATTTGCACTTGGTGCTATCAA
AAATCCAAGCAATATCAATCTGGGATTTGAAGACACCACAAACCCGGTGGCACCGAAAGGAATCACTAA
ACTCAAATCCACTGGTGATGACACAGTAATGAATGAGGCACCGCCTGTTGAAGAAGAGATAGATCCATT
AGATGCTTTTATGAGCGCAATGGGAGCTACTGACACTACTCCCTCGACGACTTCGGCTTCTCTAGCTGAC
ATAATAATGGATGAAGAAAATGAAAGAAGCAGTAATGATACCCTCGACGAATTCGAAAACAACCCTGAG
GAATCAAGGCTCAACTTGAAAAAAGAAGCGGAAGGATATCCCTATTGTGATCATTCTAAAATGAACT
ACGAGCCATTTAGAAAACTTTTTACATCGAGCCACCTGAAGTTGCGGCAATGACTGAAGAAGAACTG
ACATGATGAGATTGGAGCTTGATGGTATCAAGATCCGGGGACTGAATTGCCCTAAACCAGTTCTCAAGT
GGTCCCAGTTTGGTCTGCCAGTGCCTACTATGAATGTCATTAACAGTCTGGGTTATGAAAAACCTTCACT
ATTGAGGCAAGCCATCCCTTCAATTATGTCTGGAAGAGATGTTATTGGTGTGGCCAAGACTGGTAGTG
GTAAGACTATGGCATTCTGCTTCCACTATTTTCGTGAGATCAAGACCAGCGTCCTTTGCTTAAACATGAA
GGTCCATGGCACTGGTTATGACTCCTACTCGTGAGCTTGCTGTCCAGATTTATCGCGAATGTAACCCTT
TTTAAAAGCTTTAAACTTGCAGCAGTTTGTGCTTATGGCGTTCTCCTATTAAGGATCAGATTGCGGAC
CTGAAACGTGGTGTGAGATTGTAGTGTGCACTCCTGGAAGAATGATTGATTGCTTGCTGCTAATGCAG
GTCGAGTCATTAATCTTCATCGGTTACCTACTTGGTACTAGATGAAGCTGATAGAATGTTTGATATGGGT
TTTGAAGCCTCAGGTTATGAAAATTATAATAACATCAGACCTGATAGACAAACAGTTCTTTTAGCGCAAC
ATTTCCAGACAAATGGAAACGCTTGCTCGAAAAACATTGAAAAAGGCAATTGAGATTATTGTTGGCGCT
AGAAGTGTGTTGGCACCTGAGATCACACAGATTGTAGAGGTTTCGTACCGCCGCAACC
AAATTCACACGG
CTGTTGGAACCTCTTGGTGAATTCTATAACAACCTTCTGACTCTCGTGCACCTATTTTTGTGGATCGTCAG
GAGTCGGCAGATTTGCTATTAAGGATCTGATACAGAGAGGTTACCCATGTCTTTCTATTTCATGGTGGCA
AAGATCAGATTGATCGCGACTCTGCAATTGCAGATTTTAAAAGCGGAGTGACCTCATTGTTGATTGCTAC
ATCTATTGCAGCCAGAGGGCTGGATGTGAAACAGTTAAAGCTGGTTGTTAACTACGATGCACCAAACCA
CATGGAAGATTATGTTACAGAGTGGGAAGAACGGGAAGAGCTGGA
AATACTGGTACAGCTGTTACCTT
TATTGAACCTGGCCAAGATAGAGCTGCTGTGATATTGCCAAAGCTCTTAACTTTCTAAGGTGGAGGTG
CCTGAAAAGTTGCAAGAGATAGTTGACAAATTTATGGCTAAGGTTAAGGAGGGCAAAGAAAAGTATGTC
TCTTCTGGATTTGGTGGTAAAGGTCTGGAAAAGCTGGATGAAGCTAGAGATACTGCAATGAAGTTGGAG
CGCAAGGCTTACGGTCAGGATGATGGGAAGGAGACAGTCAGCGATGACAATGAAGATTCTACAGAGGT
TGTAAGAGCGAAGAGTCACTCCATTCTTTGTATTCCATTGCGCCTACTGTTGTCAAACAAGGACATCAT
GCATCCACGCTTGAAAAAATGTCCAAGCGGAACGGTGTCTTCCGCGCTGGTGCAGCACCTGATAATCATG
GCCCGATACAAGTGCTTTCCACACCACGTTGGAAATCAATGACTACCCACAACAGGCTAGATGGAAAGT
TACTAACAATTCCAATATCACCAAAATTATTGAGGCAAACCTCAATTACGACCAAGGGTCAAGTATT
ATCCCCGGGCAAGGAGCCCAGCGAGGGAGAGGAGAAGAAATTATACTTGCTTATTGAGGGCCAGACC
GAACCTTCTGTGGCTAACGCGCGAAAGGAATTGGCAGCCTTACTCATTGCGGGAATGGAAGAAGCCGCG
CATTAGAAAAGCAGGGCCCCCTCGGGACGATACACAATTAATGA

DEAD/DEAH box helicase (622-1146 pb)

Helicase conserved C-terminal domain (1246-1587 pb)

>DCL1_*Geotrichum_candidum* (aa)

MSKSAPVSKFRLGAIKNPSNINLGFEDTTNPVAPKGITKLGSTGDDTVMNEAPPVEEIDPLDAFMSAMGAT
DTPSTTSASLADIIMDEENERSSNDTLDEFENPPEEKAQLEKKKRKDIPIVDHSKMNYEPFRKTFYIEPPEVA
AMTEEETDMMRLELDGIKIRGLNCPKPKVLKWSQFGLPVPTMNVINSLGYEKPS**SIQAQAIPSIMSGRDVIGVA**
KTGSGKTMAFLLPLFRQIKDQRPLLKHEGPMALVMTPTRELAVQIYRECKPFLKALNLRAVCAYGGSPIKDQIA
DLKRGAEIVVCTPGRMIDLLAANAGRVINLHRVTYLVLDEADRMFDMGFEPQVMKIINNIRPDRQTVLFSAT
FPRQMETLARKTLKKAIEIIVGARSVVAPEITQIVEVRTAAT**KFTRLLELLGEFYNNSSDSRALIFVDRQESADLL**
KDLIQRGYPCLSIHGGKDQIDRDSAIADFKSGVTSLLIATSIAARGLDVKQLKLVVNYDAPNHMEDYVHRVGRT
GRAGNTGTAVTFIEPGQDRAAVDIAKALKLSKVEVPEKLQEIVDKFMAKVKEGKEKYVSSGFGGKLEKLDEA
RDTAMKLERKAYGQDDGKETVSDDNEDSTEVGKSEESLHSLYSIAPTVMKQGHASTLEKMSKRNGVLRAGA
APDNHGPDTSAFHITTLEINDYPQARWKVTNNSNITKIIEANSTSITTKGQYPPGKEPSEGEKKLYLLIEGQT
ELSVANARKELAALLIAGMEEAAHSESRAPSGRYTIK-

DEAD/DEAH box helicase (208-382 aa)

Helicase conserved C-terminal domain (416-529 aa)

ANEXO 6.- INFORMACIÓN DE SECUENCIAS DCL DE PAPAYA, PIÑA Y MELÓN

Fruta	Número de acceso
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	<ul style="list-style-type: none">• A0A343J651 (UniProt)• Xm_022041523.1 (GenBank)
Piña (<i>Ananas comosus</i>)	<ul style="list-style-type: none">• A0A6P5FGZ9 (UniProt)• A0A6P5FLM4 (UniProt)• A0A6P5GGM9 (UniProt)• A0A199VI58 (UniProt)
Melón (<i>Cucumis melo</i>)	<ul style="list-style-type: none">• A0A1S3AUV8 (UniProt)• A0A1S3B9B7 (UniProt)• A0A1S3BDT0 (UniProt)• A0A1S3B9W6 (UniProt)