



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CAMPUS TUXTEPEC

“Diseño y evaluación de biofungicidas basados en sRNAs para el control de los hongos fitopatógenos *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Anthracoctystis cenchri* y *Aspergillus tubingensis*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

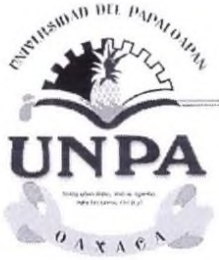
Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:

FERNANDO SOLANO GARCIA

Directora: Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA. 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 29 de junio de 2022 a las 12:00 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 "**Diseño y evaluación de biofungicidas basados en sRNAs para el control de los hongos fitopatógenos *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Anthracozytis cenchrí* y *Aspergillus tubingensis***" presentada por el alumno Fernando Solano García, con número de matrícula 16090046, 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 el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 29 de junio de 2022

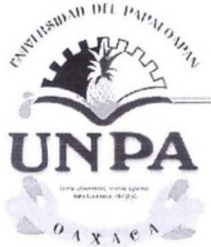
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Directora de Tesis

Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Catedra CONACyT-UNPA
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

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

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



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 29 de junio de 2022
Oficio No. JCIB/001/02/2018
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 del alumno **Fernando Solano García** titulado "**Diseño y evaluación de biofungicidas basados en sRNAs para el control de los hongos fitopatógenos *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Anthracoctystis cenchrí* y *Aspergillus tubingensis***" Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado 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:

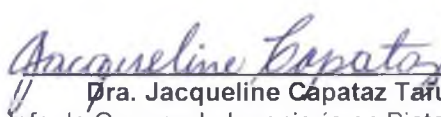
- Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia (Presidente, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García (Secretario, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Edgar García López (Vocal, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Paúl Mauricio Sánchez Ocampo (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Enrique Villalobos Amador (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

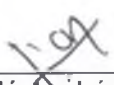
Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

Terra uberrima, mens aperta

Bou Lo-tama, chí jí jú


Dra. Jacqueline Capataz Taru
Jefa de Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Universidad del Papaloapan


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



c.c.p. Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, Director de tesis, para su conocimiento
c.c.p. Fernando Solano García, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril S/N, 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 el siguiente congreso:

Solano-García, F., Esquivel-Aguilar, K.F., Peña-Castro, J.M., Barrera-Figueroa, B.E. Isolation and identification of fungal pathogens in tropical fruits and design of synthetic dsRNAs for postharvest protection via a SIGS strategy. Online, del 8 al 11 de Noviembre del 2021. XIX National Plant Biochemistry and Molecular Biology Congress.

Agradecimientos

A mis padres, W. Fernando Solano y Josefina García, por creer en mí y darme la oportunidad de estudiar, siempre estaré agradecido por todos los sacrificios y esfuerzos que han hecho por mí, mis logros también son de ustedes.

A mis hermanos y familiares, Ruth, Ivone, Brian y Chris, que sin importar las diferencias han estado conmigo todo el camino.

Al Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo, Dr. Andrés Aguirre Cruz, Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Dr Edgar García López, Dr. Édgar Baldemar Sepúlveda, Dra. Arianna A. Huerta Heredia, QFB Leticia Saldaña Medina y MCQ Beatriz Castro Ilario, por compartir reactivos, equipos usados y experiencia en el desarrollo de este trabajo. Gracias también a todas aquellas personas que me dedicaron tiempo y palabras de apoyo a lo largo de este proceso.

A mis amistades del laboratorio, especialmente a Karlita. Gracias a tu compañía, el trabajo de laboratorio era más ameno. Gracias por compartir tu tiempo y darme tu apoyo.

Al Dr. Julián Mario Peña Castro, por todo el apoyo que me ha otorgado, tanto moral como académico. Gracias por la confianza puesta en mí, es un modelo de investigador al que aspiro llegar a ser algún día.

Finalmente, a la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, mi asesora de tesis. Gracias por la confianza, por los consejos, por los recursos, por el apoyo y por todo el cariño que me ha brindado. Es usted una de las personas que más admiro. Con su ejemplo, me inspira a dar lo mejor de mí para ser un mejor investigador. Haber sido parte de su laboratorio fue la mejor decisión que tomé. Una y mil veces volvería a escoger trabajar con usted.

Resumen

Las enfermedades vegetales son responsables de hasta el 30% de pérdidas mundialmente, la mayoría de ellas son atribuidas a hongos patógenos. Un nuevo enfoque llamado SIGS (*Spray-induce gene silencing*, silenciamiento génico inducido por aspersion) ha emergido como alternativa al uso de fungicidas químicos, basado en la aplicación por aspersion de dsRNAs (RNAs de doble cadena) que inhiben el desarrollo y crecimiento de los hongos al silenciar genes clave de la patogénesis, por ejemplo, los genes Dicer-like (DCLs) que son importantes para la biogénesis de RNAs pequeños que actúan en la interacción planta-patógeno, entre otros procesos.

En el presente trabajo se planteó el objetivo de desarrollar y evaluar la estrategia SIGS dirigida a genes DCL de los hongos *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Anthracozytis cenchri* y *Aspergillus tubingensis*, los cuales fueron identificados molecularmente en trabajos previos como patógenos de mango, plátano y piña, respectivamente.

Como resultado, se logró la identificación de genes DCL en *Aspergillus tubingensis* y *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. En *Anthracozytis cenchri* hubo éxito en amplificar DCL usando primers degenerados diseñados a partir de zonas conservadas en hongos relacionados. De las secuencias DCL encontradas, se seleccionaron regiones no conservadas de 250 pb que fueron amplificadas, fusionadas en una construcción con extremos T7 y usadas de molde para la síntesis de dsRNA-DCL1/2 largo y corto. La evaluación de los dsRNA-DCL1/2 en bioensayos de germinación de esporas e inhibición de crecimiento de micelio *in vitro* no mostró efecto en la reducción del crecimiento de ninguno de los patógenos probados. Un ensayo *in vivo* usando el patosistema Mango-*Lasiodiplodia pseudotheobromae* tampoco mostró efecto fungicida. Los resultados obtenidos indican que es necesario rediseñar los bioensayos para conocer si la ausencia de efectos se debe a la elección del gen, a la elección de la zona en el gen, a la baja estabilidad de los dsRNAs, o a la incapacidad de los hongos para la toma de RNAs ambientales.

Por otra parte, mediante un sistema modelo de frutos de uva se demostró que uno de los biofungicidas de RNAi diseñado es efectivo para inhibir el crecimiento de *Aspergillus tubingensis* en ensayos *in vivo*. Los resultados de este trabajo indican que los biofungicidas basados en sRNAs poseen el potencial para establecerse como una alternativa viable para la protección de productos agrícolas en la etapa postcosecha.

Abstract

Plant diseases are responsible for up to 30% of losses worldwide, most of them are attributed to pathogens fungi. A new approach, known as SIGS (spray-induced gene silencing) has emerged, and it is based on the spraying of dsRNAs to inhibit the development and growth of fungi through the silencing of key genes in the pathogenesis, like genes encoding Dicer-like or DCLs, which are important for the biogenesis of sRNAs, and that are involved in the plant-pathogen interaction, among other processes.

This work was aimed to develop and evaluate the SIGS strategy directed to DCL genes in the fungal pathogens *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Anthracoctis cenchri* and *Aspergillus tubingensis*, which were molecularly identified in previous works as pathogens of mango, banana and pineapple, respectively.

As a result, DCL genes were identified from *Aspergillus tubingensis* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. The amplification of DCL in *Anthracoctis cenchri* using degenerated primers designed from conserved zones in related fungi was successful. From the DCL identified, 250 pb non-conserved regions were chosen, amplified, fused in a construct with T7 ends and finally used as template for long and short dsRNA-DCL1/2 synthesis. The evaluation of dsRNA-DCL1/2 in *in vitro* spore germination assays and mycelial growth inhibition did not show effects in any of the pathogens tested. An *in vivo* assay using the pathosystem Mango-*Lasiodiplodia pseudotheobromae* did not showed any fungicide effect. The results indicate the need to redesign the bioassays to investigate whether the absence of effects is due to the gene or the zone in the gene selected, to the low stability of dsRNAs, or to the lack of capacity of fungal pathogens to uptake environmental RNAs.

On the other side, through the use of a model system consisting of grape fruits, it was demonstrated that one of the biofungicides designed in this work was effective to inhibit the growth of *Aspergillus tubingensis* in *in vivo* assays. These results indicate that sRNA-based biofungicides have the potential to establish as a viable alternative for the protection of crop produce in the post-harvest stage.

Índice de contenido

1. Introducción	1
1.1 Seguridad alimentaria	1
1.2 Impacto de los hongos patógenos en la agricultura en México	1
1.3 Estrategias tradicionales de protección de cultivos	3
1.3.1 Siembra mixta	3
1.3.2 Agroquímicos.....	4
1.3.3 Biocontrol.....	5
1.4 SIGS y HIGS, estrategias biotecnológicas modernas de protección de cultivos basadas en sRNAs	6
1.5 <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> , <i>Anthracoctis cenchrí</i> y <i>Aspergillus tubingensis</i> como fitopatógenos	15
1.5.1 <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	15
1.5.2 <i>Anthracoctis cenchrí</i>	16
1.5.3 <i>Aspergillus tubingensis</i>	18
3. Justificación	20
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivos	22
5.1 General	22
5.2 Particulares.....	22
6. Diagrama experimental.....	23
7. Materiales y Métodos	24
7.1 Material biológico.....	24
7.2 Extracción de DNA genómico.....	24
7.3 Identificación de genes DCL.....	25

7.3.1 Búsquedas de anotaciones de secuencias DCL en bases de datos	25
7.3.2 Predicción de DCLs y dominios	26
7.3.3 Identificación de genes DCL <i>de novo</i>	26
7.4 Diseño de RNA de doble cadena de interferencia (dsRNAi).....	27
7.4.1 Alineamientos	27
7.4.2 Confirmación experimental.....	27
7.5 Síntesis de RNA de doble cadena de interferencia (dsRNAi)	31
7.5.1 Construcción del templado.....	31
7.5.2 Reducción de efectos off-target	34
7.5.3 Síntesis de dsRNAi	35
7.6 Bioensayos de la actividad de los biofungicidas de dsRNAi	37
7.7 Análisis estadístico	38
8. Resultados y discusión.....	39
8.1 Confirmación de la identidad de los hongos fitopatógenos.....	39
8.2 Extracción de DNA genómico.....	41
8.3 Identificación de genes DCL.....	42
8.3.1 Búsqueda de anotaciones de DCL en bases de datos	42
8.3.2 Predicción de DCLs y dominios	44
8.3.3 Identificación de genes DCL <i>de novo</i>	47
8.4 Diseño de RNA de doble cadena de interferencia (dsRNAi).....	49
8.4.1 Alineamientos.....	49
8.5 Síntesis de RNA de doble cadena de interferencia (dsRNAi)	59
8.5.1 Construcción del templado.....	59
8.5.2 Reducción de efectos off-target	66
8.5.3 Síntesis de dsRNAi	74

8.6 Bioensayos de la actividad fungicida de los dsRNAi	75
10. Perspectivas	83
11. Referencias	85
Anexo 1. Preparación y composición de soluciones y reactivos y protocolos	91
Anexo 2. Secuencias de DCL en aminoácidos y nucleótidos	82
Anexo 3. Evidencia de las corridas experimentales	110

Índice de figuras

Figura 1. Comparación en los porcentajes de exportaciones de frutos tropicales de los distintos países del mundo (OEC, 2021).....	2
Figura 2. La aplicación externa de Bc-DCL1/2-dsRNAs y –sRNAs (20 µL de 20 ng/µL) inhibe la virulencia de <i>B. cinerea</i> en jitomate, fresa, uva, lechuga, cebolla y pétalos de rosa, comparado con el tratamiento control usando agua (Wang et al, 2016).....	9
Figura 3. Movimiento de ARN entre los patógenos fúngicos de las plantas y sus huéspedes y el empleo del silenciamiento génico inducido por aspersión (SIGS) para contrarrestar la virulencia de los patógenos. El fondo representa la variedad de cultivos y productos post-cosecha en los que se pueden utilizar SIGS para prevenir pérdidas por enfermedades (Wang et al, 2017).....	14
Figura 4. Esporas de <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> . a) Conidio maduro. b) Conidio hialino inmaduro (Lian et al, 2019).....	15
Figura 5. <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> aislado de mango. El círculo negro indica el lugar de donde fue aislado (Santiago Tapia, 2019).	16
Figura 6. Microscopía de las sporeballs. A-B esporas de <i>Anthraco cystis grodzinskae</i> (Piątek, Lutz, & Yorou, 2015). A Sporeball (barra 20µm). B Esporas exteriores (barra 10µm). C esporas de <i>Anthraco cystis penniseti</i> (barra 50µm) (Kabaktepe, Akata, & Akgül, 2016).	17
Figura 7. <i>Anthraco cystis cenchri</i> aislado de plátano. El círculo azul indica el lugar del que se aisló (Santiago Tapia, 2019).	18
Figura 8. Estructuras de <i>Aspergillus tubingensis</i> . A Cabezas de los conidióforos. B Esporas (Zhao et al, 2018).	19
Figura 9. <i>Aspergillus tubingensis</i> aislado de piña. El círculo blanco indica el lugar de donde se aisló (Santiago Tapia, 2019).	19
Figura 10. Secuencia experimental.....	23
Figura 11. Estructura del gen DICER LIKE con los dominios típicos. Imagen generada en SnapGene.	25
Figura 12. Esquema general de fusión de fragmentos de DCL.	32
Figura 13. Características morfológicas de la cepa de <i>Aspergillus tubingensis</i> recuperada. A, Morfología colonial de <i>A. tubingensis</i> . B, Detalle de los conidióforos con esporas vistos en	

estereoscopio con objetivo 10X. C, Detalle de esporangios vistos con microscopio óptico con objetivo 10X. D, Detalle de esporas visto con microscopio óptico con objetivo 40X.	39
Figura 14. Morfología de <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> . A Morfología colonial, micelio aéreo oscuro. B-C Detalle de hifas poco septadas a 20X.	40
Figura 15. Morfología de <i>Anthracocestis cenchri</i> . A. Morfología colonial. B Detalle de sporeball a 40X.	40
Figura 16. Gel de agarosa 1% que muestra el gDNA obtenido de los hongos. La flecha indica el peso molecular de la banda. MPM: Marcador de peso molecular.	41
Figura 17. Búsqueda de DCL en Ananas comosus. A Árbol generado en UniProt con las secuencias depositadas para DCL de Ananas cosmosus. Los números indican cada grupo de secuencias resultantes del alineamiento. Las líneas amarillas indican la secuencia representativa escogida de cada grupo. B Árbol con las secuencias elegidas de DCL de <i>Ananas cosmosus</i>	43
Figura 18. Secuencias DCL del plátano encontradas en UniProt.	44
Figura 19. Hits para los DCL 1 y 2 de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en el genoma de <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> . Secuence ID: Para DCL1 RHKG01000374.1 de 17397 a 21410 ; para DCL2 RHKG01000099.1 de 336142 a 341402	44
Figura 20. Predicción de DCL1 en <i>L. pseudotheobromae</i> . A Marco abierto de lectura en FGENESH. B Dominios de DCL predichos en Pfam. CDSf: primero (comenzando el codón de inicio); CDSi: interno (exón interno); CDSl: último segmento de codificación (codón de paro); CDSo: para genes con una sola secuencia codificante (comenzando con codón de inicio y terminando con codón de paro); PolA: señal de poliA para terminar la transcripción; TSS: sitio de inicio de la transcripción.	45
Figura 21. Predicción de DCL2 en <i>L. pseudotheobromae</i> . A Marco abierto de lectura en FGENESH. B Predicción de los dominios de DCL en Pfam. CDSf: primero (comenzando el codón de inicio); CDSi: interno (exón interno); CDSl: último segmento de codificación (codón de paro); CDSo: para genes con una sola secuencia codificante (comenzando con codón de inicio y terminando con codón de paro); PolA: señal de poliA para terminar la transcripción; TSS: sitio de inicio de la transcripción.	46
Figura 22. Zonas conservadas de DCL en especies cercanas a <i>A. cenchri</i> . A Alineamiento de las secuencias peptídicas de DCL de especies relacionadas con <i>A. cenchri</i> . Se indican las regiones	

conservadas con asteriscos. B Estructura del gen DCL de <i>A. flocculosa</i> como modelo para el diseño de primers degenerados. En gris se indica las zonas dónde hay conservación.	47
Figura 23. Alineamiento de nucleótidos de las zonas conservadas de los DCL de especies relacionadas con <i>A. cenchri</i>	48
Figura 24. Alineamientos de los DCLs de la piña vs DCLs de <i>A. tubingensis</i> . Las primeras 5 secuencias corresponden a los DCLs de la piña; la última secuencia corresponde al DCL del hongo. Se resaltan en gris las zonas de mayor homología.	49
Figura 25. Alineamientos de las secuencias nucleotídicas de los DCLs de piña vs <i>Aspergillus tubingensis</i> . A DCL1. B DCL2.2. C DCL2.1. Se resaltan las similitudes.	51
Figura 26. Ubicación de los primers para la amplificación de los DCLs en <i>A. tubingensis</i> . La zona gris indica la región amplificada para la generación de dsRNAi.	52
Figura 27. DCLs de <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> . La zona gris indica la región amplificada para el diseño de los dsRNAi.	52
Figura 28. Geles de agarosa al 1% de PCR para amplificar los DCLs en <i>A. tubingensis</i> . A Confirmación de la presencia de DCL1 y DCL2.1 en el gDNA de <i>A. tubingensis</i> del tamaño esperado (250 pb). B PCR de gradiente para el DCL2.2 de <i>A. tubingensis</i> . Temperaturas de izquierda a derecha en los pocillos: 53.1°C, 54.4°C, 55.3°C, 57.7°C, 58.2°C y 60°C. C PCR de gradiente con el segundo diseño para el DCL2.2 de <i>Aspergillus tubingensis</i> . De izquierda a derecha las temperaturas son: 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C y 62°C.	54
Figura 29. Gel de agarosa al 1% con las bandas correspondientes al DCL1 y DCL2 de <i>L. pseudotheobromae</i>	54
Figura 30. Geles de agarosa al 1% para amplificar DCL en <i>A. cenchri</i> . A PCR de gradiente con el diseño degenerado para el DCL de <i>A. cenchri</i> . De izquierda a derecha las temperaturas son: 53.1°C, 54.4°C, 55.3°C, 57.7°C, 58.2°C y 60°C. B PCR de gradiente con el segundo diseño de primers degenerados, el primer diseño y las combinaciones 2F1R y 1F2R. El orden de los pocillos se describe en la Tabla 18.	55
Figura 31. Gel de agarosa al 1% con primers degenerados en Acen. A1: 50°C, A2: 55°C, A3: 60°C y A4: 65°C. El control negativo se realizó a 50°C.	57
Figura 32. Geles de expresión de DCL como transcrito en <i>A. tubingensis</i> y <i>L. pseudotheobromae</i> . A Gel de agarosa al 1% con MOPS. A bandas ribosomales de <i>A. tubingensis</i> . B Productos de	

amplificación de DCL1 y DCL2.1 a partir de cDNA de <i>A. tubingensis</i> (cDNA). C Bandas ribosomales de <i>L. pseudotheobromae</i> . D Productos de amplificación de DCL1 y DCL2 a partir de cDNA de <i>L. pseudotheobromae</i> (cDNA). Se usaron como controles negativos una dilución de RNA tratado con DNasa previo a la síntesis de cDNA (RNAdil) y agua (-), y como control positivo se empleó gDNA.....	58
Figura 33. Gel de agarosa al 1% que muestra los amplicones de los DCLs con extremos complementarios de A <i>Aspergillus tubingensis</i> y B <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	60
Figura 34. Gel de agarosa al 1% con las construcciones de Aspt1-2-2 y Lpse1-2. A Construcciones de la fusión de los DCLs de <i>A. tubingensis</i> y <i>L. pseudotheobromae</i> . B Construcciones con extremos T7 de <i>A. tubingensis</i> y <i>L. pseudotheobromae</i>	61
Figura 35. Resumen de reacciones para la construcción del templado. A <i>A. tubingensis</i> . B <i>L. pseudotheobromae</i> . Carriles DCL1-DCL2.1/DCL1-DCL2: bandas de 250 pb correspondientes a los fragmentos de DCLs. Carriles DCL1Comp-DCL2.1Comp/DCL1Comp-DCL2Comp: fragmentos de DCL con extremos complementarios, con un tamaño aproximado de 273 pb. Carril DCL1-2.1-DCL1-2: fragmento de 500 pb correspondiente a la suma de tamaños de ambos DCLs. Carril T7DCL1-2.1-T7DCL1-2: fragmento de 540 pb correspondiente a la fusión de ambos DCLs más la secuencia del promotor T7.	61
Figura 36. Proceso de clonación de la construcción de Aspt-Dcl1/2.1. A Producto de PCR con primers T7. B Colonias blancas con construcción. C PCR de colonia con primers M13. D Análisis de plásmido de clona con la construcción Aspt-DCL1/2.1 con enzima de restricción NotI y PCR con primers T7.	63
Figura 37. Proceso de clonación de la construcción de Lpse-Dcl1/2. A Producto de PCR con primers T7. B Colonias blancas con construcción. C PCR de colonia con primers M13. D Análisis de plásmido de clona con la construcción Lpse-DCL1/2 con enzima de restricción NotI y PCR con primers T7.	64
Figura 38. Análisis de la secuencia Aspt-DCL1/2.1. Alineamiento entre las secuencias recuperadas de la secuenciación y las secuencias obtenidas in silico. Morado: Promotor T7. Azul: DCL1, Verde: DCL2.1, Rojo: Diferencias. Aspt_DCL2.1: Secuencia recuperada de la secuenciación. Aspt_DCL2.1Blas: Secuencia recuperada del NCBI.	65

Figura 39. Análisis de la secuencia Lpse-DCL1/2. Alineamiento entre las secuencias recuperadas de la secuenciación y las secuencias obtenidas in silico. Morado: Promotor T7. Azul: DCL1, Verde: DCL2, Rojo: Diferencias, Gris: similitud de aminoácidos, Azul: polaridad del aminoácido. Lpse_DCL2: Secuencia recuperada de la secuenciación. Lpse_DCL2Blas: Secuencia recuperada del NCBI.	66
Figura 40. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Aspt en el género <i>Aspergillus</i>	67
Figura 41. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Aspt en <i>Ananas comosus</i>	68
Figura 42. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Aspt en <i>Homo sapiens</i>	69
Figura 43. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Aspt que excluye al género <i>Aspergillus</i> .70	
Figura 44. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Lpse en el género <i>Lasiodiplodia</i>	70
Figura 45. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Lpse en <i>Mangifera</i>	71
Figura 46. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Lpse en <i>Homo sapiens</i>	72
Figura 47. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Lpse que excluye al género <i>Lasiodiplodia</i>	73
Figura 48. Gel de agarosa al 1% con RNAi largo y corto. A <i>A. tubingensis</i> . B <i>L. pseudotheobromae</i> . Las bandas arriba de 500 pb corresponden al ldsRNAi mientras que las manchas debajo de 100 pb corresponden a los sdsRNAi.....	74
Figura 49. Bioensayo de inhibición de germinación de esporas. A Placas con crecimiento de esporas de <i>A. tubingensis</i> . B Gráfico de columnas del promedio número de colonias obtenidas para cada tratamiento. Las barras de error muestran la desviación estándar (\pm SD) de 3 réplicas biológicas.....	75
Figura 50. Efecto de sdsAspt sobre uvas. A diámetro de infección en uvas tratadas con sdsAspt y agua, se observan diferencias en el tamaño de la lesión. B Boxplot con los datos de diámetro de infección, se muestran las diferencias significativas con letras distintas.	78
Figura 51. Bioensayo de crecimiento de micelio de <i>L. pseudotheobromae</i> en medio líquido adicionado con dsRNAi (ldsRNA y sdsRNA).	79
Figura 52. Ensayo in vivo. A área infectada por <i>L. pseudotheobromae</i> en mangos tratados con agua y dsRNA-Lpse. A Progresión de la enfermedad en mango tras 5 dpi. B Gráfico de barras que muestra el promedio de área infectada en mango. Las barras de error muestran la desviación estándar (\pm SD) de 4 réplicas biológicas.	81

Índice de tablas

Tabla 1. Producción anual de frutos tropicales y posición de Oaxaca en la producción Nacional (elaborada con datos de Panorama Agroalimentario 2020).....	2
Tabla 2. Lista de biofungicidas usados para tratar enfermedades en cultivos. Tabla modificada de Rouabhi (2010).....	6
Tabla 3. Parámetros de la PCR para DCLs de <i>Aspergillus tubingensis</i>	28
Tabla 4. Parámetros de PCR para DCL2 de <i>Aspergillus tubingensis</i>	28
Tabla 5. Parámetros de la PCR de gradiente con el primer par de primers degenerados para <i>Anthracoctis cenchri</i>	29
Tabla 6. Parámetros de la PCR con los primers degenerados para <i>Anthracoctis cenchri</i>	30
Tabla 7. Parámetros de la PCR para amplificar DCLs en <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	30
Tabla 8. Programa para fusión de fragmentos de DCL.....	33
Tabla 9. Parámetros para el análisis del plásmido.	34
Tabla 10. Parámetros de búsqueda de blancos no deseados.....	35
Tabla 11. Preparación de reacciones de síntesis de dsRNAi largos y cortos	36
Tabla 12. Concentraciones obtenidas de gDNA.	41
Tabla 13. Oligonucleótidos degenerados para amplificar DCL en <i>A. cenchri</i>	48
Tabla 14. Primers para amplificar las secuencias DCL de <i>Aspergillus tubingensis</i>	52
Tabla 15. Primers para amplificar DCL1 y DCL2 de <i>L. pseudotheobromae</i>	53
Tabla 16. Segundo diseño de primers para el DCL2 de <i>Aspergillus tubingensis</i>	53
Tabla 17. 2do diseño de primers degenerados para <i>A. cenchri</i>	55
Tabla 18. Distribución de las muestras de la PCR de gradiente con los primers degenerados para <i>A. cenchri</i> de la figura 37B.	55
Tabla 19. Diseño de primers degenerados para <i>A. cenchri</i> con consideración de la variación de bases para cada codón de aminoácidos.....	56
Tabla 20. Concentraciones de los fragmentos de DCLs de <i>A. tubingensis</i> y <i>L. pseudotheobromae</i>	58
Tabla 21. Diseño de primers complementarios para la fusión de los DCLs.....	59
Tabla 22. Concentración de productos con extremos complementarios.	59
Tabla 23. Rendimientos de ldsRNAi y sdsRNAi.	74

Tabla 24. Número de colonias germinadas de <i>A. tubingensis</i> . Datos correspondientes a un experimento con 3 réplicas biológicas con diferentes concentraciones de ldsRNAi y sdsRNAi.	76
Tabla 25. Análisis de varianza correspondiente al experimento de inhibición de germinación de esporas de <i>A. tubingensis</i>	76
Tabla 26. Datos de diámetro de infección en uvas tratadas con sdsAspt.	77
Tabla 27. Análisis de varianza correspondiente al experimento de efecto de sdsAspt en uvas. .	78
Tabla 28. Porcentaje de área infectada en mango por <i>L. pseudotheobromae</i> . Los datos se recabaron tras medir el área infectada 5dpi usando el software ImageJ.....	80
Tabla 29. Análisis de varianza correspondiente al experimento de inhibición de crecimiento de micelio de <i>L. pseudotheobromae</i>	80

Abreviaturas

AGO: proteína Argonauta.

DCL: proteína DICER-LIKE.

dsRNA: RNA bicatenario/doble cadena.

gDNA: DNA genómico.

HIGS: silenciamiento génico inducido por el huésped.

miRNAs: microRNAs.

mRNA: RNA mensajero.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PTGS: Silenciamiento génico postranscripcional.

RDRs: RNA polimerasa dependiente de RNA.

RNA: Ácido ribonucleico.

SIGS: silenciamiento génico inducido por aspersion.

siRNAs: sRNAs de interferencia.

sRNA: RNA pequeño.

ssRNA: RNA monocatenario.

1. Introducción

1.1 Seguridad alimentaria

La seguridad alimentaria, según la definición del Comité de Seguridad Alimentaria Mundial de las Naciones Unidas, significa que todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico, social y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfagan sus preferencias alimentarias y necesidades dietéticas para una vida activa y saludable (IFPRI, 2021).

Uno de los mayores retos actuales es el manejo de las cuestiones de seguridad alimentaria, dado que en las próximas décadas se verá significativamente amenazada por fenómenos tales como el cambio climático, el crecimiento demográfico, el aumento de los precios, problemas sociales, entre otros. Por ello, es necesario generar estrategias para adaptarse a los cambios, como son la adecuada administración del agua, modelos de uso de tierras, manejo de patógenos, pestes y enfermedades en cultivos, y procesamiento postcosecha, por mencionar algunas.

Dentro de los agentes patógenos de las plantas, los hongos y oomicetos son responsables de pérdidas agrícolas mundiales de aproximadamente \$60 mil millones de dólares anuales en el rendimiento de cultivos, lo que representa 10-23% de las pérdidas totales de rendimiento. El éxito de los hongos (y oomicetos) patógenos subyace en su alta adaptabilidad al ambiente, su capacidad para superar rápidamente la resistencia vegetal y para convertirse en patógenos de múltiples huéspedes gracias a sus modelos mixtos de reproducción y grandes tamaños de población (Kettles & Luna, 2019).

1.2 Impacto de los hongos patógenos en la agricultura en México

México es un país productor y exportador de frutos tropicales, uno de los principales alimentos a escala global, y en el 2019 se posicionó en el primer lugar de países exportadores a nivel internacional con un 23.9% de la producción anual y un valor de \$3.6 mil millones de dólares (Figura 1) (OEC, 2021).

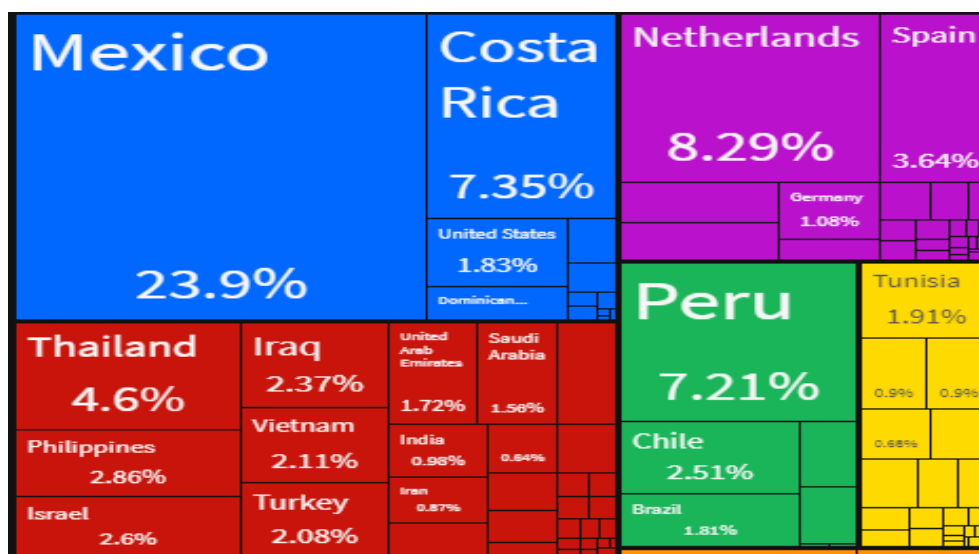


Figura 1. Comparación en los porcentajes de exportaciones de frutos tropicales de los distintos países del mundo (OEC, 2021).

La actividad agrícola del estado de Oaxaca registra una de las más variadas producciones de nuestro país, y su notable calidad lo posiciona como un referente internacional. El estado tiene una importante producción agrícola, en su territorio se siembra: maíz, frijol, cacahuate, trigo, sorgo, café, limón, mango, maguey mezcalero, copra y hule (Gobierno de México, 2020), además, es un productor de frutos tropicales de importancia económica como la papaya, piña, plátano, naranja, melón, por mencionar algunos, ocupando posiciones entre los primeros 10 lugares en la producción nacional (Tabla 1).

Tabla 1. Producción anual de frutos tropicales y posición de Oaxaca en la producción Nacional (elaborada con datos de Panorama Agroalimentario 2020).

Producto	Producción anual 2020 (Toneladas)	Posición en la producción nacional
Papaya	323,614	1°
Piña	145,417	2°
Mango	208,798	5°
Melón	17,882	8°
Plátano	78,824	8°
Naranja	54,979	10°

Los productos agrícolas son invadidos por diversos microorganismos durante el desarrollo del cultivo en el campo, cosecha, transporte y almacenamiento, siendo los hongos los más abundantes y la principal causa de enfermedades. Los hongos afectan la agricultura, debido a la reducción del potencial de producción de los cultivos que atacan, ocasionando pérdidas económicas. Los hongos que crecen sobre productos agrícolas, en especial los que invaden granos durante su desarrollo, cosecha o almacenamiento, han sido clasificados desde el punto de vista ecológico por Christensen y Kauffman (1969) en hongos de campo, hongos de almacén y hongos de deterioro avanzado. En el caso de los hongos de almacén, se trata de microorganismos que invaden los granos después de la cosecha (Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios, 2016).

Los daños más importantes que causan los hongos de almacén en alimentos se enlistan como: enmohecimiento, calentamiento y hedor, necrosis y podredumbre, reducción del peso, cambios en propiedades organolépticas y producción de micotoxinas, las cuales, si son ingeridas pueden resultar perjudiciales para los consumidores; además que se traduce en un periodo reducido para su transporte y puesta en mercados para su venta.

1.3 Estrategias tradicionales de protección de cultivos

Para mitigar los daños causados por hongos, los agrónomos emplean una variedad de alternativas de control de patógenos como es la siembra mixta, el uso de agroquímicos y el biocontrol.

1.3.1 Siembra mixta

Las enfermedades de las plantas se manejan mejor integrando una serie de prácticas de control que pueden incluir: rotación de cultivos, selección de cultivares tolerantes o resistentes a enfermedades (cultivares genéticamente menos susceptibles que otros cultivares), tiempo de siembra, nivel de fertilización, modificación climática, saneamiento y aplicación de fungicidas (APS, 2021). Se deben evitar los monocultivos, puesto que, si una nueva cepa patógena apareciera, la diversidad genética vegetal podría obstaculizar la dispersión del patógeno. Incluso

si una cantidad de enfermedades en parcelas mixtas es mayor que en monocultivos, la incidencia de estas enfermedades se reduce, debido a que no se puede propagar adecuadamente, esto es igual a lo que en humanos se conoce como inmunidad colectiva (Kettles & Luna, 2019). Sin embargo, los policultivos representan un desafío significativo en la cadena de alimentos, por ejemplo, en la homogeneidad de la cosecha para los productores que necesitan garantizar su producción final.

1.3.2 Agroquímicos

Un fungicida es un tipo de pesticida que controla las enfermedades fúngicas inhibiendo o eliminando específicamente el hongo que causa la enfermedad; muchos fungicidas tienen una actividad dirigida que imparte una alta eficacia contra patógenos específicos, lo que significa un bajo potencial de toxicidad para los humanos y otros organismos, pero también da como resultado un alto riesgo para que los patógenos desarrollen resistencia al fungicida. El modo de acción de los fungicidas es eliminando al hongo al dañar sus membranas celulares, inactivando proteínas o enzimas importantes, o por interferencia con procesos clave como la producción de energía o la respiración. La resistencia a los fungicidas es un rasgo hereditario estable que resulta en una reducción de la sensibilidad a un fungicida por parte de un hongo individual. Esta capacidad se obtiene mediante procesos evolutivos (APS, 2021).

En un futuro, los fungicidas sintéticos tendrán estrictas restricciones a causa de los límites máximos de residuos que dejan en el ambiente, lo que los hará inadecuados; además, debido al dinamismo de las regulaciones, la industria de los agroquímicos necesita ajustarse rápidamente a los nuevos protocolos y estándares, así como desarrollar productos nuevos y efectivos para la protección de los cultivos.

Aunque los problemas de contaminación ambiental, así como la resistencia a fungicidas químicos existen, los fungicidas siguen siendo los métodos de control más importantes para controlar las enfermedades en plantas y con las investigaciones futuras, cada vez más aparecerán nuevos fungicidas que serán usados para el control de enfermedades (Peng *et al*, 2013).

1.3.3 Biocontrol

El “control biológico” o “biocontrol” es un método que involucra el manejo y eliminación de una peste a través de sus enemigos naturales, o de una enfermedad al usar sus antagonistas (COLEACP, 2011); dichos antagonistas son conocidos como agentes de control biológico.

Para inhibir exitosamente la infección y desarrollo del patógeno, operan varios posibles mecanismos en el sistema trófico de interacción huésped-patógeno-antagonista, tales como antibiosis, micoparasitismo, producción de enzimas líticas, resistencia inducida, formación de biopelículas y competición por nutrientes limitantes y espacio. Este último es un mecanismo de biocontrol efectivo cuando el antagonista está presente en cantidades suficientes en el momento y lugar adecuado (Spadaro & Droby, 2016).

Algunos hongos que se conoce tienen actividad antagonista contra hongos fitopatógenos son, por ejemplo, del género *Trichoderma*, *T. virens*, el cual está aprobado en Estados Unidos para tratar *Rhizotocnia solani* y *Pythium ultimum* en cultivos hortícolas (COLEACP, 2011). En la Tabla 2 se muestran algunos biofungicidas comerciales cuyo principio activo son bacterias y hongos.

Aunque los agentes de control biológico pueden controlar enfermedades y causar poco o nulo daño ambiental, su eficacia es menor que con el uso de fungicidas químicos, ya que se ve afectada por factores como la complejidad de la planta o el sistema del suelo, y difícilmente puede mantener un control estable (Peng *et al*, 2013).

A pesar de que los tres métodos mencionados de protección vegetal contra enfermedades causadas por hongos han sido herramientas invaluable para reducir las pérdidas económicas en los cultivos, los riesgos a la salud, la variabilidad en su eficacia y los costos ambientales que han generado hacen urgente la necesidad de desarrollar nuevas alternativas de alta efectividad y menor impacto ambiental. Una de las alternativas más recientes al uso de los fungicidas sintéticos son los fungicidas basados en moléculas de pequeños ARN (sRNA) (Kettles & Luna, 2019).

Tabla 2. Lista de biofungicidas usados para tratar enfermedades en cultivos. Tabla modificada de Rouabhi (2010).

Producto	Ingrediente activo	Enfermedad	Sitio de tratamiento
Contans	<i>Coniothyrium minitans</i>	Moho gris (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Sclerotinia minor</i> y <i>Sclerotinia trifoliorum</i>)	En suelo
Kodiak	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Botrytis</i>	Semillas
Serenade			Foliar
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Marchitamiento fúngico	En suelo
RootShield Granules, RootShield WP	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i>	
T22-HC			
Actinovate AG	<i>Streptomyces lydicus</i>	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i>	En suelo y foliar
SoilGard	<i>Gliocladium virens</i>	Marchitamiento fúngico	En suelo

1.4 SIGS y HIGS, estrategias biotecnológicas modernas de protección de cultivos basadas en sRNAs

En el estudio de los mecanismos de infección de los hongos, se ha encontrado que los sRNA cumplen roles clave en los procesos moleculares de virulencia. Los sRNAs son pequeños fragmentos de ARN de 20-24nt que tienen roles activos como reguladores de la expresión de genes; median procesos tales como la interferencia del ARN, el silenciamiento génico, co-supresión y quelling, entre otros procesos en los cuales los sRNA reconocen ARN mensajeros (mRNA) por complementariedad de secuencias (Barrera-Figueroa, Wu, & Liu, 2012). En plantas, como en todos los eucariontes, los sRNA están divididos en 2 grupos principales: los microRNAs (miRNAs) y los pequeños RNAs de interferencia (siRNAs), los cuales son procesados de

precursores de una horquilla de una sola hebra o de RNA bicatenario (dsRNA), respectivamente (Zhu *et al*, 2019).

Los siRNAs participan en el proceso conocido como silenciamiento por RNA, o RNA de interferencia o interferente (RNAi). El RNA interferente es un proceso biológico donde los sRNAs suprimen la expresión de genes por medio del reconocimiento y silenciamiento de mRNA específicos (Wang & Dean, 2019). Los siRNAs se generan mediante rutas de biogénesis que incluyen tres componentes principales: 1) Proteína RNA polimerasa dependiente de RNA (RDRs) que es responsable de catalizar la biosíntesis de dsRNAs a partir de un templado de RNA monocatenario (ssRNA), 2) Proteínas DICER-LIKE (DCL) las cuales cortan el dsRNA o la horquilla de RNA monocatenario en sRNAs, y 3) Proteínas Argonauta (AGO), las cuales son guiadas por sRNAs y se unen al mRNA objetivo de forma complementaria a la secuencia, provocando cortes en el mRNA o inhibiendo la traducción (Zhu *et al*, 2019). El efecto global de estos procesos se conoce como silenciamiento génico postranscripcional, o PTGS.

Dentro de las plantas, los sRNAs se mueven de una célula a otra presumiblemente a través de plasmodesmos, y viajan a través del sistema vascular; además, los sRNAs también se pueden mover entre un huésped y los organismos con los que interactúa, induciendo el silenciamiento génico, en un fenómeno llamado entrecruzamiento de reinos (cross-kingdom) (Cai *et al*, 2018), en donde células patógenas liberan sRNAs para silenciar genes de respuesta inmunitaria del huésped y así aumentar su virulencia, mediando su interacción (Huang *et al*, 2019).

Weiberg *et al*, (2013) realizaron una demostración de la importancia de los sRNAs en el proceso de patogénesis de *Botrytis cinerea*, un hongo fitopatógeno causante de la enfermedad del moho gris en más de 200 especies de plantas. En dicho estudio, se generaron mutantes de *B. cinerea* que perdieron la capacidad de producir sRNAs tras haber mutado sus genes Argonauta (*ago1*) o DCL (*dcl1 dcl2*), todos importantes en la ruta de biogénesis y actividad de sRNAs. Como resultado, las mutantes de *B. cinerea* mostraron una patogenicidad reducida en *Arabidopsis* y jitomate, además de una baja virulencia en fresa, uva, lechuga y pétalos de rosa (Wang *et al*, 2016).

Por su parte, los sRNAs en plantas también son parte importante de la respuesta de defensa al ataque de patógenos. Para aumentar la defensa de las plantas, se han desarrollado

estrategias de reforzamiento de la síntesis de sRNAs dirigidos al silenciamiento de genes de patógenos específicos. En dicha aplicación, se generan plantas transgénicas que llevan construcciones de RNAi (sRNAs) dirigidos a genes relacionados con la virulencia de nematodos, hongos y plantas parásitas. Los siRNAs son inducidos y entran a las células patógenas para causar silenciamiento génico. Este fenómeno de silenciamiento es conocido como silenciamiento génico inducido por el huésped (host-induced gene silencing, HIGS), y se ha probado como un método de protección de cultivos contra varios patógenos (Wang *et al*, 2016).

Usando el mismo principio de RNAi pero usando sRNAs sintéticos exógenos, Mumbanza *et al.* (2013) logró reducir la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum Schlecht f. sp. cubense WC Snyder & HN Hans* y *Mycosphaerella fijiensis Morelet* al incubar una suspensión de esporas con sRNAs contra los genes adenilato ciclasa y DNA polimerasa subunidad alfa y subunidad beta.

Adicionalmente, y con base en el fundamento de HIGS, se ha propuesto el silenciamiento génico inducido por aspersión (spray-induced gene silencing, SIGS) como una estrategia innovadora para la protección de cultivos que, a diferencia de HIGS, no implica la transformación genética de plantas, y que consiste en la aplicación exógena de sRNAs complementarios a genes involucrados en procesos clave del ciclo de vida de los hongos (síntesis de componentes de pared celular, o genes involucrados en la síntesis de sRNAs en contra de la respuesta inmune del huésped). Los sRNAs se aplican sobre la planta/frutos para evitar el crecimiento y daño por hongos (Song *et al*, 2018). Con esto, además de que se evita la generación de organismos genéticamente modificados, se evita también el uso de agroquímicos.

La estrategia SIGS ha sido usada por diversos autores. Wang *et al.* (2016), uno de los primeros autores, usó RNAs de doble cadena largos (ldsRNA) y cortos (sdsRNA) contra los 2 genes DCL del hongo patógeno *Botrytis cinerea* y lo aplicó por aspersión en frutos, vegetales y pétalos de rosa (Figura 2), obteniendo los mismo resultados de reducción de virulencia vistos con la doble mutante *dcl1 dcl2* para el mismo hongo.

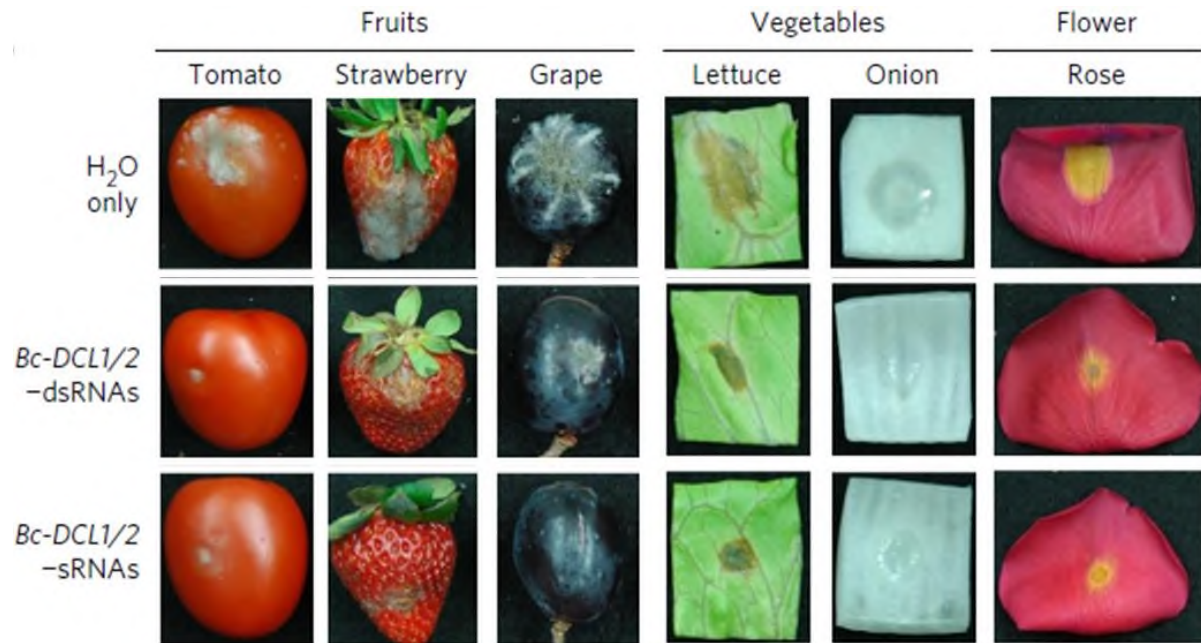


Figura 2. La aplicación externa de Bc-DCL1/2-dsRNAs y -sRNAs (20 μ L de 20 ng/ μ L) inhibe la virulencia de *B. cinerea* en jitomate, fresa, uva, lechuga, cebolla y pétalos de rosa, comparado con el tratamiento control usando agua (Wang *et al.*, 2016).

Koch *et al.* (2016) basó sus estudios en *Fusarium graminearum*, un patógeno importante en cereales. Se generó una construcción de 791 nt con fragmentos de los tres genes fúngicos citocromo P450 lanosterol C-14- α -demetilasa CYP51 (A, B y C) requeridos para la biosíntesis de ergosterol, y el dsRNA generado de la construcción se asperjó en hojas de cebada, inhibiendo el crecimiento del hongo.

McLoughlin *et al.* (2018) en sus investigaciones sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, sugiere que suprimir transcritos involucrados en la modificación de la pared celular y proteínas fúngicas de respuesta a especies reactivas de oxígeno (ROS) impiden el establecimiento del hongo en la superficie de hojas de *Brassica napus* y *Arabidopsis thaliana*.

Song *et al.* (2018) trabajó en *Fusarium asiaticum*, otro patógeno de importancia agronómica, usando como gen objetivo *Myo5* (miosin5, miosina de clase I, es un motor molecular que se une a actina e hidroliza ATP para producir fuerza física), en donde se generaron 8 fragmentos que corresponden a las diferentes regiones de *Myo5*, y en el que el dsRNA generado a partir del fragmento 8 demostró un silenciamiento eficiente del gen en ensayos HIGS y SIGS, lo que resultó en defectos en la pared celular, interrupción del ciclo de vida y reducción de la virulencia del hongo. Además, en el mismo estudio, se realizaron ensayos *in vitro* del efecto del mismo dsRNA del fragmento 8 en los hongos *Fusarium graminearum*, *Fusarium tricinctum* y *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, todos estrechamente relacionados con *F. asiaticum*, encontrándose una clara inhibición del crecimiento fúngico, así como micelio anormal.

Nerva *et al.* (2020), se dirigió contra los genes CYP51, quitina sintasa 1, y factor de elongación 2 de *Botrytis cinerea in vitro*. Además, probó 3 métodos de suministro de dsRNA en vid, por adsorción en peciolo, asperjando dsRNA en hojas y asperjando en racimos de uva post-cosecha, siendo todos efectivos en la reducción de la enfermedad.

Islam *et al.* (2020) probó un enfoque *in vitro* de RNAi, generando encapsulados de mini-células de *E. coli* que contenían en su interior dsRNA (ME-dsRNA) contra los genes de quitina sintasa (*Chs3a* y *Chs3b*) y DCL (*DCL1* y *DCL2*) de *Botrytis fuckeliana*. Sus resultados mostraron una inhibición significativa del crecimiento del hongo *in vitro*; adicionalmente los mini-cells protegieron a los dsRNA de la degradación por RNasas.

Otro estudio realizado por Werner *et al.* (2020) en el hongo *Fusarium graminearum*, empleó como objetivo los genes para las proteínas Argonauta (*FgAGO*) y DICER-LIKE (*FgDCL*) para proteger hojas de cebada. En dicho estudio, se encontró que los genes *FgDCLs* fueron más suprimidos a comparación de los genes *FgAGOs*; ambas proteínas en *F. graminearum* contribuyen al crecimiento vegetativo fúngico y generativo, producción de micotoxinas, respuesta antiviral, sensibilidad al RNAi ambiental y desarrollo de enfermedades en plantas.

Otro género de hongo en el que también ha sido probado SIGS es *Penicillium italicum*, en donde se aplicaron dsRNA en naranja (*Citrus sinensis*) para silenciar los genes de DCL del hongo (*Pit-DCL2*), logrando reducir la virulencia del hongo (Yin *et al.*, 2020).

Hu *et al.* (2020) probó SIGS en el hongo biotrófico obligado *Phakopsora pachyrhizi*, causante de la roya asiática de la soja, asperjando dsRNA contra los genes acetil-coA aciltransferasa, una proteína 16s ribosomal 40s y una proteína H del sistema de escisión de glicina. Sus resultados demostraron una reducción del desarrollo de la roya en hojas sueltas de soja, así como disminución de la biomasa del hongo.

Qiao *et al.* (2021) trabajó en una variedad de hongos fitopatógenos, primero demostrando que los dsRNA dirigidos a genes involucrados en la ruta de tráfico de vesículas en *B. cinerea* (vacuolar protein sortin 51, dinactina y supresor de actina 1) reducen la enfermedad causada por el hongo en jitomate, pétalos de rosa y uvas. Después probaron dsRNA dirigidos a homólogos de los genes antes mencionados pero en *Sclerotinia sclerotiorum*, obteniendo también resultados similares de reducción de la enfermedad en hojas de lechuga y col. Nuevamente, dsRNA dirigidos a homólogos de los genes mencionados pero en *Aspergillus niger* fueron evaluados, junto con dsRNA dirigido al gen exo-poligalacturonasa b, causando crecimiento débil del hongo y tamaño de heridas más pequeñas en jitomate, manzana y uvas. En *Rhizoctonia solani* se probaron dsRNA dirigidos sólo a los genes dinactina y supresor de actina 1, obteniendo protección contra el hongo en hojas de arroz asperjadas. Los dsRNA dirigidos contra dinactina, supresor de actina 1 y DCL1/2 en *Verticillium dahliae* se probaron en raíces de *Arabidopsis thaliana* sumergidas en una mezcla de los dsRNAs, mostrando una reducción en los síntomas de la enfermedad. Todos los hongos antes mencionados demostraron ser capaces de absorber dsRNA en ensayos de inhibición de GFP con dsRNA-GFP.

Sundaresha *et al.* (2021) demostró reducción del crecimiento de *Phytophthora infestans* en ensayos *in vitro* usando dsRNA contra los genes sorbitol deshidrogenasa, factor de elongación translación 1- α , fosfolipasa-D like 3, proteína HAM34-like rica en serina-treonina ácida anclada en glicosilfosfatidilinositol y proteína de choque térmico 90 en combinaciones, además, obtuvo los mismos resultados con la estrategia SIGS en hojas sueltas de papa. Kalyandurg *et al.* (2021) en el mismo patosistema pero usando los genes de proteína de unión a nucleótido-guanina subunidad beta, proteína de membrana haustorial, cutinasa y endo-1,3(4)-beta-glucanasa demostraron tener efecto en la progresión de la enfermedad.

Haile *et al.* (2021) observó virulencia altamente afectada del patógeno *Plasmopara viticola* al asperjar dsRNA que contenía fragmentos fusionados de los genes DCL1 y 2 del patógeno en vid.

Mosa & Youssef (2021) lograron controlar la pudrición de corona y raíz causada por *Fusarium oxysporum f. sp. radialis-lycopersici* al dirigirse a sus genes CYP51, quitin sintasa 1 y factor de elongación 2, primero demostrando efectos de disminución de crecimiento del hongo *in vitro* al agregar dsRNA y después probando la estrategia SIGS, obteniendo resultados similares. Adicionalmente, demostraron que usando una formulación de nanosheets de hidróxido doble en capas se puede proteger el dsRNA de la degradación por RNAsas.

Yang *et al.* (2021) usando el patosistema *Fusarium graminearum*-trigo, demostró la efectividad de dsRNA dirigidos a los genes de quitin sintasa, glucano sintasa y proteína cinasa al disminuir la progresión de la enfermedad causada por el hongo. En su trabajo sugiere que diferentes construcciones de RNAi muestran substancialmente una variedad de impactos en la patogenicidad del hongo sobre la planta, además que la combinación de dsRNA tiene fuertes efectos en el desarrollo de la enfermedad.

Duanis-Assaf *et al.* (2021) demostró que un tratamiento dual de dsRNA contra 3 genes de la ruta de biosíntesis de ergosterol de *Botrytis cinerea* junto con fungicidas inhibidores de ergosterol reduce hasta 100 veces la cantidad de fungicida requerida para lograr la misma tasa de protección.

Ruiz-Jiménez *et al.* (2021) abordaron el patógeno biótrofo causante del mildiu polvoriendo, *Podosphaera xanthii*. Diseñaron dsRNA contra proteínas conservadas y no anotadas (CNAPs) que tienen funciones putativas como transporte de efluentes o respiración, y 3 de estas proteínas (CNAP1048, CNAP10905 y CNAP30520) demostraron generar fuertes efectos de disminución de enfermedad en hojas de melón. Adicionalmente se demostró que dsRNA contra CYP51 y TUB2 del hongo también tienen fuertes efectos de disminución del mildiu.

Sarkar & Roy-Barman (2021) trabajaron en uno de los patógenos más importantes del arroz, *Magnaporthe oryzae*, primero demostrando ligeros impactos fenotípicos *in vitro* usando dsRNA contra MoDES1, un gen de patogenicidad supresor de defensa del huésped proveniente de *M. oryzae*, que es importante para la detoxificación de ROS derivadas de plantas y que es

crucial en la patogénesis. Después fue aplicada la estrategia SIGS en hojas de arroz heridas, que resultó en resistencia significativa contra la enfermedad.

En la Figura 3 se observa que los efectores de RNAs derivados de patógenos se administran al huésped, donde suprimen las respuestas inmunitarias del mismo. La aplicación por aspersión de RNAs específicos de genes puede suprimir la virulencia a través de RNAi en múltiples patógenos ya sea en cultivos o post-cosecha. Estos RNAs pueden translocarse directamente al patógeno eucariota o indirectamente a través del hospedador. Estos ARN también pueden diseminarse sistémicamente entre las células o hacia otros tejidos de la planta, muy probablemente a través de plasmodesmo y estructuras del floema vascular (Wang *et al*, 2017).

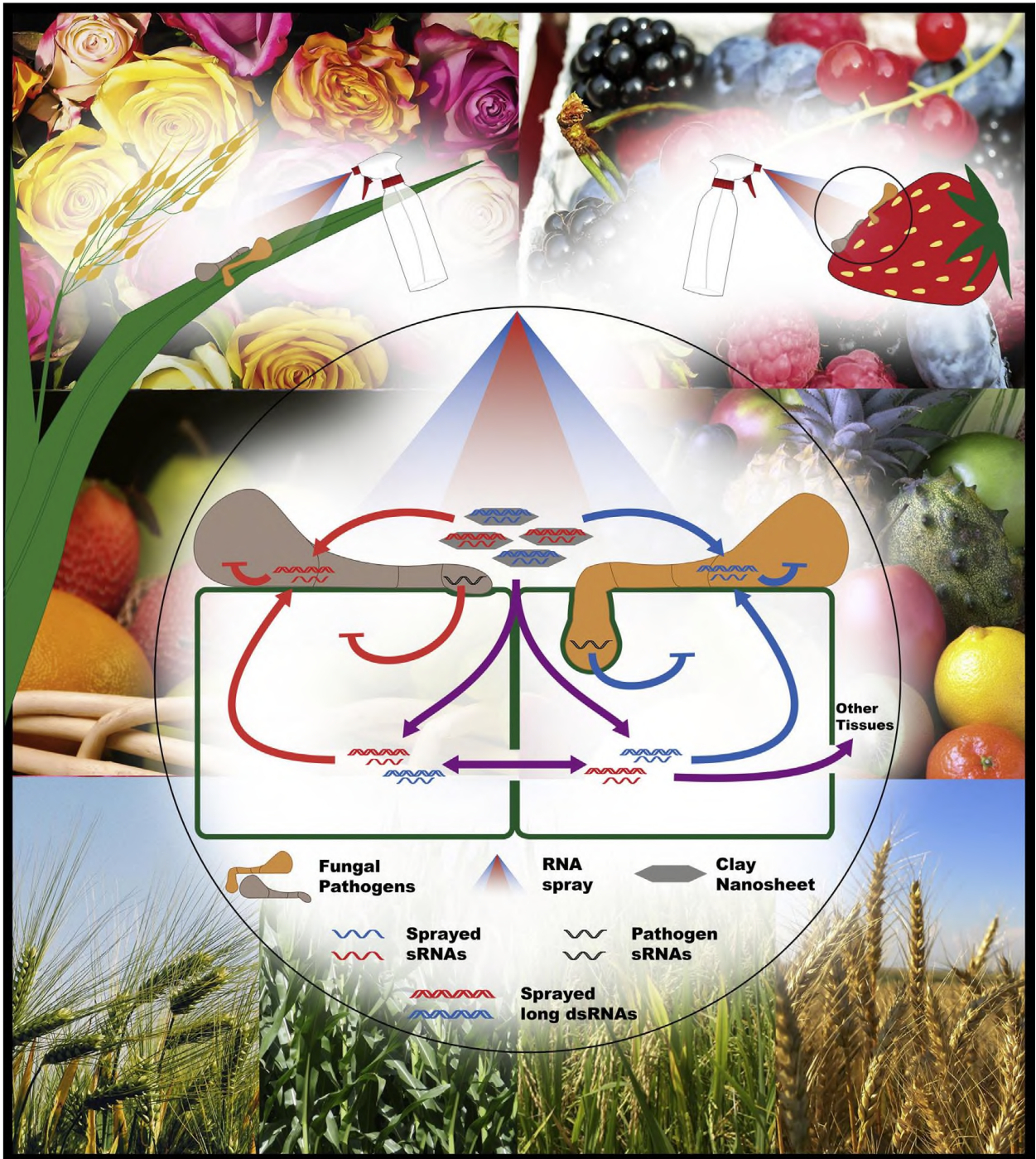


Figura 3. Movimiento de ARN entre los patógenos fúngicos de las plantas y sus huéspedes y el empleo del silenciamiento génico inducido por aspersión (SIGS) para contrarrestar la virulencia de los patógenos. El fondo representa la variedad de cultivos y productos post-cosecha en los que se pueden utilizar SIGS para prevenir pérdidas por enfermedades (Wang *et al*, 2017).

1.5 *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Anthracoctis cenchri* y *Aspergillus tubingensis* como fitopatógenos

En un trabajo previo realizado por Santiago-Tapia (2019), se aislaron 12 hongos fitopatógenos de frutos tropicales de la región de la Cuenca del Papaloapan. Para la identificación molecular de dichos hongos se amplificó y secuenció la región del espaciador intergénico transcrito (ITS), y con las secuencias obtenidas se realizaron alineamientos y se construyeron árboles filogenéticos que mostraron la identidad de cada hongo. Entre los hongos identificados, se abordó el diseño de biofungicidas de sRNAs para el patosistema *Citrus sinensis:Penicillium digitatum* para el diseño de los sRNAs. Además, en el trabajo mencionado, se proponen para su futuro estudio los patosistemas *Mangifera indica:Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Musa sp:Anthracoctis cenchri* y *Ananas comosus:Aspergillus tubingensis*. La importancia de dichos hongos como fitopatógenos se describe a continuación.

1.5.1 *Lasiodiplodia pseudotheobromae*

Lasiodiplodia es un género perteneciente a la familia Botryosphaeriaceae, que comprende numerosas especies con una distribución cosmopolita; dicha familia está asociada con varias plantas huésped, pudiendo actuar como patógeno primario o secundario. Una de las características típicas del género es el micelio aéreo de color blanco, el cual se vuelve gris verdoso/oscuero conforme el hongo va madurando (Marques *et al*, 2013). Sus conidios son de cilíndricos a elipsoidales con la base y el ápice de forma redondeada. Los conidios jóvenes son hialinos, volviéndose marrón oscuro con un septo en medio y estrías longitudinales a medida que maduran (Figura 4).

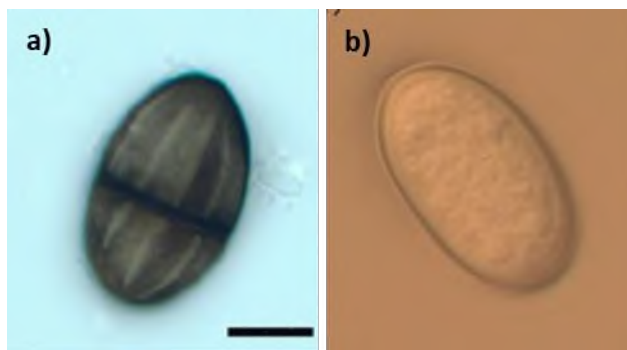


Figura 4. Esporas de *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. a) Conidio maduro. b) Conidio hialino inmaduro (Lian *et al*, 2019).

Las especies de *Lasiodiplodia* son patógenos importantes de plantas en países productores de mango. Infectan plantas durante fases tanto pre-cosecha como pos-cosecha. La pudrición de la fruta reduce la producción de mango y crea grandes pérdidas económicas en los países productores (Munirah *et al*, 2017).

Algunas de las especies del género *Lasiodiplodia* que se han reportado que atacan al mango son: *Lasiodiplodia crassispora*, *Lasiodiplodia egyptiaca*, *Lasiodiplodia hormozganensis*, *Lasiodiplodia iraniensis*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia sp.*; así mismo, *L. pseudotheobromae* se reporta como una especie menos virulenta (Marques *et al*, 2013). Las enfermedades ocasionadas por estos patógenos incluyen muerte descendente, cáncer, gomosis, tizón de la hoja, pudrición de raíz en plantas maderables y cultivos.

Previamente, en el grupo de trabajo se reportó la presencia de *L. pseudotheobromae* en mango (Santiago Tapia, 2019) (Figura 5). Esta especie causa pudrición del pedúnculo y muerte descendente, lo que afecta en la producción y vida de anaquel de los frutos, (Picos *et al*, 2015).



Figura 5. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* aislado de mango. El círculo negro indica el lugar de donde fue aislado (Santiago Tapia, 2019).

1.5.2 *Anthracoystis cenchri*

Este hongo fue clasificado inicialmente dentro del género de *Ustilago* (*Ustilago cenchri*), sin embargo, este género, junto con *Sporisorium* y *Macalpinomyces*, formaban un complejo difícil de resolver, por lo que varias especies se tuvieron que reclasificar (McTaggart *et al*, 2012). Se propusieron nuevos géneros para subdividir algunos hongos que diferían sutilmente de los géneros *Ustilago*, *Sporisorium* y *Macalpinomyces*, los cuales fueron *Endosporisorium*,

Lundquisti, *Anthracoystis*, *Yenia*, y *Tubisorus*; a pesar de ello, la descripción de los nuevos géneros o la ubicación del taxón de un género pobremente definido ha contribuido a una confusión sistémica dentro del complejo (McTaggart *et al*, 2012).

Anthracoystis cenchri fue descrito también en el género *Sporisorium* (*Sporisorium cenchri*), pero no cumplía con las características que describían originalmente a este género, tales como la presencia de columelas y células estériles. *A. cenchri* también fue clasificado en el género *Sorosporium* (*Sorosporium cenchri*), sin embargo, *Anthracoystis* se describió como un género distinto basado en la presencia de agallas de carbón, y una formación peculiar de su peridio que se desarrolla a través de envolturas florales (McTaggart *et al*, 2012).

Los *Ustilaginomicetos* (hongos del carbón) son el segundo grupo más importante de basidiomicetos parásitos de plantas. En huéspedes y órganos específicos, desarrollan unas masas oscuras polvorientas de teliosporas en soros. Las teliosporas son liberadas, dispersadas y germinan con basidios en ambientes húmedos. Después de una fase saprofitica más o menos prolongada, las hifas dicarióticas infectan plantas huésped susceptibles (Piepenbrin, 2002). Las esporas, que están compactadas en estructuras llamadas “sporeballs” (bolas de esporas), son de globosas a subglobosas (Figura 6).

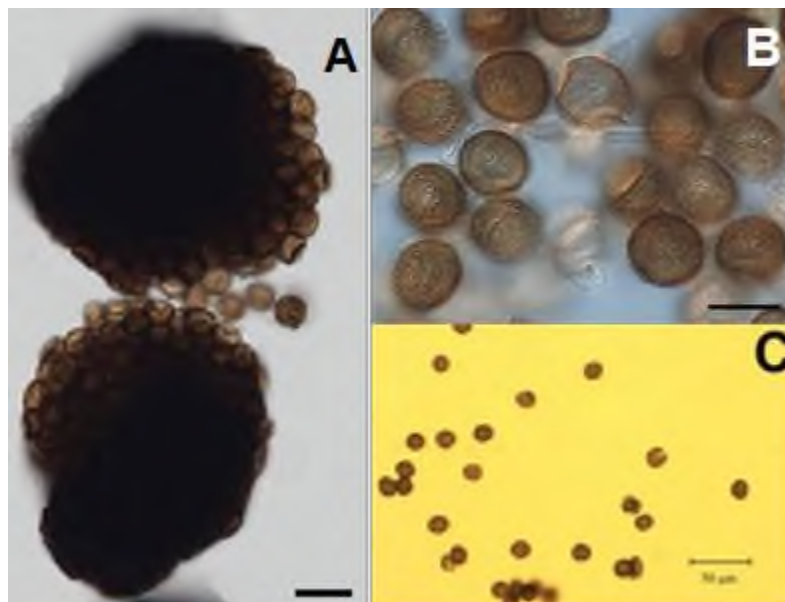


Figura 6. Microscopía de las sporeballs. A-B esporas de *Anthracoystis grodzinskae* (Piątek, Lutz, & Yorou, 2015). A Sporeball (barra 20µm). B Esporas exteriores (barra 10µm). C esporas de *Anthracoystis penniseti* (barra 50µm) (Kabaktepe, Akata, & Akgül, 2016).

Los miembros de *Anthracocestis* son especies predominantemente tropicales, con varias especies que se encuentran en regiones de temperatura cálidas y unas pocas especies introducidas junto con sus huéspedes en áreas templadas. Dos especies son patógenas para cultivos, *Anthracocestis destruens*, causante del carbón de penacho del mijo (*Panicum miliaceum*), y *Anthracocestis ehrenbergii*, causante del tizón largo del sorgo (*Sorghum spp.*) (Piątek, Lutz, & Yorou, 2015). No obstante, *Anthracocestis cenchrri* ha sido reportado como patógeno en plátano (Santiago Tapia, 2019) (Figura 7) a pesar de que se encuentra en un género que infecta cereales.



Figura 7. *Anthracocestis cenchrri* aislado de plátano. El círculo azul indica el lugar del que se aisló (Santiago Tapia, 2019).

1.5.3 *Aspergillus tubingensis*

Aunque el género *Aspergillus* no se considera una causa importante de enfermedades vegetales, las especies de *Aspergillus* son responsables de varios trastornos en plantas y sus productos. Las especies más comunes son *A. niger* y *Aspergillus flavus*, seguidas de *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus alliaceus*. Pueden contaminar productos agrícolas en diferentes etapas que van desde la pre-cosecha, cosecha, procesamiento y manejo. Los cambios debidos al deterioro por especies de *Aspergillus* pueden ser de naturaleza sensorial, nutricional y calidad, como: pigmentación, decoloración, podredumbre, desarrollo de sabores y olores extraños. No obstante, la consecuencia más notable de su presencia son las micotoxinas que contaminan alimentos. Ya que son oportunistas, la mayoría de ellos se encuentran como mohos de almacenamiento en productos vegetales (Perrone *et al*, 2007).

En particular, *Aspergillus tubingensis* presenta micelio blanco con esporulación oscura que se puede extender en toda la superficie de la colonia. Las esporas son pequeñas y de forma esférica las cuales son producidas por conidióforos (Figura 8).

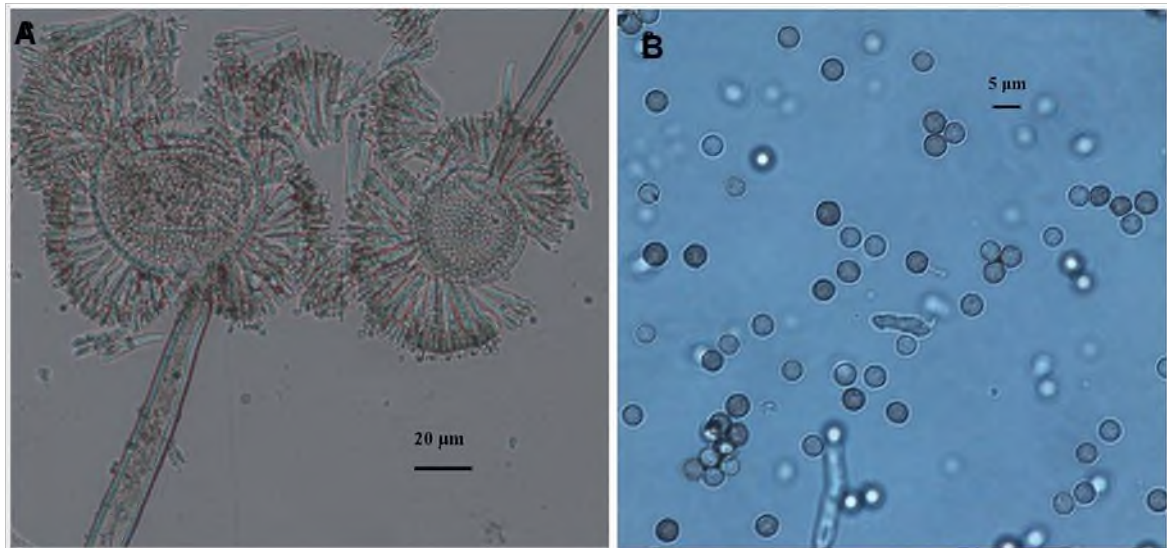


Figura 8. Estructuras de *Aspergillus tubingensis*. A Cabezas de los conidióforos. B Esporas (Zhao *et al*, 2018).

Aspergillus tubingensis ha sido reportado como patógeno en fresa produciendo una esporulación negra de hongo (Palmer *et al*, 2019) al igual que en jatrofa, produciendo manchas que aumentan de tamaño de color café oscuro que secan la hoja (Guo *et al*, 2017) y en piña (Santiago Tapia, 2019) (Figura 9). Además, no sólo está reportado como patógeno de plantas, sino también se ha estudiado como un potencial agente de biocontrol contra el moho gris producido por *Botrytis cinerea* en jitomate (Zhao *et al*, 2018).



Figura 9. *Aspergillus tubingensis* aislado de piña. El círculo blanco indica el lugar de donde se aisló (Santiago Tapia, 2019).

3. Justificación

La seguridad alimentaria se ve amenazada por la presencia de pestes y patógenos que causan daños en la cantidad y calidad de los alimentos producidos para satisfacer la demanda. Con el aumento de la población también crecerá la necesidad de producir mayor cantidad de alimentos, por lo cual los agricultores se ven en la necesidad de emplear estrategias para combatir a los patógenos.

Las estrategias tradicionales para el combate de enfermedades en plantas de cultivo producen un impacto negativo en el ambiente como la contaminación por residuos o la generación de organismos genéticamente modificados resistentes a enfermedades, por lo que se han tenido que proponer nuevas metodologías de protección vegetal. Una de dichas alternativas es la tecnología SIGS, basada en el fenómeno natural de intercambio de sRNAs entre huésped y patógeno durante la interacción. Al día de hoy, SIGS no ha sido aplicado en los patosistemas *Lasiodiplodia*-Mango, *Anthracozytis*-Plátano y *Aspergillus*-Piña, por lo que se requiere explorar la posibilidad de desarrollar biofungicidas basados en sRNAs que puedan aplicarse en dichos patógenos.

Para cumplir el propósito, es necesario investigar en bases de datos genómicas la accesibilidad de secuencias que permitan ubicar blancos moleculares para el silenciamiento, especialmente los genes DCL, y realizar bioensayos *in vitro* para probar la efectividad de los biofungicidas diseñados. Los resultados servirán como base para la implementación de nuevas estrategias de protección vegetal que permitan alargar la vida de anaquel de los productos, así como la disminución de pérdidas económicas e intoxicaciones por micotoxinas en los consumidores, causado por la presencia de hongos fitopatógenos en los frutos tropicales.

4. Hipótesis

La estrategia de silenciamiento génico basado en sRNAs dirigidos a genes DCL será efectiva en la disminución del crecimiento y desarrollo de los hongos fitopatógenos Lasiodiplodia pseudotheobromae, Anthracocystis cenchrí y Aspergillus tubingensis, en bioensayos.

5. Objetivos

5.1 General

Evaluar la efectividad de la estrategia de silenciamiento génico basado en sRNAs dirigidos a genes DCL sobre la disminución del crecimiento y desarrollo de los hongos fitopatógenos *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Anthracocestis cenchri* y *Aspergillus tubingensis*, en bioensayos.

5.2 Particulares

5.2.1 Identificar secuencias DCLs en los hongos de interés en bases de datos genómicas o *de novo* y confirmar las secuencias.

5.2.2 Diseñar RNAs pequeños para el silenciamiento de genes DCL en los hongos de interés.

5.2.3 Generar construcciones para la síntesis de los sRNAs *in vitro*.

5.2.4 Evaluar la efectividad de la estrategia de silenciamiento génico basado en sRNAs en la disminución del crecimiento y desarrollo de los hongos patógenos identificados mediante bioensayos.

6. Diagrama experimental

La secuencia experimental del presente trabajo se resume en la Figura 10.



Figura 10. Secuencia experimental.

7. Materiales y Métodos

7.1 Material biológico

Para el desarrollo de la presente tesis, se emplearon las cepas puras de los hongos fitopatógenos *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Anthracocestis cenchri*, y *Aspergillus tubingensis*, los cuales fueron aislados previamente de frutos tropicales por Santiago-Tapia (2019). Se recuperaron las cepas a partir de los cultivos almacenados a -80°C por medio de siembra con un asa bacteriológica en cajas Petri en medio agar PDA, y se incubaron a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 4 días, con el fin de obtener cultivos frescos. Además, se analizaron las características macro y microscópicas de los cultivos recuperados para confirmar que estuvieran libres de contaminación.

7.2 Extracción de DNA genómico

Con el propósito de obtener DNA para futuros procedimientos de biología molecular, se realizó la extracción de DNA genómico por el método de fenol-cloroformo empleado por Santiago Tapia (2019), que consistió en recolectar micelio de cada hongo y triturarlo en un mortero con nitrógeno líquido. Del polvo obtenido se colocó un volumen aproximado de 200 μL en un microtubo de 1.5 mL al cual se agregaron 600 μL solución de lisis (Anexo I). La mezcla se homogenizó en vórtex por 15 s y se incubó a 80°C por 10 min en un termobloque (Multi-Blok Heater ThermoFisher Scientific). Posteriormente se añadió a la mezcla 700 μL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se llevó a vórtex 15 s y después se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min (Heraeus Fresco 21 Centrifuge Thermo Scientific). Se rescató una parte del sobrenadante ($\sim 400\text{-}500$ μL) en un tubo nuevo y se agregó dos volúmenes de etanol absoluto y el 10% del volumen del sobrenadante de solución de acetato de sodio 3 M, se mezcló en vórtex por 15 s y se dejó en incubación a -20°C por 2 h. Pasado el tiempo, se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm por 20 min, se descartó el sobrenadante, se le agregó 1 mL de etanol al 80% como solución de lavado, se mezcló nuevamente en vórtex por 15 s y se centrifugó una vez más a 10,000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secando por 10 min a temperatura ambiente. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 40 μL de agua con DEPC, destilada, desionizada, estéril y tratada con luz UV. Para eliminar trazas de RNA, las muestras se trataron con 1 μL de RNasa (RNase Cocktail Invitrogen), seguido por incubación a 37°C por 30 min.

Finalmente se inactivó la enzima a 65°C por 10 min. Los tubos se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior. Se midió la concentración del gDNA en un equipo Nanodrop (ThermoFisher Scientific) y se cargó 1 µL de cada muestra en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE (Anexo 1) para verificar la integridad del mismo.

7.3 Identificación de genes DCL

7.3.1 Búsquedas de anotaciones de secuencias DCL en bases de datos

Se realizaron búsquedas de secuencias de genes DCL de los hongos así como de las plantas huésped, en las bases de datos curadas UniProt (UniProt Consortium, 2021) y funRNA (Choi *et al*, 2014). Para considerar que una secuencia fuera catalogada como DCL se buscaron características típicas de la proteína, como los dominios DEAD-LIKE HELICASE, HELICASE C-terminal, Dicer dsRNA-binding fold y Ribonuclease III (Figura 11).

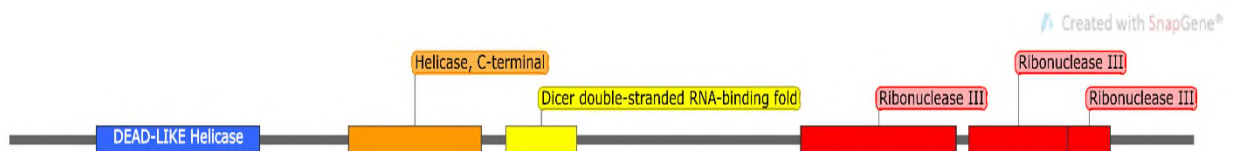


Figura 11. Estructura del gen DICER LIKE con los dominios típicos. Imagen generada en SnapGene.

Para los casos en donde se encontraron más de 10 reportes de secuencias en UniProt (Anexo 2), se discriminaron aquellas secuencias menores a 500 aminoácidos (aa) de longitud, debido a que son secuencias incompletas que no reúnen las características suficientes para ser consideradas. Las secuencias restantes se sometieron a subsecuentes alineamientos para agruparlas por similitud, además, cada subgrupo fue sometido a subsecuentes alineamientos con el fin de determinar si varias de las secuencias de un mismo grupo corresponden entre sí a isoformas o variantes. Lo anterior con el objetivo para disminuir aún más el número de secuencias que se usaron en el alineamiento con los DCLs del hongo.

7.3.2 Predicción de DCLs y dominios

Al no contar con secuencias DCL reportadas en base de datos para *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, se realizaron predicciones de secuencias DCLs usando como referencia 2 secuencias anotadas como DCL de una especie estrechamente cercana, *Lasiodiplodia theobromae* (Anexo 2), cada una de las cuales se introdujo al BLASTn del NCBI con la base de datos Whole-genome shotgun contigs (wgs) para *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (taxid: 466954). La secuencia nucleotídica encontrada para DCL1 se introdujo en FGENESH, usando como referencia al organismo *Diplodia seriata*, ya que es el más cercano encontrado en la base de la herramienta, y el marco abierto de lectura obtenido se introdujo en la herramienta Pfam HMMER (Mistry *et al*, 2021), para ubicar los dominios característicos de DCL, esto con el objetivo de ubicar las zonas de diseño de los dsRNAi. A partir de ahí se siguió el mismo procedimiento para la secuencia nucleotídica encontrada para el DCL2.

7.3.3 Identificación de genes DCL *de novo*

En el caso de *Anthracoctis cenchri*, al no haber ninguna secuencia genómica reportada en bases ni que haya calificado como probable DCL por predicción (de acuerdo a la sección 7.3.2), se procedió al diseño de 4 pares de oligonucleótidos degenerados (2 orientación directo y 2 orientación reverso) a partir de regiones de alta conservación en DCLs de diversos hongos del mismo género y familia. Para esto se realizaron alineamientos con secuencias DCL reportadas en UniProt de las especies cercanas *Anthracoctis flocculosa* PF-1, *Sporisorium graminicola*, *Sporisorium reilianum* f. sp. *Reilianum*, *Sporisorium scitamineum*, *Ustilago bromivora*, *Ustilago trichophora* y *Ustilago hordei* (Anexo 2). Una vez encontradas las zonas conservadas, se ubicaron tales regiones en las secuencias nucleotídicas correspondientes de cada DCL y se alinearon para comprobar cómo es la conservación en nucleótidos, debido a los cambios que puede haber por la degeneración del código genético. Para el diseño de los oligonucleótidos degenerados se cambió por N aquellas posiciones donde las bases difieren (ya que la N representa el cambio por cualquiera de las 4 bases nitrogenadas posibles). El segundo diseño de oligonucleótidos degenerados se cuidó que los extremos 3' de cada primer tuvieran por lo menos 5 nt conservados y no más de 5 bases degeneradas por diseño.

7.4 Diseño de RNA de doble cadena de interferencia (dsRNAi)

7.4.1 Alineamientos

El diseño de los dsRNAi se llevó a cabo localizando las regiones con la menor similitud posible entre las secuencias de DCL de los hongos contra las de las plantas, usando la herramienta de alineación de secuencias múltiple BioEdit (Hall, 1999).

Para *Aspergillus tubingensis*, se alinearon sus secuencias peptídicas de DCLs vs los 5 DCLs de la piña usando la herramienta de alineamiento propia de UniProt. Después se procedió a hacer los alineamientos de las regiones de baja similitud con las secuencias nucleotídicas correspondientes con el fin de confirmar que se siguiera manteniendo una baja similitud a nivel de nucleótidos. En el caso de *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, la zona elegida para el diseño de los dsRNAi fue poco antes del dominio Helicase, C-terminal, ya que es una zona ampliamente variable.

Con la información de los alineamientos se diseñaron primers para amplificar fragmentos libres de intrones de las regiones de menor conservación obtenidas, con el objetivo de fusionar los fragmentos en un amplicón de aproximadamente 500 pb.

7.4.2 Confirmación experimental

Para confirmar la presencia de los genes DCL, se realizó una PCR (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ThermoFisher Scientific) primero usando como molde gDNA de cada hongo. Para *Aspergillus tubingensis*, los parámetros usados para la amplificación de los fragmentos de 250 pb de cada secuencia DCL están descritos en la *Tabla 3*.

Para los casos en los que se requirió determinar experimentalmente la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, como fue el de la amplificación de DCL2.2, se empleó la DNA polimerasa DreamTaq Green (ThermoFisher Scientific) para realizar un gradiente con los primers para descartar la posibilidad de tener una temperatura de alineación equivocada. Para ésto se siguieron los parámetros descritos en la *Tabla 4*.

Tabla 3. Parámetros de la PCR para DCLs de *Aspergillus tubingensis*.

Reactivo		Volumen	
H ₂ O		13.3 µL	
Buffer 5X		4 µL	
DNTPs 10mM		0.5 µL	
Primer Forward 10mM		0.5 µL	
Primer Reverse 10mM		0.5 µL	
DNA POL Phusion		0.2 µL	
gDNA		1 µL	
Volumen final		20 µL	
Etapa	Temperatura	Tiempo	
Pre-desnaturalización	98°C	5 min	
Desnaturalización inicial	98°C	20 s	30 ciclos
Alineamiento	57°C	20 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	5 min	

Tabla 4. Parámetros de PCR para DCL2 de *Aspergillus tubingensis*.

Reactivo		Volumen	
H ₂ O		8 µL	
DreamTaqGreen		10 µL	
Primer Forward 10mM		0.5 µL	
Primer Reverse 10mM		0.5 µL	
gDNA		1 µL	
Volumen final		20 µL	
Etapa	Temperatura		Tiempo
Pre-desnaturalización	95°C		5 min
Desnaturalización inicial	95°C		30 s
Alineamiento	53.1°C/54.4°C/55.3°C/57.7°C/58.2°C/60°C		30 s
Extensión	72°C		30 s
Extensión final	72°C		5 min

Se procedió con un nuevo diseño de oligonucleótidos para la amplificación del DCL2.2 moviendo 88 pb hacia el sentido 3' del primer Aspt_2c 1F. Se realizó una PCR de gradiente con los mismo parámetros mostrados en la *Tabla 4* pero con otra rampa de temperaturas (52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C y 62°C).

Para *Anthracoystis cenchri*, se realizó una PCR de gradiente con el primer par de primers degenerados empleando DNA genómico del hongo de interés como molde usando los parámetros de la *Tabla 5*.

Tabla 5. Parámetros de la PCR de gradiente con el primer par de primers degenerados para *Anthracoystis cenchri*.

Reactivo	Volumen	
H ₂ O	8 µL	
DreamTaqGreen	10 µL	
Primer Forward 10 mM	0.5 µL	
Primer Reverse 10 mM	0.5 µL	
gDNA	1 µL	
Volumen final	20 µL	

Etapas	Temperatura	Tiempo
Pre-desnaturalización	95°C	5 min
Desnaturalización inicial	95°C	30 s
Alineamiento	53.1°C/54.4°C/55.3°C/57.7°C/58.2°C/60°C	30 s
Extensión	72°C	1.5 min
Extensión final	72°C	5 min

Se realizó una PCR de gradiente para el segundo diseño y se incluyó también el primer diseño y combinaciones entre ambos primers (1F1R, 2F2R, 1F2R, 2F1R). Los parámetros se presentan en la *Tabla 6*. Para el caso de *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, la PCR se siguió con los parámetros usados se muestran en la *Tabla 7*.

Tabla 6. Parámetros de la PCR con los primers degenerados para *Anthracoystis cenchri*.

Reactivo		Volumen	
H ₂ O		13.3 μL	
Buffer 5X		4 μL	
DNTPs 10mM		0.5 μL	
Primer Forward 10mM		0.5 μL	
Primer Reverse 10mM		0.5 μL	
DNA POL Phusion		0.2 μL	
gDNA		1 μL	
Volumen final		20 μL	
Etapa	Temperatura	Tiempo	
Pre-desnaturalización	98°C	5 min	
Desnaturalización inicial	98°C	20 s	30 ciclos
Alineamiento	55°C/60°C/65°C	1.5 min	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	5 min	

Tabla 7. Parámetros de la PCR para amplificar DCLs en *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.

Reactivo		Volumen	
H ₂ O		8 μL	
MaxProbe		10 μL	
Primer Forward 10mM		0.5 μL	
Primer Reverse 10mM		0.5 μL	
gDNA		1 μL	
Volumen final		20 μL	
Etapa	Temperatura	Tiempo	
Pre-desnaturalización	95°C	10 min	
Desnaturalización inicial	95°C	15 s	30 ciclos
Alineamiento	60°C	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	5 min	

Para confirmar la presencia de los DCLs como transcritos, se procedió a la extracción de RNA total por el método de TRIzol (Anexo 1), se cuantificó en Nanodrop y se realizó una verificación en gel de Agarosa al 1% con MOPS (Anexo 1) para confirmar la calidad del RNA. Al RNA obtenido se le dio un tratamiento con DNAsa I incubado a 37°C por 1 h (DNAsa I ThermoFisher Scientific) para eliminar las trazas de DNA residual que pudieran interferir en las reacciones subsecuentes. El RNA tratado se usó de molde en una reacción de síntesis de cDNA empleando la transcriptasa reversa Maxima First Strand cDNA (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA sintetizado se diluyó 1:5 y fue usado como molde en una reacción de PCR con los oligonucleótidos específicos para confirmar que el mRNA derivado del gen DCL, al cual se dirigen los RNAs de interferencia de doble cadena (dsRNAi) se encontraba presente. Además, se usó 1 µL de una dilución del RNA como control negativo para el cDNA, gDNA como control positivo, y agua como control negativo de la reacción.

7.5 Síntesis de RNA de doble cadena de interferencia (dsRNAi)

7.5.1 Construcción del templado

Para generar las construcciones que servirían como templado para la síntesis del dsRNAi, se siguió la metodología usada por Santiago-Tapia (2019) con algunas modificaciones. El esquema general se presenta en la Figura 12. A partir de las regiones que se amplificaron, aproximadamente 250 pb para *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (DCL1 y DCL2) y *Aspergillus tubingensis* (DCL1 y DC2.1), se realizó una purificación usando beads magnéticas (AMPure XP) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la fusión de los fragmentos primero se agregaron extremos complementarios de cada secuencia mediante PCR por medio de primers diseñados con las secuencias complementarias en el sentido inverso. Una vez amplificados los fragmentos con extremos complementarios se purificaron y cuantificaron. Después, se mezclaron ambos productos en un mismo tubo en concentraciones equimolares, de forma que hubiera por lo menos 200 ng de DNA de cada producto de DCL en el volumen final. Se llevó a cabo el programa de PCR indicado en la Tabla 8.

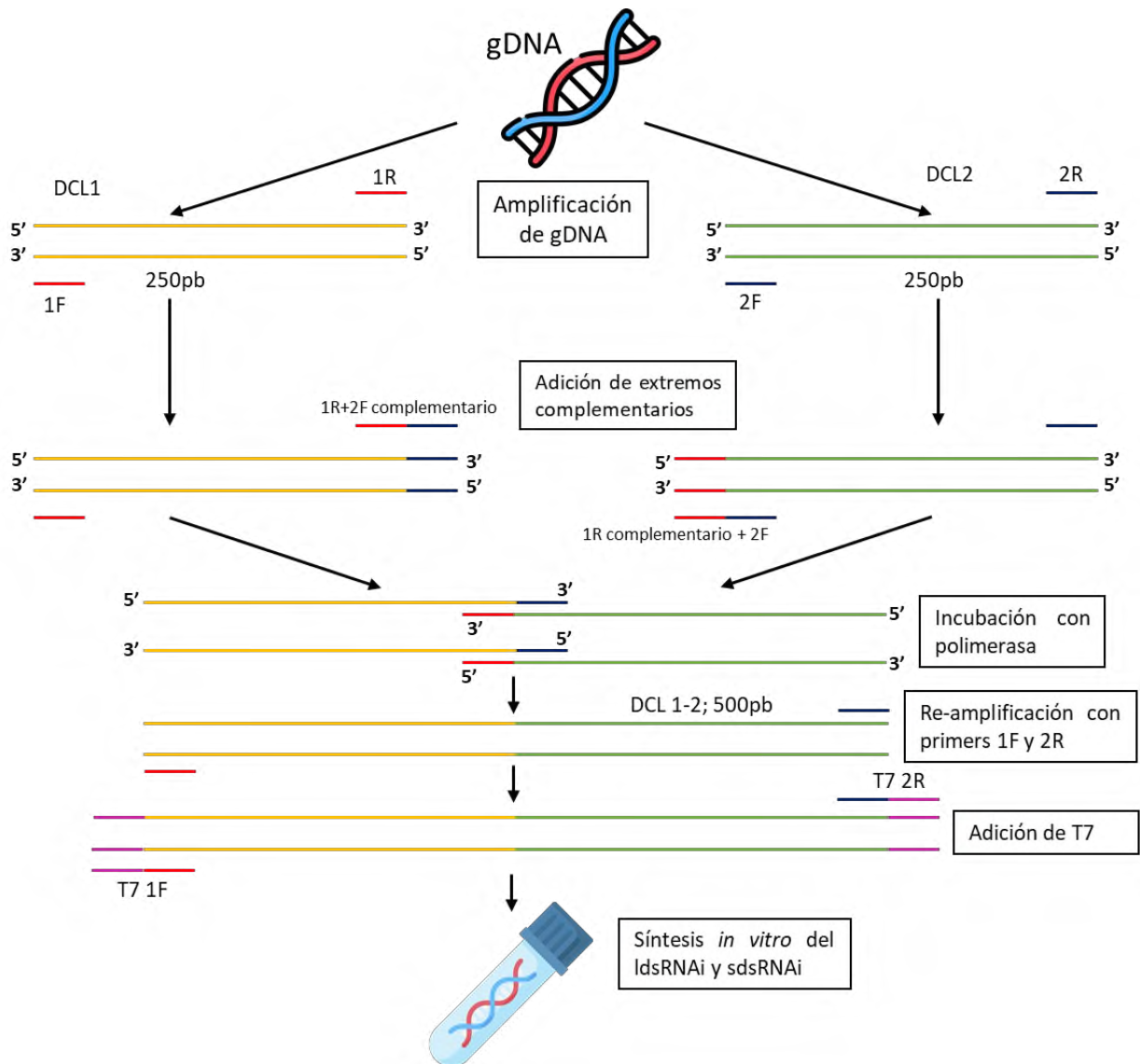


Figura 12. Esquema general de fusión de fragmentos de DCL.

Una vez obtenida la construcción, por medio de PCR se les adicionó a los productos obtenidos la secuencia del promotor T7 en sus extremos usando un nuevo diseño de primers con la secuencia de dicho promotor. Los amplicones con las secuencias adicionadas del promotor se purificaron usando beads magnéticas y posteriormente fueron ligados en el vector de clonación pGEM-T Easy, con el cual se transformaron células competentes de *Escherichia coli* (One Shot Top 10) siguiendo el protocolo del fabricante.

Tabla 8. Programa para fusión de fragmentos de DCL.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	5 min	1
2	94°C (-2°C cada ciclo)	1 min	35
3	24°C	25 min	1
PAUSA			
Tomar 10 µL de la reacción y agregar a 10 µL de mezcla de polimerasa con buffer y dNTPs (para un Vf=20 µL).			
4	68°C	5min	1
PAUSA			
Tomar 9 µL de la reacción y agregar a 11 µL de mezcla de reacción de PCR con los primers 1F Y 2R.			
5	95°C	10 min	1
6	95°C	"	30
7	57°C/60°C	30 s	
8	72°C	30 s	
9	72°C	5 min	1
10	4°C	∞	-

Se seleccionaron colonias blancas transformantes que después se cultivaron en medio líquido LB (Anexo 1) con antibiótico de selección durante 14 h a 37°C. Seguidamente se realizó extracción de plásmido mediante el método de lisis alcalina (Anexo 1) para la confirmación del inserto por medio de PCR de colonia (tomando parte de una colonia con una punta estéril y mezclando en un microtubo con mezcla de reacción para PCR) usando el primer T7, y adicionalmente por digestión usando la enzima de restricción NotI (New England Biolabs), los parámetros se muestran en Tabla 9.

Finalmente, los plásmidos aislados con el producto resultante de DCL múltiple se enviaron a secuenciar para confirmar que contenían la construcción correcta del templado para la síntesis de los dsRNAi. El análisis de las secuencias recuperadas se realizó mediante alineamientos con las secuencias encontradas *in silico*.

Tabla 9. Parámetros para el análisis del plásmido.

PCR			
H ₂ O		8 µL	
DreamTaqGreen		10 µL	
Primer T7 For		1 µL	
Plásmido diluido a 250ng/µL		1 µL	
Volumen final		20 µL	
Etapa	Temperatura	Tiempo	
Pre-desnaturalización	95°C	5 min	
Desnaturalización inicial	95°C	30 s	30 ciclos
Alineamiento	55°C	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	5 min	
Digestión			
H ₂ O		7.5 µL	
Buffer		1 µL	
NotI		0.5 µL	
Plásmido sin diluir		1 µL	
Volumen final		10 µL	
Incubar a 37°C por 1 h			

7.5.2 Reducción de efectos off-target

Una vez secuenciadas las construcciones con los fragmentos de DCLs de los hongos, se realizó un análisis usando la herramienta BLASTn del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para conocer las posibilidades de dirigirse a un blanco de silenciamiento no deseado (off-target). Se introdujo la secuencia completa de cada construcción ajustando a los parámetros mostrados en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros de búsqueda de blancos no deseados.

Base de datos	Refseq_rna (Transcript Reference Seq)
Organismo	<i>A. tubingensis</i> (incluido y excluido) <i>Ananas comosus</i> <i>Homo sapiens</i> <i>L. pseudotheobromae</i> (incluido y excluido) <i>Mangifera</i>
Optimizado para	Highly similar sequences (Megablast)
Umbral esperado	10
Tamaño de palabra	20 (16 para los casos de no coincidencia)
Puntaje para match/mismatch	1, -2
Gap costs	Existencia 5, Extensión 2

7.5.3 Síntesis de dsRNAi

La síntesis del dsRNAi largo (ldsRNAi) procedió con el uso del kit MEGAScript RNAi (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNAi resultante se trató posteriormente con una mezcla enzimática de DNasa y RNasa para remover DNA residual y RNA de cadena sencilla. Una fracción del ldsRNAi que resultó de esta reacción fue posteriormente empleada en una reacción catalizada por la enzima ShortCut RNaseIII (New England Biolabs), para la generación de fragmentos cortos (21-24 nt) de RNA de doble cadena (sdsRNAi). Las reacciones de síntesis y generación de fragmentos cortos se prepararon de acuerdo a la Tabla 11.

Tabla 11. Preparación de reacciones de síntesis de dsRNAi largos y cortos

Síntesis de dsRNAs	
Componente	Volumen
H ₂ O	4.5 µL
ATP	2 µL
CTP	2 µL
GTP	2 µL
TTP	2 µL
Buffer de reacción	2 µL
Molde (DNA)	3.5 µL
Mezcla enzimática	2 µL
Incubar a 37°C por 4 h	
Digestión con DNasa y RNasa	
dsRNAs	20 µL
H ₂ O	21 µL
Buffer de digestión 10X	5 µL
DNasa I	2 µL
RNasa	2 µL
Incubar a 37°C por 1h	
Digestión con RNasa III	
H ₂ O	c.b.p. 100 µL
Buffer de digestión 10X	10 µL
dsRNAs	hasta 10 µg
ShortCut RNasa III	10 µL
MnCl ₂ 10X	10 µL
Incubar a 37°C por 1 h	
Detener la reacción con 10 µL de EDTA 10X	

Ambos RNAi (ldsRNAi y sdsRNAi) se corrieron en un gel de agarosa al 1% para verificar su integreidad, además se cuantificaron en el Nanodrop (ThermoFisher Scientific) para conocer su concentración para su uso en los bioensayos de actividad biofungicida.

7.6 Bioensayos de la actividad de los biofungicidas de dsRNAi

La actividad de los biofungicidas de dsRNAi sobre el desarrollo de los hongos fitopatógenos se evaluó mediante bioensayos de inhibición de la germinación de esporas fúngicas para *A. tubingensis*, de acuerdo al protocolo de Mumbanza, *et al.* (2013), mientras que para *L. pseudotheobromae* en bioensayos de crecimiento de micelio en medio líquido de acuerdo al protocolo de Islam, *et al.* (2021) y de crecimiento en fruto (mango).

Para el primer bioensayo, se recuperaron esporas fúngicas de *A. tubingensis* de un cultivo de 9 días, las cuales que fueron puestas en suspensión en agua destilada estéril para facilitar su cuantificación en una cámara de Neubauer. Las suspensión se ajustó a una concentración de 5×10^5 esporas/mL. Para los tratamientos, se colocaron en tubos triplicados 10 μ L de la suspensión de esporas y se agregó 15 μ L de dsRNAi (IdsRNAi o sdsRNAi) para lograr dosis de 1, 0.5, 0.25 y 0 μ g en el volumen final. Los tubos se incubaron por 24 h a 28°C. Al término se agregaron 1.5 mL de agua destilada estéril y posteriormente fueron plaqueadas alícuotas de 100 μ L en cajas de Petri con medio PDA. Las placas se incubaron a 28°C por 24 h para verificar la inhibición de la germinación y cuantificar el número de colonias desarrolladas en porcentaje relativo al tratamiento control.

Para el caso de *L. pseudotheobromae*, ante la falta de producción de esporas, se realizó un bioensayo de crecimiento en medio PDB usando micelio como lo reportado por (Islam *et al*, 2020). Para los tratamientos, se colocaron inóculos de 4 mm de diámetro de un cultivo de dos días de *L. pseudotheobromae* en pocillos triplicados que contenían 200 μ L de PDB con dosis de dsRNAi (IdsRNAi o sdsRNAi) de 1, 0.5, 0.25 y 0 μ g en el volumen final. Las placas se incubaron a 28°C por 24 h para verificar la inhibición del crecimiento del micelio y cuantificar el área cubierta por el hongo en el pocillo en porcentaje relativo al tratamiento control.

Por último, se realizó un bioensayo en el patosistema Mango-*L. pseudotheobromae*. El bioensayo consistió en hacer una herida por punción en el mango (por triplicado) y depositar sobre ella una gota de 15 μ l con 500 o 0 μ g de IdsRNAi y dejarla reposar 24 h, al término del tiempo se inoculó una porción de micelio de un cultivo de dos días de *L. pseudotheobromae* usando un asa en punta. Los mangos se incubaron a 28°C y se tomó evidencia del desarrollo de la enfermedad a los 2, 3, 4 y 5 días post inoculación (dpi). Usando el software ImageJ (Schneider,

Rasband, & Eliceiri, 2012), se cuantificó el porcentaje de daño sobre la superficie total para cada mango y se comparó con el tratamiento control.

7.7 Análisis estadístico

Para todos los experimentos, se realizó un ANOVA de una sola vía para determinar las diferencias entre las medias de los tratamientos y si existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$) se aplicó la prueba HSD de Tukey como método de comparación de diferencia de medias. El análisis estadístico se llevó a cabo en el software RStudio (RStudioTeam, 2022).

8. Resultados y discusión

8.1 Confirmación de la identidad de los hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos que se emplearon en el presente trabajo fueron recuperados a partir de cultivos almacenados en un ultracongelador y se analizaron para confirmar su identidad. Después de realizar el análisis de sus características macro y microscópicas, se observó que correspondían a las especies identificadas por Santiago-Tapia (2019). La cepa reportada como H1NR1 fue identificada como *Aspergillus tubingensis* (Aspt), con un crecimiento radial típico del género *Aspergillus* (Figura 13A). Se observaron también las estructuras reproductivas comunes del género, como lo son las agrupaciones de esporángios cargados de esporas (Figura 13B-C), éstas últimas de forma esférica agrupadas en racimos (Figura 13D).

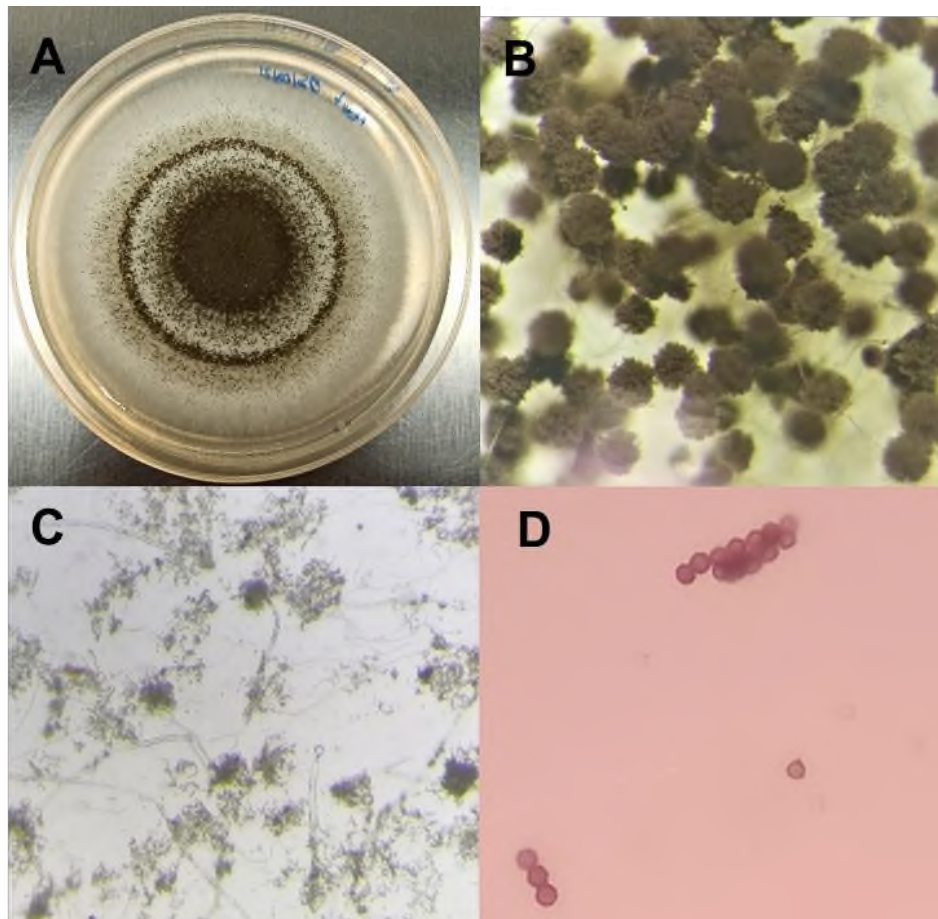


Figura 13. Características morfológicas de la cepa de *Aspergillus tubingensis* recuperada. A, Morfología colonial de *A. tubingensis*. B, Detalle de los conidióforos con esporas vistos en estereoscopio con objetivo 10X. C, Detalle de esporangios vistos con microscopio óptico con objetivo 10X. D, Detalle de esporas visto con microscopio óptico con objetivo 40X.

La cepa reportada como H1BR1 fue identificada como *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Lpse). Su morfología colonial se observó de abundante micelio aéreo blanco que se torna de color oscuro (Figura 14A). Presenta hifas alargadas y poco septadas (Figura 14B-C).

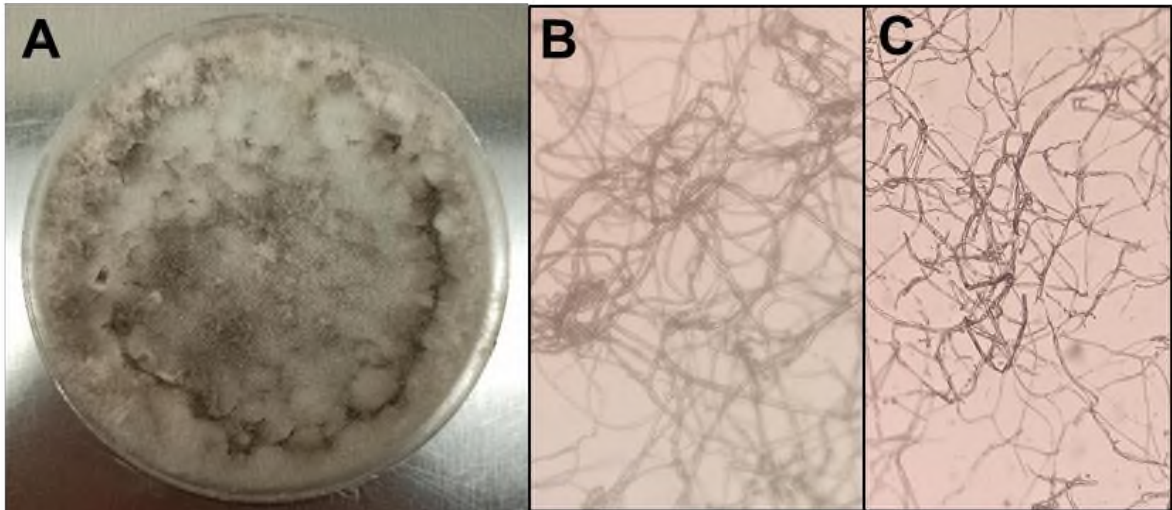


Figura 14. Morfología de *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. A Morfología colonial, micelio aéreo oscuro. B-C Detalle de hifas poco septadas a 20X.

La cepa reportada como H1BVR1 fue identificada como *Anthracocestis cenchri* (Acen). La morfología colonial que presentó fue de crecimiento como una pasta suave y consistente de color rosa claro sobre el medio (Figura 15A). Al microscopio se pudo observar la espora típica del género conocida como sporeball, siendo una agrupación de esporas pequeñas cubierta en su superficie con estructuras tipo espina (Figura 15B).

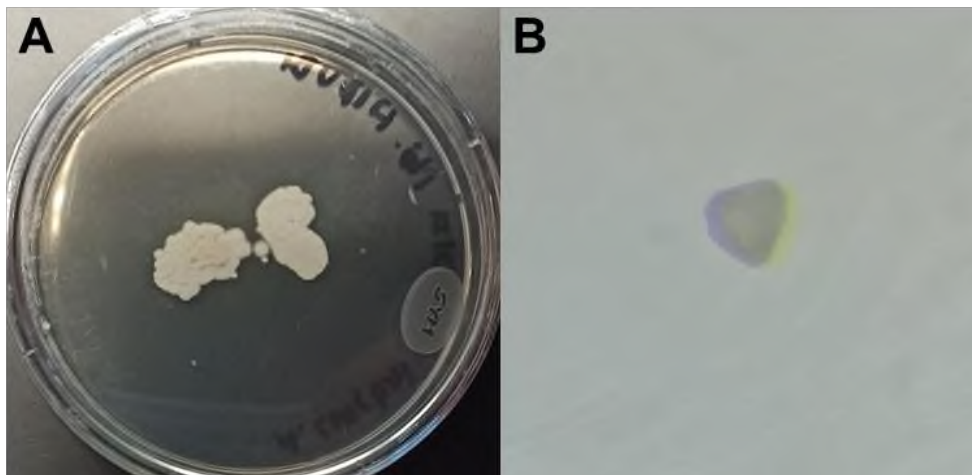


Figura 15. Morfología de *Anthracocestis cenchri*. A. Morfología colonial. B Detalle de sporeball a 40X.

8.2 Extracción de DNA genómico

Una vez que se confirmó la morfología de los hongos fitopatógenos, se realizaron extracciones de DNA genómico (gDNA). Los rendimientos obtenidos para cada muestra se muestran en la Tabla 12. En la Figura 16 se muestra que el gDNA obtenido se encuentra en buen estado. En el caso de *L. pseudotheobromae* se obtuvo concentración debido a que se recupera muy poco micelio de la caja. Con la finalidad de disminuir la concentración de los posibles inhibidores de la PCR, así como para asegurar que el mismo gDNA no inhiba la reacción, se realizaron diluciones: 1:5 para Lpse, 1:15 para Acen y 1:20 para Aspt.

Tabla 12. Concentraciones obtenidas de gDNA.

Muestra	Concentración
<i>Aspergillus tubingensis</i> (Aspt)	5,210.4 ng/ μ L
<i>Anthracoystis cenchri</i> (Acen)	3,288.3 ng/ μ L
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (Lpse)	528.1 ng/ μ L

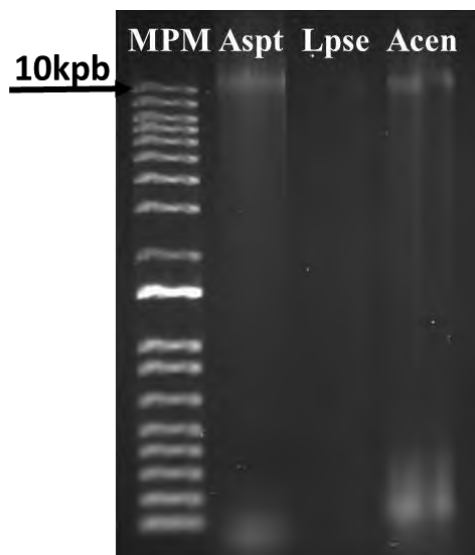


Figura 16. Gel de agarosa 1% que muestra el gDNA obtenido de los hongos. La flecha indica el peso molecular de la banda. MPM: Marcador de peso molecular.

8.3 Identificación de genes DCL

8.3.1 Búsqueda de anotaciones de DCL en bases de datos

Dando cumplimiento al objetivo particular 5.2.1 del presente trabajo, se realizaron búsquedas de secuencias de genes DCL de los hongos seleccionados, así como de las plantas huésped, en las bases de datos curadas UniProt (UniProt Consortium, 2021) y funRNA (Choi *et al*, 2014).

Para *Aspergillus tubingensis* se encontraron 3 secuencias de DICER (Anexo 2) en la base de datos funRNA (nt) y UniProt (aa), mismas que correspondían entre ambas bases de datos. Todas las secuencias se encontraron con los dominios característicos de DICER, los cuales son **DEAD-LIKE HELICASE**, **Helicase C-terminal**, **Dicer dsRNA-binding fold** y **Ribonuclase III**. La primer secuencia DCL está reportada en UniProt como **ATP-dependent helicase dcl1** (DCL1). La segunda y tercer secuencia se reportan como “**proteína no caracterizada**”, que fueron anotadas como DCL2.1 y DCL2.2. Las 3 secuencias fueron presentadas en UniProt como “proteínas inferidas por homología”. Según el mismo sitio “indica que la existencia de una proteína es probable porque existen ortólogos claros en especies estrechamente relacionadas”. Al mismo tiempo el sitio hace notar que aunque se “cuente con la evidencia de la 'existencia de proteínas' no proporciona información sobre la precisión o qué tan correctas son las secuencias mostradas”, no obstante, para fines de este trabajo, que una proteína sea inferida por homología significa también que cuenta con soporte suficiente para ser catalogada como similar a otras proteínas con funciones o características comparables.

Para el caso de la piña (*Ananas comosus*), planta huésped de *A. tubingensis*, se encontraron reportes de 35 secuencias de DCL en UniProt. Para propósitos de alineamiento se discriminaron aquellas secuencias menores a 500 aa de longitud y se usó el programa de alineamiento del mismo sitio, encontrándose que se alinean en 5 grupos resaltados en la Figura 17A. Al analizar los alineamientos, se encontró que las secuencias de un mismo grupo en realidad son la misma, ya que las diferencias que se observan son principalmente variaciones de longitud, pues las secuencias de menor tamaño se terminaban emparejando a lo largo de las secuencias

más largas, lo cual puede ser debido a la existencia de diferentes isoformas para un mismo gen DCL en *Ananas cosmosus*, o simplemente la secuencia reportada está incompleta, lo que representó un sesgo en el alineamiento, no obstante conservan la suficiente homología para ser el mismo gen. De cada uno de alineamientos realizados por grupo, se escogió la secuencia más representativa en función de su longitud y porcentaje de similitud al resto de las demás secuencias.

Al alinear las 5 secuencias seleccionadas, se encontraron presentes regiones conservadas, mismas que correspondían a los dominios DCL, pero con diferencias suficientes a lo largo de la secuencia, por lo tanto, fueron consideradas secuencias distintas del mismo tipo de proteína/gen DCL (Figura 17B).

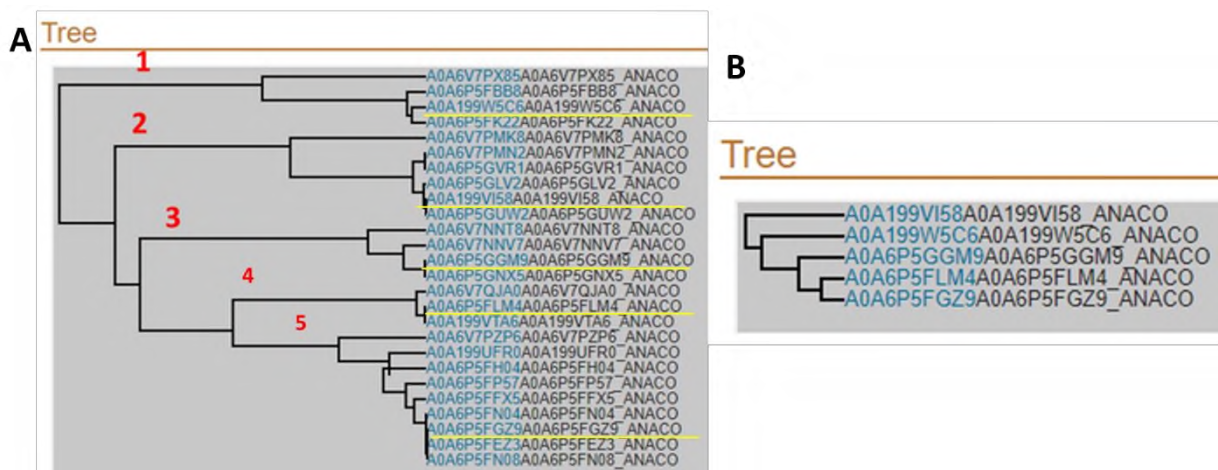


Figura 17. Búsqueda de DCL en *Ananas cosmosus*. A Árbol generado en UniProt con las secuencias depositadas para DCL de *Ananas cosmosus*. Los números indican cada grupo de secuencias resultantes del alineamiento. Las líneas amarillas indican la secuencia representativa escogida de cada grupo. B Árbol con las secuencias elegidas de DCL de *Ananas cosmosus*.

Con *L. pseudotheobromae*, *A. cenchr*i y mango (*Mangifera indica*) no se encontraron reportes de genes DCL en funRNA ni en UniProt, por lo que se procedió a realizar predicciones de secuencias DCL (sección 8.3.2).

Con los DCLs de plátano (*Musa acuminata*) se encontraron 4 secuencias DCL en UniProt, todas distintas entre sí, por lo que fueron las seleccionadas para hacer los posteriores alineamientos (Figura 18).

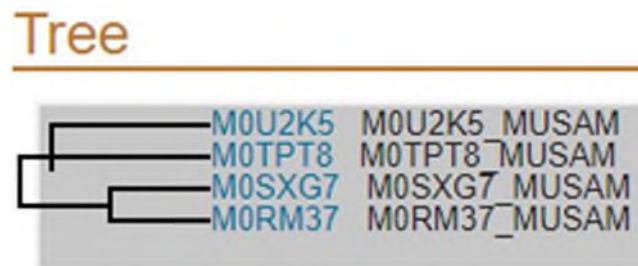


Figura 18. Secuencias DCL del plátano encontradas en UniProt.

8.3.2 Predicción de DCLs y dominios

Para *L. pseudotheobromae* se encontraron dos predicciones de secuencias (Anexo 2) usando las dos secuencias de DCL de su especie emparentada *Lasiodiplodia theobromae* reportadas en UniProt: ID: DCL1 A0A5N5DT14 y DCL2 A0A5N5D4R5 (Figura 19) (Anexo 2). La longitud del DCL1 predicho fue de 4013 pb y para el DCL2 fue de 5260 pb.

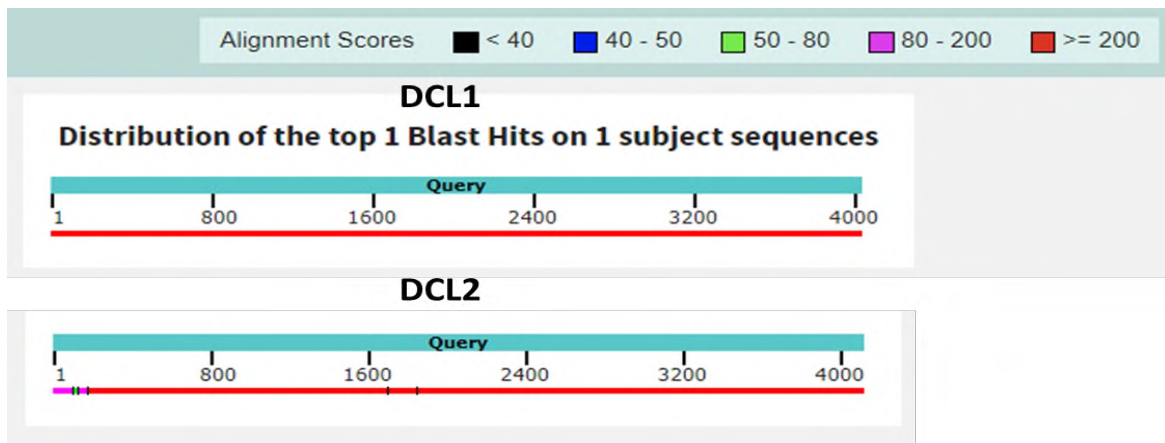


Figura 19. Hits para los DCL 1 y 2 de *Lasiodiplodia theobromae* en el genoma de *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. Secuence ID: Para DCL1 [RHKG01000374.1](#) de 17397 a 21410; para DCL2 [RHKG01000099.1](#) de 336142 a 341402.

La secuencia nucleotídica de DCL1 introducida en FGENESH dió una predicción de marco abierto de lectura de 1180 aa, siendo menor con respecto a la propoción 1/3 de pares de bases de la secuencia, pues la herramienta descarta fragmentos que considera como intrones. En Pfam se encontraron dominios característicos de la proteína DCL para el marco abierto de lectura encontrado en FGENESH (Figura 20).

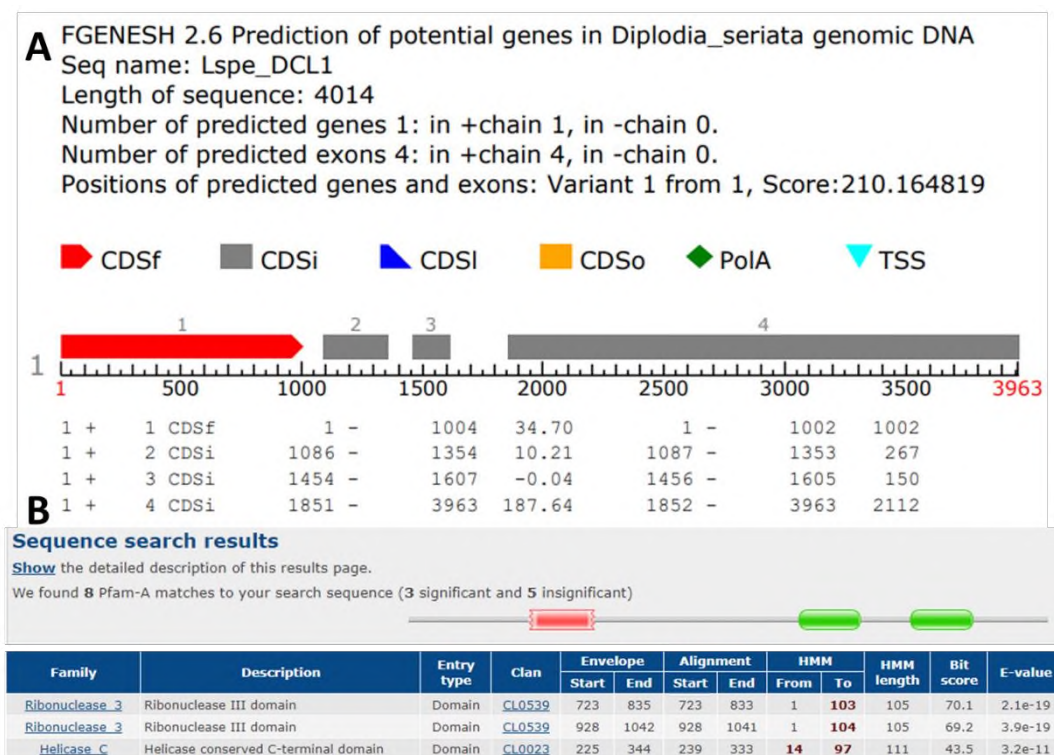


Figura 20. Predicción de DCL1 en *L. pseudotheobromae*. A Marco abierto de lectura en FGENESH.

B Dominios de DCL predichos en Pfam. CDSf: primero (comenzando el codón de inicio); CDSi: interno (exón interno); CDSi: último segmento de codificación (codón de paro); CDSo: para genes con una sola secuencia codificante (comenzando con codón de inicio y terminando con codón de paro); PoIA: señal de poliA para terminar la transcripción; TSS: sitio de inicio de la transcripción.

Para la secuencia nucleotídica encontrada para el DCL2, en FGENESH se registró un marco abierto de lectura de 1238 aa, y en Pfam se encontraron nuevamente los dominios característicos de proteína DCL (Figura 21).

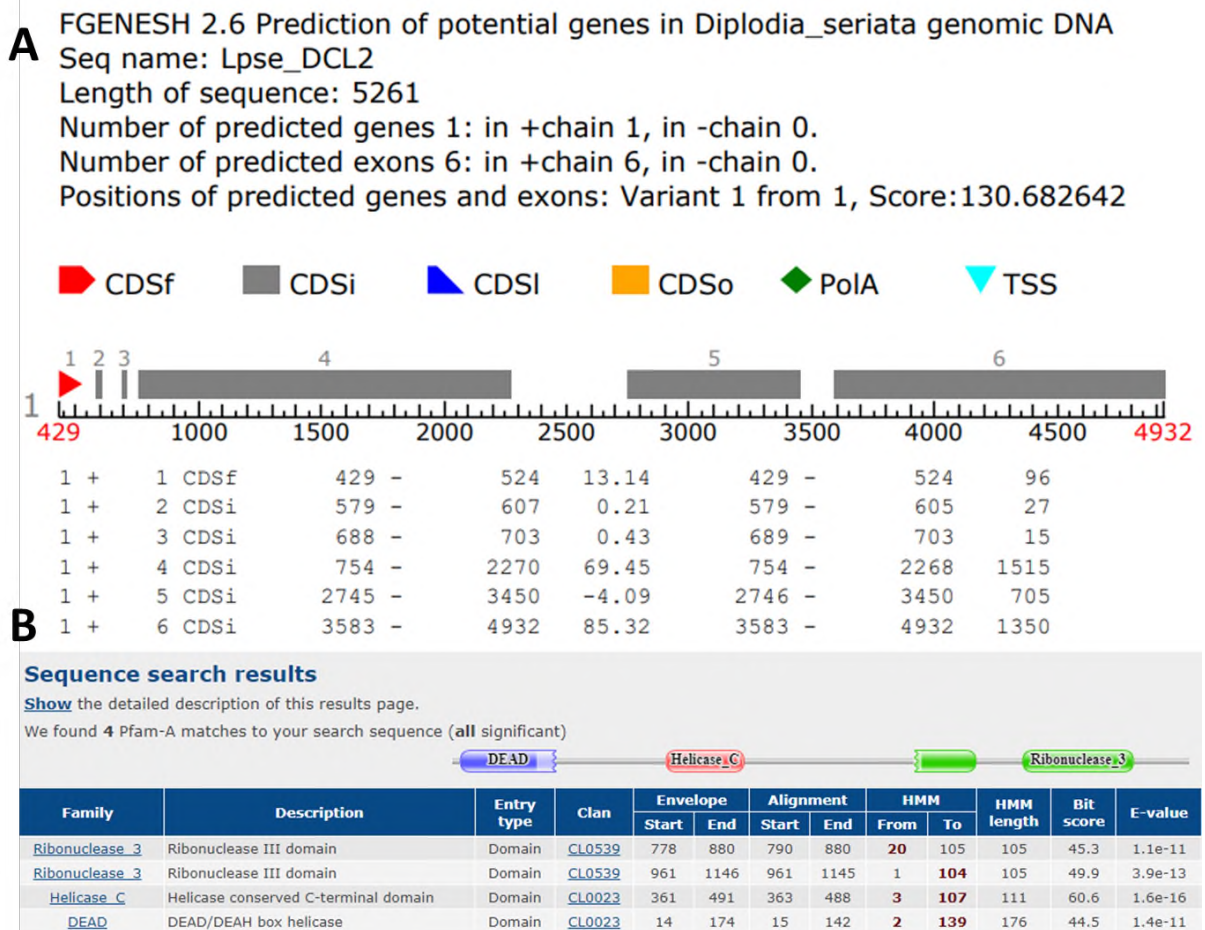


Figura 21. Predicción de DCL2 en *L. pseudotheobromae*. A Marco abierto de lectura en FGENESH. B Predicción de los dominios de DCL en Pfam. CDSf: primero (comenzando el codón de inicio); CDSi: interno (exón interno); CDSI: último segmento de codificación (codón de paro); CDSO: para genes con una sola secuencia codificante (comenzando con codón de inicio y terminando con codón de paro); PoIA: señal de poliA para terminar la transcripción; TSS: sitio de inicio de la transcripción.

No se encontraron reportes para secuencias DCL de especies cercanas en mango. Para *A. cenchr* se encontraron secuencias DCL para especies cercanas pero no hay información de su genoma en la base de datos wsg del NCBI, por lo que se procedió a la identificación *de novo*.

8.3.3 Identificación de genes DCL *de novo*

Para *A. cenchri*, las búsquedas en UniProt resultaron en reportes de secuencias anotadas como DCL en especies del género *Anthracocestis* y géneros relacionados, dichas especies fueron: *Anthracocestis flocculosa* PF-1, *Sporisorium graminicola*, *Sporisorium reilianum* f. sp. *Reilianum*, *Sporisorium scitamimum*, *Ustilago bromivora*, *Ustilago trichophora* y *Ustilago hordei*. Del alineamiento realizado con las secuencias peptídicas recuperadas, se ubicaron 2 zonas de alta conservación entre ellas (Figura 22) (Anexo 2). El primer fragmento tiene una longitud continua de 13 aa y se encuentra en el dominio **DEAD-LIKE HELICASE**. El segundo fragmento tiene una longitud continua de 11 aa y está ubicado en el dominio **Helicase, C-Terminal**. Las zonas encontradas dan una pauta para el diseño de los primers degenerados, pues al ser consistentes entre especies relacionadas, se puede esperar que se mantenga en *A. cenchri*.

Del alineamiento realizado con las secuencias nucleotídicas correspondientes para los DCL reportados, se encontró que se mantiene la alta conservación en las secuencias de nucleótidos (Figura 23), por lo que dichas zonas se eligieron para el diseño de los oligonucleótidos degenerados. Los primers diseñados contienen “N” en las partes donde existen diferencias, pues significa que en esta posición se puede agregar cualquiera de las 4 bases nitrogenadas (Tabla 13).

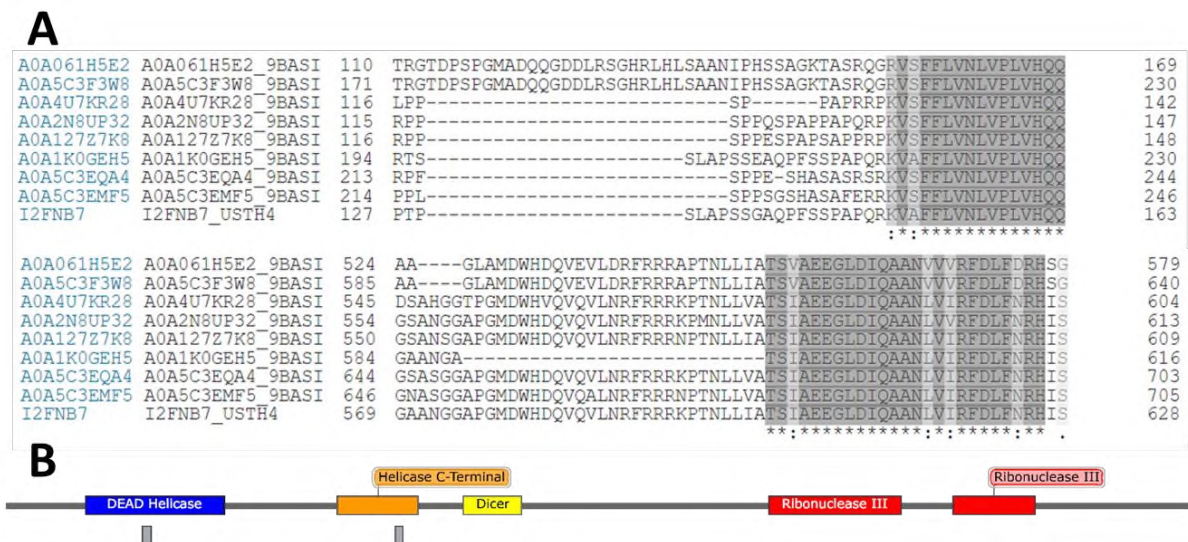


Figura 22. Zonas conservadas de DCL en especies cercanas a *A. cenchri*. **A** Alineamiento de las secuencias peptídicas de DCL de especies relacionadas con *A. cenchri*. Se indican las regiones conservadas con asteriscos. **B** Estructura del gen DCL de *A. flocculosa* como modelo para el diseño de primers degenerados. En gris se indica las zonas dónde hay conservación.

Secuencia proteica:			<u>F F L V N L V P L V H Q Q</u>
ENA	CCF48410	CCF48410.1	TTCTTCCTCGTAAACCTAGTCCCTCTAGTTCACCAACAA
ENA	CDU21985	CDU21985.1	TTCTTCCTCGTCAACCTCGTGCCTCTGGTCCACCAACAG
ENA	EPQ27664	EPQ27664.1	TTCTTCCTCGTCAACCTCGTGCCCTGGTCCACCAGCAG
ENA	SAM86482	SAM86482.1	TTCTTCCTCGTAAACCTAGTCCCTCTAGTTCACCAACAA
ENA	SJX66616	SJX66616.1	TTCTTTCTCGTCAACCTCGTGCCGCTCGTGCATCAGCAG
ENA	SPO31844	SPO31844.1	TTCTTTCTCGTCAACCTAGTTCCTCCCTCGTCCACCAGCAA
ENA	SPO31957	SPO31957.1	TTCTTCCTCGTCAATCTGGTCCCCCTCGTCCACCAGCAA
ENA	SPO39203	SPO39203.1	TTCTTCCTCGTCAACCTCGTGCCCTGGTCCACCAGCAG
ENA	TKY86881	TKY86881.1	TTCTTCCTAGTCAACCTTGTGCCTCTGGTCCATCAGCAG
			***** ** ** ** **
Secuencia proteica:			<u>A E E G L D I Q A A N</u>
ENA	CCF48410	CCF48410.1	GCCGAAGAAGGGTTGGATATTCAGGCTGCCAAC
ENA	CDU21985	CDU21985.1	GCCGAAGAAGGTCTCGACATTCAAGCCGCCAAC
ENA	EPQ27664	EPQ27664.1	GCCGAGGAGGGGCTCGACATCCAGGCTGCCAAT
ENA	SAM86482	SAM86482.1	GCCGAAGAAGGCTTGGATATTCAGGCTGCCAAC
ENA	SJX66616	SJX66616.1	GCCGAAGAGGGACTCGACATCCAGGCGGCCAAC
ENA	SPO31844	SPO31844.1	GCTGAAGAAGGGCTCGACATCCAAGCCGCCAAC
ENA	SPO31957	SPO31957.1	GCCGAGGAAGGACTCGACATTCAAGCAGCCAAC
ENA	SPO39203	SPO39203.1	GCCGAGGAGGGGCTCGACATCCAGGCTGCCAAT
ENA	TKY86881	TKY86881.1	GCCGAAGAAGGTCTCGACATCCAAGCCGCCAAC
			** ** ** * ** ** ** **

Figura 23. Alineamiento de nucleótidos de las zonas conservadas de los DCL de especies relacionadas con *A. cenchri*.

Tabla 13. Oligonucleótidos degenerados para amplificar DCL en *A. cenchri*.

Nombre	Secuencia 5'-3'
Acen_1c 1F	GTNCCNCTNGTNCANCA
Acen_1c 1R	TTGGCNGCNTGNATNTCNA

Para el caso del mango, no hubo reportes de secuencias DCL para ninguna especie cercana, por lo que no fue considerada para la elección de la zona de diseño del RNAi en *L. pseudothebromae*.

8.4 Diseño de RNA de doble cadena de interferencia (dsRNAi)

8.4.1 Alineamientos

De los alineamientos realizados con los 5 DCLs de la piña vs cada uno de los DCLs de *A. tubingensis* se encontraron regiones de baja homología como se muestra en la Figura 24.



Figura 24. Alineamientos de los DCLs de la piña vs DCLs de *A. tubingensis*. Las primeras 5 secuencias corresponden a los DCLs de la piña; la última secuencia corresponde al DCL del hongo. Se resaltan en gris las zonas de mayor homología.

Se siguió observando la baja homología en los alineamientos con las secuencias nucleotídicas correspondientes (Figura 25).

Las regiones de baja homología elegidas para el diseño de los primers están en el brazo conector entre los dominios DEAD-HELICASE y Helicase, C-terminal; la zona se muestra en el esquema de la Figura 26, con un amplicón de 250 pb para cada secuencia DCL. Los primers se muestran en la Tabla 14.

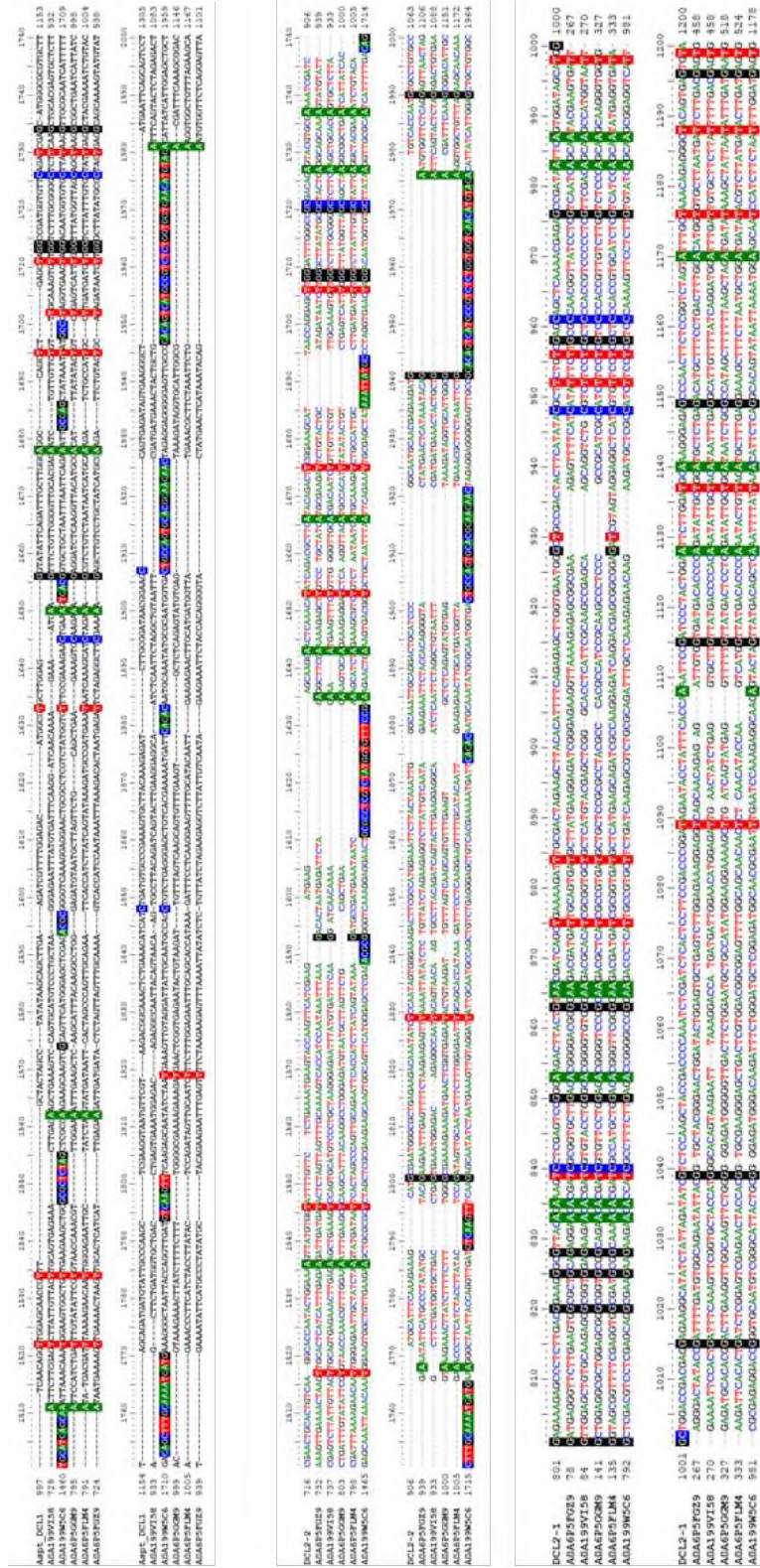


Figura 25. Alineamientos de las secuencias nucleotídicas de los DCLs de piña vs *Aspergillus tubingensis*. A DCL1. B DCL2.2. C DCL2.1. Se resaltan las similitudes.

Tabla 14. Primers para amplificar las secuencias DCL de *Aspergillus tubingensis*

Nombre	Secuencia 5'-3'
Aspt_1c 1F	GAGACATGGCGTGCTTGG
Aspt_1c 1R	TCAGGACTGCTGAATTCATAGCC
Aspt_2c 1F	CCTTCTTATACGATTCCGAACTGC
Aspt_2c 1R	TTGTCTTCTCAGCGCCCATTC
Aspt_3c 1F	GAGCCCTCTTGACGGAAGG
Aspt_3c 1R	GGTCGGTAGCTTGGAGACG

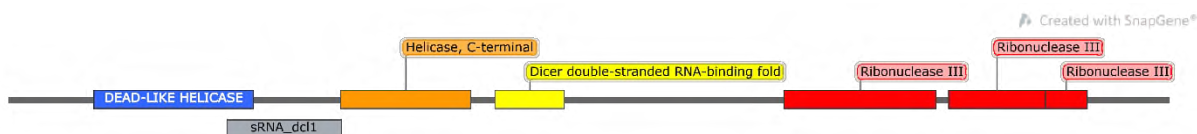


Figura 26. Ubicación de los primers para la amplificación de los DCLs en *A. tubingensis*. La zona gris indica la región amplificada para la generación de dsRNAi.

En el caso de *L. pseudotheobromae*, no se encontraron reportes de secuencias DCL del mango para hacer alineamientos ni de especies cercanas para hacer predicciones o identificaciones *de novo*, por tanto, para elegir la zona de diseño para los dsRNAi se siguió el criterio usado para la elección de la zona de diseño en *A. tubingensis*, ubicándose en el brazo conector entre los dominios DEAD-LIKE HELICASE y Helicase, C-terminal (Figura 27), pues es una zona ampliamente variable. Los primers diseñados se muestran en la Tabla 15.

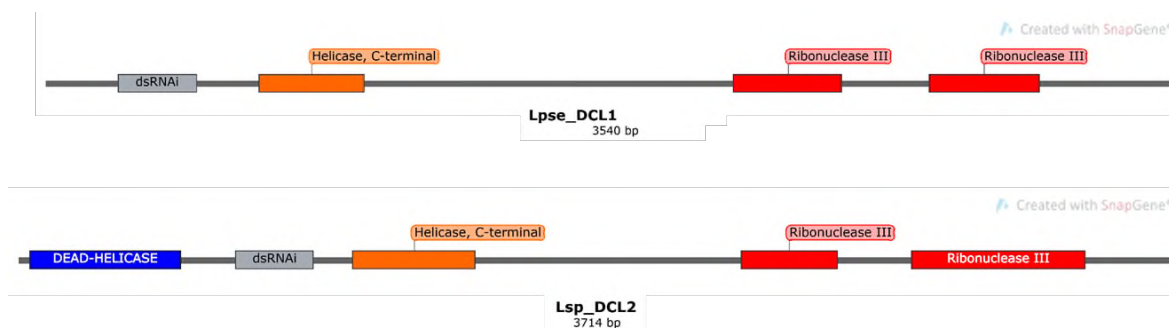


Figura 27. DCLs de *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. La zona gris indica la región amplificada para el diseño de los dsRNAi.

Tabla 15. Primers para amplificar DCL1 y DCL2 de *L. pseudotheobromae*.

Nombre	Secuencia 5'-3'
Lpse_1c 1F	GCCGCTAGCGATCTCGAA
Lpse_1c 2R	AGAACATGTCTGAGCACCATGC
Lpse_2c 1F	CGTCTATCACGCGTACGACATC
Lpse_2c 1R	GAAGGCATCAAATTTGGCGATGC

8.4.2 Confirmación experimental

En *A. tubingensis*, como resultado de las reacciones de PCR, se obtuvieron productos de amplificación de DCL1 y DCL2.1 (Figura 29A) pero no de DCL2.2. Considerando la posibilidad de que no se haya empleado la temperatura de alineamiento correcta en el programa de PCR, se realizó un gradiente de temperatura, obteniendo nuevamente resultados negativos para este gen (Figura 29B). Al no obtener resultado con diferentes temperaturas, era probable que se haya realizado una mala elección de la zona de diseño de primers por lo que se empleó un segundo diseño de primers (Tabla 16), no obstante, aun habiendo movido esa zona (88 pb downstream) no hubo éxito en la amplificación del DCL2.2 (Figura 29C). Ante la imposibilidad de amplificar el DCL2.2, se tomó la decisión de eliminar a DCL2.2 del diseño. Esta secuencia fue inferida por homología, lo que la hace susceptible de no estar adecuadamente reportada, por tanto, pudo haber afectado el diseño de los primers. Por tal razón, se siguió trabajando solo con las dos secuencias ya confirmadas.

Tabla 16. Segundo diseño de primers para el DCL2 de *Aspergillus tubingensis*.

Nombre	Secuencia 5'-3'
Aspt_2c 2F	GTTTCATCGAAGATGAAGAGCAAGC
Aspt_2c 2R	TTCTCGTTGCATTGCCGG

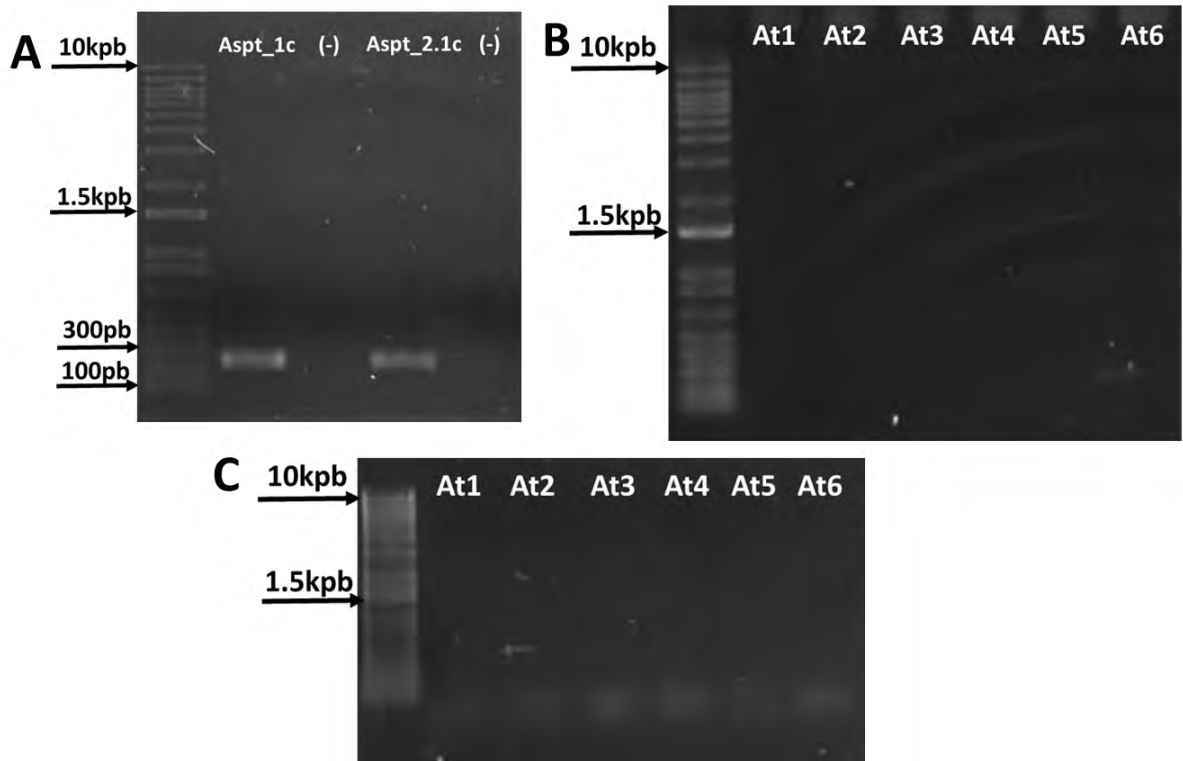


Figura 28. Geles de agarosa al 1% de PCR para amplificar los DCLs en *A. tubingensis*. A Confirmación de la presencia de DCL1 y DCL2.1 en el gDNA de *A. tubingensis* del tamaño esperado (250 pb). B PCR de gradiente para el DCL2.2 de *A. tubingensis*. Temperaturas de izquierda a derecha en los pocillos: 53.1°C, 54.4°C, 55.3°C, 57.7°C, 58.2°C y 60°C. C PCR de gradiente con el segundo diseño para el DCL2.2 de *Aspergillus tubingensis*. De izquierda a derecha las temperaturas son: 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C y 62°C.

Para el caso de *L. pseudotheobromae*, se confirmó la presencia de DCL1 y DCL2 en el gDNA con los primers diseñados (Figura 29).

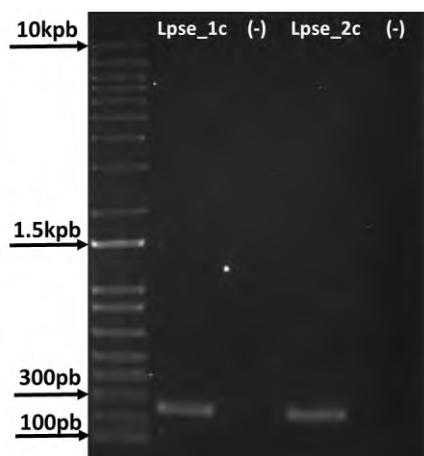


Figura 29. Gel de agarosa al 1% con las bandas correspondientes al DCL1 y DCL2 de *L. pseudotheobromae*.

Con *Anthracoystis cenchri*, los resultados de la PCR usando el par de primers degenerados con PCR de gradiente no mostraron éxito en la amplificación del DCL identificado *de novo* (Figura 30A). Pensando en que el diseño contaba con exceso de bases degeneradas a lo largo del diseño (6 y 5), se diseñó un nuevo par de primers con sólo 5 y 4 bases degeneradas (Tabla 17). Se corrió una reacción de PCR usando el nuevo par de primers y en combinación con el primer diseño (1F1R, 2F2R, 1F2R, 2F1R, Tabla 18), nuevamente sin obtener éxito (Figura 30B).

Tabla 17. 2do diseño de primers degenerados para *A. cenchri*.

Nombre	Secuencia 5'-3'
Acen_1c 2F	CCNAAGATCNTNGGNATGAC
Acen_1c 2R	CCNCNNGANTGNAGGAA

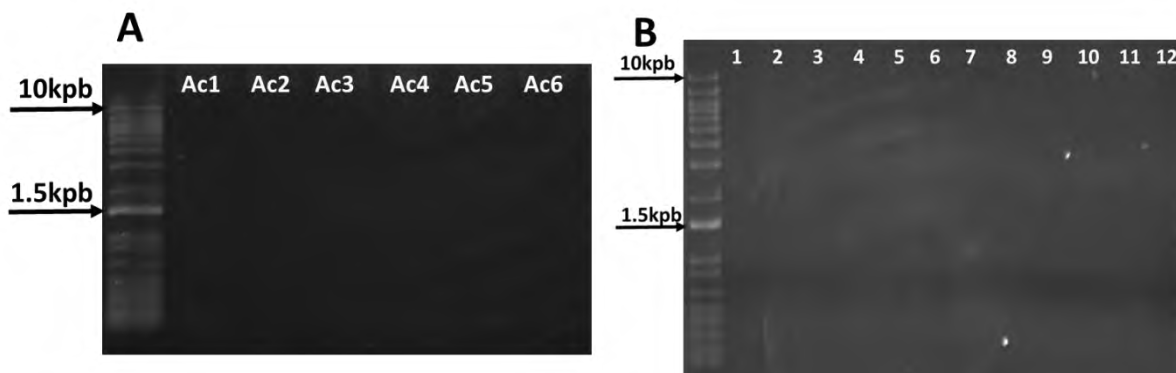


Figura 30. Geles de agarosa al 1% para amplificar DCL en *A. cenchri*. A PCR de gradiente con el diseño degenerado para el DCL de *A. cenchri*. De izquierda a derecha las temperaturas son: 53.1°C, 54.4°C, 55.3°C, 57.7°C, 58.2°C y 60°C. B PCR de gradiente con el segundo diseño de primers degenerados, el primer diseño y las combinaciones 2F1R y 1F2R. El orden de los pocillos se describe en la Tabla 18.

Tabla 18. Distribución de las muestras de la PCR de gradiente con los primers degenerados para *A. cenchri* de la figura 37B.

Combinación	1F1R	1F2R	2F1R	2F2R
55°C	1	4	7	10
60°C	2	5	8	11
65°C	3	3	9	12

Ante la negativa de poder amplificar el DCL en *A. cenchri*, se decidió emplear un último diseño degenerado de primers, esta vez tomando en cuenta la variación de bases para los codones de cada aminoácidos, como se muestra en la Tabla 19. Las letras distintas a A, T, C y G representan diferentes combinaciones de bases para una sólo posición, para el primer diseñado se usaron las siguientes bases degeneradas: N (A, T, C o G), V (A, C o G), B (T, G o C), D (A, G o T), R (A o G), M (A o C), S (C o G), Y (C o T).

Tabla 19. Diseño de primers degenerados para *A. cenchri* con consideración de la variación de bases para cada codón de aminoácidos.

aa	F			F			L			V			N			L			V			P			L			V			
Uhrd	T	T	C	T	T	C	C	C	T	C	G	T	A	A	A	C	C	T	A	G	T	C	C	C	T	C	T	A	G	T	T
Scit																															
Aflc1																															
Ubrm																															
Srlm																															
Utrc1																															
Utrc2																															
Aflc2																															
Sgrm																															
Primer	T	T	C	T	T	Y	C	T	M	G	T	C	A	A	C	C	T	N	G	T	G	C	C	B	C	T	S	G	T	C	
aa	E			E			G			L			D			I			Q			A			A			N			
Uhrd	G	A	A	G	A	A	G	G	G	T	T	G	G	A	T	A	T	T	C	A	G	G	C	T	G	C	C	A	A	C	
Scit																															
Aflc1																															
Ubrm																															
Srlm																															
Utrc1																															
Utrc2																															
Aflc2																															
Sgrm																															
Primer	G	A	R	G	A	R	G	G	D	C	T	C	G	A	C	A	T	Y	C	A	R	G	C	B	G	C	C	A	A	Y	
Nombre del primer	Secuencia 5'-3'																														
Acen_FYMN	TTCTTYCTMGTC AACCTNGTGCC																														
Acen_RVYR	TTGGCVGCYTG RATGTCGAG																														

Se realizó una PCR de gradiente (50, 55, 60 y 65°C) con los parámetros anteriormente mencionados, obteniéndose una banda de acercana a 1.5 kb, que puede corresponder al peso esperado de 1.23 kb (Figura 31).

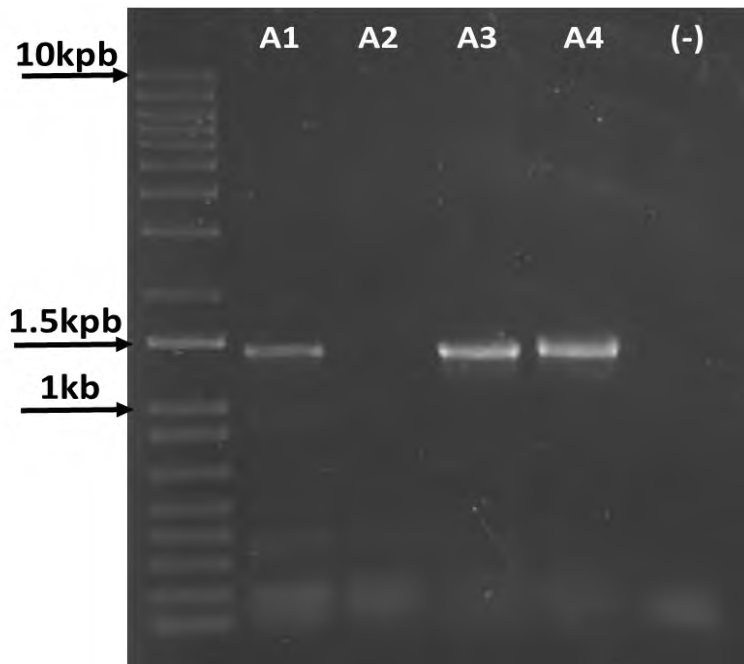


Figura 31. Gel de agarosa al 1% con primers degenerados en Acen. A1: 50°C, A2: 55°C, A3: 60°C y A4: 65°C. El control negativo se realizó a 50°C.

Para la confirmación de los DCLs como transcritos, se realizó una extracción de RNA total, donde se obtuvo una concentración de 2.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para *A. tubingensis*, y 2.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para *L. pseudotheobromae*; la calidad de ambos RNAs resultó aceptable, con ambas bandas ribosomales definidas, las cuales se visualizaron en un gel de agarosa al 1% con buffer MOPS (Figura 32A y 32C). Como resultado del diagnóstico de la expresión de DCL, se logró la amplificación de los DCLs a partir de cDNA, lo que demuestra su expresión tanto en *A. tubingensis* como en *L. pseudotheobromae* (Figura 32B y 32D). Debido a que se expresan, son susceptibles de ser silenciados mediante RNAi. Además se observó que la banda para DCL1 es menos intensa con respecto al segundo DCL. El control negativo RNAdil indica que no hay gDNA remanente en la muestra de cDNA, lo cual significa que la amplificación es específica del cDNA derivado del RNA. Todos los fragmentos fueron purificados para las subsecuentes reacciones, las concentraciones se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Concentraciones de los fragmentos de DCLs de *A. tubingensis* y *L. pseudotheobromae*.

Muestra	Concentración (ng/ μ L)
Aspt_1c	66.5
Aspt_3c	66.7
Lpse_1c	32.2
Lpse_2c	35.1

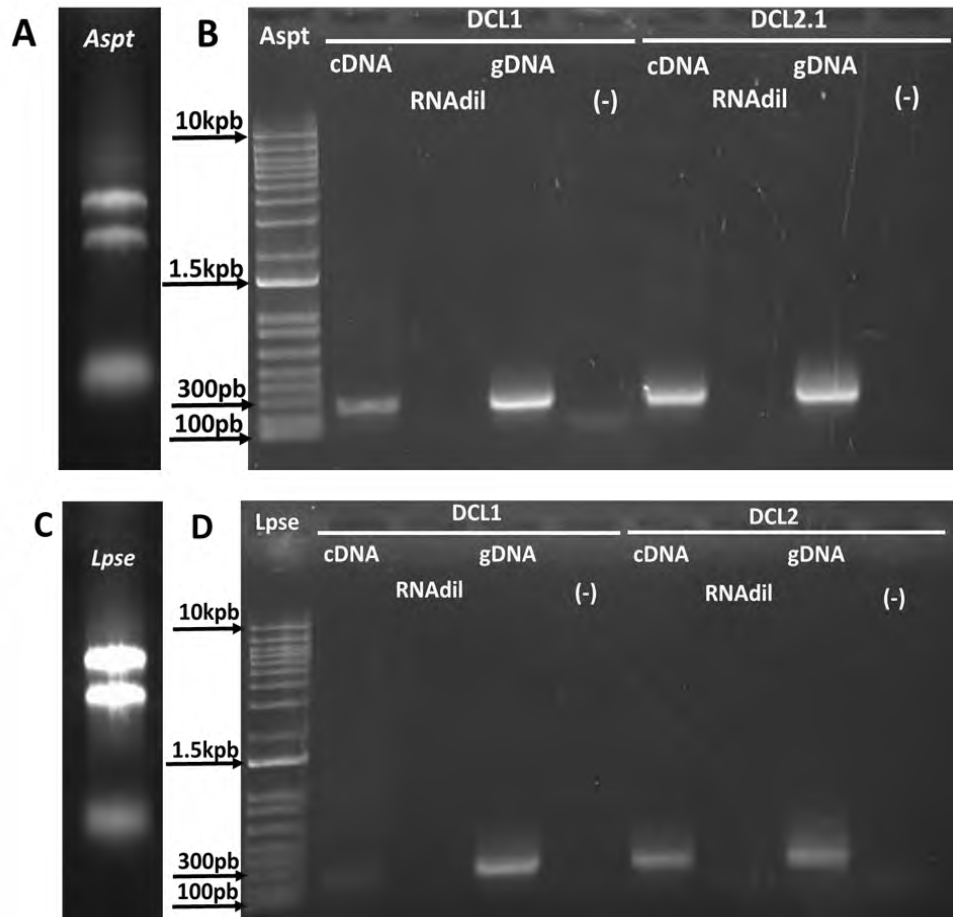


Figura 32. Geles de expresión de DCL como transcrito en *A. tubingensis* y *L. pseudotheobromae*. A Gel de agarosa al 1% con MOPS. A bandas ribosomales de *A. tubingensis*. B Productos de amplificación de DCL1 y DCL2.1 a partir de cDNA de *A. tubingensis* (cDNA). C Bandas ribosomales de *L. pseudotheobromae*. D Productos de amplificación de DCL1 y DCL2 a partir de cDNA de *L. pseudotheobromae* (cDNA). Se usaron como controles negativos una dilución de RNA tratado con DNasa previo a la síntesis de cDNA (RNAdil) y agua (-), y como control positivo se empleó gDNA.

8.5 Síntesis de RNA de doble cadena de interferencia (dsRNAi)

8.5.1 Construcción del templado

Para llevar a cabo la síntesis de dsRNAi se tuvo por objetivo reunir en una sola molécula los fragmentos de DCLs seleccionados para cada patógeno, además de flanquearlos en ambos extremos con la secuencia del promotor T7. Para la construcción del templado se siguió el esquema de la Figura 12. Se amplificaron los DCLs purificados con los primers con secuencias complementarias en sus extremos, mostrados en la Tabla 21. Se logró adicionar con éxitos los extremos complementarios, obteniéndose bandas ligeramente más pesadas como se muestra en la Figura 33. El rendimiento de los productos purificados se muestra en la Tabla 22.

Tabla 21. Diseño de primers complementarios para la fusión de los DCLs.

Nombre del primer	Secuencia 5'-3'
Aspt_1RRC-3F	GGCTATGAATTCAGCAGTCCTGAGAGCCCTCTTGACGGAAGG
Aspt_3FRC-1R	CCTTCCGTCAAGAGGGCTCTCAGGACTGCTGAATTCATAGCC
Lpse_1RRC-2F	GCATGGTGCTCAGACATGTTCTCGTCTATCACGCGTACGACATC
Lpse_2FRC-1R	GATGTCGTACGCGTGATAGACGAGAACATGTCTGAGCACCATGC

Tabla 22. Concentración de productos con extremos complementarios.

Muestra	Concentración (ng/ μ L)
Aspt_1c comp	25
Aspt_3c comp	35.3
Lpse_1c comp	36.6
Lpse_2c comp	44.2

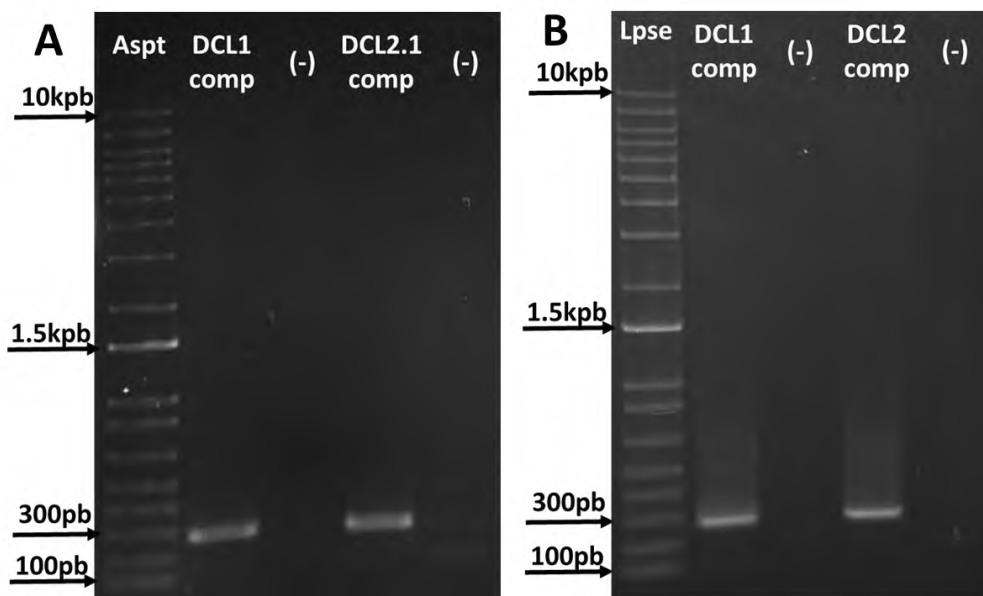


Figura 33. Gel de agarosa al 1% que muestra los amplicones de los DCLs con extremos complementarios de A *Aspergillus tubingensis* y B *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.

Para fusionar los DCLs se siguió el programa descrito en la Tabla 8, logrando así obtener las construcciones esperadas en ambos casos (500 pb) como lo muestran las bandas en la Figura 34A. La concentración obtenida después de purificar las construcciones fue de 11 ng/ μ L en ambos casos, los cuales posteriormente fueron reamplificados con primers que en sus extremos tienen la secuencia del promotor T7, los amplicones resultantes se muestran en la Figura 34.

Para ambas construcciones, se cortó del gel la banda de 540 pb, se purificó y se obtuvo una concentración de 16 ng/ μ L. La historia de las reacciones de PCR hasta la fusión de fragmentos está resumida en la Figura 35.

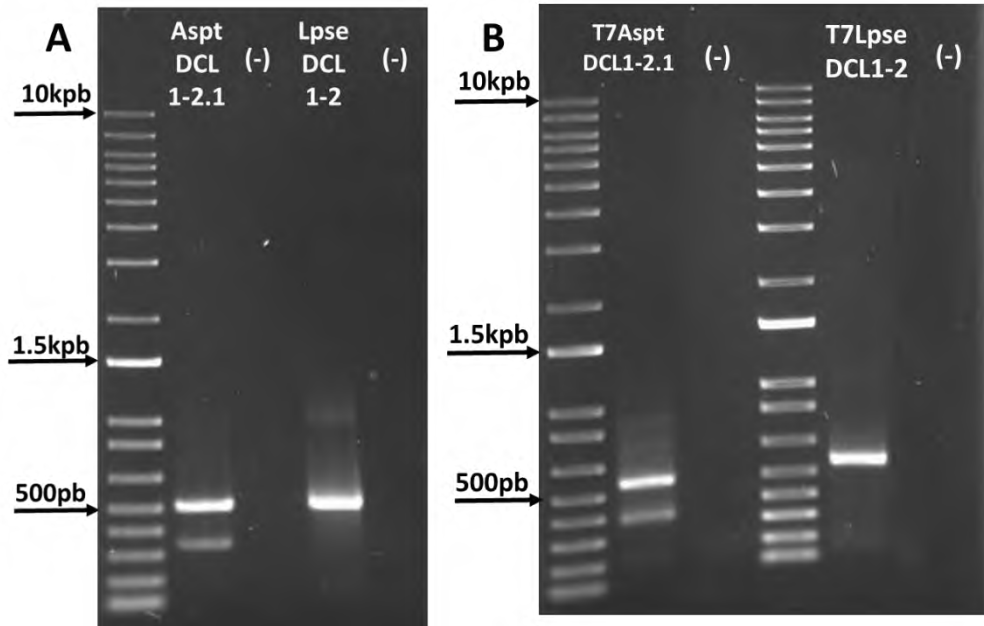


Figura 34. Gel de agarosa al 1% con las construcciones de Aspt1-2-2 y Lpse1-2. A Construcciones de la fusión de los DCLs de *A. tubingensis* y *L. pseudotheobromae*. B Construcciones con extremos T7 de *A. tubingensis* y *L. pseudotheobromae*.

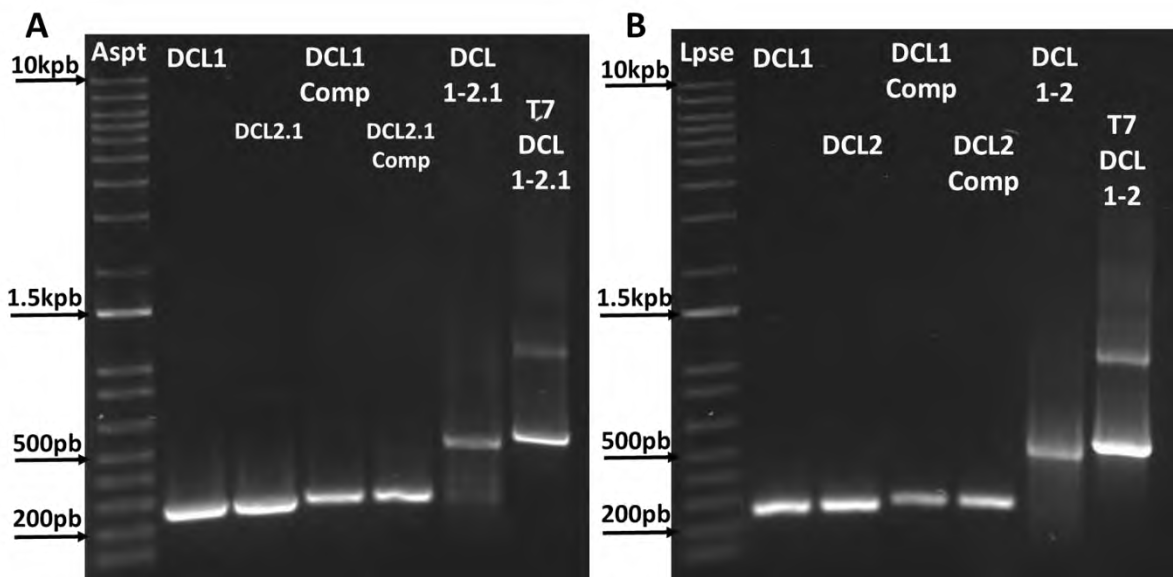


Figura 35. Resumen de reacciones para la construcción del templado. A *A. tubingensis*. B *L. pseudotheobromae*. Carriles DCL1-DCL2.1/DCL1-DCL2: bandas de 250 pb correspondientes a los fragmentos de DCLs. Carriles DCL1Comp-DCL2.1Comp/DCL1Comp-DCL2Comp: fragmentos de DCL con extremos complementarios, con un tamaño aproximado de 273 pb. Carril DCL1-2.1-DCL1-2: fragmento de 500 pb correspondiente a la suma de tamaños de ambos DCLs. Carril T7DCL1-2.1-T7DCL1-2: fragmento de 540 pb correspondiente a la fusión de ambos DCLs más la secuencia del promotor T7.

Ambos construcciones purificadas se reamplificaron usando únicamente el primer T7 (Figura 36A y Figura 37A). Una vez enriquecido, el producto se ligó en el vector p-GEM T-easy (Anexo 1) y posteriormente clonados en células competentes de *E. coli*. De las colonias blancas obtenidas, se seleccionaron 4 de cada construcción (Figura 36B y Figura 37B); por PCR de colonia, usando el par de primer M13, se confirmó que todas contenían a la construcción, pues amplificaron una banda de aproximadamente 760 pb (Figura 36C y Figura 37C), la cual corresponde al peso de la construcción con una secuencia parcial del plásmido.

Las colonias transformantes positivas de cada construcción se sembraron de forma independiente en medio LB líquido con ampicilina, y se extrajo plásmido con el método de lisis alcalina, alcanzando rendimientos de 8.8 µg/µL en promedio.

Para confirmar la presencia del inserto en el plásmido extraído, se realizó una reacción de digestión usando la enzima de restricción NotI (New England Biolabs), obteniéndose una banda correspondiente al tamaño de la construcción junto con una banda de 3 kb que corresponde al peso del vector usado (Figura 36D y Figura 37D). También se confirmó la presencia de las construcciones en el plásmido por medio de PCR usando el primer T7, y se obtuvo una banda correspondiente con el tamaño de la construcción (540 pb), mostrados en la Figura 36D y Figura 37D. El plásmido fue enviado a secuenciar al LANGEBIO para confirmar que la secuencia era correcta.

De la secuenciación se obtuvieron las secuencias de las construcciones en sentido directo (F) y reverso (R), mismas que fueron alineadas con las secuencias encontradas en UniProt y funRNA para comparar su identidad. El análisis del alineamiento reveló que la construcción corresponde con las secuencias reportadas en las bases de datos.

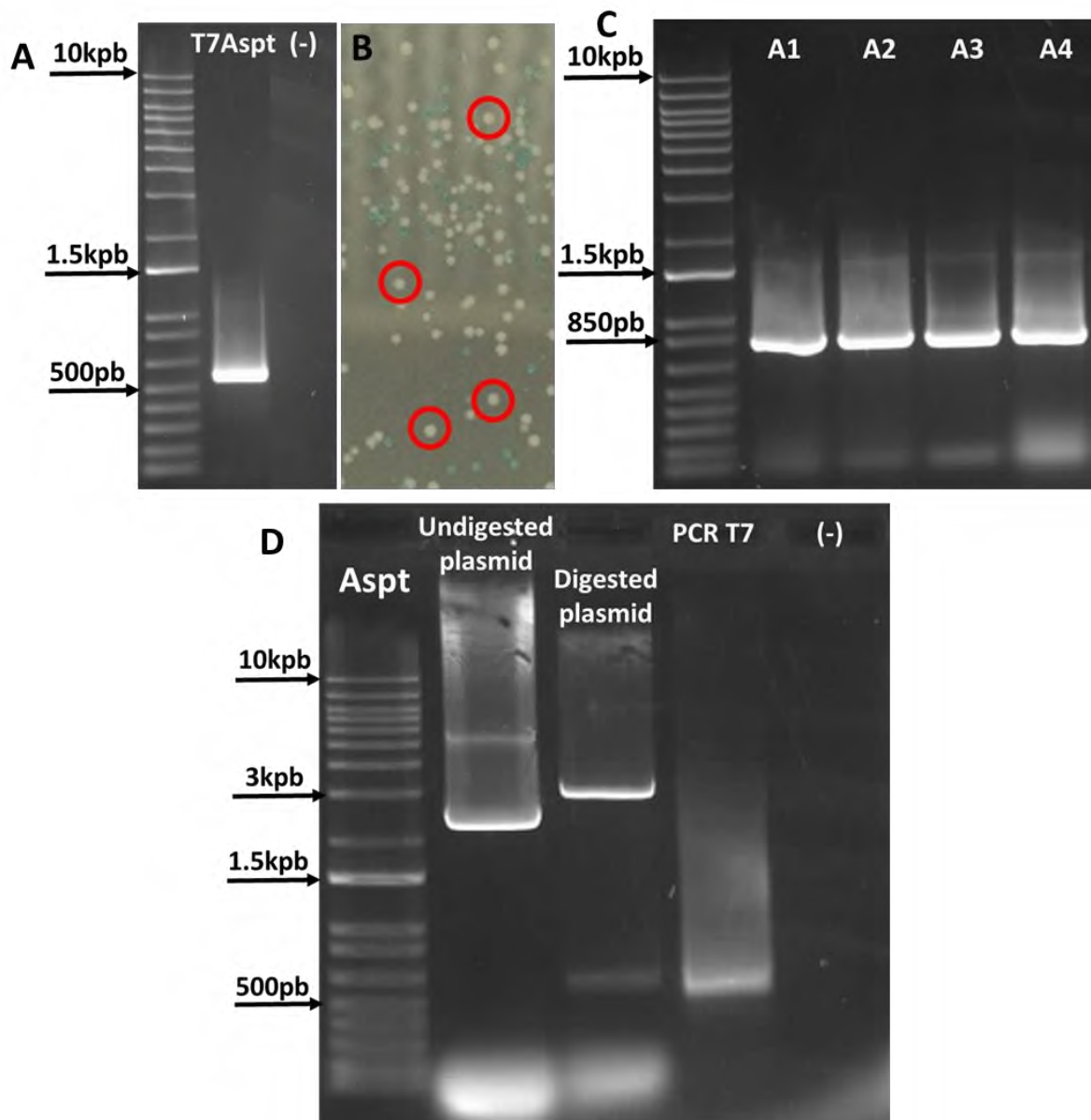


Figura 36. Proceso de clonación de la construcción de Aspt-Dcl1/2.1. A Producto de PCR con primers T7. B Colonias blancas con construcción. C PCR de colonia con primers M13. D Análisis de plásmido de clona con la construcción Aspt-DCL1/2.1 con enzima de restricción NotI y PCR con primers T7.

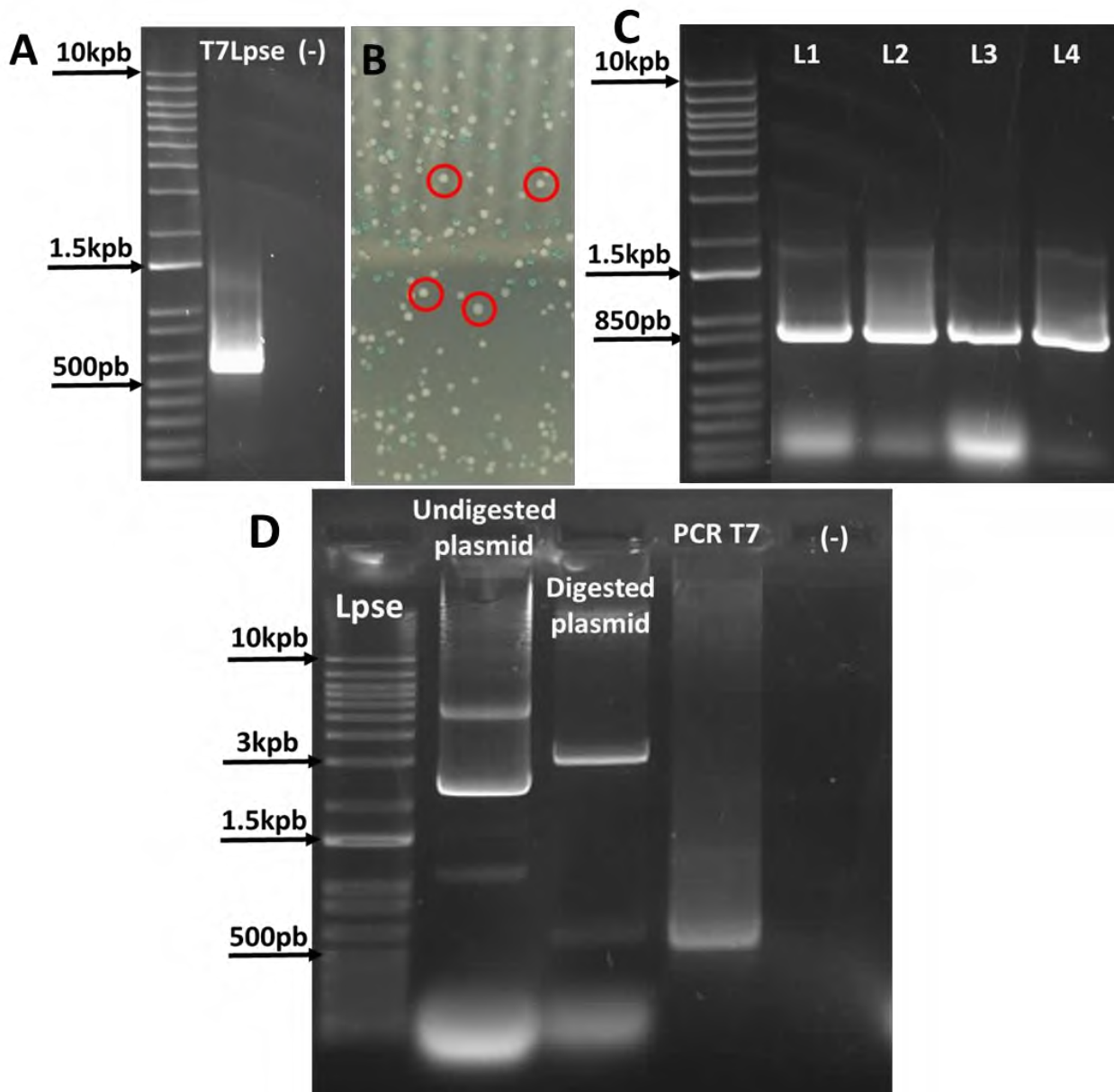


Figura 37. Proceso de clonación de la construcción de Lpse-Dcl1/2. A Producto de PCR con primers T7. B Colonias blancas con construcción. C PCR de colonia con primers M13. D Análisis de plásmido de clona con la construcción Lpse-DCL1/2 con enzima de restricción NotI y PCR con primers T7.

Las diferencias que se encontraron en Aspt fueron 13, entre las secuencias del DCL2.1 reportadas en las bases de datos, por tanto, se hizo un BLAST con la herramienta del NCBI y se encontró una secuencia de *A. tubingenensis* reportada como DCL2-1 que sólo tiene 4 diferencias, habiendo sustitución de adenina por guanina, como se puede observar en la Figura 38.



Figura 38. Análisis de la secuencia Aspt-DCL1/2.1. Alineamiento entre las secuencias recuperadas de la secuenciación y las secuencias obtenidas *in silico*. Morado: Promotor T7. Azul: DCL1, Verde: DCL2.1, Rojo: Diferencias. Aspt_DCL2.1: Secuencia recuperada de la secuenciación. Aspt_DCL2.1Blas: Secuencia recuperada del NCBI.

Las diferencias que se encontraron en Lpse-DCL1/2 fueron únicamente 2 en la secuencia del DCL2 (Figura 39), siendo cambios de adenina por guanina y timina por citosina.

DCL Múltiple Lpse



Figura 39. Análisis de la secuencia Lpse-DCL1/2. Alineamiento entre las secuencias recuperadas de la secuenciación y las secuencias obtenidas in silico. Morado: Promotor T7. Azul: DCL1, Verde: DCL2, Rojo: Diferencias, Gris: similitud de aminoácidos, Azul: polaridad del aminoácido. Lpse_DCL2: Secuencia recuperada de la secuenciación. Lpse_DCL2Blas: Secuencia recuperada del NCBI.

8.5.2 Reducción de efectos off-target

Con la finalidad de evaluar el espectro de actividad de los RNAi y de reducir la probabilidad de efectos de silenciamiento en genes distintos a los genes objetivo del silenciamiento, se realizó un análisis de las secuencias recuperadas de la secuenciación de los plásmidos con las construcciones. El análisis de las secuencias de las zonas elegidas en los DCLs de *A. tubingensis* vs el género *Aspergillus* resultó en 22 hits en las siguientes especies: *A. tubingensis*, *Aspergillus neoniger*, *Aspergillus eucalypticola*, *Aspergillus vadensis*, *Aspergillus piperis*, *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus costaricensis* y *A. niger* en todos ellos hubo alta conservación de las secuencias **dicer-like 1** y **dicer-like2.1** (Figura 40), por lo que es probable que el ldsRNAi diseñado para *A. tubingensis* pueda tener efectos en las especies antes mencionadas, así como se demostró que dsRNA para el gen *Myo5* en *Fusarium asiaticum* tuvo efecto en especies muy cercanas de *Fusarium*, incluyendo *F. graminearum* y *F. oxysporum* (Song *et al*, 2018).

Alignment Scores < 40 40 - 50 50 - 80 80 - 200 >= 200

Distribution of the top 22 Blast Hits on 22 subject sequences



Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
Aspergillus tubingensis ATP-dependent helicase dcl1 (AIWJ_00322), partial mRNA	Aspergillus tubingensis	471	471	50%	4e-131	99.20%	4560	XM_035495438.1
Aspergillus neoniger CBS 115656 ATP-dependent helicase dcl1 (BO87DRAFT_404209), parti...	Aspergillus neoniger CBS 115...	465	465	50%	2e-129	98.80%	4616	XM_025625835.1
Aspergillus tubingensis dicer-like protein 2-1 (AIWJ_00655), partial mRNA	Aspergillus tubingensis	458	458	50%	5e-127	98.40%	4188	XM_035495970.1
Aspergillus eucalypticola CBS 122712 ATP-dependent helicase dcl1 (BO83DRAFT_444467), ...	Aspergillus eucalypticola CBS...	444	444	50%	6e-123	97.22%	5136	XM_025536498.1
Aspergillus vadensis CBS 113365 ATP-dependent helicase dcl1 (BO88DRAFT_478428), parti...	Aspergillus vadensis CBS 113...	433	433	49%	2e-119	96.79%	4584	XM_025711995.1
Aspergillus piperis CBS 112811 ATP-dependent helicase dcl1 (BO85DRAFT_522506), mRNA	Aspergillus piperis CBS 112811	433	433	50%	2e-119	96.43%	4735	XM_025665265.1
Aspergillus luchuensis dicer-like protein 1 (DCL1), partial mRNA	Aspergillus luchuensis	427	427	50%	9e-118	96.03%	4560	XM_041687898.1
Aspergillus costaricensis CBS 115574 dicer-like protein 1 (BO79DRAFT_154229), partial mR...	Aspergillus costaricensis CB...	421	421	50%	5e-116	95.63%	4485	XM_025678744.1
Aspergillus costaricensis CBS 115574 dicer-like protein 2-1 (BO79DRAFT_194871), partial ...	Aspergillus costaricensis CB...	406	406	50%	2e-111	94.80%	4356	XM_025681084.1
Aspergillus piperis CBS 112811 dicer-like protein 2-1 (BO85DRAFT_423735), mRNA	Aspergillus piperis CBS 112811	394	394	49%	6e-108	94.33%	4473	XM_025658017.1
Aspergillus luchuensis dicer-like protein 2-1 (DCL2), partial mRNA	Aspergillus luchuensis	389	389	49%	3e-106	93.93%	4191	XM_041689372.1
Aspergillus neoniger CBS 115656 dicer-like protein 2-1 (BO87DRAFT_406328), partial mRNA	Aspergillus neoniger CBS 115...	383	383	49%	2e-104	93.52%	4365	XM_025625992.1
Aspergillus niger CBS 513.88 dicer-like protein 1, mRNA	Aspergillus niger CBS 513.88	381	381	50%	7e-104	92.86%	4482	XM_001398718.2
Aspergillus niger CBS 101883 uncharacterized protein (BO96DRAFT_368502), mRNA	Aspergillus niger CBS 101883	375	375	50%	4e-102	92.46%	4842	XM_025589861.1
Aspergillus eucalypticola CBS 122712 dicer-like protein 2-1 (BO83DRAFT_406819), partial m...	Aspergillus eucalypticola CBS...	371	371	49%	6e-101	92.71%	4348	XM_025533899.1
Aspergillus vadensis CBS 113365 dicer-like protein 2-1 (BO88DRAFT_381470), partial mRNA	Aspergillus vadensis CBS 113...	365	365	49%	3e-99	92.31%	4333	XM_025704585.1
Aspergillus niger CBS 101883 ATP-dependent helicase dcl2-1 (BO96DRAFT_362833), mRNA	Aspergillus niger CBS 101883	302	302	49%	4e-80	87.85%	4367	XM_025595661.1
Aspergillus niger CBS 513.88 ATP-dependent helicase dcl2, mRNA	Aspergillus niger CBS 513.88	302	302	49%	4e-80	87.85%	4224	XM_001400888.2
Aspergillus welwitschiae ATP-dependent helicase dcl2-1 (BO94DRAFT_166338), partial mR...	Aspergillus welwitschiae	291	291	49%	1e-76	87.04%	4164	XM_026770518.1
Aspergillus heteromorphus CBS 117.55 dicer-like protein 1 (BO70DRAFT_424160), partial mR...	Aspergillus heteromorphus C...	142	142	25%	4e-32	85.94%	4804	XM_025547609.1
Aspergillus sclerotiorum CBS 115572 dicer-like protein 1 (BO94DRAFT_507177), partial mRNA	Aspergillus sclerotiorum CBS...	123	123	26%	3e-26	82.71%	4789	XM_025609604.1
Aspergillus udagawae pre-mRNA-splicing factor 8 (Aud_000422), partial mRNA	Aspergillus udagawae	39.1	39.1	4%	0.75	100.00%	7065	XM_043285935.1

Figura 40. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Aspt en el género *Aspergillus*.

El análisis de efectos off-target contra *Ananas comosus* resultó en 20 hits, que corresponden con las siguientes proteínas: **3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolasa-like protein 3, protein BTR1-like, mitochondrial coenzyme A transporter, mRNA-decapping enzyme-like protein, FAR1-RELATED SEQUENCE 6-LIKE, DNA replication complex GINS protein PSF2 y zinc finger protein CONSTANS-LIKE 13-like** (Figura 41). No representan un riesgo para la planta, pues no hay más de 19 pb alineadas de manera continua.

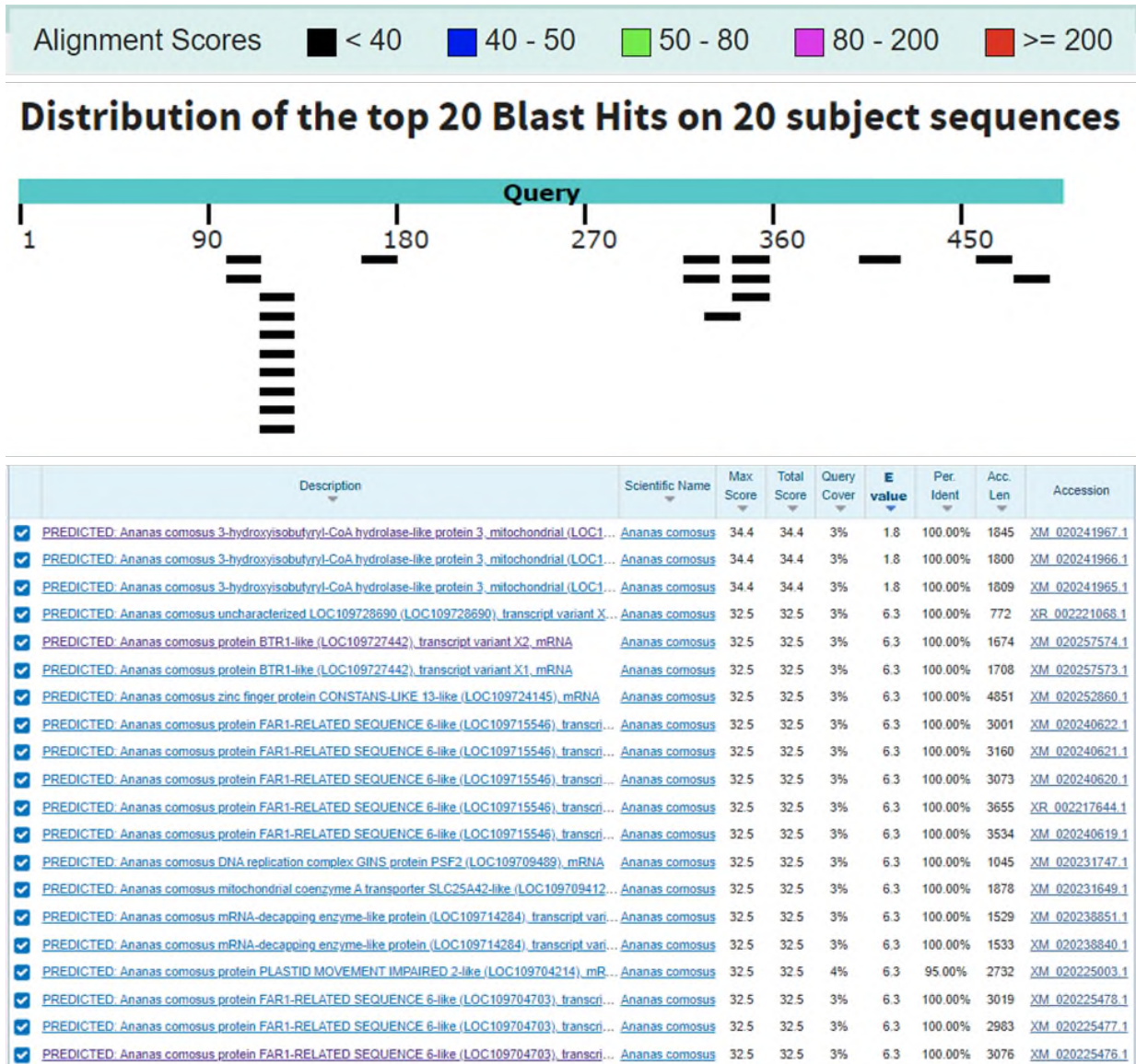


Figura 41. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Aspt en *Ananas comosus*.

En *Homo sapiens*, se encontraron 22 hits, pero sólo corresponden a 3 proteínas: **CD46 molecule transcript variant e, i, l, j, m, b, k, f, d, c, n, X8, X7, X6, X2 y X1**; **OR4K2 olfactory receptor family 4 subfamily K member 2** y **PIPOX pipecolic acid and sarcosine oxidase** (Figura 42). No representan riesgo para el humano, ya que se cuenta con un sistema inmune innato que reconoce dsRNA, además, los humanos tienen una larga historia de consumo de cantidades considerables de dsRNA en su dieta provenientes de plantas infectadas con algún virus, sin presentar efectos detectables (Fletcher *et al*, 2020).

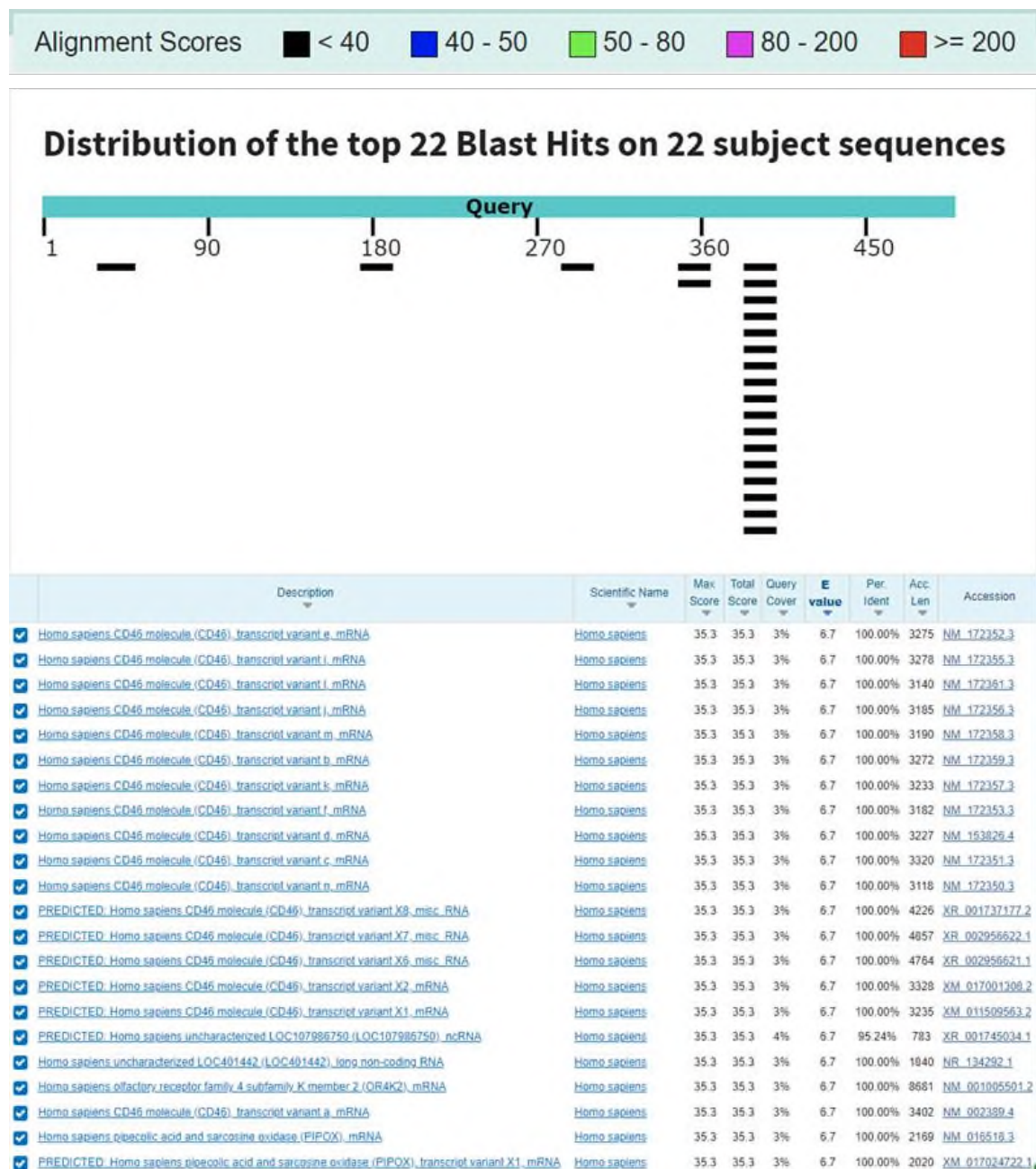


Figura 42. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Aspt en *Homo sapiens*.

En búsquedas que excluían al género *Aspergillus*, sólo se encontraron 5 hits en 4 especies: *Cryptococcus neoformans var. grubii* H99 hypothetical protein, NAD(P)-binding protein [*Cutaneotrichosporon oleaginosum*], acyl-CoA N-acyltransferase *Dothidotthia symphoricarpi* y hypothetical protein *Saprolegnia parasítica* (Figura 43). Ninguna de las especies mencionadas es de especial atención.

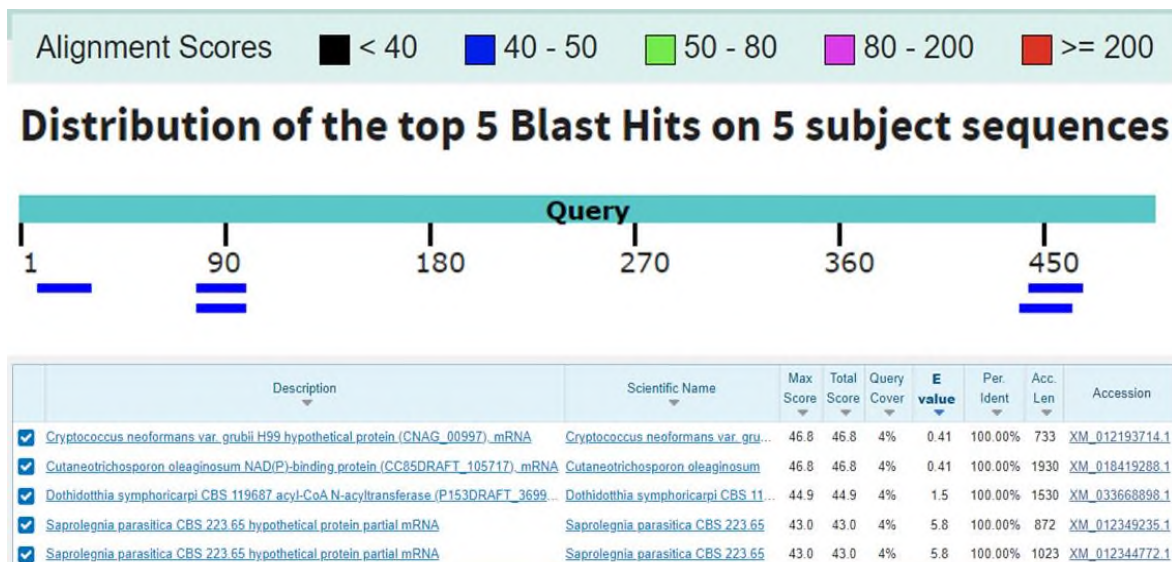


Figura 43. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Aspt que excluye al género *Aspergillus*.

El análisis de las secuencias de las zonas elegidas en los DCLs de *L. pseudotheobromae* vs el género *Lasiodiplodia* resultó en únicamente 2 hits en *L. theobromae*, siendo en los DCLs que se usaron para hacer predicción de DCL en *L. pseudotheobromae* (Figura 44).

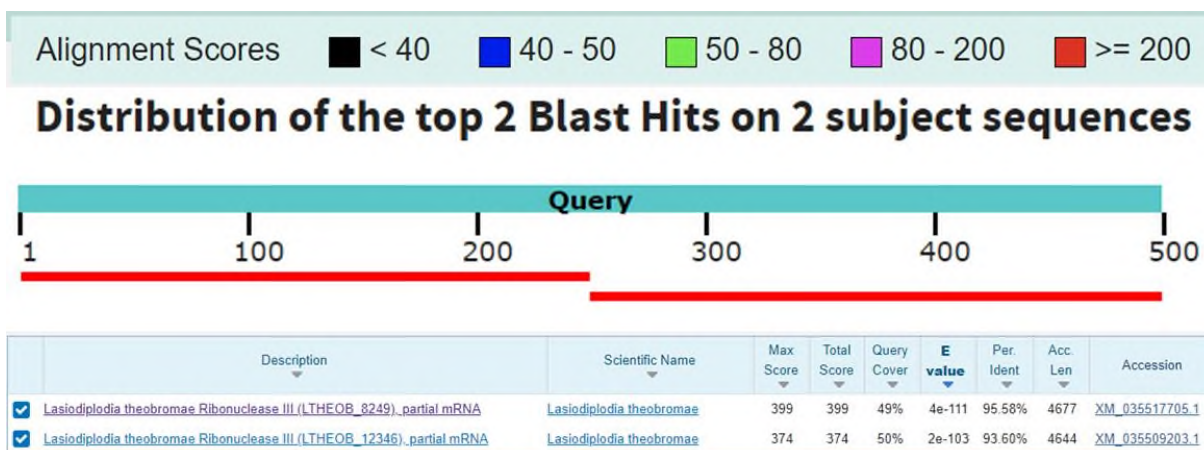


Figura 44. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Lpse en el género *Lasiodiplodia*.

El análisis en la planta de mango resultó en 19 hits que se concentraban en sólo 5 proteínas: **protein LONG AFTER FAR-RED 3**, **LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2**, **cyclin-dependent kinase G-2**, **GRAS family protein RAD1-like** y **chaperone protein ClpB-like** (Figura 45). No representa un riesgo para la planta, pues la especificidad es sólo en una pequeña zona de no más de 19 pb.



Figura 45. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Lpse en *Mangifera*.

En *Homo sapiens*, se encontraron 18 hits, y todos corresponden a la misma proteína: **AXDND1 axonemal dynein light chain domain containing 1** (Figura 46), sin embargo, no representa riesgo para el humano por las razones antes mencionadas.

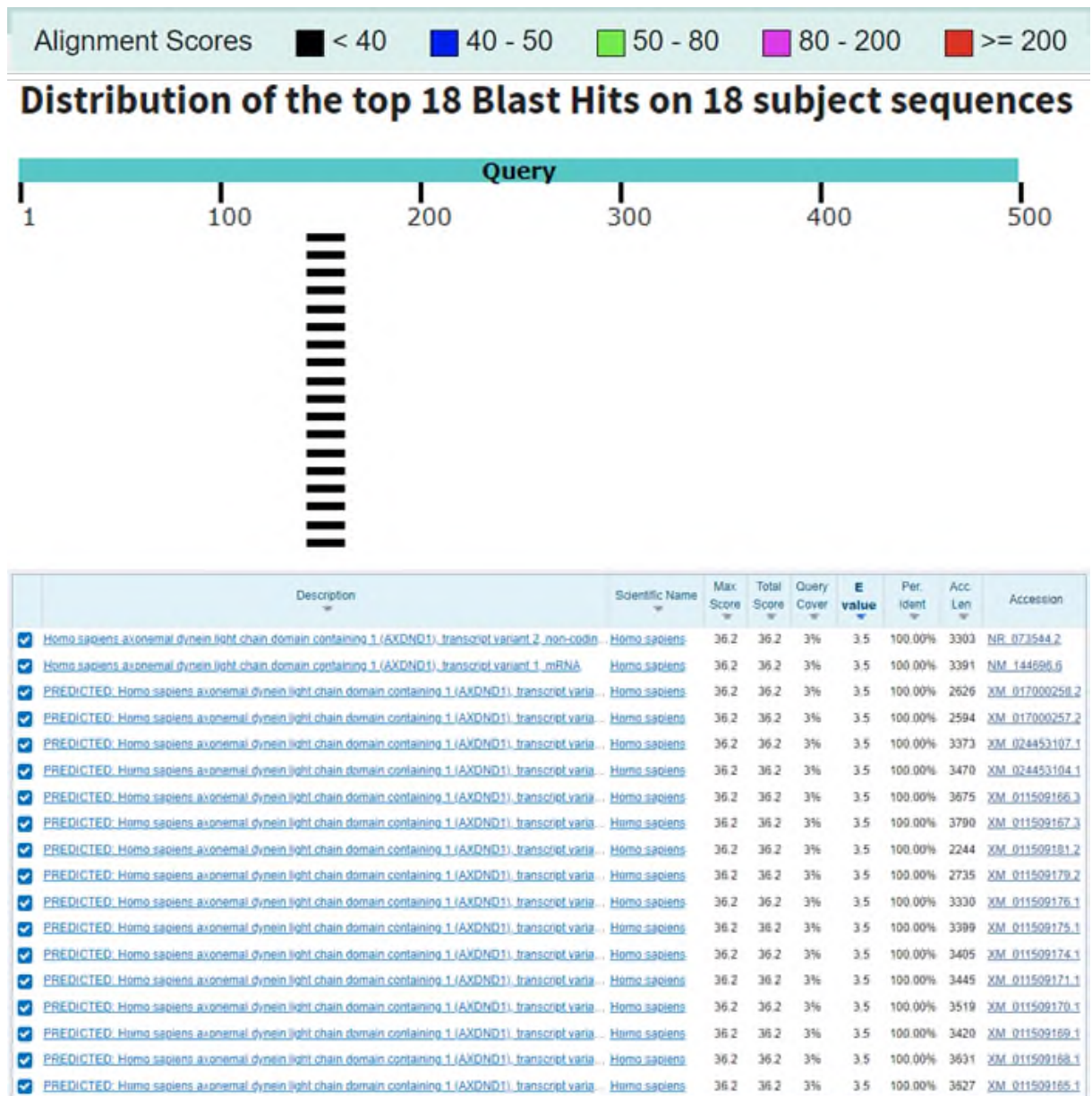


Figura 46. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Lpse en *Homo sapiens*.

Por último, el análisis excluyendo al género *Lasiodiplodia* resultó en 5 hits en dos especies: **MCF.2 cell line derived transforming sequence like (*Ochotona curzoniae*)** y **uncharacterized LOC110681528 (*Aedes aegypti*)** (Figura 47). Ninguna de las especies mencionadas es de preocupación.

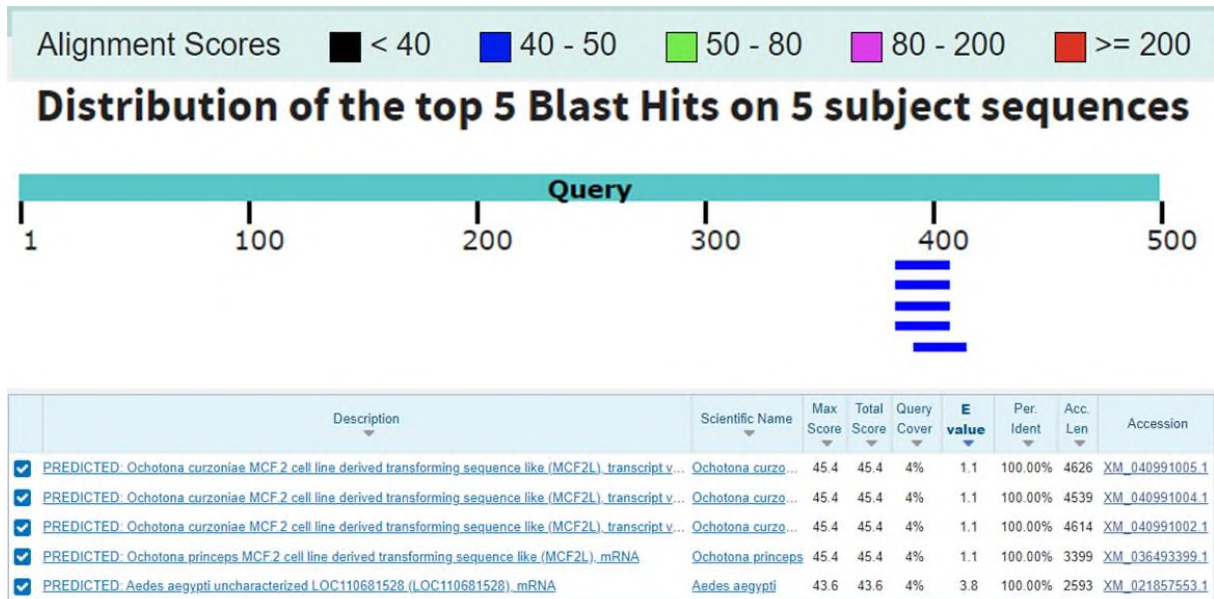


Figura 47. Resultados del análisis off-target del dsRNA-Lpse que excluye al género *Lasiodiplodia*.

En la la gran mayoría de los alineamientos, se notó que el E-value era alto. De acuerdo al NCBI, el E-value es el número de hits que se esperan ver por casualidad, esto es que un E-value de $1e^{-44}$ significa que se espera ver ese alineamiento $1e^{-44}$ veces por casualidad, es decir, no es debido al azar. Se puede entender que si el alineamiento no es por casualidad puede ser entonces por tener relación biológica, sin embargo, E-values bajos no necesariamente significa que sean secuencias homólogas, pero se puede inferir homología. El E-value también está en función de la longitud de la cadena y la longitud del emparejamiento.

8.5.3 Síntesis de dsRNAi

La síntesis de ldsRNAi de ambas construcciones se llevó a cabo satisfactoriamente, obteniéndose productos íntegros (Figura 48). Los rendimientos obtenidos para los RNAi se muestran en la Tabla 23. Las bandas se ven ligeramente más pesadas a lo que se espera (500 pb y 18-24 pb) de acuerdo al gel, pero esto es explicado debido a que el dsRNA exhibe menor movilidad electroforética con respecto del DNA.

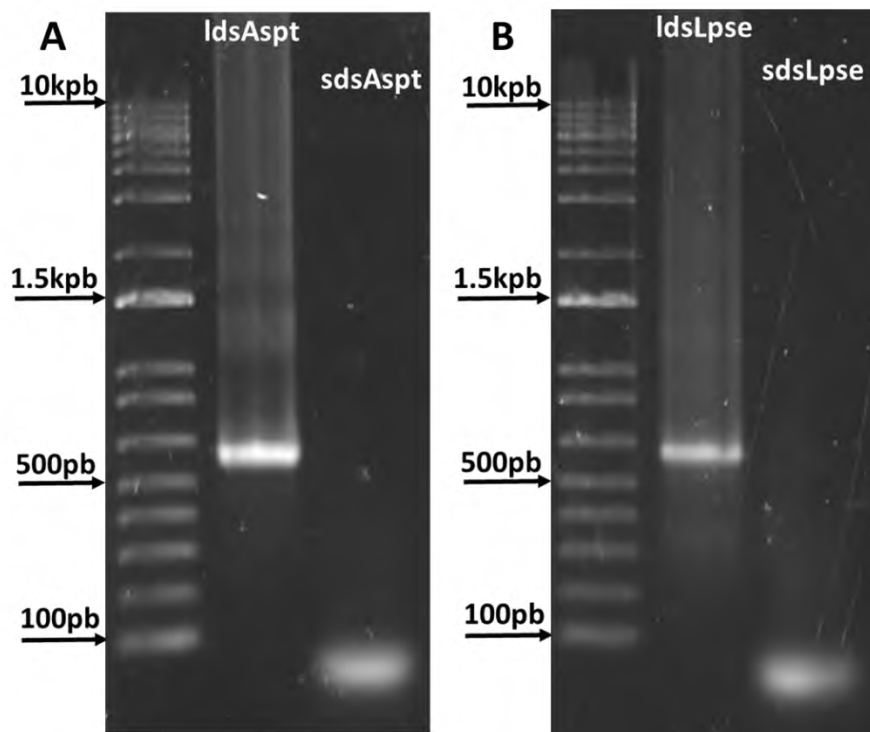


Figura 48. Gel de agarosa al 1% con RNAi largo y corto. A *A. tubingensis*. B *L. pseudotheobromae*. Las bandas arriba de 500 pb corresponden al ldsRNAi mientras que las manchas debajo de 100 pb corresponden a los sdsRNAi.

Tabla 23. Rendimientos de ldsRNAi y sdsRNAi.

Muestra	Concentración ng/ μ L	Rendimiento (μ g)
ldsAspt	950	950
sdsAspt	360	360
ldsLpse	447	447
sdsLpse	400	400

8.6 Bioensayos de la actividad fungicida de los dsRNAi

Los bioensayos de *A. tubingensis* sobre germinación de esporas en placas petri no mostraron diferencias significativas en el número de colonias germinadas entre el control y los tratamientos con diferentes concentraciones de dsRNAi, ni en ningún tipo de dsRNAi (ldsRNAi y sdsRNAi) (Figura 49; Tabla 24; Tabla 25).

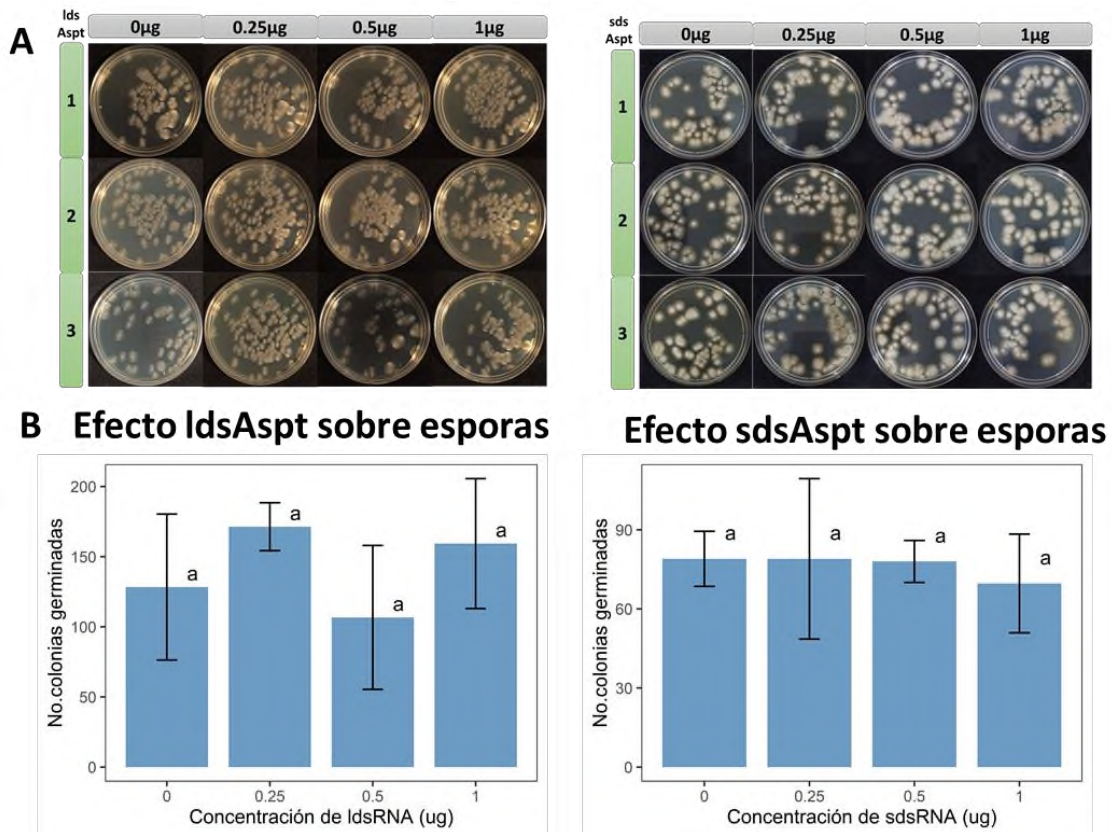


Figura 49. Bioensayo de inhibición de germinación de esporas. A Placas con crecimiento de esporas de *A. tubingensis*. B Gráfico de columnas del promedio número de colonias obtenidas para cada tratamiento. Las barras de error muestran la desviación estándar (\pm SD) de 3 réplicas biológicas.

Tabla 24. Número de colonias germinadas de *A. tubingensis*. Datos correspondientes a un experimento con 3 réplicas biológicas con diferentes concentraciones de ldsRNAi y sdsRNAi.

Cantidad de ldsRNA	No. De colonias			Promedio	DS	Tukey
0 µg	129	180	76	128.3333	52.0032	a
0.25 µg	160	163	191	171.3333	17.0977	a
0.5 µg	117	152	51	106.6667	51.2867	a
1 µg	212	141	125	159.3333	43.3069	a
Cantidad de sdsRNA	No. De colonias			Promedio	DS	Tukey
0 µg	72	91	74	79	10.4403	a
0.25 µg	59	64	114	79	30.4138	a
0.5 µg	75	87	72	78	7.9372	a
1 µg	91	62	56	69.6667	18.7171	a

Tabla 25. Análisis de varianza correspondiente al experimento de inhibición de germinación de esporas de *A. tubingensis*.

ANÁLISIS DE VARIANZA ldsAspt						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7784.25	3	2594.75	1.3355	0.3293	4.0661
Dentro de los grupos	15542.6666	8	1942.8333	F<F _{crit} No hay diferencia entre las medias		
Total	23326.9166					
ANÁLISIS DE VARIANZA sdsAspt						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	184.25	3	61.4167	0.1697	0.9138	4.0661
Dentro de los grupos	2894.6667	8	361.8333	F<F _{crit} No hay diferencias significativas entre las medias		
Total	3078.9167					

Estos resultados sugieren que DCL no es afectado en los estadios de germinación de espóra cuando crece en medio PDA, lo que puede ser explicado debido a la carencia de la interacción planta-patógeno que es importante para el fenómeno de entrecruzamiento de reinos de RNAi (Wang *et al*, 2017). Además se ha reportado que el procesamiento previo de dsRNAi por la planta mejora la eficiencia de silenciamiento (Song *et al*, 2018), sin embargo, otros autores muestran que dsRNAi dirigidos a genes involucrados en la germinación de esporas o formación del apesorio sí afectan la germinación de esporas y desarrollo del hongo (Mumbanza *et al*, 2013; Hu *et al*, 2020). No obstante, no se descarta la posibilidad de que DCL esté involucrado en la

patogénesis del hongo, pues resultados de otros autores muestran que aplicando dsRNAi contra DCL en sistemas *in vivo* reducen la patogenicidad de los hongos así como la progresión de la enfermedad que causan (Wang *et al*, 2016; Islam *et al*, 2020; Werner *et al*, 2020; Yin *et al*, 2020; Haile *et al*, 2021; Qiao *et al*, 2021), adicionalmente, se ha visto que la eficiencia de SIGS depende también de la capacidad del hongo de asimilar los dsRNA y procesarlos (Qiao *et al*, 2021). Para ensayos de germinación de espora se sugiere escoger genes involucrados en la formación de los tubos de germinación, formación de estructuras como el haustorio o apresorio, o de síntesis de componentes estructurales como quitina o ergosterol (Koch *et al*, 2016; Mumbanza *et al*, 2013).

Además, es importante resaltar que debido a la alta variabilidad en cuanto al número de colonias germinadas en los controles, es difícil atribuir diferencias de crecimiento en los tratamientos debidas al efecto de los dsRNAi. Se decidió realizar un ensayo *in vivo* usando como fruta modelo la uva, debido a la practicidad de manejo y fácil reproducción de la infección por *Aspergillus* como mostró Qiao, *et al* (2021). Para el ensayo, se inocularon en uvas 10 µL de sdsRNAi a 20 ng/µL o agua, se dejó reposar 24 h y posteriormente fueron inoculados 10 µL de una suspensión de esporas de *A. tubingensis* a 4×10^4 esp/mL, 24 h después de haber inoculado las esporas, se agregó una segunda dosis de 10 µL de sdsRNAi a 20 ng/µL o agua y al 5 dpi se cuantificó el diámetro de infección.

Los resultados del experimento (Tabla 26) mostraron una tendencia de inhibición en el tratamiento de sdsAspt con respecto al tratamiento control (Figura 50), habiendo diferencias significativas en el diámetro de infección, siendo menor en el grupo tratamiento (Tabla 27). Este resultado sugiere que *A. tubingensis* es susceptible al dsRNAi al igual que lo reportado por Qiao, *et al* (2021) con *A. niger*, adicionalmente se observó que los sdsRNAi promovieron un efecto de inhibición marcado a diferencia de ldsRNAi, sobretodo cuando hay dosis posteriores a la primera.

Tabla 26. Datos de diámetro de infección en uvas tratadas con sdsAspt.

Cantidad de sdsAspt	Diámetro de infección (cm)					Promedio	DS	TUKEY
0µg	0.98	0.75	1.10	0.88	0.75	0.892	0.1512	a
0.5µg	0.09	0.43	0.11	0.33	0.44	0.280	0.17	b

Tabla 27. Análisis de varianza correspondiente al experimento de efecto de sdsAspt en uvas.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.9364	1	0.9364	36.1738	0.000318	5.3176
Dentro de los grupos	0.2071	8	0.0259	F>F _{crit} Hay diferencias significativas entre las medias		
Total	1.14344	9				

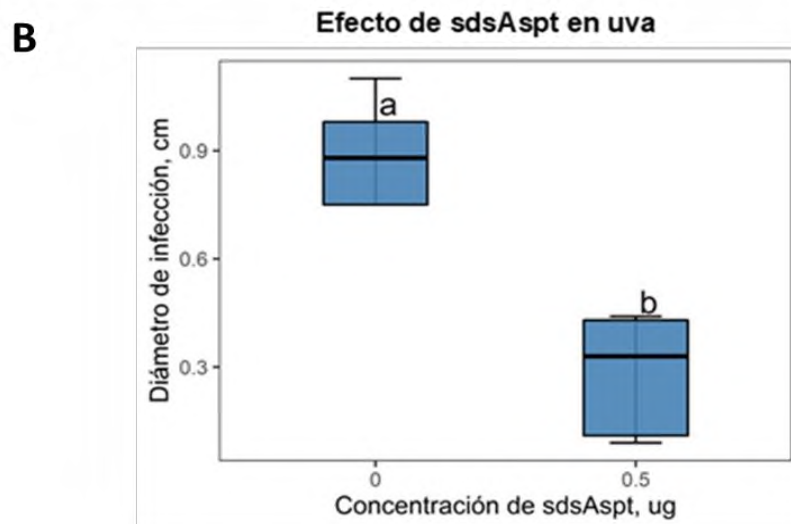


Figura 50. Efecto de sdsAspt sobre uvas. A diámetro de infección en uvas tratadas con sdsAspt y agua, se observan diferencias en el tamaño de la lesión. B Boxplot con los datos de diámetro de infección, se muestran las diferencias significativas con letras distintas.

Por otra parte, los resultados de los bioensayos de crecimiento de micelio de *L. pseudotheobromae* en medio líquido no mostraron diferencias significativas en el crecimiento entre el control y los tratamientos con diferente concentración de dsRNAi, ni en ningún tipo de dsRNAi (ldsRNAi y sdsRNAi) (Figura 51). Este resultado es consistente con lo observado por Islam *et al* (2020), pues muestra que la adición de “naked-dsRNA” contra los DCLs de *Botrytis fuckeliana* no genera cambios en su crecimiento, no así con la aplicación de “minicells” que contienen la misma construcción de dsRNAi los cuales sí provocaron un marcado efecto negativo en el desarrollo del hongo *in vitro*. Adicionalmente, el efecto *in vitro* de una sólo dosis de dsRNAi puede no ser suficiente para generar un efecto en el patógeno, como lo observado por Nerva *et al* (2020), quien mostró que la adicción de BcdsRNA-CYP51 cada 12 h en *Botrytis cinerea* provoca disminución del crecimiento del hongo *in vitro*.

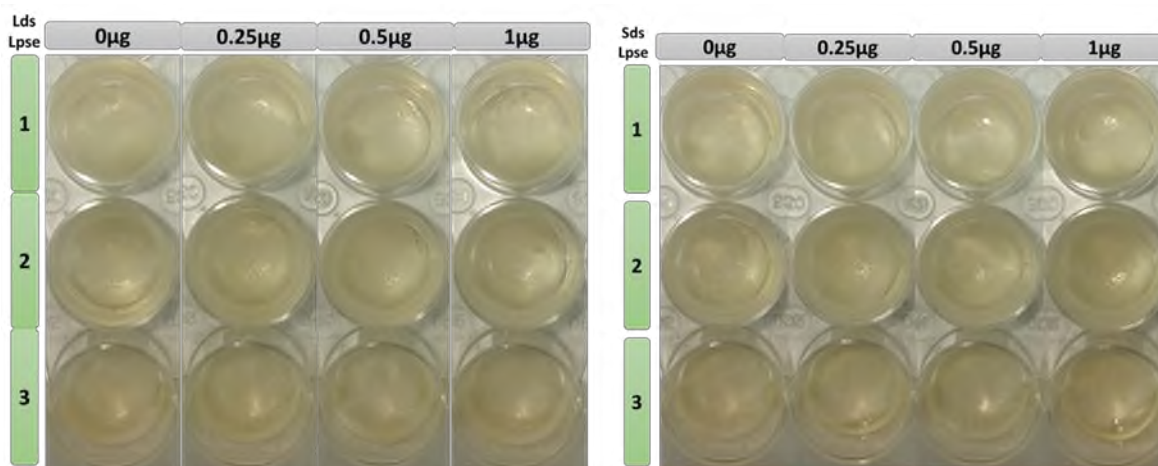


Figura 51. Bioensayo de crecimiento de micelio de *L. pseudotheobromae* en medio líquido adicionado con dsRNAi (ldsRNA y sdsRNA).

En conjunto con el resultado obtenido y ante la ausencia de formulaciones de encapsulamiento de dsRNAi, se optó por montar el patosistema mango-*L. pseudotheobromae* usando micelo ante la imposibilidad de producción de esporas, con una sola concentración de ldsRNA-Lpse (500 ng/µL). Se midió el porcentaje de área afectada del fruto y, nuevamente, los resultados del experimento no mostraron diferencias significativas en el desarrollo de la enfermedad entre el control y el tratamiento con ldsRNA-Lpse (Tabla 28, Tabla 29, Figura 52). Sin embargo, es necesario optimizar el patosistema a fin de determinar mejores parámetros para el

establecimiento de la infección, pues a pesar de que se logró inoculando micelo, la cantidad de inóculo tomada entre muestra y muestra puede variar debido a la naturaleza de la técnica, además de que algunos puntos de inoculación, tanto en los controles como en los tratamientos, no mostraron crecimiento del hongo, lo que genera ruido en la toma de medición y análisis estadístico. Otro parámetro a optimizar es las dosis de dsRNAi, pues se ha demostrado que subsecuentes aplicaciones a la dosis inicial refuerzan el efecto de SIGS a diferencia de los tratamientos de unidosis (Nerva, Sandrini, Gambino, & Chitarra, 2020).

Tabla 28. Porcentaje de área infectada en mango por *L. pseudotheobromae*. Los datos se recabaron tras medir el área infectada 5dpi usando el software ImageJ.

Cantidad de ldsRNA	%Área infectada				Promedio	DS	Tukey
0 µg	65.39	79.37	46.46	52.97	61.0475	14.5213	a
0.5 µg	63.02	49.97	0.37	78.45	47.95525	33.7900	a

Tabla 29. Análisis de varianza correspondiente al experimento de inhibición de crecimiento de micelio de *L. pseudotheobromae*.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	342.9580	1	342.9580	0.5070	0.5031	5.9873
Dentro de los grupos	4057.9041	6	676.3173	F < F _{crit} No hay diferencias significativas entre las medias		
Total	4400.8622					

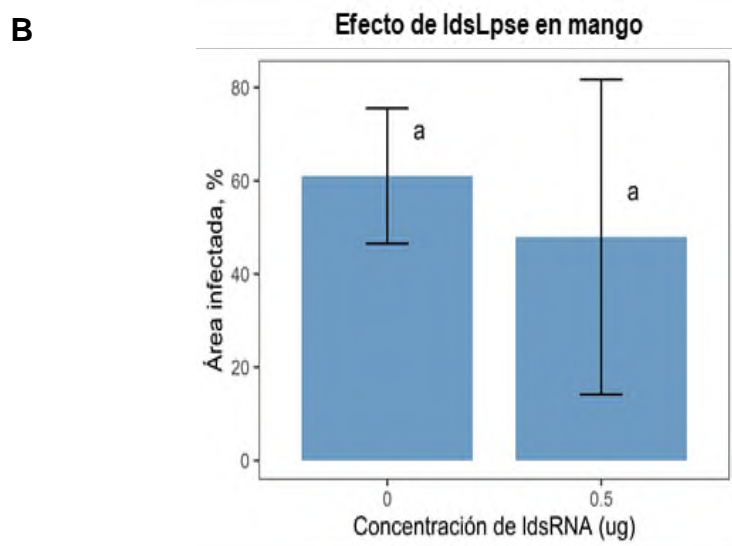
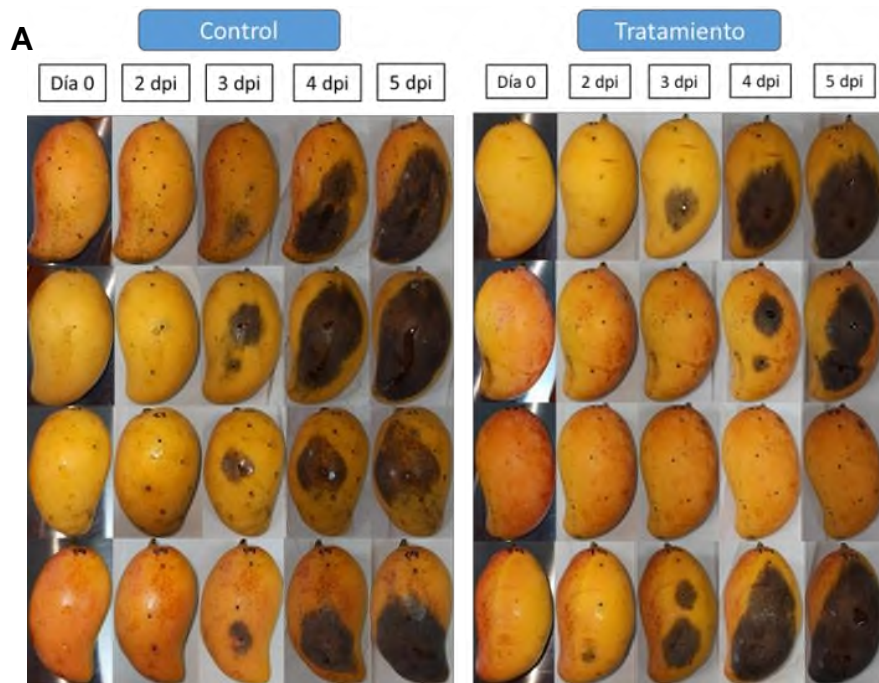


Figura 52. Ensayo *in vivo*. A área infectada por *L. pseudotheobromae* en mangos tratados con agua y dsRNA-Lpse. A Progresión de la enfermedad en mango tras 5 dpi. B Gráfico de barras que muestra el promedio de área infectada en mango. Las barras de error muestran la desviación estándar (\pm SD) de 4 réplicas biológicas.

9. Conclusiones

De acuerdo a la información genómica reportada en bases de datos, se logró la identificación de 3 secuencias DCL en *Aspergillus tubingensis* y 2 secuencias DCL en *Lasiodiplodia pseudotheobromae* a partir de predicciones con los DCLs de *L. theobromae*. Para *Anthracocestis cenchri*, se logró amplificar una secuencia probable de DCL a partir del diseño de primers degenerados usando secuencias DCL de especies cercanas, sin embargo es necesario más investigación enfocada en recabar su información genómica.

Mediante primers diseñados en regiones de baja homología entre los DCLs fúngicos y de las plantas huésped, se logró amplificar 2 de las 3 secuencias DCL en *A. tubingensis*, así como las 2 secuencias DCL de *L. pseudotheobromae*. Ambos pares fueron fusionados en una quimera de DNA mediante 3 PCRs secuenciales, adicionadas con el promotor T7 en ambos extremos, ligadas en el vector p-GEM T-easy y confirmadas por secuenciación. Las construcciones sirvieron de molde para la síntesis de ldsRNAi y sdsRNAi de buena calidad. Las secuencias escogidas no tienen off-targets significativos en las plantas huésped ni en otros organismos, de acuerdo a las predicciones bioinformáticas.

Los resultados de los bioensayos *in vitro* no mostraron reducción de la enfermedad para ningún patógeno, lo que sugiere que DCL no es esencial para la germinación de esporas en condiciones *in vitro*, ni el crecimiento del hongo en medio líquido.

Por otro lado, los resultados de pruebas *in vivo* usando uvas sugiere que *A. tubingensis* es susceptible al dsRNAi, pues se observó una tendencia de disminución de desarrollo de lesión con dos dosis de sdsRNAi. Así mismo, el ensayo *in vivo* de *L. pseudotheobromae* en mango no resultó en reducción de la enfermedad, sin embargo, es necesario estandarizar los ensayos *in vivo* para ambos hongos, a fin de conocer si los dsRNAi diseñados pueden ofrecer un mayor efecto de protección en los frutos.

10. Perspectivas

Con los resultados recabados en esta tesis, se quedan abiertos nuevos puntos de vista por resolver. Empezando con *Anthracoystis cenchri*, cuya secuencia amplificada con primers degenerados deberá ser clonada y secuenciada para conocer la secuencia y poder diseñar dsRNAi sobre su DCL. Es necesario mayor trabajo de nivel molecular que permita la identificación de nuevas secuencias DCL en su genoma, así como de otros blancos moleculares. El siguiente paso en futuras investigaciones con las construcciones hechas en el presente trabajo, será la estandarización del establecimiento de la infección en los frutos huésped, o en modelos que permitan la recolección de datos de forma sencilla.

Es necesario optimizar parámetros como la dosis efectiva de dsRNAi, estudiar el efecto de aplicaciones posteriores en el sistema *in vivo*, así como cuestiones de durabilidad del dsRNAi en el ambiente o formulaciones que protejan del efecto de nucleasas ambientales o fotodegradación por rayos UV, alargando su vida media. Otra forma de conocer los efectos de silenciamiento sería realizando RT-qPCR para determinar si el nivel de abundancia de los transcritos de DCL disminuye con los tratamientos de dsRNAi. Es importante resaltar que el patógeno *Aspergillus tubingensis* tiene potencial en SIGS, pues se ha demostrado que *Aspergillus niger*, una especie muy cercana, es capaz de absorber dsRNAi además de ser susceptible a SIGS (Qiao *et al*, 2021).

En caso de que la construcción presentada no tenga efectos de reducción de severidad de la enfermedad, todavía se pueden abordar otras estrategias como un diseño de dsRNAi sobre otras regiones de los DCLs, como puede ser el dominio Helicase C-terminal, o bien, con un diseño más largo, pues se ha reportado que mayores tamaños de ldsRNAs pueden generar una mayor cantidad de siRNAs efectivos en el silenciamiento (Höfle *et al*, 2019). Adicionalmente, es conveniente mantener la estrategia de fusión de ambos genes, pues también se ha demostrado que diseños que vayan dirigidos a más de un gen aumentan su efectividad, ya sea fusionados (Koch *et al*, 2019) o en combinación por dsRNAs individuales (Yang *et al*, 2021). También se puede abordar la elección de genes implicados en procesos como síntesis de componentes estructurales esenciales, como ergosterol o quitina, los cuales a su vez son encontrados sólo en hongos, por lo que se prevé no tengan efectos off-targen en plantas.

Es necesario mayor conocimiento sobre cómo son entregados los dsRNAi a los patógenos, por qué en algunos patosistemas funcionan mejor que en otros, cuáles son los mecanismos moleculares de consumo, procesamiento y translocación de los mismos, para poder hacer posible las aplicaciones en campo (Pereira & Koch, 2021), así como también conocer si puede tener implicaciones negativas en el ambiente.

Con base en lo conocido hasta ahora, el uso dsRNAi aplicado en SIGS tiene un gran potencial para funcionar como estrategia de protección de cultivos de forma amigable con el ambiente, sin embargo, todavía estamos en una posición lejana a la comercialización y aplicación en campo, no obstante, con el constante desarrollo de esta tecnología cada vez nos acercamos más a la nueva generación de biofungicidas.

11. Referencias

- (SIAP), S. d., & (SADER), S. d. (2020). *Panorama agroalimentario 2020*. Obtenido de https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020
- Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios. (2016). Almacenamiento en México. *Claridades Agropecuarias*(271). Recuperado el 12 de Enero de 2021, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/185452/revista_271.pdf
- APS. (13 de Enero de 2021). *What are Fungicides?* Recuperado el 10 de Julio de 2021, de <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Pages/Fungicides.aspx>
- Barrera-Figueroa, B., Wu, Z., & Liu, R. (2012). Abiotic stress-associated microRNAs in plants: Discovery, expression analysis, and evolution. *Frontiers of biology*, *8*(2), 189–197. doi:10.1007/s11515-012-1210-6
- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F.-M., Palmquist, J., . . . Jin, H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, *360*(6393), 1126–1129. doi:10.1126/science.aar4142
- Choi, J., Kim, K.-T. J., Wu, J., Song, H., & Asiegbe, F. O. (2014). funRNA: a fungi-centered genomics platform for genes encoding key components of RNAi. *BMC Genomics*, *15*. doi:10.1186/1471-2164-15-S9-S14
- COLEACP, P. c. (2011). Biological control and integrated crop protection. *COLEACP PIP training manuals*. COLEACP. Recuperado el 31 de Enero de 2021, de https://training.coleacp.org/pluginfile.php/4150/mod_data/content/30395/coleac001-pip-module-10-uk-pp.pdf
- Duanis-Assaf, D., Galsurker, O., Davydov, O., Maurer, D., Feygenberg, O., Sagi, M., . . . Alkan, N. (2021). Double-stranded RNA targeting fungal ergosterol biosynthesis pathway controls *Botrytis cinerea* and postharvest grey mould. *Plant Biotechnology Journal*, *20*, 226-237. doi:10.1111/pbi.13708
- EMBL-EBI. (15 de Enero de 2021). *T-Coffee*. Obtenido de <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>
- Fletcher, S. J., Reeves, P. T., Hoang, B. T., & Mitter, N. (2020). A perspective on RNAi-based biopesticides. *frontiers*, *11*(51). doi:10.3389/fpls.2020.00051
- Gobierno de México. (12 de Enero de 2020). *Oaxaca, sólido productor agrícola y gastronómico*. Recuperado el 9 de Julio de 2021, de <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/oaxaca-solido-productor-agricola-y-gastronomico>

- Guo, J.-W., Gao, Y., Li, C., Yang, L.-F., Tian, X.-J. H., Kong, Q., . . . Li, W.-J. (2017). First Report of Leaf Spot Disease Caused by *Aspergillus tubingensis* on *Jatropha curcas* in Yunnan, China. *Plant Disease*. doi:10.1094/PDIS-08-16-1183-PDN
- Haile, M. Z., Gebremichael, D. E., Capriotti, L., Molesini, B., Negrini, F., Collina, M., . . . Baraldi, E. (2021). Double-stranded RNA targeting Dicer-Like genes compromises the pathogenicity of *Plasmopara viticola* on grapevine. *Frontiers*, *12*(667539). doi:10.3389/fpls.2021.667539
- Hall, T. A. (1999). *BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT*. (Vol. 41). Nucleic Acids Symposium Series.
- Höfle, L., Biedenkopf, D., Werner, B. T., Shrestha, A., Jelonek, L., & Koch, A. (2019). Study on the efficiency of dsRNAs with increasing length in RNA-based silencing of the *Fusarium* CYP51 genes. *RNA Biology*, *17*(4), 463-473. doi:10.1080/15476286.2019.1700033
- Hu, D., Chen, Z.-Y., Zhang, C., & Ganiger, M. (2020). Reduction of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean through host- and spray-induced gene silencing. *Molecular Plant Pathology*, *794-807*. doi:10.1111/mpp.12931
- Huang, C.-Y., Wang, H., Hu, P., Hamby, R., & Jin, H. (2019). Small RNAs- Big players in Plant-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe*, *26*, 173-182. doi:10.1016/j.chom.2019.07.021
- IFPRI. (12 de Enero de 2021). *FOOD SECURITY*. Recuperado el 9 de Julio de 2021, de <https://www.ifpri.org/topic/food-security#:~:text=Food%20security,%20as%20defined%20by,an%20active%20and%20healthy%20life>.
- Islam, M. T., Davis, Z., Chen, L., Englaender, J., Zomorodi, S., Frank, J., . . . Sherif, S. M. (2020). Minicell-based fungal RNAi delivery for sustainable crop protection. *Microbial biotechnology*, *14*(4), 1847-1856. doi:10.1111/1751-7915.13699
- Kabaktepe, Ş., Akata, I., & Akgül, H. (2016). A New Anthracocystis (Ustilaginales) Record for Turkey. *Hacetatepe J. Biol. & Chem.*, *44*(1), 21-24. doi:10.15671/HJBC.20164417562
- Kalyandurg, P. B., Sundararajan, P., Dubey, M., Ghadamgahi, F., Zahid, M. A., Whisson, S. C., & Vetukurri, R. R. (2021). Spray-Induced Gene Silencing as a Potential Tool to Control Potato Late Blight Disease. *Phytopathology*, *111*, 2168-2175. doi:10.1094/PHYTO-02-21-0054-SC
- Kettles, G., & Luna, E. (2019). Food Security in 2044: How do we control the fungal threat? *Fungal Biology*, *123*(8), 558-564. doi:10.1016/j.funbio.2019.04.006
- Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Rossbach, O., Abdellatif, E., . . . Kogel, K.-H. (2016). An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. *PLOS Pathogens*, *10*(12). doi:An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery

- Koch, A., Höfle, L., Werner, B. T., Imani, J., Schmidt, A., Jelonek, L., & K-H., K. (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. doi:10.1111/mpp.12866
- Lian, L., Li, H., Zhou, L., & Chen, F. (2019). *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causes stem canker of Chinese hackberry in China. *Journal of Forestry Research*, *31*(6), 2571-2580. doi:10.1007/s11676-019-01049-x
- Marques, M. W., Lima, N. B., de Moraes Jr, M. A., G Barbosa, M. A., Souza, B. O., Michereff, S. J., . . . Câmara, M. J. (2013). Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*, 181-193. doi:10.1007/s13225-013-0231-z
- McLoughlin, A. G., Wytinck, N., Walker, P. L., Girard, I. J., Rashid, K. Y., Kievit, T., . . . Belmonte, M. F. (2018). Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports*, *8*(7320). doi:10.1038/s41598-018-25434-4
- McTaggart, A. R., Shivas, R. G., Geering, A. D., Vánky, K., & Scharaschkin, T. (2012). A review of the *Ustilago-Sporisorium-Macalpinomyces* complex. *Persoonia*, *29*, 55-62. doi:10.3767/003158512X660283
- McTaggart, A. R., Shivas, R. G., Geering, A. D., Vánky, K., & Scharaschkin, T. (2012). Taxonomic revision of *Ustilago*, *Sporisorium* and *Macalpinomyces*. *Persoonia*, *29*, 116-132. doi:10.3767/003158512X661462
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L., . . . Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, *49*, 412-419. doi:10.1093/nar/gkaa913
- Mosa, M. A., & Youssef, K. (2021). Topical delivery of host induced RNAi silencing by layered double hydroxide nanosheets: An efficient tool to decipher pathogenicity gene function of *Fusarium crown and root rot* in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *115*(101684). doi:10.1016/j.pmp.2021.101684
- Mumbanza, F. M., Kiggundu, A., Tusiime, G., Tushemereirwe, W. K., Niblett, C., & Bailey, A. (2013). In vitro antifungal activity of synthetic dsRNA molecules against two pathogens of banana, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Manag Sci*, *69*, 1155-1162. doi:10.1002/ps.3480
- Munirah, M. S., Yong, S. Y., & Ain Izzati, M. Z. (2017). Characterization of *Lasiodiplodia theobromae* and *L. pseudotheobromae* causing fruit rot on pre-harvest mango in Malaysia. *Plant Pathology & Quarantine*, *7*(2), 202-213. doi:10.5943/ppq/7/2/14
- Nerva, L., Sandrini, M., Gambino, G., & Chitarra, W. (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(200). doi:10.3390/biom10020200
- OEC. (2021). OEC. Recuperado el 9 de Julio de 2021, de <https://staging.oec.world/en/profile/hs92/tropical-fruits#exporters-importers>
- Palmer, M. G., Mansouripour, S. M., Blauer, K. A., & Holmes, G. J. (2019). First report of *Aspergillus tubingensis* causing strawberry fruit rot in California. *Plant Disease*, 103. doi:10.1094/PDIS-05-19-0978-PDN
- Peng, D., Li, S., Wang, J., Chen, C., & Zhou, M. (2013). Integrated biological and chemical control of rice sheath blight by *Bacillus subtilis* NJ-18 and jinggangmycin. *Pest Management Science*, 70. doi:10.1002/ps.3551
- Pereira, A., & Koch, A. (2021). Lab-to-field transition of RNA spray applications- How far are we? *Frontiers*, 12(755203). doi:10.3389/fpls.2021.755203
- Perrone, G. S., Cozzi, G., Ehrlich, K., Vargara, J., Frisvad, J. C., Meijer, M., . . . Samson, R. A. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in mycology*, 59, 53-66. doi:10.3114/sim.2007.59.07
- Piątek, M., Lutz, M., & Yorou, N. S. (2015). A molecular phylogenetic framework for *Anthracoctystis* (Ustilaginales), including five new combinations (inter alia for the asexual *Pseudozyma flocculosa*), and description of *Anthracoctystis grodzinskae* sp. nov. *Mycological Progress*, 14(88), 1-15. doi:10.1007/s11557-015-1114-3
- Picos, P., García-Estrada, R., León-Félix, J., Sañudo Barajas, J. A., & Allende, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(1), 54-74.
- Piepenbrin, M. (2002). Annotated check list and key for smut fungi in Colombia. *Caldasia*, 24, 103-119. doi:10.1071/AP07036.
- Qiao, L., Lan, C., Capriotti, L., Ah-Fong, A., Sanchez, N. J., Hambry, R., . . . Jin, H. (2021). Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake . *Plant Biotechnology Journal*, 19, 1756-1768. doi:10.1111/pbi.13589
- Rouabhi, R. (2010). Introduction and Toxicology of Fungicides. En O. Carisse, *Fungicides* (págs. 363-382). InTech. doi:10.13140/RG.2.1.2099.9125
- RStudioTeam. (2022). RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA.
- Ruiz-Jiménez, L., Polonio, A., Vielba-Fernández, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2021). Gene Mining for Conserved, Non-Annotated Proteins of *Podosphaera xanthii* Identifies Novel Target Candidates for Controlling Powdery Mildews by Spray-Induced Gene Silencing. *Journal of fungi*, 7(735). doi:10.3390/jof7090735

- 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., & Roy-Barman, S. (2021). Spray-Induced Silencing of Pathogenicity Gene MoDES1 via Exogenous Double-Stranded RNA Can Confer Partial Resistance Against Fungal Blast in Rice. *Frontiers*, *12*(733129). doi:10.3389/fpls.2021.733129
- Schneider, C., Rasband, W., & Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*, 671-675. doi:doi.org/10.1038/nmeth.2089
- Song, X., Gu, K.-X., Duan, X.-X., Xiao, X.-M., Duan, Y., Wang, J.-X., & Yu, N. (2018). Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. *Molecular Plant Pathology*, *19*(12), 2543–2560. doi:10.1111/mpp.12728
- Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Unraveling the mechanisms used by antagonistic yeast to control postharvest pathogens on fruit. *Acta Horticulturae*, 63-70. doi:10.17660/ActaHortic.2016.1144.9
- Sundaresha, S., Sharma, S., Bairwa, A., Tomar, M., Kumar, R., Bhardwaj, V., . . . Chakrabarti, S. K. (2021). Spraying of dsRNA molecules derived from *Phytophthora infestans*, as an effective plant protection strategies for the management of potato late blight. *Preprints*. doi:10.20944/preprints202102.0280.v1
- UniProt Consortium. (15 de Enero de 2021). *UniProt*. Obtenido de <https://www.uniprot.org/>
- Wang, M. &, Lin, F.-M., Thomma, B., Huang, H.-D., & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature plants*, *2*(10). doi:10.1038/nplants.2016.151
- Wang, M., & Dean, R. A. (2019). Movement of small RNAs in and between plants and fungi. *Molecular Plant Pathology*, *21*, 589-601. doi:10.1111/mpp.12911
- Wang, M., Thomas, N., & Jin, H. (2017). Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection. *ELSEVIER*, 133-141. doi:10.1016/j.pbi.2017.05.003
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., . . . Jin, H. (2013). Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. *Science*, *342*(6154), 118-123. doi:10.1126/science.1239705
- Werner, B. T., Gaffar, Y. F., Schuemann, J., Biedenkopf, D., & Koch, M. A. (2020). RNA-Spray-Mediated Silencing of *Fusarium graminearum* AGO and DCL Genes improve disease resistance. *Frontiers*, *11*(476). doi:10.3389/fpls.2020.00476
- Yang, P., Yi, S.-Y., Nian, J.-N., Yuan, Q.-S., He, W.-J., Zhang, J.-B., & Liao, Y.-C. (2021). Application of Double-Strand RNAs Targeting Chitin Synthase, Glucan Synthase, and Protein Kinase

Reduces *Fusarium graminearum* Spreading in Wheat. *Frontiers*, 12(660976). doi:10.3389/fmicb.2021.660976

Yin, C., Zhu, H., Jiang, Y., Shan, Y., & Gong, L. (2020). Silencing DICER-LIKE genes reduces virulence and sRNA Generation in *Penicillium italicum*, the cause of Citrus Blue Mold. *Cells*, 9(363). doi:10.3390/cells9020363

Zhao, J., Liu, W., Liu, D., Lu, C., Zhang, D., Wu, H., . . . Meng, L. (2018). Identification and evaluation of *Aspergillus tubingensis* as a potential biocontrol agent against grey mould on tomato. *Journal of General Plant Pathology*, 84, 1-12. doi:10.1007/s10327-018-0764-9

Zhu, C., Liu, T., Chang, Y.-N., & Duan, C.-G. (2019). Small RNA Functions as a Trafficking Effector in Plant Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11). doi:10.3390/ijms20112816

Anexo 1. Preparación y composición de soluciones y reactivos y protocolos

1. ddH₂O + DEPC (1L)

Se desioniza 1L de agua destilada y se agrega 1mL de DEPC (Sigma, D5758), se mantiene en agitación toda la noche. Esterilizar 15min a 15lb/in² a 121°C. Almacenar a temperatura ambiente.

2. Buffer TAE 50X (500mL)

- Tris-base 121g
- Ácido acético glacial 28.55mL
- Ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 0.5M 50mL

Disolver el Tris, EDTA y ácido acético en ddH₂O + DEPC, se ajusta a pH 8.0 y se afora a 500mL. Se almacena a 4°C.

3. Buffer MOPS (500mL)

- MOPS 20.927g
- EDTA 0.5M 10mL
- Acetato de sodio 5.44g
- NaOH 1N para ajuste de pH

Disolver el acetato de sodio en ddH₂O + DEPC. Adicionar al MOPS y disolver. Agregar el EDTA y ajustar a pH 7.0 con NaOH. Aforar a 500mL.

4. Solución de Lisis

- Tris-HCl 50mM
- SDS 3% v/v
- EDTA 50mM
- Mercaptoetanol 1% v/v

5. Gel de Agarosa 1% con buffer TAE (100mL)

- Agarosa 1g
- Buffer TAE 1X 100mL

Calentar la mezcla sin hervir hasta que la agarosa se haya derretido completamente.

6. Gel de Agarosa 1% con Buffer MOPS (100mL)

- Agarosa 1g
- Formaldehído 18mL
- Buffer MOPS 10X 10mL
- ddH₂O + DEPC cbp 100mL

Disolver la agarosa en ddH₂O + DEPC, dejar enfriar un poco y agregar el resto de los componentes. Almacenar a temperatura ambiente.

7. Solución I (10mL)

- Tris-HCl 1M 0.25mL
- ddH₂O + DEPC cbp 10mL
- EDTA 0.5M 0.2mL

Mezclar los componentes y guardar a 4°C.

8. Solución II (200µL)

- NaOH 10N 4µL
- ddH₂O + DEPC cbp 200µL
- SDS 10% 20µL

9. Solución III (10mL)

- Acetato de potasio 5M 6mL
- ddH₂O + DEPC cbp 10mL
- Ácido acético glacial 1.15mL

Mezclar los componentes y almacenar a 4°C.

10. Medio de cultivo LB Sólido (100mL)

- Extracto de levadura 0.5g
- Agar bacteriológico 6g
- Peptona de caseína 1g
- ddH₂O + DEPC cbp 100mL
- NaCl 1g

En un matraz vaciar el agua y en agitación agregar los componentes hasta disolver bien. Esterilizar 15min a 15lb/

in2 a 121°C. Enfriar a 40-50°C y agregar 100µL ampilina 100mg/mL.

11. Vector de clonación p-GEM T-easy

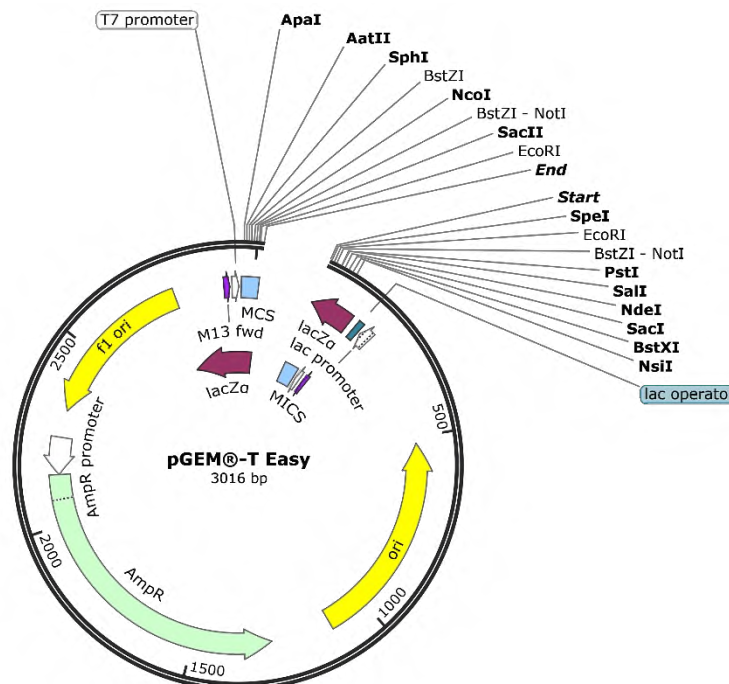


Ilustración a. Estructura del vector p-GEM T-easy. Se muestran las enzimas de restricción que se encuentran en el sitio de clonaje múltiple (MCS). NotI, enzima usada en el trabajo, corta flanqueando el sitio de clonación.

12. Extracción de plásmido por el método de lisis alcalina

Vaciar el cultivo bacteriano en tubos de 1.5mL y centrifugar a 12krpm x 2min. Vaciar gentilmente el sobrenadante por decantación, dejando el pellet bacteriano sin líquido. Resuspender el pellet en 100µL de Solución I y agitar por vórtex vigorosamente. Meter la mezcla en hielo.

Agregar 200µL de la Solución II recién preparada al pellet y mezclar por inversión 10 veces, poner seguidamente en hielo. Añadir 150µL de Solución III, cerrar y dispersar la solución mediante inversión varias veces; poner en hielo 5min.

Centrifugar el lisado bacteriano a 12krpm x 5min a 4°C. Transferir el sobrenadante a tubos nuevos. Agregar un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, mezclar por vórtex y centrifugar a 12krpm x 2min a 4°C. Transferir la capa superior acuosa a un tubo nuevo.

Precipitar el plásmido añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente. Mezclar por vórtex y dejar reposar 2min a temperatura ambiente. Centrifugar el plásmido a 12krpm x 5min a 4°C. Se obtiene un pellet blanquecino.

Remover el sobrenadante por aspiración gentil. Se lava el pellet con 1mL de etanol al 70% y mezclar por inversión. Centrifugar a 12krpm x 2min a 4°C. Remover el sobrenadante por aspiración gentil. Dejar secar a temperatura ambiente.

Resuspender el pellet en 30µL de ddH₂O + DEPC, incubar con RNAsa 30min a 37°C, inactivar a 65°C y almacenar a -20°C.

Anexo 2. Secuencias de DCL en aminoácidos y nucleótidos

Aspergillus tubingensis

Taxonomía

- Dominio: Eukaryota
- Reino: Fungi
- Filo: Ascomycota
- Clase: Eurotiomycetes
- Orden: Eurotiales
- Familia: Trichocomaceae
- Género: *Aspergillus*
- Especie: *A. tubingensis*

DCL1

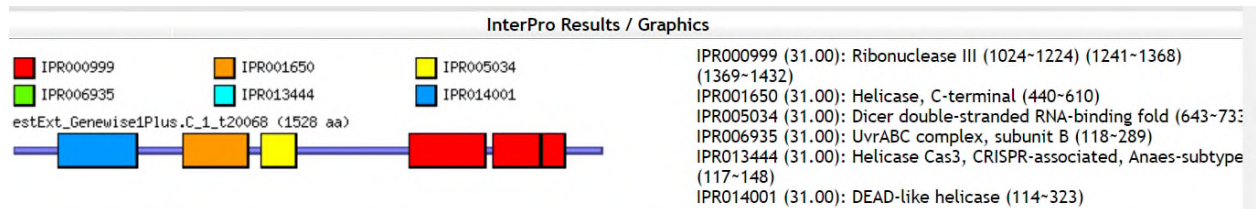


Ilustración b. Estructura de DCL1 de *A. tubingensis*. Imagen recuperada de funRNA.

Nota: En gris se resaltan las zonas usadas para el diseño del RNAi.

>Aspt_DCL1_Protein_Sequence

MPPAHASNMGVNSDLHGPDQNLVETIKGRAVTMTEDI LQEDDRSSDESNDHEHEDQIIAGVSQQRI TQNAKFKDLLAQRADSGPIH
 DAKVTHDLPNAQLSTAHLIAKQDLGIGTLDPREYQLEL FERAKA QNTIAVLDTGSGKTLIAVLLKHTLEKELNDRAEGKQHRIAFF
 LVDSVTLAYQQA AVLRRNLDQSVGHFFGAMGTDLWSKSVWEQH FQKNMVICTAEILNQCLLNSYVKMSQINLLI FDEAHTTKDHP
 YARI IRESYLEEDPSKRPRIFGMTASPIDTKGDIVDEATRLEKLLDSRIATTSNMSLLRQVVRPVERVWVSNRLEQPFATSLYKQL
 EDRFGDMACLEGIFRFAWQASSELGRWCSDRAWARALADDVLPKLEGNVRKTANSETSSDVPESAYKEILRITEASEIVKGYEFSSP
 EAFGQLSPKVQVLRRELVHYFGRPTEKCI VFTQKRYTALILSELFQTLNVPFLRPGVLI GVRSGDLAGMNITFRQQFI SLVKFRGTG
 E INCLFATSVAAEGLDIPDCNLVVRFDLYQTLIQYVQSRGRARHFNSTYASMVERGNLDHEQRLLEVQDAEKMMQNF CRTLPEDRLL
 YGIDHDLDTVLQKDEGNRTFKIKSTGAKLTYHSA TAILARYASSLQYEKEISAQVTVVLPINGAFVCEVILPEKSPIRGLTGSPAM
 KKSIAKRSAAFDTCLLRKNKLLDDHFN SIYHRRLPAMRNAKLAITSKRTSEYDMI SKPSLWGRKQGMAPKELYGTVITFLPSSQLS
 HEARPLLLFTRELRPHFPQFPIFLDDDIETTILTPLENQILLSEEEVDALTVFTLRVFRDVFHKTYDNEPEKMA YWLA PVRVQSSY
 IPSFDPRQILDWESLNYVRDND SI PFSTEIRPESLVDL FVFD AWDGRCRFFTVGIEESLTPSSPPPPFVARRRHMTDIMNYCSSLSK
 NSRAKFLSTCHWDQPVLR AELVRLRRNLLDRMTDTEREVETRCFICLEPLKVSAP AATAFSCLAFFA IISRIDAYLISLQGCESLN
 FTVKLDLALAEAF TKDSNTEEHRAQQIHVQRMGRNYERLEFLGDCFLKMATSI ALFTQNPDDDEFDYHVNRMC LICNKNLFNAAVK
 KEIYKYIRSRGFSRHTWYPEGLKLLQKGDHSRKATTESKHALAEKTIADVCEALIGASLLSGGPEHRFDMAVAVTTLVNSPSHMAE
 RWKDYI SLYTIPKYQRRADGAEIHLCRKVEEKL SYRFYPTLLGS AFTHPSYPSAWAKVPCYQRLEFLGDSLIDMVCVEDLFARYP
 DRDPQWLTEHKMAMVSNKFLGALAVKLG LHTLKYFSAPLQSQITQYAEIQTAEGESEGAVD YWTVTKDPPKCLPDMVEAYVGA V
 VDSDFNFEVIEKFFRDHIKPF FEDMAIYDSFANKHPTTFLYNRLTNEFGCTNYCLKAGEMPSIDGAPAGVLA AVI VHDVVIAEGTAS
 SGRYAKVKASERALAVLDELSSAAFQRKYRCDCRESGLDARPDIGTAI

>At_DCL1_Gene_sequence

ATGCCACCAGCTCACGCTTCCAATATGGGAGTAAATCCGATCTTCATGGGCCTGATCAGAACC TACCCGTGGAACAATAAAAGGG
 CGCGCCGTGACGATGACTGAGGATATACTACAGGAAGATGACAGATCATCGGATGAATCCGACAATGACGAGCACGAAGACCAGATC
 ATAGCAGGAGTTTACAGCAACGTATTACCCAGAACGCAAAGTTCAAAGACCTTCTTGACACAGCGTGCTGATT CAGCCCCATCCAT
 GACGCTAAAGTCAACCATGACCTGCCAAATGCTCAGCTTCCACTGCGCACTTGATAGCGAAACAAGACCTTGGAAATGGT ACGCTG
 GATCCAAGAGAGTATCAATTGGAAC TATTTGAGAGAGCGAAAGCGCAGAATACAATTGCTGTACTTGACACGGGCTCTGGGAAGACT
 TTGATTGCAGTGTGTACTTAAACATACACTGGAAAAGGAACTGAATGATCGCGCGGAGGGGAAGCAACATCGAATAGCCTTTTTTC
 CTTGTGGATAGCGTTACTCGCATACCAACAGGCCGCGGTACTACGCAATAACTTGGATCAGAGTGTGGGCATTTCTTTGGAGCT
 ATGGGAAC TACCTGTGGAGCAAAGTGTCTGGGAGCAGCACTTCCAAAAGAACATGGTGATCGTCTGTACAGCGGAGATTTTAAAC

CAGTGCCTGCTCAACTCCTACGTCAAGATGAGCCAAATTAACCTCCTAATATTCGATGAAGCGCACCATACAAAGAAAGATCATCCC
 TATGCACGCATTATACGTGAATCTTACCTCGAAGAAGACCCCTCAAAGCGTCCACGAATATTTGGAAATGACTGCATCACCCATTGAC
 ACAAAGGTGATATAGTCGATGAAGCTACGAGACTTGAGAAGTTGCTTGACAGTAGGATAGCTACGACTTCCAACATGTCACCTTCTA
 CGGCAGGTGGTCAGGCGTCCGGTGGAGAGAGATATGGTCTTCAACAGGTTGGAGCAACCGTTTGCTACTAGCCTATATAAGCAGCTT
 GAAGATCGTTTTGGAGACATGGCGTGGTGGAGGTTATATTCAGATTGCTTGGCAGGCCAGCTCTGAGCTAGGCCGATGGTGTTCGA
 GATCGAGCATGGGCGCGTCTTTAGCAGATGATGTATTGCCAAGCTCGAAGGTAATGTTTCGTAAGACGGCAAACCTCTGAAACATCA
 TCTGATGTGCCCGAAAGTGTCTACAAAGAGATCTTGGGATAACGGAAAGCCAGTGAGATAGTGAAGGGCTATGAATTCAGCAGTCCCT
 GAGGCTTTTGGCCAGCTTAGCCCCAAAGTGAAGTCCCTTCGCGAAGAGCTTGTCCACTATTTTGGACGACCGACGGAGACAAAATGC
 ATTGTTTTACGCAAGAGCGCTACACAGCTTTGATTCTGTCTGAACTTTTTCAAACCCCTGAATGTTCCCTTCCCTCGGCCGTGGTGTG
 CTTATTTGGTGTCCGGTCTGGGGATTTAGCAGGAATGAACATAACGTTCCGCCAGCAGTTTATTTCCCTTGGTCAAGTTCAGGACCGGC
 GAGATCAATTGCTTGTTCGCTACATCAGTTGCTGAAGAGGGTCTGGATATTCCTGATTGTAATCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 CAAACGTTGATCCAATACGTGCAAAGCGTGGGCGGGCGAGGCATTTCAATTCACGTATGCGAGTATGGTTCGAAAGAGGAAACCTG
 GATCATGAGCAGAGGCTACTTGAGGTTCAAGATGCTGAAAAAATGATGCAAAAATTTTGCAGAACCCTCCCCGAGGATAGGCTACTA
 TATGGCATTGACCAGATCTTGATACAGTGTACAGAAAAGACGAGGGCAACAGGACTTTCAAATCAAATCTACAGGTGCTAAGCTA
 ACCTATCATTACAGCAACGGCGATACTTGTCTGGTACGCTAGTTCTTTTGAATACGAAAAGGAAATTTTCGGCCCAAGTAAACATATGTA
 GTGTTTCCATTAACGGTGCCTTTGTTTGGGAGGTTATTCACGGAAAAGTCACTTCCGAGGCCACCTATCCGAGGACGCCAGTAAATG
 AAGAAGTCCATTGCGAAGCGCTCTGCGGCTTTGATACATGTCTTTTACTTTCGGAAGAACAAGTTGCTCGATGACCATTTCATTTCA
 ATATACCATCGTCCCTTCCGGCAATGCGAAAACGCGAAAACCTTGAATAACATCGAAGCGCACCGAGTATGACATGATATCGAAG
 CCATCTCTATGGGGCCGAAACAAGGAATGGCCCCAAAGAACTTATGGCACCGTATCACGTTCTTGGCCTCCAGTCAACTATCG
 CACGAGGCCAGACCTTTGCTATTTGTTACACGAGAGAGACTGCCACACTTTCCACAGTTTCCCATCTCCCTCGATGACGACATAGAG
 ACTACAATACTACGACTCCCTTGGAAAATCAGATTTACTTTTTCAGAAGAGGAAGTTGATGCCCTCACAGTGTCTTACTCTTCGTGT
 TTTCTGTGACGTGTTCCACAAGACTTACGACAACGAGCCGAAAAGATGGCTTACTGGCTAGCCCCGGTAAGGGTTCAAAGCTCATA
 ATCCCCTCATTGACCAAGGAGCAGATCTTACTGGGAGAGCCTCACTACGTGCGGATAACGATAGCATTCATCTCTACGGAG
 ATACGCCAGAGAGCTTGGTTGATCTCTTTGTGTTGATGCTGCGGATGGAAGATGCCGATTTTTTTCAGTAGGAATCGAGGAAAGT
 CTGACTCCCTCTTCTCCACCACCTTTGTAGCCGGCGCAGACACATGACCGATATATGAATTACTGCTCGAGCCTCTCCAAG
 AACTCCAGGGCTAAATCTTGTGACTTGTACTGGGACCAACCTGTCTTAAGGGCAGAGCTCGTACGACTCCGCAGGAACCTTTTA
 GACAGAAATGACAGACCCGAGAGAGAGTGAACGAGGTTGCTTCAATTTGTCTTGAGCCTTTGAAAGTATCTGCTATCCCTGCAGCT
 ACAGCATTCTCCTGCTCGCATTCCCA**GCAATCATCTCTAGAATTGATGCATACCTAATCTCTCTCCAAGGCTGCGAAAAGCTAAAC**
TTACCGTCAAGCTGGACCTCGCCCTGAAGCATTCACAAAAGACTCCGATAATACCGAGGACCCGAGCTCAGCAGATACATGTC
CAACGAGGAATGGGAAGAAATATGAGCGATTGGAATTCCTCGGAGACTGTTCCCTGAAGATGGCTACCTCGATTGCTCTCTTACA
CAAACCAGACGATGATGAGTTTACTATCACGTAACCGGATGTGCTCATTGCAACAAGAACCCTTTAATGCAGCCGTA
AAGGAGATCTATAAGTATATTCGTAGTCGAGGATTTTCGAGACATACATGGTATCCAGAGGGTCTGAAGTTACTACAAGGTAAGAC
CACAGTAGAAAGGCAACCACGGAGAGCAAGCATGCCCTTGCAGAGAAAACAATTGCAGATGTTTGCAGGCTTTGATAGGGGCGTCT
CTGCTTTCGGTGGTCTGAACATCGATTGACATGGCTGTCAAGGCAGTGACTACTCTGGTGAACAGTCCAGTACATGGCTGAG
CGATGGAAGGACTACATTTCTTTATATACGATACCGAAGTATCAGCGCCGAGCGCGGATGGTGGCAGATACACCTTTGTGAAAG
GTGCAAGAGAAGCTGAGTACCGCTCCGTTACCCGACGCTTCTGGATCAGCTTTCACATCCCTTCGATACCATTCGATGGCT
AAAGTGGCCTGCTATCAGCGCTTGGAGTTTCTTGGTATTCACTGATCGATATGGTGTGCGTGGAAAGACTTGTTCAGGATTCCT
GACCGAGACCCAGTGGCTCACAGAACACAAAATGGCCATGGTATCCAACAAGTTTCTGGTGTCTTAGCCGTGAAATGGGGCTC
CATACGATCTAAAATACTTTAGCGCTCCGTTGCAATCTCAGATCACTCAGTACGCCGAAGAAATCCAGACAGCAGAGGGCGAGAGT
GAGGGCGCGGTGGACTATTTGGACTGTGACAAAAGACCTCCTAAGTGTTTGCCCGACATGGTTGAAGCGTATGTAGGTGCAGTTTC
GTGACTCCGATTTCAACTTCGAGGTCATTGAGAAGTTCTTCCGGGATCACATCAACCATTTTTTCGAGGACATGGCAATTTATGAC
AGTTCGCAAAATAGCACCTTACGACTTTCTGTGATAAATCGACTGACTAATGAATTCGGCTGCACGAATATGTTGTAAGCTGGT
GAGATGCCACAGCATTGATGGGGCCCCGGCTGGGTTTTTAGCGCCGTTGATCGTGCATGATGTTGCTATTGCCGAAGGTACAGCATCA
TCTGGTTCGATGCTAAAGTTAAGGCCAGTGAAGGGCACTCGCAGTGTGACGAGCTATCGTACGAGCTTTCCAGAGAAAATAT
CGCTGTGATTGTGAGAGTACAGGACTTGGCAAGACCCGACATTGGAACGGCTATCTGA

DCL2

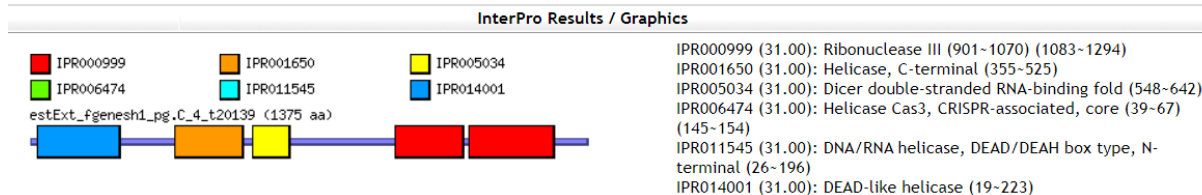


Ilustración c. Estructura de DCL2 de *A. tubingensis*. Imagen recuperada de funRNA.

>Aspt_helicase_dcl2-2_Protein_sequence

MASSTDYHADSTPGPPTTNMELRIREYQLEMLNESLKRNVIVVMPGTGKTVQVAILRILADIDKGDSDKFWVLLCPTVALSEQHHTHTI
 RNRVPSMWCRCGFTSRDQVEYWKKEKIWDNALLGIKIAVSTYQVLYDALSHGFVKLSQISLLIFDEAHHCKRDHVANKIMQDHYHKMH
 QSGAQNLPKILGLTASPILSDLSSLETVESNLGSIKTPRQYYAQLLQFTNRPILIPRLPSYTIIPNCTVKAPILEKLCGILFSENEV
 PSSKMKSKQLKHIRRFQTSESINQELGIWAATEYVRKSIIMHFKESMRMGAEKTNISNSGKDFAMEILLTKLGLQDCIPAMQREDEV
 SPMCLCLLEDELSKAYREGFCGLVFVTQRATVLAALKWLIENHPLTSHLFTCGTFIGMSTTQYSKTELGNLHDIRNQFETLEKFRQGS
 NLIITDALEEGIDIPACNTVLNFNLSQLSLKFIQRRGRARRENSQFIIMEDESMPYLKQLEMEIELVSKLQNAERRQIPANEL

DFDEYERISLSLHVDRGTGAQLIMREAVGYLYHLCSKLPQAPYVSNKPLFSYERNNYGRFRAVVRLPSNLDPSLQSFSSRNWSRRKY
AREDAALEAYKALYQAGLVNDYLVPTQVSDHLDGNTILRSYSIQNLDPWQDIAHLWKLDSQLYLHLKRIIRPEDEIHIHMFY
QLDTTVHPLFIDYCTTYTAILTPGHPITTNVPLCQVNTLIFQSVYRDHCSRKNIDYAFLLVPGLEEPKLEFLERYSGSVSLTEL
LNQEATPSALGLLRSHTKPSRPLLVEPWVEGCVLSDLSISSFTAKVKYMTSRRNFLSQGNLAARKSKRCEPRIFFEANVKGMSVR
DFFVDKLPMSFAQVALLTPSIIHEVEVYIIAQNLRQELSLRSVTPWQRDLAIAIRPTSIEHRATFRSLAFIGDALIKYLFARQLF
LHHLLHGLLSSSLKQRNLS DAGLAYAIYQSGLGKFLISKHLNGKRWAPPLVSRIKSSSNEARQRSIGATLADMTKAVVGAFFIDG
GLNQAAACASVMFPKLTWNASSLHDGTYSKTRPANAVAPTIVDMEELLYTFTDKSLAVESMTHPCTGLVQTTSYRRLSFLGAS
VLEWIVVSYLHRHAQVMNPKRMQSLKSAFTNNTFLTVAITFHQVRERNHIYVDEHKVHQNVKTCISRLWDFLRLHSDALSTELTN
FVQVSSEEVDAIKHELWERRFYPWVRLSALGDMRVLSDIIQSTFGAVFIDSQATLTS CNALAEKLGILP LLEHFIS HQITTDHPKDI
LQAILRGRKLSYQISVDEKHPGTLRCSALADSSEIASVEGHMNDV I KMLAAETA VRLLRKG FALSETS

>At_helicase_dcl2-2_Gene_sequence

ATGGCCTCATCTACCGATTACCATGCAGACAGTACGCCGGGACCCGACCAACTAATATGGAGCTTAGAATCAGAGAGTATCAATTGGAG
ATGTTGAACGAGAGTTTGAACGTAATGTTATCGTTGTGATGCCAACAGGTACTGGGAAAACGCAAGTAGCCATATTACGGATTCTG
GCGGACATAGACAAGGAGACTCAGATAAGTTCGTATGGCTACTTTGTCCACAGTTGCTTTATCTGAGCAGCATACACATAACAATA
CGAAACCGTGTTCCCTCTATGTGGTGCAGAGGGTTCACCAGTAGAGATCAGGTGGAATATTGGAAAGAGAAGAAAATATGGGATAAT
GCCTTGTGGGAATAAAGATTGCAGTTTCAACATATCAGGTTCTATATGACGCCTATCCCATGGTTTTGTAAACTGAGCCAAATT
TCTTTACTCATATTTCGATGAAGCCCACCATTGTAAGGGGATCAGTTGCGAACAAGATAATGCAGGACCATTACCATAAGATGCAC
CAAAGTGGTGCAGCAATCTACCGAAGATACTTGGTCTGACTGCTTCTCCCATTTTTATCCGACTTGTTCATCTTTGGAGACCGTGGAA
AGCAACCTGGGCAGTATATGCAAGACCCCTCGCCAATACTACGCGCAACTCCTGCAATTCACAAACCGGCCACTTATATTGCCGCGC
CTACTTCTTATACGATTCCGAACCTGCACTGTCAAGGACCAATACTGGAAAAGTTATGTGGTATTTGTTCTCTGAAAATGAAGTA
CCAAGTTCATCGAAGATGAAGAGCAAGCAACTCAAACATATCAGACGCTTCATACAGACTTCGGAAGCATTAACCCAGGAGCTTGGG
ATTTGGGCCGCGACAGAGTACGTGCGAAAATCGATCATGCATTTCAAAGAAAGCATGCGAATGGGCGCTGAGAAGACAAAATATCTCC
AATAGTGGGAAAGACTTCGCCATGGAAATCTTACTAAATTGGGCAAATTGCAGGACTGCATCCCGCAATGCAACGAGAA GATGTG
TCACCAATGTGCCTGTGCCTATTGGATGAGCTTTCAAAGGCATACAGAGAAGGATTCTGCGGTCTGGTGTTCGTTACGCGAGCGAGCG
ACTGTACTTGCATTGAAATGGCTGATAGAGAACCATCCACTTACGAGCCACCTATTTACTTGTGGGACATTCATTGGTATGTCAACC
ACACAATACAGCAAAAACAGAGCTCGGAAATCTCCATGACATCCGAAATCAGACTGAAACGCTAGAGAAGTTCGGGCAAGGCTCTATA
AACCTAATCATAACGACCGAGTCTTGAAGAAGGCATTTGATATACCGGCATGCAATACAGTGTCTAACTCAACAGCTCAGCTATCC
TTGAAATCCTTTCATTCAGCGACGGGGCGTGCACGAAGGGAGAATCCAGTTTATTTATCATTATGGAAAGATGAAAGCGGCCCAATG
TACTTGAACAACCTCGAGATGGAGGAAA TAGAGCTAGTTTCAAATTCAGAAATGCCGAGCGAAGGCAAATACCAGCTAACGAGCTG
GACTTCGACGAGTACGAGAGGATTTCCCTTTCAGTTGACAGGACCGGAGCGCAGCTGATAATGCGGGAA GCGGTGCGGTAT
TTGTATCATCTTTGTTCAAAGCTACCTGCCAGCCGTATGTGAGCAACAAGCCCTGTTTTCTTACGAGCGCAATAACTACGGCCGA
TTCAGGGCGGTAGTCAGATTGCCGAGCAACCTCGACCCCTCCCTTCAGTCAATTTCTAGCTCAAGAAATGGTCCAGACGCAAGTAT
GCGAGGGAGGACCGCATTAGAAGCATATAAAGCGCTTTACCAGGCTGGCTTGTAAACGATTACTTGGTCCGACAGGCTCTCA
GACCATTTGGATGGGAATACCATATTACGGTCCCCTACAGTATTCAGAAACAGTTCAGTTCCTTGGCAGGATTTGCTCATATGG
AAACTTGACAGTACGCTGTATCTTCAAAAACACGAATCATAAGACCAGAAGAGGACGAAATCCACATACATATGATTTTTCCATAT
CAGCTTGACACAACAGTTCACATTCCTCTTTTCATTGATTATTGCACAACCTATACGGCCATTCTCACACCGGGGCATCCAATCACT
ACAAATGTTCCACTTTGCCAGCAAGTGACAAACCTGATCTTCCAGTGGTTCACGAGACCATTGTTCTCGCAAGAACATAGACTAT
GCGTTCCTTCTTGTCCAGGACTGGAAGAACCAGGCTGATTGAGTTCCTTGAGAGGTATTCTGGATCAGTCAGCTGACTGAGCTT
CTGAATCAGGAAGCTACGCCGAGTGCCTTGGACTGCTTCGCAGTATACGAAACCCAGTTCGACCCTTTTGGTTGAGCCTTGGGTA
GAAGGAGAGTGCCTTTATCAGATGATTGTCCATTTCGCTTCCAGGCAAAAGTAAATACATGACTAGTCGCCGGAACCTTCTC
TCTCAAAGGAAATCTAGCTAGGAAATCAAACCGCTGTGAGCCCAAGGATAGGCTTTGAAGTAATGTGAAAGGCATGTCTGTGCCA
GATTTCTTGTGATAAGCTACCTTCCATGTTTGCCAGGTCGCCCTCCTTACACCAAGCATAATCCACGAGGTGGAGGTATATATC
ATAGCGCAAAATTTGCGACAGGAACATCGTTACGATCAGTCACGCCCTGGCAACGACTTGATTTATGGCCATTGCTATCAGGCCT
ACAAGTATTGAGCATCGAGCCACCTTCGCTCATTAGCCTTCAATGGCGATGCACTCATCAAGTATCTCTTCGCAAGGCAATTAATTT
CTGCACCATCATTTGTTGCACGAAGGCTCCTGTCTCTTTGAAGCAGAGGAATCTGTCTGATGCGGGTCTTGCAATATGCTATATAT
CAATCTGGCCTTGGGAAATTCCTCATAAGCAAACATCTCAACGGGAAACGATGGGCGCCACCGCTTGTGTCGAGGATTAATCTCTCC
AGCAATGAAGCCAGGACGATCCATCGGTGCGGCTACGCTGGTATATGACGAAAGCAGTTGTGGGGCTGCCCTCATAGATGGT
GGACTGAACCAGGCTGCTGCATGCGCATCAGTCATGTTTCCAAAACCTCAAGACTTGGAAATGCATCATCTCTGCATGATGGTACTTAT
TCCAAAACAAGACCGGCAATGCAGTTGCTCCAACAGCAATAGTCGATATGGAAGAACTCCTTGGATATACTTTACGGACAAATCC
CTGGCTGTAGAAAGTATGACACATCCATCTTGCCTGGTCTTGTGCAACAACATCTTATCGGCGTCTCTCATTCTCGGAGCCAGC
GTGCTAGAATGGATTGTGTGAGCTATCTACATCGACATGCACAAGTATGAAATCCAAAAGGATGCAGTCTTGAAGTCCGCGTTC
ACAAACAACACATTTCTGACCTTTGTGGCAATAACATTCACCAAGTAAGGGAGCGAAATCATATATATGTTGATGATGAACACAAG
GTCCATCAAATGTGAAGACATGCTGATTAGGCTCTGGGATTTCTTCGCTTGCATAGCGATGCCTTATCCACTGAGTTAACAAAC
TTTGTTC AAGTGCATCTGAGGAGGTGGATGCTATCAAACATGAACATATGGGAGCGCGGATTTTACCATGGGTGGCGCTGAGCGCA
CTTGGGGACATGCGAGTGTGTCTGATATCATTAGAGCACTTTTGGTGTGTCTTTATCGATTCTCAAGCAACCCTAACATCCTGC
AATGCTCTGGCAGAAAACCTCGGAATTCGCGCTTTTGGAGCATTTCAATTTCCCATCAAATCACTACAGACCATCCAAAAGACATT
CTACAAGCCATCCTTCGAGGACGCAAACTCTCTTATCAGATCTCTGTGACAAAGAACATCCCGGGACACTGCGGTGTCTGCAGT
GCTGATTCCTCGGAGATCGCCTCAGTGGAAAGCCATATGAATGATGATGTAATCAAGATGCTGGCAGCTGAAACGGCGCTTCGTCTC
CTGCCAAGGGGTTGCTTTATCCGAGACATCGTGA

DCL2.1



IPR000999 (31.00): Ribonuclease III (905-1080) (1092-1249) (1250-1309)
 IPR001650 (31.00): Helicase, C-terminal (373-535)
 IPR005034 (31.00): Dicer double-stranded RNA-binding fold (565-659)
 IPR006474 (31.00): Helicase Cas3, CRISPR-associated, core (41-50) (444-470)
 IPR011545 (31.00): DNA/RNA helicase, DEAD/DEAH box type, N-terminal (22-164)
 IPR014001 (31.00): DEAD-like helicase (15-214)

Ilustración d. Estructura de DCL2.1 de *A. tubingensis*. Imagen recuperada de funRNA.

>Aspt_dicer-like_2-1_Protein_sequence

```
MTAAATVLPAGENAPAYRPRSYQVEMFEASLKENIIVTMGTGSGKTHIALLRIMKELESNPBKLIWFLTPTVALCLQQKFISDNIP
AVRARTLTSLDKVELWTEQPIWDAILKEMQVVVSTHAVLADAMSHGFVKITQLGLMIFDEAHHCMRRHPANKIMQDFYHPALERHGA
EAVPKILGLTASPVVRSNKQELLLKIESNLDAVCKTPTHRSELMTHTHRPYLQQLLFTFVLLDDLQAGSRTLKALVNAWTSMRLEDD
PYIKKLRKSPLDGRALQKVLSESGKTYCNDQLKRFATRSLHIFRELGEWAADYFIYASVEQLKTRADNSVDSMGWTDDEEKAYLLDIVS
KLPTPNLDLTPSPDRIPISPKFRSLLEFLDAKGEPNFSGLVFAKQRATVSVMEKLLSIHPVTKHRFRFCASVFGWSGGGSKDVLGEL
LDARMQRDLSSEFRGQKLNLIATDVLEEGIDISACSVVVCYDKPPNLKSFVQRRGRARHRKSTYATMFSTDESSALS KWEDLEQA
MIEAYEDDERLLREAWALEAINEEVEVERLEVPSTGAVLTADTAVAHLNHFCAVLPQPYASNEPEFSEYKDDADLLRGTVTLPSCVH
PEVRRIQQRWWQTERAARKEAAAFQAYKRLYEFGLSDHLLPFKRNLELKETDHNLPALVEVSEQYDPVWDWACSWSSPDVHQTI
AIKHNGDSHMCIRLTSPTSLPPIEPMTLFWDESETTYTLAFDKPKRMKGI AADS IENMRLATALYLHAASSRQLRPEQDFVTLFGPDL
SDLELAEWLKKHAGDEPALEVYSRKDFPTIMGIVRDLRYNEPMVFKRWVWSGDDTPIVELECDAPFKRNLLHRQTLAAKQLDTE
IPDISSKIRLILAENCTIDKLPYAETIFGRFISVILDRLEATLVATRLCETILRDLEFSSIRHVITAITAPSAQSLTNYQRYEFFGD
SVLKFTVSCQLFFQHNPWHGEGLSEGRDEIVQNSRLARAALDAGLDAFIMNKFTT PRKWTAPLISEKISLTPKQRTISTKVLADVVE
ALIGASYIDGGFAAAHACIHRFLPEVNLEHIDRTTTPASTPEGTNHTLNDDHLMTHI GYTFTHKSLLVE SLTHPSQCFDTTTTQSY
QRLEFLGDVAVLDMAIMSTLLSHPHEIQGQMTKIKHAVVNANLLAFFCFMEFALTEKRSTVQITPSGTASLNPSVDHKVELWRFMR
YQGAHLQTARDAALSRHASLRKSIHGLQHS PYPWKYLSQLNADKFFSDIIESILGAFIDSHGNLAECEKFLERLGLLWYLRRI LK
DEVDMHPRNIAQQMAKGEIRFEVVRVVGNDGTAGTAGGEDDGYRCAVTMAGVEGVAVLVEGCLTSEEAEITAAERAVEILVGRG
```

>Aspt_dicer-like_gene_sequence_2-1

```
ATGACAGCTGCTGCGACTGTACTTCCC GCGGCGAGAATGCGCCCGCATACCCCGCGCAGCTACCAGGTGGAGATGTTTGAGGCG
AGTTTAAAGGAGAATATCATGTGCAGATGGGAACGGCAGTGGGAAAACATCACATCGCTTTGCTGCGAATCATGAAGGAGATCGGAG
AGTAATCCGCAAGTAACTGGTTCTTAACACCCACTGTCGCCCTATGTCTGCAACAATCAAATCATCTCCGACAATATCCCC
GCCGTCCGGGCCCGGACCTCACCAGTCTAGACAAGGTCGAGCTCTGGACTGAGCAACCATCTGGGATGCGATCCTGAAGGAGATG
CAGGTGGTGGTGTCCACGCATGCGGTTCTTGCCGATGCGATGAGCCATGGGTTCTGCAAGATCACCCAGCTGGGCTGATGATTTTC
GATGAAGCCATCATGTGCATGCGACGCCACCCTGCCAATAAGATCATGCAGGACTTTTATCACCCGCGCTGGAAAGGCATGGCGCG
GAAGCTGTGCCAAGATCTGGGCCTCAGGCTAGTCCCGTGGTGAATCAAATAACAGGAGCTACTGAAGATTGAGTCAAATCTT
GATGCCGTGTGCAAGACACCCGACTCATCGGTCAGAGCTTATGACGCATACCCATCGGCCATATTTGCAGCAGATCTTGTTCACC
CCGTGTGCTCGACGATCTGCAGGCTGGAAGCAGGACTTTGAAAGCTTTGTGACGCATGGACATCTATGAGACTCGAGGATGAT
CCGTACATCAAGAAATGAGAAAAGAGCCCTCTTGACGGAAGGGCGTTACAGAAAAGTCCCTCGAGTCCGGGAAGACTTACTGTAACGAT
CAGCTGAAAAGATTTGCGACTAGAAGCTTACACATTTTTCAGAGAGCTTGGTGAATGGGCTGCCGACTACTTCATATACGCTTCTGTCT
GAGCAGCTCAAACGAGAGCCGATAATTCAGTGGATAGCATGGGCTGGACCGACGAGGAGAAGGCATATCTATTAGATATCGTCTCC
AAGCTACCGACCCCAAATCTCGATCTACTCCTTCCGACCCGATAGAAATACCTATTTACCAAATTCGATCCCTACTGGAATTC
TTGGATGCAAAGGGAGAGCCCACTTCTCCGGTCTAGTATTTGCTAAACAGAGGGCTACAGTGAGTGAATGGAAAAGCTACTGTCT
ATTATCCTGTAACGAAACATCGTTTTCTGATGCGCCCTCTCGTCCGGCTGGTCCGGCGGAGGTAGCAAAGACGTTCTGGGTGAGCTC
CTTGACGCCCTGACGCGCATACCTGAGCGAGTTCGGACCGGCCAAGAAGACTTGATTATTGCGACGGATGTGCTGGAGGAG
GGCATTGACATTAGCGCTGACGCGTGGTAGTCTGCTATGATAAGCCAAAAGCTTGAATCGTTTCGACAGACGAGGCTGCTGGC
CGGCACAGGAAATCCACTTATGCCATCATGTTTTCTACAGATGATGAATCTTCTGCACTGAGCAAGTGGGAGGACCTGGAAACAGGCC
ATGATTGAAGCGTACGAGGATGACGAAAGGCGACTGCGCGAGGCTTTGGGCCCTGGAGGCTATCAACGAAAGAGTGGTGGAAAGGCTT
GAGGTGCCATCTACTGGTGTGCTTTGACGGCAGACACCGCTGTTGACATCTCAACCATTTCTGTGCGAGTCTGCCGCGCCAACCG
TATGCGAGTAATGAGCCTGAATTTTCATATGAGAAGGATGATGCAGATCTATTGAGAGGTACTGTCCATTTGCCGTCCTGCGTCCAT
CCCCAAGTCCCGCTTATTCAGGGCCAGCGATGGTGGCAGACCCGACGAGCAGCTCGGAAAGAAGCAGCCTTTCAAGCCTACAACCG
CTCTACGAGTTTGGTCTCTGAGCGATCATCTACTTCCATCTCAAAGGAATTTAGAGCTAAAAGAGACCGCATGTTAACCTGCCA
GCCCTTGTGGAAGTATCGGAACAGTACGATCCATGGGTCGATTGGGCTTGTTCCTGGTCATCCCCGTGATGCTCAAACGCAAAT
GCTATAAAGCACAAATGGGACTCTCACATGTGTATCAGGTTGACCAGCCAAACGAGTCTACCACCGATTGAACCGATGACCTTATTC
TGGGACAGCGAGACAACCTATACGTTGGCGTTGACAAAACCGAAGCGAATGAAAGGGATCGCCGCTGACAGCATTGAAAATATGAGA
CTAGCAACCGCGCTATACCTCCACGCTGCAAGCTCTAGACAACCTGAGACCCGAACAAGACTTTGTTACTCTGTTTGGCCCGACCTT
TCCGACCTTGAGTTGGCAGAATGGCTTAAGAAGCAGCCTGGAGACGAGCCTGCTCTAGAGGTCTACTCTCGCAAGGACTTTTCTTACG
ATAATGGGCATTGTGCGGGACCGCTTACGCTACAATGAGCCCATGGTGTCAAACGGTGGGTTGTGTCGGGACAAGATGACACACCC
ATAGTCGAGCTCGAATGCGACGCTTCCAAAAGCGAGAAATCTTTGCAACGGCAACATAGCTGCTAAGCAACTTGATACTGAA
ATCCCTGATATCTCTCAAAGATCCGCTTATTCTTTCGGGAAAACCTGCACCATAGACAAAATCCCTATGCCGAAACCATCTTCCGCGC
CGCTTCATATCAGTTACTGATAGACTAGAAGCCACATGGTGGACTAGACTATGCGAGACCATCTCCGCGATCTTGAATTC
```

TCCAGCATTCGTCATGTCATCACGGCCATCACCGCGCCAGCGCGCAATCACTGACCAACTACCAGCGATACGAGTTCTTCGGCGAC
 TCGGTCCTCAAATTCACCGTCTCATGCCAATCTTCTTCCAGCACCCCACTGGCAGCAAGGCTACCTCTCCGAAGGACGAGACGAG
 ATCGTCCAAAATCCCGTCTCGCCCGAGCGGCCCTCGACGCCCGCCCTCGACGCCCTTCATCATGAACAAGACGTTCACTCCCCGAAA
 TGGACCGCCCCCTCATCTCCGAAAAGATCAGCCTCACCCCAAACAACGAACAATATCCACCAAAGTCTCGCCGACGTAGTCGAA
 GCCCTAATCGGAGCCTCTACATCGACGGCGGCTTCGCCGCGCCACGCTGCATCCACCGTCTCTCCCGAAGTGAACTCGAG
 CACATCGACCGCACCACCACACAGCCCCCTCAACCCAGAAGGCACCACCAACCACACCTAAACGACGACCACCTAATGACACAC
 ATCGGCTACACCTTCACACACAAATCCCTCCTCGTGAATCCCTCACCCACCCATCCTGCCAATTCGACACCACCACCAATCCTAC
 CAACGACTCGAATTCCTCGGCGACGCCGCTCTCGACATGGCCATCATGTGACCCCTCTCTCCACCCGACGAAATCCCCAAGGC
 CAAATGACCAAGATAAAGCAGCCGTCGTGAACGCCAACCTCCTCGCCTTCTTCTGCATGGAATTCGCCCTCACTGAAAAACGCTCC
 ACCGTACAAAATCACCCTCGGGAACCGCTCCCTCAACCCCTCATCCGTCGACCACAAAGTCGAACCTCGGCCGTTTCATGCGCTAC
 CAAGGCGCCATCTCCAAACAGCCGAGACGAGCCTTATCCCGCCACGCTCGCTCCGCAAATCCATCATCCACGGCCTGCAACAC
 TCCCCGTCATACCCCTGGAAATACCTCTCCAGCTCAACGCGGATAAATTTCTTCCGATATCATCGAGAGTATCCTGGGCGCTATA
 TTCATCGATTGCGATGGGAATCTGGCCGAGTGTGAGAAGTTTCTGGAACGGTTGGGCTGTTGTGGTATTTG
 AGGAGGATTCGAAGGATGAGGTGGATGTTATGCATCCGAGGAATATTGCGCAGCAGATGGCGAAGGGGGAGATTAGGTTTGGAGTG
 GTGAGGTGGTGAATGGGGATGGTACTGCTGGTACTGCTGGTGGGAGGATGATGGGGCAGCTATCCGTTGTCGGTGACGATGGCA
 GCGTGGAGGGCGTGGCTGTTCTTGTGGAGGGGTGTTGACTAGTGAGGAGCGGAGATTACGGCGCGGAGAGGGCTGTGGAGATT
 CTTGTGGGGAGGGGGTGTAG

Lasiodiplodia theobromae

Taxonomía

- Dominio: Eukaryota
- Reino: Fungi
- Filo: Ascomycota
- Clase: Dothideomycetes
- Orden: Botryosphaeriales
- Familia: Botryosphaeriaceae
- Género: *Lasiodiplodia*
- Especie: *L. theobromae*

DCL1

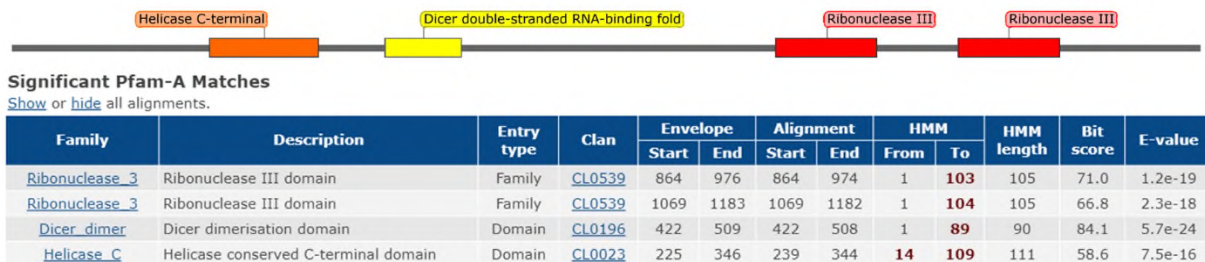


Ilustración e. Estructura de DCL1 de *L. theobromae*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

```
>tr|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI Dicer-like protein 1 OS=Lasiodiplodia
theobromae OX=45133 GN=DCL1_1 PE=4 SV=1
MVLVCTAEVLAQCLMHSFITMEQINLLIFDEAHHAKKGHSYAKIINDYYVPTDQSKRPRIFGMTASPVDAKVDVAQAASDLEALLHC
RIATTSNLDLLRKTISRPDENVVIYAPLEKPFETPLHIKMKEKFADMEAFRTLQSSKEASSQLGAWCSDFWFYALQEEEAKKLES
RREQEYHRNKRFKSISALDEEVARLREAAKMVSSHMFGEPLNLTCLSSKVLLEHLSWLFYRFRPTKARCIVFVERRDARLLHRVF
SSIGGQHLKSGMIVGSTGKGNLNIITFRDQVMTLLKFKKGE LNCLFATSVAEEGLDVPDCNLVVRFDLYKTMICYVQSRGRARHKNS
RYLHMIIEGNLRHRQLVLEARQAEKLMRQFCEALPEDRLLKGNADLDDLI LDRDFRITYTEPSTKAKLTYDSLSVLAHFTALLPR
QGEVFPDPLYIVSPWVGKFCIEVILPENSPIPSAMGRLCARKAISKRSAAFEACVQLREGGYLDENLLPIYTKQLPAMRNARLALNC
KKTSAIDMMTKPQLWAATRGTTPEELHITVIELPDGLERPNQPLAILTRTPLPSLPEFPIFLNSGTASMVQLTPLTSVFKCSFDEVQ
YLTTYTLRVFKDIFNKTYEEDHAKMSYWIAPMKACYQVLDGGFYGLRDLIDWAALEEVQKHVEYHWTAEMSDDFLLDKYLVDKWDGG
RRFFTECLKGLKPTDVPEDAVKGTVEHRKDLNYSISLYKMSRAKADSTWNRDQVIEARQVLHRRNMLAEPEPERREGDLRSKVY
LCPEPLRISTLHFAAVATYIFPAVIHRIDQYLIALEACQLLGLDIRPDLALEAVTKSDNTEEHGEEVLNFRRGMGNNYERLEFMG
DCFLKMATSIALFGENPDDNEFDHFVKRMCLVCNQNLFPETAKEQLTKYIRSMASFRRTWYPDGLKMLEGKGHKRTGEEVIKHGLGD
KTIAADVCEALIGAAYLTHDSRDEWKQENWDNAVAVTNLVAPEHTMKKWEYFDAYEKPAYLDAEPTAAQMDLVNQAKEHPYRFR
SAKLLRSFAFIHPSYPYTFEKVPSYQRLEFLGDSLIDNACITWLVYNFDPKDPQWLTEHKMAMVSNRFLGAVCVKLGFKHLKYHSQ
```

LEYQIRDYVTEIREAEHNANGARDFWVSVKPPKCLPDIVEAYVGALFVDS EYDFAEVQKFFEMHIKWYFEDITIYDSYANAHPIVR
LHRLFLEVLGCTEHKVMVQELPTITPGAPVRCIAGVMVHNRI IAEGMASSGKNAKAKAKFALDDLETMPLFQFKEMYGDCDCDEQSD
EEECGDDDDDAGDLVEVEAEADTHVRIVKRGV

>ENA|KAB2581198|KAB2581198.1 *Lasiodiplodia theobromae* Dicer-like protein 1
ATGGTCCTGTTTGCACCGCTGAAGTCTCGCCAGTGCCCTCATGCATTCTTTCATCACCATGGAGCAGATCAATCTACTAATCTTC
GACGAAGCTCATCATGCCAAAAAGGGCCACAGCTACGCTAAGATCATCAATGATTATTACGTCCCTACAGATCAGAGCAAACGTCCC
AGAATATTCGGAATGACAGCCTCGCCGGTGGATGCAAAGGTGGACGTTGCTCAAGCCGCTAGTGATCTCGAAGCACTCTTACATTGC
CGCATCGCAACCACCTCAAACCTGGACCTATTGCGCAAGACAATCAGTCGCCCGGACGAGAACGTGGTGATATACGCTCCACTTGAG
AAGCCGTTTCGAGACACCGCTGCACATCAAGATGAAAGAGAAGTTTGCAGCATGGAAGCATTCCGCACTCTCTTTTCACTCTTCCAAA
GAGGCAAGCTCTCAGCTCGGTGCATGGTCTCGGACATGTTCTGGTTTTATGCTCTCCAGGAGGAAGAGGCAAAGAAAGCTTGAGAGC
CGTCGAGAACAAGAATATCACCGGAACAAAAGGTTCAAGTCGATATCGGCCCTCGACGAGGAGGTAGCAAGATTGAGAGAAGCTGCA
AAGATGTTAGCAGTCATATGTTCCGGCAGCCTCAGCTGAACCTGACATGTCTGAGTTCAAAGGTTCTGGAGCTGCACAGTTGGCTG
TTCCGGTACTTTGAACGGCCAACGAAAGCAAGGTGCATCGTCTTCGTCGAGCGGCCGAGACACTGCCTGTCTGTTGCACCCGCTCTTC
AGCAGCATTGGAGGCCAGCACCTCAAATCCGGCATGATCGTCTGTTAGTACGGGCCAAAGGAATGACCTCAACATCACCTTCCGGCAG
CAGGTCATGACTCTCTTAAAATTCAAAGGGGAAATGAACTGCCTGTTTGAACCTCTGTTGCTGAGGAAGCCCTCGACGTACCC
GACTGCAACCTAGTCTCAGATTGACCTTTACAAAACGATGATCCAGTATGTGCAGTCCAGGGGCCGAGCCCGGCCACAAGAATTCC
CGATACTTGACATGATTGAGGAGGGCAATTTACGCCACAGGCAGCTTGTCTGGAAGCTCGCCAGGCAGAGAAGTTGATGCGGCAG
TTCTGCGAGGCTTTGCGGAGGATCGCTCCTGAAAGGAAACGACGCGGATCTGGATGACCTCATTCGATCGCACAGACTTTAGAA
ACTTACACGGAACCCAGCACCAAGGCGAAGCTCACCTATGATTCCAGCCTCAGCGTCTTGTCTACTTTACAGCACTACTCCCCAGG
CAGGGAGAAGTCTCTTTTATCTCTCTATATTGTGTCCCTTTGGTCAGGTAATTCATCTGTGAGGTTATCTCCCGAGAAAATTTCA
CCCATCCCATCAGCAATGGGTCGTCTGTGTGCGCGAAAGGCTATTTCAAACGCTCAGCAGCCTCGAAGCATGTGTTCCAACTCCG
GAAGCCGGTACCTCGACGAGAATCTCTGCCGATCTACAAAGCAGCTTCTGCTATGAGAAACGCCCGGCTGGCATTGAATTGC
AAGAAGACTAGTGCTACGATATGATGACGAAGCCGCAACTGTGGGCAGCTACCCGTTGGTACAACCCGGAAGAATACATATCACT
GTCATTGAACCTCCAGATGGTCTTGAAAGGCCGAATCAGCCGCTAGCGATACTTACTCGTACACCTCTCCCAAGCCTTCCGGAGTTT
CCAATTTTCTCAATTCGGAACCGCAGTATGGTCCAGCTGACGCTTTGACGCTCTGTCTTCAAATGCAGCTTCGATGAAGTTCAG
TATTTGACTACATACACTCAGGGTGTCAAAGACATCTTCAAACAGACATACGAAGAGGACCACGCCAAGATGTCTTATTGGATT
GCCCCGATGAAGGCTTGCTATCAGGTGCTTGATGGTGGATTTTATGGTTTACGAGACATCCTCGATTGGGCAGCTTTGGAGGAGGTC
CAAAGCACGTTGAGTACCATTGGACGCGGAGATGTCGGATGATTTTCTTCTGACAAAGTATCTGGTCGACAAGTGGGACGGAGGT
CGGCGCTTTTTTACGGAATGCCTTAAGGGAGATCTGAAGCCGACAGACCTGTGCCGGAAGACGCTGTCAAAGGAAAGACGGTTGAA
CACAGGAAAGACATCTGAACTACTCCATTAGTCTGTATAAGATGTCAAAGCGAAGGCCGACTCAACCTGGAACCGTGATCAGCCG
GTAATCGAAGCAAGGCAGGTGCTCCATCGCCGAACATGTTGGCGGAACCCGAGAGGCGTGAAGGCGATCTCCGATCAAAGGTGTAC
CTGTGTCGGAACCTCTGAGGATATCAACGCTTCATCCCGCAGCTGTGGCCACCATCTACATCTTCCCCGCTGTGATCCATCGCATA
GACCAATATCTCATTCGCTTGAAGCTTGTGAGCTTCTGGACTGGACATCCGTCCTGACTTGGCGTTGGAGGCGGTGACGAAGGAT
TCGGACAACACCGAGGAACACGGAGAAGAGGTTCTGAACTTCCGCCGCGGATGGGCAACAAC TACGAGCGCTTTGAATTCATGGGA
GATTGTTTTCTCAAGATGGCCACCTCGATTGCCCTCTCGGAGAGAATCCGGATGACAATGAGTTGATTTCCATGTCAAGAGGATG
TGCCTGGTGTGCAACCAAACCTGTTTGAAGCTGCAAAAGAGCTGCAGCTCACCAAGTACATCCGACGATGGCATTCTCAAGAAGA
ACGTGGTATCCGGATGGCCTAAAGATGTTGGAAGGCAAAGGCCACAAGAGAAGTGGAGAAGAAGTGATCAAGCATGGTCTTGGTGAC
AAGACTATTGCCGACGCTCGGAGGCTCTCATTGGGGCGGCGTATTTGACACACGAC AGTCGAGACGAATGGAAGCAAGAAAACCTGG
GATAACGCTGTGAAGGAGTCACCAATCTCGTGGCCAGCCGAGAACACACCATGAAGAAGTGGTCAGAGTATTTTACGCATACGAG
AAGCCAGCTTATCTCGATGCGGAGCCACGGCCCGCAATGGATTTAGTCAATCAAGCCGAGAAGGAGCACCCATACCCGTTCCGT
TCAGCGAAGCTGTTGATCGGCCCTCATAACCCCTTCTTATCCCTACACATTCGAGAAAGTACCCTCCTAC CAGCGCTTGGAGTTT
CTGGGGCACTCGCTCATTGACAACGCTTGTATTACCTGGCTAGTCTACAACCTTCCGGACAAGACCCTCAGTGGCTGACGGAGCAC
AAGATGGCCATGGTGTCCAACAGATTTCTCGGCGCGTCTGCGTGAAGCTCGGATTCACAAGCACCTCAAGTACTACCCTCACAG
CTCGAATACCAGATCCGCGACTACGTCACCGAAATCCGCGAGGCCGAGCACAACGCCAACGGAGCGCGGATTTCTGGGTGTCGGTC
AAGCCCGCGCCGAAGTGCTTCCCGACATAGTCGAGGCATACGTCGGCGCGCTGTTCTGTCGACAGC GAATACGACTTCGCCGAGGTC
CAGAAGTTCTTCGAGATGCACATCAAATGGTACTTCGAGGACATCACCATCTACGACTCGTACGCCAACGCGCACCCCATCGTCCG
CTCCACCGCTCTTCTCGAGGTGCTCGGCTGCACCCGAGCACAAGGTCATGGTCCAGGAGCTGCCGACTATCACGCCCGGCGCCCG
GTCAGGTGCATCGCCGTTGTCATGGTACACAACCCGATATTGCGGAGGGTATGGCTTCTTCTGGGAAGAACGCCAAGGCCAAGGCT
GCGAAGTTTGCCTTGACGACCTTGAACCATGCCGCTGTTCCAGTTCAAAGAGATGTACGGATGTGACTGCGACGAGCAGAGTGAT
GAAGAGGAATGCGGTGATGACGATGACGATGCGGGTGAATTTGGTGGAGGTTGGTGAAGCCGAAGATACTCATGTTCTGATTGTGAAG
AGGGGAGTTTGA

DCL2

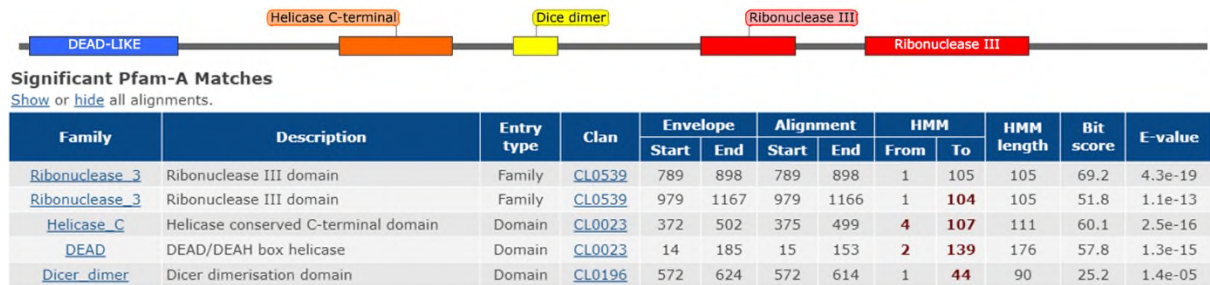


Ilustración f. Estructura de DCL2 de *L. theobromae*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

```
>tr|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI Dicer-like protein 2 OS=Lasiodiplodia
theobromae OX=45133 GN=DCL2 PE=4 SV=1
MESPNGEPTFFCLRSYQAE MVEESLKQNIIVAMDTGSGKTHVAISR TAAELES CNPDQLVWFIAPTVTLCHQQFCLFEKHLPAYEIR
FLSGNDNVDRWTDQNIWDAVLRNVRI VVSTPAVLLDALTHAFVKLPR LALLIFDEAHMCRGNHPASAIMQRFYHPLLANGDRDSL PK
ILGLTASPVV SANASGLEI IERSLNAIAKTPKIHR TDLLRFTHRPELVQLNYPGQYLDPSAGPPVLAALANVYHAYDILEDPIYILSL
RKKASETTDETRDQVLELEKLLHN RKYIHEQLKKLYSRALGIYNE LGGPPTEFYRSCIAKFDALFNSSHLLLDWSSAEGKHLH
DMLATVAAA PVSQHTGIHDSLS PKMNTLV D LLLSEWNADFTGI I FVEQRATVAAMDHVLSNHPRLRDLFSVGT FVGTSM TVHRKSH
LGIGDLVEIKHQQTLEEF RAGKKNLIVATAVLEEGIDVSNCHIVICFEP PKNLKSFIQRGRARK KDSKFVIMFPDDSTFVKSP EM
WLDLEE QMKEAYLNDQRVVQAAEQRELEEDD DTYRCESTGALLTLDN AMQHLYHFCAILG DGGQHVDLRPRFFFTVDQNDRTTATV
TLPSSPGAYGEGE RQFLFEGGSRPALEVYAE LQAGLSPTIGLLHPRKGVV GAPLMFRRFQIPDISMTE DENLQEEEEATVQVCSAF
PKRRDFLHYIRDSAQY GMYTKETILPAE GFLMSRLPVAYS MFAAFLPSILHRYELFMIVQELCDTAVRSVGF TNHELVLRAITASST
NENDYQRLEFLGDCILKY STAVQLMADFLHWPESYLTERKDRIVSNGALAKASRR TGLDKFIITKAFTGSKWRPRYVQDILATSQAA
LQESQTLSTKT LADVVESLI GA AFVEGGIHK AHLCTSTFLTSLEWKS LHHCRTI LQDHAAE HASAPV LHLERVEELIGYTFKNKYL
LLEALTHASFTAPREA ASSYQRLEYLGDAVLDYIISGRLYAHR RKPANANASNDGGSTIPPRGHAADELPHW TMHSIRAALVNAS
FLAFLCMEATIFEPRTDVVFAPSSTTAA PLPLSTALANEQPYTVPGT P SRKALWHFLRHSSPTLLASATAARHERYSEDIWRAL
RQHRRYPWRLFAKVGAEKFFSDI VEAVLGAVFIDS TTNSSLSVGDNEMVDGAEGQEKNGKV VLEEGEELEACERFLEKI GLMDVLDR
FMRDEV DCLHPKTQLGR LAGSDKVVWEWDEGLDAGEAES PEGGMKGRFR CRVGLGETWVG DWVDGETR HGAETEADRAV LTLVA
QGRSWRGMERWEGASGDEIEGGNGDGEVKSESE EVDQVVAGAVIGDSDMD DATPQPSHAI
```

```
>ENA|KAB2572547|KAB2572547.1 Lasiodiplodia theobromae Dicer-like protein 2
ATGGAGTCGCCGACGAGAGCCTACCTTTTCTGCCTCGGTCCTACCAGGCTGAAATGGTCGAGGAGAGCTTGAAGCAAACATC
ATTGTTGCTATGGACAGGGCAGCGGGAAGACCCACGTCGCAATATCCCGTACTGCTGCCGAGCTCGAAAGCTGCAACCCAGACCAG
CTGGTCTGGT TTTATTGCGCCTACTGTCA C C C T C T G C C A C C A G C A G T T C T G T C T C T T T G A G A A G C A T C T C C C C G C A T A T G A G A T C C G C
T T T C T C A G C G G C A A T G A T A A C G T C G A C C G C T G G A C G G A T C A G A A C A T T T G G G A T G C C G T C T C A G A A A T G T C C G C A T C G T C G T G T C G
A C C C C G G C T G T G C T G T G G A T G C T C T G A C C C A T G C C T T T G T G A A G C T C C C C G A C T T G C G C T T C T G A T A T T C G A C A G G C C C A C A T G
T G T C G A G G C A A C C A T C C T G C C A G T G C C A T C A T G C A G A G A T T C T A C C A C C A C T G C T T G C A A A T G G C G A T C G C G A C A G C C T G C C C A A G
A T C C T C G G C T T G A C A G C G A G T C C G G T C G T C A G T G C A A A C G C A A G C G G C C T G G A G A T T A T C G A A C G C A G C C T C A A T G C A A T C G C C A A A
A C T C C A A G A T T C A T C G A A C A G A C C T C C T T C G C T C A C A C A G C C T G A G C T T G T G C A G T T A A A T T A C C T G G T C A A T A T T T A G A C
C C C T C C C G G C A C C C A G T C C T T G C T G C T C T G C T A C G T C T A T C A C G C T A C G C A T C A C A T C T T G G A G A T C C A T A C A T A T T A T G T C G
C G T A A A A A A G C A T C A G A G A C C A C G G A T G A G A C C C G G A C C A A G T C T T A A G A G A G C T G G A G A A G C T G T A C A C A A T A G A A A G A C A T A T
A T C C A C G A G C A G C T G A A G A A G C T C T A C T C G C G A G C C T C G G T A T C T A T A A T G A G C T T G G T G G A C C T C C A A C A G A G T T C T A C A T C C G G
A G T T G C A T C G C C A A G T T T G A T G C C T T C T T A A C C A A C T C A A G C C A T T G C T A C T T G A C T G G T C A T C A G C C G A A G G C A A G C A T C T C C A C
G A C A T G C T C G C G A C C G T G G C C G C A G C C C C G C C T G T G A G C C A G C A T A C G G G A A T A C A T G A C A G T C T A T C A C C A A G A T G A A T A C T C T C
G T C G A T C T C T C T G T C T G A A T G G A A T G C T G A C T T T A C C G G C A T C A T C T T C G T C G A G C A G C G C G T A C C G T T G C T G C A A T G G A C C A T
G T T C T G T G C A A C C C C T C G G T T C G G A C T T G T C A G T C G G C A C C T T T G T C G G C A C C T C C A T G A C C T T C A C A G A A A T C C C A T
C T C G G C A T C G G C A C C T G G T A G A A A T C A A A C A C C A G C A G A C T C T T G A A G A A T T C C G C G C T G G C A G A A A A A C C T T A T T G T C G C A
A C C G C C G T T C T G G A A G A A G G T A T T G A T G T A T C C A A C T G C C A T A T T G T C A T T T G C T T C G A A C C C C C A A G A A C C T C A A G T C T T T C A T T
C A G C G C C G G C C G T G C G A G G A A G A A G A C T C A A A G T T G T C A T C A T G T T C C C T G A C G A C T C C A C C T T T G T C A A G T C T C C A G A A A T G
T G G T T G A C C T G G A A G A C A A A T G A A G G A G C G T A T T G A A T G A T C A A C G G G T A G T C C A A G C A G C A G A A C A A C G C G A A A A C T C G A A
G A G G A T G G A G A C G A C C T A C C G T G C G A A T C C A C G G G G G C G T T C T C A C G C T C G A T A A C G C A A T G C A A C A T C T G T A C C A T T T C T G C
G C C A T T C T C G G C G A C G G A C A A C A C G T G G A T C T A C G G C C T C G G T C T C T C A C G G T A G A T C A A A T G A T C G C A C G A C T G C T A C C G T C
A C C T T G C C G A C T C A C C G G T G C C T A T G G C G A A G G C G A A C C G C A G T T T C T A G A G T T T G C G G T G A A A G A A C G A C C T G C A C T T G A G G T C
T A C G C C G A G C T T C A G G C T G G C C T C A G C C C A C G A T A G G T C T T C T A C A T C C G A A A G G A G T T G T A G G C G C C C C T T T G A T G T T C C G C C G C
T T C C A A A T T C C T G A T A T C A G C A T G A C C G A A G A C G A A T C C A G C A A G A A G A A G A G G C G A C T G T C C A A G T T G T C T G C T C A G C A T T T
C C C A A A A G G C G T G A C T T C C T G C A T T A T A T C A G A G A T T C G G C C A A T A T G G C A T G T A T A C G A A G G A A A C C A T A C T A C C A G C C G A A G G T
T T C C T A T G A G C A G G T A C C A G T A G C T A T T C C A T G T T C G C G G C T T C C T G C C A T C G A T T T T G C A C C G C T A C G A G C T T T T C A T G A T C
G T T C A A G A G C T T T G C G A C A C T G C A G T A C G C T C C G T T G G T T T A C T A A T C A T G A A C T G G T A C T G C G C G C C A T C A C C G C A T C G T C G A C G
A A C G A A A T G A C T A C A G A C T G G A A T T T T G G G G A T T G C A T A T T G A A A T A C A G C A C C G G T C C A G C T C A T G G C A G A C T T C C T C
```

CACTGGCCCGAGAGCTATCTCACTGAACGTAAGATCGCATTGTTTCCAACGGTGCCTCGTAAAGCCTCACGCCGACCGGCCTC
 GACAATTATCATCACTAAGGCCCTCACGGCTCCAAATGGCGGCCACGCTATGTGCAAGATATCCTAGCCACATCTCAAGCTGCT
 CTACAAGAGAGTCAAACGCTATCTACCAAGACCCCTGGCTGATGTGGTTCGAGTCGCTCATCGGTGCCGCCCTCGTTGAGGGC
 GGCATA
 CATAAAGCGCACCTCTGCACATCCACCTTCCTCACCAGCCTCGAATGGAAGTGCCTGCACCCTGCCGCACGATCCTGCAGGACCAC
 GCGGCGGAGGAACACGCTCAGCGCCAGTGTCCACCTCGAGCGCGTTGAGGAGCTCATCGGATACACGTTCAAGAACAAGTACCTC
 CTCTCGAAGCCCTGACACACGCTCCTTACCAGCGCCCGGGAAGCCGCTCCTCATCTCACCAAGCTCTCGAGTATCTCGGGCAG
 GCCGTCCTCGACTACATCATCTCCGGCCGGCTGTACGCGCACCGCAGAAAGCCAGCAGCCAACGCCAGCCAGCAACGACGCGGGT
 AGCACGATCCCACCCCGCGGCCACGCCGCGAGAGCTGCCGACTGGACGATGCCTCCATCCGGGCCGCCCTCGTCAACGCGTCT
 TTCCTCGCCTTCTCTGCATGGAGGCCACCATCTTCGAGCCGCAACCGAGCTCGTTTTCGCTCCTTATCCACCAGCAGCCGCT
 CCCCTTCCCCTTTCGACAGCACTGGCAAACGAGCAACCATAACCCGTCGCCGACGCCCTCCCGCAAGCGCTGTGGCACTTCCCTG
 CGACACTCGTCGCCGACGCTGCTCGCCTCCGCCACGCCGCTACCGCCCGCAGAGCGCTATAGCGAAGACATCTGGCGCGCGCTG
 CGGCAGCATCGCCGGTACCCTGGCGGCTGTTCCGCAAGGTTGGGGCGGAGAAATTTCTTTTCGGACATCGTCGAGGCGGTGCTGGGT
 GCTGTCTTTATCGATTTCGACGACAAACAGTTCCTTGTCTGTTGGTGAATGAGATGGTTGACGGGGCAGAGGGACAGGAGAAAAAT
 GGAAAGGTTGTGCTGGAGGAAGAGGAGGAACCTGAAGCCTGCGAGCGGTTTCTGGAGAAGATCGGATTTGATGGACGTGCTGGATAGG
 TTCATGAGGGACGAGGTCGACTGTTTGCACCCAAAGACGCAGCTGGGGCGGTTGGCGGGTAGCGATAAGGTGGTTTGGGAGTGGGAC
 GAAGGGACTTGGACGCTGGCGAGGCGGAGTCGCCGGAGGGAGGAATGAAGGGGAAGAGGTTTGGTGTAGAGTCGGCCTTGGGGAG
 ACATGGGTTGGTACTCGGTTGACGGGAGACTAGGCACGCTGACAGAAACGAGGCGCGGATCGGGCGGTTGACCTTGGTGGCG
 CAAGGGCGAAGTTGGAGGGGGATGGAGAGGTGGAGGGTGGAGTGGCAGCAGATCGAAGGTGGAATGGTGTGAGATGAAGTG
 AAGAGCGAAGAGAGTGAAGAAGTCGATCAGGTTGTGCTGGTGTGATTGGGGACGATTTCGGACATGGATGATGCTACTCCTCAG
 CCATCTCATGCGATTTAA

Lasiodiplodia pseudotheobromae

Taxonomía

- Dominio: Eukaryota
- Reino: Fungi
- Filo: Ascomycota
- Clase: Dothideomycetes
- Orden: Botryosphaerales
- Familia: Botryosphaeriaceae
- Género: *Lasiodiplodia*
- Especie: *L. pseudotheobromae*

Nota: En gris se resaltan las zonas elegidas para el diseño del RNAi.

DCL1



Ilustración g. Estructura de DCL1 de *L. pseudotheobromae*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

>Lpse_DCL1_Protein_sequence

MVLVCTAEVLAQCLMHSFITMEQINLLIFDEAHHAKKGHSYAKIINDYYVPTDQSKRPRIFGMTASPVDAKVDVAQAASDLEALLHC
 RIATTSNLDLLRKTISRPDENVVIYAPLEKPFETPLHIKMKKEKFADMEAFRTLTFQSSKEASSQLGAWCSDMFWFYALQEEEAKKLES
 RREQEYHRNKRFKTISALDEEVARLREAAKMVSSHMFGEFQNLNLTCLSSKVLLEHLSWLFYFRPTKARCIVFVQRRDARLLHRVF
 SSIGGQHLRSGMIVGSTGKGNLNIIFRGQVMTLLKFKKGLNCLFATSVAAEGLDIPDCNLVVRFDLYKTMIIQYVQSRGRARHKNS
 RYLHMIIEGNLHHRQLVLEARQAEKLMRQFCEALPEDRLLKGNADLDDLMLDRKDFRTYTEPCTKAKLTYDSSLVLAHFTAVLPR
 QGEVFPDPLYIVSPRSKGFICEVILPENSPLPSATGRLCARKAIAKRSAAFEACIQLREGGYLDENLLPIYTKQLPAMRNARLALNC
 KKTSAYDMMTKPQLWAATRGTTPEELRITVIELPDGLERPNOPLAIIPLPSLPEFPIFLNSGTASMVQLTPLTSVFKCSFVEVQ
 YLTTYTLRAFKDIIFNKTYEEDHAKMSYWLAPMKACYQVLDGGFYGLRDLIDWAALEEVEKHVEYHWTAEMSDDFLLDKYLVDKWDGG
 RFFFTECLKGDLKPTDVPDDAVKGTVEHRKDIILNYSISLYKASRAKADPTWNRDQVPIEARQVLRHRRNMLAEPPERREGDLRSKVY

LCPEPLRISTLRPAAVATIYVFPVAVIHRIDQYLIALAEACQLLGLAIRPDLALEAVTKDSDNTEEHGEEVMNFRGMGNNYERLEFIG
DCFLKMATSI SLFGENPDDNEFDHFVKRMCLVCNQNLFFETAKELQLTKYIRSMAFSRRTWYPDGLKMLEGKGHKRTGEEVIKHLGLD
KTIADVCEAFIGAAYLTHDSRDEWKQENWDNAVKAIVNLVASPEHTMKWSEYFDAYEKPSYLDAEPTAAQVDLVNQAEKEHPYRFR
SAKLLRSAFIHPSYPYTFEKVPSYQRLEFLGDSLIDNACITWLVYTFDPDKDPQWLTEHKMAMVSNKFLGAVCVKLGPHKHLKYHSQ
LEYQIRDYVTEIREAEHNANGARDFWVSVKPPPKCLPDIVEAYVVALFVDSEYNFAEVQKFFEMHIKWYFEDITIYDSYANAHPVIR
LHRLFSEVLGCTEHKVMVQELPTIIVPGAPVRCIAGVMVHNRI IAEGMASSGKNAKAKAKAFALDDLETMPLFQFKETYGCDCDEQTD
EEGCGSDDDASDLVEVGEAEDTHARVVKRGV

>RHKG01000374.1:17397-21410 *Lasiodiplodia pseudotheobromae* strain CBS 116459

NODE_548_length_188289_cov_24.514299, whole genome shotgun sequence
ATGGTCCTTGTCTGCACCCTGGAAGTCTCGCCAGTGCCTCATGCATTCTTCATCACCATGGAGCAGATCAATCTACTAATCTTC
GACGAAGCTCATCATGCCAAAAGGGCCACAGCTACGTAAGATCATCAATGATTACTACGTGCCACAGATCAGAGCAAACGTCCC
AGAATATTCGGAATGACAGCCTCGCCGGTGGATGCAAAGGTGGACCTTGCTCAAGCCGCTAGCGATCTCGAAGCATTATGCATTGC
CGCATCGCAACCACCTCAAACCTGGACCTACTGCGCAAGACAATCAGCCGCCGGACGAGAACGTGGTGATATACGCCCACTTGAG
AAGCCGTTTGAGACACCCTGCATATCAAGATGAAAGAGAAGTTCGCCGACATGGAAGCATTCCGCACTCTCTTCAGTCTTCCAAA
GAAGCAAGCTCTCAGTCCGGTGCATGGTGCATGACATGTTCTGGTTTATGCTCTCCAGGAGGAAGGCAAGAGCTTGAGAGC
CGTCGGGAACAAGAATATCACCGAAACAAAAGGTTCAAGACGATTTTCGCCCTCGACGAGGAGTACGAAGATTGAGAGAAGCTGCA
AAGATGGTTAGCAGTCATATGTTCCGGCAACCTCAGCTGAACTTGACATGTCTGAGTTCAAAGGTCTGGAGCTGCACAGTTGGCTA
TTCCGGTACTTCGAACGGCCAAACCAAGCAAGGTGCATCGTCTTCGTCAGCGGCGAGACACTGCTCGTCTGTTACACCGCGTCTTC
AGCAGCATTGGAGGCCAGCACCTCAGATCCGGTATGATCGTCCGTTAGTACTGGCAAAGGGAATGACCTCAACATCACCTTCGCCGGC
CAGGTCTAGTCTCTTAAAATTCAAAAAGGGGGAATTGAACTGCTTGTTCGAACCTCTGTTGCTGAGGAAGGCCCTGCACATACC
GACTGCAACCTCGTCCGATTCCGACCTTACAAAACGATGATCCAGTATGTGCAGTCCAGGGGCCGAGCCCGGCACAAGAATTC
CGATACCTGCACATGATTGAGGAGGCAATTTACATCACAGCGAGCTGTTCTTGGAAAGCCCGCAGGCAAGAAAGTTGATGCGGCAG
TTCTGTGAGGCTTTGCCGGAGGATCGTCTCCTGAAAGGAAACGACGCGGATCTGGATGACCTCATGCTCGATCGCAAGGACTTCAGA
ACTTACACGGAACCTGCACCAAGGCGAAGCTCACCTATGATTCCAGCTCAGCGTCTTGTCTACTTTACAGCAGTACTCCCCAGG
CAGGGAGAGTTTCTTTGATCCTCTCTACATCGTGTCCCCTCGGTACGTAATTCATTTGTGAGGTTATCCTCCAGAAAATTCA
CCCCCTCCATCAGCAACGGGTGCTCTGTGTGCGCAAAGGCTATTGCAAAGCGCTCAGCAGCTTTCCGAGGCTGCATCAACTCCGC
GAAGCGGGTACCTCGACGAGAATCTCTGCCGATCTACACAAAGCAGCTTCTGCTATGAGAAATGCCGACTGGCGTTGAATTGC
AAGAAGACCAGTCCGATACGATATGATGACGAAGCCCAACTGTGGGACGTAACCCGTTGTAACCTCCGGAAGAAGTACGATACCT
GTATCGAACTTCCAGATGGTCTTGAAGGCCCAATCACAGCGAGCTGCGGATACTTACTCGTATAACCTTCCCGAGCCTTCCGGAGTT
CCAATTTTCTCAATTCCGGAACCGCGAGTATGGTTCAGTGCAGCTTAAACGTCCTTCAAAATGCAGCTTCGTTGAAGTTCAG
TATTTGACTACATACACTCAGGGCGTTCAAAGACATCTTCAACAAGACATACGAAGAGGACCAGCCAAGATGTCCTATTGGCTT
GCCCGATGAAGGCTTGTATCAGGTAATGATGGTGGATTTTATGGTTTGCAGACATTCCTCGATTGGGCAGCTTTGGAGGAGGTC
GAAAAGCACGTTGAGTACCATTGGACGGCGGAGATGTCGATGATTTCTTCTGGACAAGTATCTGGTCGACAAGTGGGACGGAGGT
CGGCGCTTTTACGGAATGCCTTAAAGGAGATCTGAAGCCGACAGACCTGTGCCGACGACCTGTCAAAAGAAAGACAGTTGAA
CACAGAAAGACATCTGAACACTCTATTAGTCTGTACAAGGCATCAAGAGCAAGGCGGACCCAACTGAAACCGTGTATCAGCG
GTAATCGAAAGCAAGGCAAGTGTCTCCATCGTGCACACATGTGTGGCGAAACCCGAGAGCGTGAAGGTGATCTCCGATCAAGAGGTG
CTGTGTCGGAACCTCTGAGGATATCAACGCTTCTGTCGCGCAGCCGTGGCCACCATCTACGCTTTTCCCGCTGTGATCCATCGCATA
GACCAGTATCTCATTTGCGCTGGAAGCTTGTGAGCTTCTGGACTAGCATTCTGCTGACTTGGCGTTGAGGCGGTGACGAAGGAT
TCGGACAATACCGAGGAACACGAGAGAGGTTATGAACTTCCCGCGGATGGGCAACAACCTACGAGCGTCTTGAGTTTCATAGGA
GATTTGTTTCTCAAGATGGCCACCTCGATTTCCCTCTTCGGAGAGAAATCCGGATGACAATGAGTTTCGATTTCCATGCAAGAGGATG
TGCTTGGTGTGCAACCAAACTGTTTGAAGCTGCCAAAGAGCTGCAGCTCACCAAGTACATCCGACGATGGCATTCTCAAGAAGA
ACGTGGTATCCGACCGCCTCAAGATGTTGGAAGGTAAGGCCACAAGAGACTGGAGAAGAAGTATCAAGCATGGTCTTGGTGAC
AAGACCATTGCCGACGCTGCGAGGCTTTCATTGGGGCCGCTATTTGACACATGACAGTTCGAGACGAATGGAAGCAAGAAAAGTGG
GATAACGCCGTCAGGACGTCACCAATCTTGTGGCCAGCCAGAACACACCATGAAGAAGTGGTCAGAGTATTTTACGCATACGAG
AAGCTTCTTATCTCGATGCGGAGCCACGGCTGCACAAGTGGATTTGGTCAATCAAGCCGAGAAGGAGCACCATAACCGCTTCCGT
TCAGCGAAGCTGTTGAGGTCGGCTTCATACACCACTCCTATCTTACAGCTTTGAGAAAAGTGCCTTCGTACGAGCGCTTGAGTTCT
TTGGCGACTCACTCATTGACAACGCTGCATTACCTGGCTGGTCTACACTTCCCGGACAAAGACCCTCAGTGGCTGACGGAGCAC
AAGATGGCCATGGTATCCAACTTCTCGGCGCCGCTGCTGCTGAAGCTCGGATTCACAAGCACCCTAAGTACTACCCTACAG
CTCGAATACCAGATCCGCGACTACGTCACCGAAATCCGCGAGGCGGAGCACAACCGCAACCGGACGCGGATTTCTGGGTGTCGGTC
AAGCCGCGCCGAAGTGCCTTCCCGACATCGTTCGAGGCGTACGTCGCGCGCTGTTCTGTCGACAGCGAA TACAACCTCGCCGAGGTC
CAGAAGTCTTCGAGATGCACATCAAAATGGTACTTCGAGGACATCACTATCTACGACTCGTACGCCAACCGCACCCCGCTCATCCGC
CTCCACCGCTTCTTCCGAGGTGCTCGGCTGCACCGAACATAAGGTCATGGTCCAGGAGCTGCCGACCATCGTGCTGGCGCCCCG
GTCAGGTGCATCGCCGGCTCATGGTGCACAACCGCATATTGCCGAGGATGGCTTCTTCCGGGAAGAACGCTAAGGCCAAGGCA
GCGAAGTTTGCCTTGACGATCTCGAAACCATGCCGCTGTTCCAGTTCAAAGAGACGTACGGATGTGATTGCGACGAGCAGACGGAT
GAAGAGGATGCGGTGATAGCGATGATGATGCGAGCAGATTGGTGGAGGTTGGTGAAGCCGAAGATACTCATGCTCGTGTGTGAAG
AGGGAGTTTGA

DCL2

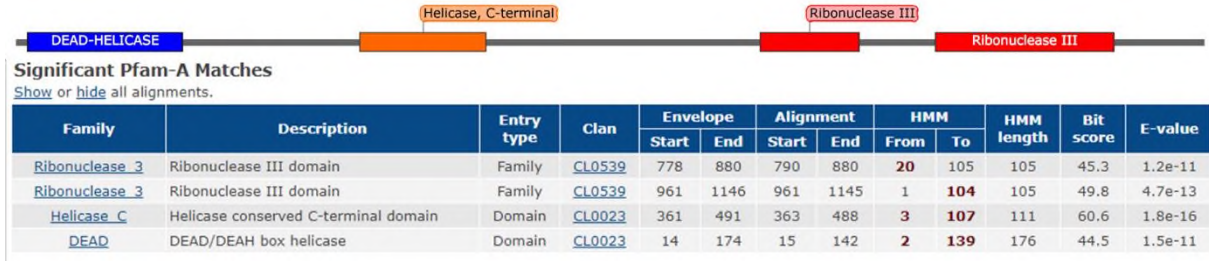


Ilustración h. Estructura de DCL2 de *L. pseudotheobromae*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

>Lpse_DCL2_Protein_sequence

```
MESPNGDSTPFCLRSYQAE MVEESLKQNIIVAMDTGSGKTHVCNPDQLVWFIAPT VTLCHQQFCLFEKHLPAYEIRFLSGNDNVDRW
TDQNIWDVLRNVRI VVSTPAVLLDALTHAFVKLPR LALLIFDEAHMCRGNHPASAIMQRFYHPLL ANGDHDSL PKILGLTASPVVS
ANASGLEI IERSLNAIAKTPKIHR TDLLRFTHRPELVQLNYPGASLDPSTGPPV LATLANVYHAYDILEDPYILSLRQKASEITDET
RSQVLELEKLLNNRKYIHEQLK KLYSRALGIYNE LGGPPEFEFYIRSCIAKFD AFLTNSSHLLLDWSSAEGKHLHDMLATVAAAQ P
VSQNTGMHDNLS PKMNALVDLL LLEWNTDFTGIIIFVEQRATVAAMDHVL SNHPRLRDLF SVGTFFVGTSMTVHRKSHLGI GDLVEIKH
QQQTLEEF RAGKKNLIVATAVLEEGIDVSNCHIVICFEP PKNLKSFIQRRGRARKK DSKFVIMFPNDSTFVKSPEM WLDLEE QMKEA
YLNDQRVVQA AEQRELEKEDGDDTYRCESTGTKVSI SEMPQPVT FVILLPQ PMLHVPDFLLHWNENIRYTL SSEPMDAITLSNDEV T
SLQHSTRALLFEIFQTRMIEERYDFPFLIARPGACGKGESQFLEFGGESRPALEVYADMQAGLNPTIGLLHPKGVGAPLMFRRFQT
SDISMTE DENLQEEETTVQVVCSAFPKRRDFLHYIRDSAQYGM YTKESILPAEGFVMSRLPIAYS MFAAF LPSILHRYELFMIVQE
LCDTVLMADFLHWPESYLTERKDRIVSNGALAKASRR TGLDKFIIITKAFTGSKWRPRYVDILATSSASLQESHTLSTKTLADVVE S
LIGA AFVEGGIHK AHLCTSAFLTSLWKPLHRCRTI LQDHAAEEHASAPVLHLERVEELIGYTFKNKYLLLEAL THASFTAPREAAS
SSYQRLEYLGD AVLDYILSGRLYAHRRKPAANASNSGCTI PPRGHADELPHWMTMHSIRASLVNASFLAFLCMEAAI FEPRTDVVF A
PSSTTTT PLPLSTALANEQPYTVPGTPSRKALWHFLRH SPTLLASAAAATARHERYSEEIWRALRQDHRYPWR LFAKVGA EKFFS
DIVEAVLGA VFIDSTNGSLSPGDDEMVDGAEGYEKNGKLVLEEGEELEACERFLEKIGL TEVLERFMRDEVDCLHPK TQLGRLAGS
DKVVWEWDDKGPDADEAASP
```

```
>RHKG01000099.1:339142-341402 Lasiodiplodia pseudotheobromae strain CBS 116459
NODE_109_length_800652_cov_24.983473, whole genome shotgun sequence
ATGGAGTCGCGCAACGGAGACTCTACCCCTTTCTGCCTGCGGTCCTACCAGGCTGAAATGGTCGAGGAGAGCTTGAAGCAGAATC
ATTGTTGCTATGGACACGGGCAGCGGGAAGACCCACGCTGCAACCCAGACAGCTGGTCTGGTTTATTGCGCCTACTGTCACCCCT
TGCCATCAGCAGTTCTGTCTCTTTGAGAAGCATCTCCCGCATATGAGATCCGCTTTCTCAGCGGCAATGATAACGTCGACCGCTGG
ACTGATCAGAACATTTGGGATGCCGTTCTCAGAAATGTTGCGATGTCGTGTCGACCCCGCTGTGCTGCTGGATGCTCTGACCCAT
GCCTTTGTGAAGCTCCCGACTTGCCTTCTGATATTGATGAGGCCACATGTGTGAGGCAACCATCCTGCTAGCGCCATCATG
CAGAGATTTTACCACCACTGCTTGC AAATGGCGACCACGACAGCCTGCCCAAGATCCTCGGCTTGACAGCGAGTCCGGTTCGTCAGT
GCAAACGCAAGCGGCTTGAGATTATCGAACGCAGCCTTAATGCAATCGCCAAAATCCCAAGATCCATAGAACAGACCTCCTTCGC
TTCACACACAGGCTGAGCTTGTGCAGTTAAATTACCTTGCCGCATCTTTAGACCCCTCTACCGGGCCACAGTCTTGTACTCTA
GCTAAACGCTATCAGCGTAGCAGATCTTGGAAGATCCGTAGCCTTGTCTGCTCAGTCAAAAAGCATCAGAGATCAGGATGAGACC
CGGAGCCAAGTCTTAAGAGAGCTGGAGAAGCTGCTAAACAACAGGAAGACTTACATCCACGAGCAGCTGAAGAAGCTCTACTCGCGA
GCGCTCGGTATCTACAATGAACTTGGTGGACCTCCAACAGAGTCTACATCCGGAGTTGCATCGCCAAAATTTGATGCCTTCTTAACC
AACTCAAGCCACTTGTACTTGTGACTGGTTCATCAGCCGAAAGCAAGCATCTCCACGACATGCTCGCGACCGTGGCCGACGCCAGCCT
GTGAGCCAGAATACGGGAATGCATGACAATCTATCGCAAAGATGAAATGCTCTCGTCGATCTTCTTCTGTCTGAATGGAATACTGAT
TTTACC GG CATCATCTTCGTGAGCAGCGCGCTACC GTTGTGCAATGGACCATGTTCTCTCGAACCACCCCTCGGCTTCGGGACTTG
TTCAGTGTGGCACCTTTGTGGCACCTCCATGACCGTTCACCGGAAATCCCATCTCGGCATCGGCGACCTGGTAGAAATCAAACAC
CAGCAGCAGACTCTGGAAGAATTCGGCGCTGGCAAGAAAACCTTATGTCGCCACC GCGTTCTGGAAGAAGGATTTGATGTATCC
AACTGCCATATTGTACTCTGCTTTGAACCCCAAAGAACCTCAAGTCTTTTCATTCAGCGCCGCGGCGCTGCAAGGAAGAAGGACTCA
AAGTTTGTATCATGTTCCCTAACGACTCCACCTTTGTCAAGTCTCCAGAAATGTGGCTGGACCTGGAAGAACAATGAAGGAGGCG
TATTTGAATGATCAACGGGTAGTCCAAGCAGCAGAACAACGCAAGAACTCAAAGAGGATGGGGACGACACCTACCGTTCGCAATCC
ACGGGGACGAAGGTGTCGATATCCATGGAACCACAACCAGTACATTTGTATCCTTCTGCCCCAGCCGATGCTGCATGTCCCTGAC
TTCCTACTTCAATTGGAACGAGAATATTCGTTACAGCTAAGCAGCAACCAATGGATGCCATAACTCTCAGCAACGCAAGTGAACA
TCACCTCAACATTCACGCGGCTCTTCTATTGAGATCTCCAGACAGTATGATCGAAGAAAGATACGATTTCCCTTTCTTAATT
GCTCGACCGGGTGCCTGTGGCAAAGGCGAAAGCCAGTTTCTAGAGTTGCGCGGTGAAAGCAGACCTGC ACTTGAGGTCTACGCCGAT
ATGCAGGCTGGCCTCAACCCACGATAGGTCTTCTACACCCGAAAGGAGTTGTAGGCGCCCTTTGATGTTCCGCCGCTTCCAACT
TCTGATATCAGCATGACCGAAGACGAGAATCTCCAGCAAGAAGAAGACGACTGTCCAAGTTGTCTGCTCAGCGTTTCCAAAAGG
CGTGACTTCTGCATTATATTAGAGATTCGGCCCAATATGGCATGTACACGAAGGAAGCATACTACCAGCCGAAGGCTTCGTTATG
AGCAGGCTACCCATAGCTTATTCGATGTTGCGGGCTTCTACCATCGATTTTGCACCCTACGAGCTTTCATGATCGTCCAAGAG
CTTTCGATACTGTACTCATGGCAGACTTCTCCACTGGCCGAGAGCTATCTCACTGAACGTAAGATCGAATTTGTTCCACGGT
GCATTCGCTAAAGCTCAGCCGACCGGCTCGACAAATCATCATCACTAAGGCCCTTACAGGCTTCCAAATGGCCGCCACGCTAT
GTGCAAGATATCTAGCCACATCTTACGCTTCTTCCAAGAGAGTCAACACTATCTACCAAGACACTAGCTGATGTGGTCGAGTCC
```

CTTATCGGTGCCGCCCTTTGTGGAGGGCGGCATACACAAAGCGCACCTCTGCACATCGGCCTTCTCACCAGCCTCGAATGGAAGCCA
CTACACCGCTGCCCGCACCATCCTGCAGGACCACGGCGGAGGAACACGCATCAGCGCCAGTGTCCACCTCGAGCGCGTCGAGGAG
CTCATCGGATACACGTTCAAGAACAAGTATCTCCTCCTCGAAGCCCTGACACACGCGTCGTTACCCGCGCCTCGGGAGCCGCCCTCC
TCGTCTTACCAACGCCCTCGAGTATCTCGGCGACGCCGTCTCGACTACATCCTCTCCGGCCGGCTGTACGCGCACCGCAGAAAACCA
GCCGCCAACGCCAGCAACAGCGGCTGCACAATCCCACCCCGCGGCCACGCCCGGACGAGCTGCCGCACTGGACGATGCACTCCATC
CGGGCCTCCCTCGTCAACGGCTCTTTCTCGCCTTCTCTGCATGGAGGCCGCCATCTTCGAGCCAGCACTGACGTCGTTTTCGCT
CCTTCATCCACCACGACAACCACTCCCTCCCTTTTCGACAGCACTAGCAAACGAGCAACCGTACACCGTCCCCGGCACTCCTTCC
CGCAAGGCTCTGTGGCACTTCTGCGACACTCATCGCCGACGCTGCTCGCCTCTGCCGCGGCCGCCACCGCCCGGCACGAGCGGTAC
AGCGAAGAGATCTGGCGCGCGCTGCGGCAGGATCATCGGTACCCGTGGCGGCTATTCGCCAAGGTTGGTGGGAGAAGTCTTTTCG
GACATCGTCGAGGCGGTGCTGGGTGCTGCTTTATCGATTGACGACAAAACGGTTCTTTGTCTCCTGGTGATGATGAGATGGTTGAC
GGGGCAGAGGGATACGAGAAAAATGGAAAGTTGGTGTAGAGGAGGGAGAGGACTTGAAGCTTGCAGCGGTTTTCTAGAGAAAATT
GGGCTGACGGAGGTGCTGGAGAGGTTGATGAGGGACGAGGTCGACTGCTTGCACCCGAAGACGCAGCTGGGGC GGTGGCGGGTAGC
GATAAGGTGGTTTTGGGAGTGGGATGACAAGGGCCCCGGATGCAGACGAGGCGGCTCACCG

Relacionados con *Anthracoystis cenchri*

Anthracoystis cenchri

Taxonomía

- Dominio: Eukaryota
- Reino: Fungi
- Filo: Basidiomycota
- Clase: Ustilaginomycetes
- Orden: Ustilaginales
- Familia: Ustilaginaceae
- Género: *Anthracoystis*
- Especie: *A. cenchri*

Las regiones resaltadas en amarillo corresponden a las zonas de mayor similitud entre todas las secuencias.

Anthracoystis flocculosa PF-1

Taxonomía

- Dominio: Eukaryota
- Reino: Fungi
- Filo: Basidiomycota
- Clase: Ustilaginomycetes
- Orden: Ustilaginales
- Familia: Ustilaginaceae
- Género: *Anthracoystis*
- Especie: *A. flocculosa*

DCL1

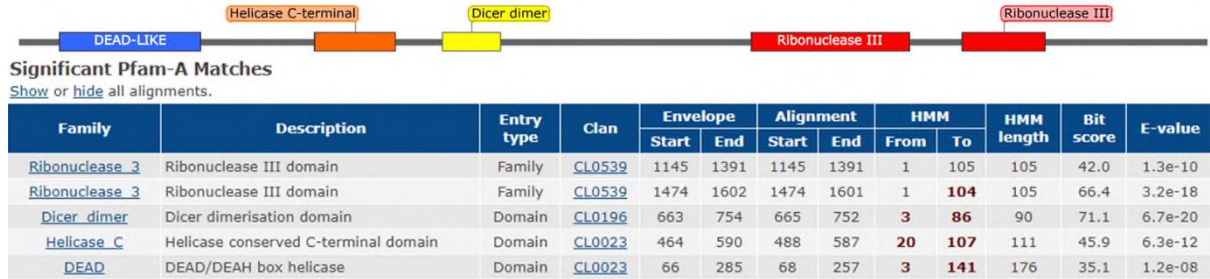


Ilustración i. Estructura de DCL1 de *A. flocculosa*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

```
>tr|A0A061H5E2|A0A061H5E2_9BASI Uncharacterized protein OS=Anthracocystis
flocculosa PF-1 OX=1277687 GN=PFL1_04802 PE=3 SV=1
MLKRPWQAARQALDALPIDAQEDDQDALRQRLKRLKLAARVVARTAVPPPATKHHKSIDDVEVRSYQSKLFEQAKTRNLIVCLPT
GSGKTLVSVLLQHMRRLPEVSTRGTDPSPGMADQQGDDLRSVGHRLHLSAANIPIHSSAGKTASRQGRVSYFLVNLVPLVHQOANVIA
SFSDLRVGKVIYVYELKDEILDLSKLRDLTWKPEWDALDDAHDVVTATQCLLALVHAYVVRIDDIIDLVFDEAHHAIKSHPYARIMLY
YRLAAEQQRPKILGMTASPVFSLGDYGEASKLLEQTLDAEIVTAPDKSQVDLQNVVNRPVELVAEYDAVDPAGIEPTALSRLMHERC
ADVSDDFAKTVWPKIEYSLIQHGQLMTDLVWHGSTQEYFTRAQRWQENARKHSARRTLLDDAWTSTAAPQDIFGQKISSSOLSADAE
LNRAMMAVLGEQPPPPSTFDVGNHNSPKVLRLLIEILKCFGCSPSSRAAFCGIIFVQRRQTAAALAEELLRRVPELDYLKPEWLIGHD
TAAGLAMDWHDQVEVLDLRFRRRAPNTLLIATSVAEGLDIOAANVVVRFDLFDRHSGFLQSRGRASQDSRFVVMARNNLAHYRVI
ASATLTEMGRDRLAKLAEKTGATARPEVEEDELGYEYFLAEPLTGARLYPQDAPNIVSHYAGYLRVEQGKDSFARPEFEIRIDDTV
WPRTFVCHLKLKLPANSQLEVVTEPWTTKRAAKRMAALEACRRLRELDLLEHLMPRM PYRLRWDPAASDSNGAIYAAPAPLRSPTRL
LHFRVRDEFQGWNTLPGLGQALGSDGSLRAFATLPLERLSRDGDDDEDEDEDDGGKIRHRSLFLVTAQPLPPTALLQLYGDRGLS
SLGEVGPAPVVLSAERFDAAQRFTETLLGWITHRQQIHLDLQAPFLVLPAAEETS GTGSTPLVDWSAVEAVASGALRNAGDVPLDDI
FDAMIIDRADLVAPGSFYAVGVRDLTPFSRPPPGSKESEWDSTSYFDHYCKSKARYSGADVAPPADQPLLSVRKLDKWRNQLVPR
PTSTKPGTAAAAAMVGI PSAVASKRQRTLPRLMIPFYAHVHPLPLSVARSGLLLPSVFYRYDDLLLSQGCSRALLSDRLPGDLVLT
ALTPPARNAGFDYERLEFYGDTVLKLLAACQVFTTRLSETEGELHVASKEILVNQVLEVHAMRLKWKVRFSDKWMKKKTFWFDGW
TEGARAATAATAATRAQAEAGGPADAAAGSNDDDDQDNEGDDDDVAKEGRGEVEERQHLASTANAVPEVPTPTPTPTPTIRTRP
TTXXXXXXPGIRTNAGAGGPADNAADDAGLPTIRTPDDADLTLAQRLLVDVDAAVPVAARDVVPCKALSDMVEALLGASLVHSGI
AGVLQTAVSIIGILPDDIAGPSSFHGQLTALSPPDPSPWRSRVDTSALSHLERVFDYTFAPHLALEAFTHPSLLASVLPQSYRLEYL
GDAFLDYCVILKIRRLYPHLDEGEATALKSNMVSNTLSALCEVLDLTSFIASHSAPLKEAVSTYTDVAVRQLRRAEEDRAELGRGGG
GNGGGEPRQYWWTRNPKAVADVVESSLGAVLVDA RFDFDRAERVFHEVYWPFLRRWCTPELAVVPIKVLTSLLTGKRKCSGWGLA
IQFAYSVGPQEGRLYLS DAGRNGGGSGGSDGNSGGNSGDDGDS DGS DRAARMAEMGAEAVRCRIYSHGVLAEETTERIRSHVQR
QALIQAQRTMAYPQRSAVAASIAARDSLDAENGGYGGHDDKGDASDAEEQESERCVVGVVSLPTFRAVIKAMRWMRPFDASTSFPEI
AARTPPKMVDVVRCSCKKGRQH
```

```
>ENA|EPQ27664|EPQ27664.1 Anthracocystis flocculosa PF-1 hypothetical protein
ATGCTCAAGCGACCCCTGGCAAGCAGCCAGGCAGGCCCTCGACGCGCTCCCATCGATGCACAAGAAGACGATCAAGACGCCCTGCGG
CAGCAGCGGCTCAAGCGCCTCAAAAAGCTCGCCGCAAGGGTCGTGGCACGCACTGCCGTACCCCGCCAGCGACCAAGCACCACAAG
TCCATCGACGACGTAGAGGTGCGATCGTATCAGAGCAAGCTCTTCGAAACAGGCAAAGACCAGGAACCTCATCGTATGCCTCCCCACC
GGCAGCGGCAAGACGCTCGTGTCTGTCTCTTCTACAACACATGAGGGCAGCTCGAGCCCGTCTCCACCCGCGGCACCCGACCCGAGC
CCTGGCATGGCCGACAGCAGGGCGACGACCTCGAAGCGGTACCCGACTGCACCTCAGCGCCGCAACATCCCGCATTCGAGCGCC
GGCAAGACCGCATCGAGCAGGGCAGGGCAGGGTCAGCTTCTCTCTCTCAACTCGTCCCGCTGGTCCACCAGCAGGCCAACGTCATGCC
AGCTTCTCCGACCTCCCGCTGGCAAGGTCTACGGCGAGCTCAAGGACGAGATCCTCGACAGCAAGCTGCGCCTCGACACCTGGCGC
AAGCCCGAGTGGGACGCGCTGCTCGACGCCACGATGTCGTGGTCCGACCAGCCCAATGCCTCCTCGGAGCCTTGGTGCACGCCTAC
GTCCGCATCGACGACATCGACCTGCTGCTTTCGACGAGGCCATCATGCCATCAAGAGCCACCCCTACGCCCGCATCATGCTCTAC
TATCGCCTGGCCGAGAGGGCCAGCGGCCAAGATCCTCGGCATGACGGCCAGCCCGTCTTCTCGCTGGCGACTACGGCGAGGCC
AGCAAGTGTCTCGAGCAGACGCTCGACGCCGAGATCGTCAACCAGCCGACAGAGCCAGGTCGACCTCCAGAATGTCTGCAATCGG
CCCGTCGAGCTCGTCGCCGAGTACGACGCCGTCGATCCCGCGGCATCGAGCCGACCGCTGTCCAGGCTGATGCACGAGCGTGC
GCCGAGCTCTCCGACGACTTGCCAAAGACGGTGTGGCCAAAGATCGAGTACAGCCTGATCCAGCAGCGGCGAGCTCATGACGACCTC
GTCTGGCAGCGCTCGACACAGGAGTATTTACAGCGGCACAGCGCTGGCAGGAAAACGCGCGCAAGCACAGCGCCAGGCGCACGCTC
CTCGACGACGCGTGGACGTCGACGGCGGCGCGCAGGACATCTTCGGGCAGAAGATCTCGTCATCGCAGCTGTCCGCCGACGCCGAG
CTCAACCGGCCATGATGCCGCTCCTCGGCGAGCAGCGCCGACCTTCCACCTTTGACGTGGGCCGACAACTGCAGCCCCAAG
GTCTCCGCTCATCGAGATCCTCAAGTGCTTTGGCTGCAGCCCCCTTCCCGCGCCGCTTCTGCGGCATCATCTTTGTCCAGCGC
CGCCAGACCGCCGCGCTCGCAGAGCTGCTCCGCGCGCTCCGGAGCTCGACTACCTCAAGCCGAGTGGCTCATCGGTCACGAC
ACGGCCCGCCGCTCCGCTGACCTGGACGGCACGACGCTCGAGGTGCTCGAGCCTCCGCGCGGCGCACGACCACTTCTGATC
GCCACGTCTGGTGGCCGAGGAGGGGCTCGACATCCAGGCTGCCAAATGTCTGTGGTCCGCTTCGACCTCTCGATCGCCACAGCGGC
CTCCAGTCCGCGGGGGCGAGCGCGTCCAGGACAGTCTGCTGCTCATGGCCGAGCGCAACAACCTCGCCACTACCGCGTCATC
GCCTCGCCACCTCACCGAGATGGGACGGCGGACTGGCTGGCCAAAGTGGCCGAGAAGACCGGCGGACGGCCCGCCGAGGTC
```

GAGGAGGACGAGCTCGGATACGAATACTTCCTCGCCGAGCCCTCACCGGCCAGACTTTACCCGAGGACGCGCCCAACATTGTT
 TCGACTACGCCGGCTACTTGCCTCGAGCAGGGCAAGGACTCGTTTTCGCGGCCGAGTTCGAGATCCGATCGACGACACGGTG
 TGGCCGGGACGTTTGTCTGCCACCTCAAGTGCCTCGCCGCAATTTCGAGCTCCGCGAGGTGTCACCGAGCCGTTGGACCACCAAGCGC
 GCCGCAAGCGCATGGTTCGCTCGAGGCTGCAGGAGGCTGAGGGAGCTGGACCTGCTCGACGAGCACCTCATGCCGCGCATGCCG
 TACCGTCTACGCTGGGATCGGCCGCCAGCGACAGCAACGGAGCCATCTACGCGGCCCGCACCGTTCGCGAGTCCACCCGGCTC
 CTGCACTTCGCGGTCCGCGACGAGTTCAGGGTTGGAACACGCTGCCTGGCCTCGGCCAAGCGTTGGGCTCGGATGGTCCCTGCGG
 GCGTTTTCGACGTTGGTGGCGCTGGAACGCTCAGCCGCGACGGCGACGACGACGACGAAGACGAAGACGAAGACGAGGTGGCAAG
 ATCCGGCACCGCTCCTTGTTCCTCGTCACGGCACAGCTTGCCTCGCCACCGCGCTGCTGCAGCTGTACGGCGATCGGGGACTCTCC
 AGCCTCGGCGAAGTGGGACCGGCGCAGCCCGTGTGCTGAGCGCCGAGCGCTTCGACGCGGCCAGCGCTTACCAGAGACGCTCCTG
 GGCTGGATCACGCACAGGCAGCAGATCCACGACTTGACGGCCCTTCTCGTCTGCCCCGGAAGCCGAAACCTCGGGCACCGGA
 TCGACGCCGTTGGTGCAGTGGTTCGGCCGTCGAGGCCGTCGCTCGGGCGCGCTCCGCAACCGCGGCGACGTGCCGTCGACGACATC
 TTCGACGCCATGATCATCGACCGCGCCGACCTCGTTCGCGCCCGGCTCGTTTACGCGTTCGGGTTCGGGCGGACCTCACGCCCTTT
 TCGCGCCCGCCCGCGGCTCAAAGGAGTCCGAGTGGGACAGCACCAGCTACTTTGACCACTACTGCAAAATCCAAGGCGAGGTACAGC
 GCGCGGACGTTGGTTCGTCGCGCCGCGGATCAGCCGCTGCTGTGCGTTCAGGAAGCTGGACAAGTGGCGCAACCAGCTCGTGCCTCGG
 CCCACCTCGACCAACCCGGGACGGCGGCCCGCCGCCATGGTCGGCATACCTCGGCCGTCGCGAGCAAGAGGCAGAGGGCGGACG
 CTGCCGCGGATGCTCATCCATTCAGCCACGCTCCAGCGCTCGGCTTCGCGTTCGCGCGCAGCGCTTCCCTCGCTCCCTCGGTC
 TTCTACCGCTACGACGACCTGCTCCTCTCGCAGGGTGCAGCCGCGCCCTCCTGTGCGACCGTCTGCGGGCGACCTGGTCTGACG
 GCGTGCAGCCCGCGCGCAACGCCGCTTCGACTACGAGCGGCTCGAGTTCTACGGCGACACGGTGTCAAGTGTGCGCGCC
 TGCCAGGTCTTTACCAGCGCTCAGCGAGCCGAGGGCGAGCTGCAGTGGCGAGCAAGGAGATCTCGTCAACCAGGTCTTCGAG
 GTCCACGCCATGAGGCTCAAGCTCTGGAAGTGGTTCGCTTCAGCGCAAGTGGATGAAAAGAAGACCTTCTGGTTCGACGCGTGG
 ACCGAGGGCGCACGAGCAGCGGCGACAGCGGCGGCGACGGCAGCCCGGCTCAAGCCGAAGGGGACCGGCGAGCAGCGCGGCC
 GGCACAACGACGACGCGCCAGGACAACGAAGGCGACGACGACGAGCTGGCGAAAGAGGGTTCGTTGGCGAGGTCGAGGAGCGGCG
 CACTGGCATTCCAGCCCAACGCCGTGCGGAGTCCCGCCGACGACGCGCCGACGCGGCGACTCCGGACGCGGCGACGCCCG
 ACGACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNACCTGGCATCCGGACCGCCACGCGCGTTCGCGGAGGTCCCGCCGACAACGCCCGCGGACG
 GCCGACTTCGACGATCCGACTACGCCGACGACCGGACTGACGCTGGCCGAGCGCTCGTTGACGTCGACGCTGCCGTGCC
 GTCGCGGCGCGGGACGTGGTGCCTGCAAGGCGTGTCCGACATGGTCGAGGCGTGTTCGCGGCTTCGCTCGTCCACTCGGCGATC
 GCCGGCTGCTGCAGCGCCGCTTCGATCGGCATCCTGCCGACGATATCGCCGGCCGTCGTCGTTCCACGGGACGCTGACGGCC
 CTCTCGCCCGCCCGGACCCGAGCTGGCGCTCGCGGTCGACAGCTCGGCGCTGTCGACCTCGAACGGGTGTTCGACTACACGTTT
 GCCGCGCGACCTCGCCTCGAGCCCTTACTACCCGTCGCTCGCTCGCTCGGTGTTGCCCTCGTACGAGCCTCGAGTACCTG
 GGAGACCTTCTCGACTACTGCTCAAGATCCGCGCCCTTACCCTCGATCTCGACGAGGGCGAGGGCGCGCTCAAG
 AGCAACATGGTTCGAACGCCACGCTTCGCGGCTGTGCGAGGTGTCGACCTGACCAGCTTCATCGCCAGCCACTCGGGCGCGCTC
 AAGGAGGCGTTCGACTACACCGACGCGTCCGCCAGCTGCGGCGCGCCGAAGAGGACAGGGCCGAGCTCGGTTCGCGCGGCGGCG
 GGCAACGCGGTTGGCGAGCCGAGGCACTGTTGGTGGAGCAGCGCAACCCGAAAGCCGTCGCGGACGCTCGTTCGAGTCGAGCCTCGGC
 GCCGTGCTGGTTCGATGCCGCTTCGACTTTGACCGGGCCGAGCGGCTCTTTGAGCACGCTACTGGCCTTTCCTGCGCCGGTGGTGC
 ACGCCGAGCTGGCCGTCGTACCCAACATCAAGTGTGACAGCGTGTGACGGCAAGCGAAAGTGTCCGGTCGGGGGCTGGCC
 ATCCAGTTTGCCTACAGCTCGGGCCGGCCAAAGAAGGACTGCGCTACCTGTCGGACGCTGGCCGCGCAACGGTGGCGGCGAGCGGT
 GCGGACGCGGCGGCAACAGCGGTGGCAACAGCGGCGACGCGGCAACGAGTGGCAGCGACCGGCGCCACGGATGGCCGAGATG
 GCGCGGAAAGCGGTGCGATGCGCATCTACTCGACGGGCTGCTCCTGGCCGAGACGACCGAGAGGATCCGCTCCATGTCCAGCGA
 CAGGCGTGTATCCAGGCAAGAGGACGATGGCCTACCCGACGCGCTTCGCGTGGCCGCGTCCATCGCCGCCGGGACAGCCTCGAT
 GCCGAGAACGCGGCTACGGCGGCCACGACACAAGGGCGACGCGAGCGACGCCGAAGAGCAGGAGTCGAGGCGCTGCGTTCGTCGGG
 CAGGTTCGCTGCCACGTTCCGCGCAGTGTATCAAGGCGATGCGTGGATGCGGCGGTTTCGATGCGTTCGACGTCGTTCCCGGAGATC
 GCGGCCAGGACGCCGCCAAGATGGTGCAGCTCGTACGCTGCAGTGCAGAGGGCCCGCCGACACTGA

DCL2



Ilustración j. Estructura de DCL2 de *A. flocculosa*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

>tr|A0A5C3F3W8|A0A5C3F3W8_9BASI Uncharacterized protein OS=Anthracocystis
 flocculosa OX=84751 GN=PSFLO_04682 PE=3 SV=1
 MPTSPASCPSLIDPRPRSNSLAKVGSLSPGSIPPRSPKEDRAQSHLQFQNDVHEHQGT PDMLKRPWQAARQALDALPIDAQEDDQD
 ALRQRLKRLKLAARVVARTAVPPATKHKSIDDVEVRSYQSKLDFEQAKTRNLIVCLPTGSGKTLVSVLLLQHMRLPEVSTRGT
 DSPGMADQQGDDLRSGHRLHLAANIPHSSAGKTASRQGRVS FFLVNLVPLVHQQ ANVIASFSDLRVGKVIYVYELKDEILD SKLRLD
 TWRKPEWDALLDAHDVVVATAQCLLGLALVHAYVRI DDI DLVDFDEAHHAIKSHPYARIMLYYRLAAEQRPKILGMTASPVFSLG DY

GEASKLLEQTLDAEIVTAPDKSQVDLQNVVNRVPELVAEYDAVDPAGIEPTALSRLMHERCADVSDDFAKTVWPKIEYSLIQHGLM
TDLVWHGSTQEYFTRAQRWQENARKHSARRTLLDDAWTSTAAPQDIFGQKISSQLSADAELNRAMMAVLGEQPPPPSTFDVGPNC
SPKVLRLLEILKFCGSPSSRAAFCGIIFVQRRQTAALAEALLRRVPELDYLKPEWLI GHDTAAGLAMWDHQVEVLDRFRRRAPTN
LLIATSVAEEGLDIQAANVVVRFDLFDRHSGFLQSRGRARQDSRFVMAERNLHAHYRIASATLTEMGRRDWLAKLAEKTGATAR
PEVEEDELGYEYFLAEPLTGARLYPQDAPNIVSHYAGYLRVEQKDSFARPEFEIRIDDTVWPRTFVCHLKLKPANSQLEVVTEPWT
TKRAAKRMAALEACRRLRELDLLEHLMPRMPYRLRWDPAASDSNGAIYAAPAPLRSPTRLHFRVREDFQGWNTLPLGLQALGSDG
SLRAFATLVPLERLSRDGDDDEDEDEDDGGKIRHRSFLVTAQPLPPTALLQLYGDRGLSSLGEVGPAPQVVLASERFDAAQRFTTE
TLLGWI THRQQI HDLQAPFLVLPAAEETS GGTSTPLVDWSAVEAVASGALRNAGDVPLDDIFDAMIIDRADLVAPGSFYAVGVRRDL
TPFSRPPPGSKSEWSDTSYFDHYCKSKARYSGADVAPPPADQPLLSVRKLDKWRNQLVPRPTSTKPGTAAAAAMVGI P SAVASKRQ
RRTLPRMLIPFYAHVHPLPLSVARSGLLLP SVFYRYDLDLLSQGCSRALLSDRLPGLDLVLTALTPARNAGFDYERLEFYGDTVLKL
LAACQVFTTRLSETEGELHVASKEILVNQVLEVHAMRLKWKVRFSDKWMKKTFWFDGWTEGARAAAATAATAATRAQAEQGPAD
AAAGSNDDDGQDNEGDDDDVAKEGRGEVEERQHASTANAGAGGPADNAADDADSDDPDTPDDADLTLAQRLVDVDAVPAARDV
PCKALS DMVEALLGASLVHSGIAGVLQTA V SIGILPDDIAGPSSFHGQLTALSPPDPSPWRSRVDTALSHLERVFYDTFAAPHLAL
EAFTHPSLLASVLPSTYQRLEYLGDFAFLDYCVILKIRRLYPHLDEGEATALKSNMVS NATLSALCEVLDLTSFIASHSAPLKEAVSTY
TDAVRQLRRAEEDRAELGRGGGGNGGGEPRQYWWTTTRNPKAVADVVESSLGAVLVDFDRAERVFVHYVWPFLLRWCTPELAVV
PNIKVLTSLTTEKRSKSWGLAIQIFAYSVGPGQELRYLSADAGRNNGGSGGSDSGNSGGNSGDDGSDGSDRAARMAEMGAEAVRC
RIYSHGVLLAETTERIRSHVQRQALIQAKRTMAYPQRSAVAASIAARDSLDAENGGYGGHDDKGDASDAEEQESERCVVGVQVSLPTF
RAVIKAMRWMRPFDASTSFPEIAARTPPKMVDVVRCSCKKGRRQH

>ENA|SPO39203|SPO39203.1 Anthracocystis flocculosa uncharacterized protein
ATGCCGACATCACCAGCGTCTTGCCCGTCTCTTATCGACCTCGTCTCGGTCCAATTCCCTGGCCAAGGTCCGGTCCCTTTCCGCC
GGCAGCATACCTCCTAGAACGCCAAAGAGGACCGCGCCAGCACGCCCTTGACGGTCCCAACGACGTCCACGAACGACACCAGGGC
ACGCCGACATGCTCAAGCGACCTTGCAAGCAGCCAGGCAGGCCCTCGACGCGCTCCCATCGATGCACAAGAAGACGATCAAGAC
GCCCTGCGGCAGCAGCGGCTCAAGCGCTCAAAAAGCTCGCCGCAAGGGTCTGGCAGCAGCTGCCGTACCCCCGCCAGCAGCAAG
CACCACAAGTCCATCGACGACGTAGAGGTGCGATCGTATCAGAGCAAGCTCTTCGAACAGGCAAGACCAGGAACCTCATCGTATGC
CTCCCCACCGGCAGCGCAAGACGCTCGTGTCTGTCTCTGCTTCTACACACATGAGGCGACTCGAGCCCGTCTCCACCCGCGGCACC
GACCCGAGCCCTGGCATGGCCGACCAGCAGGGCGAGCCTTCGAAGCGGTACCCGACTGCACCTCAGCGCCGCCAACATCCCGCAT
TCGAGCGCCGGCAAGCTCCGCATCGAGGAGGGCAGGCTCAGCTTCTTCTCTCGTCAACCTCGTGCCTCCGCTGGTCCACAGCAGCGCAAC
GTCATCGCCAGCTTCTCGACCTCCGCTTGCAAGGTCTACGGCGACTCAAGGACGAGATCTCGACAGCAAGCTCGCCGCTCGCCGCTCGAC
ACCTGGCGCAAGCCGAGTGGGACGCGCTGTCTCGACGCCACGATGTCTGTGGTCCGCCACCCCAATGCCTCCTCGGAGCCTTGGTG
CACGCTACGTCCGCATCGACGACATCGACCTGTCTGTCTTCGACGAGGCCATCATGCCATCAAGAGCCACCCCTACGCCCGCATC
ATGCTTACTATCGCTGGCCGAGAGGGCCAGCGGCCAAGATCTCGGCATGACGGCCAGCCCGTCTTCTCGTGGCGACTAC
GGCGAGGCCAGCAAGTGTCTCGAGCAGCGCTCGACGCCGAGATCTCACCGCGCCGACAAGAGCCAGGTTCGACCTCCAGAATGTC
GTCAATCGGCCCGTGCAGCTCGTCCGCGAGTACGACGCCGCTGATTCGCCCGGCATCGAGCCGACCCGCGTGTCCAGGCTGATGCAC
GAGCGCTGCGCCGACTTCCGACGACTTGGCAAGCGGTGTGGCCCAAGATCGAGTACAGCCTGATCCAGCAGGGCAGCTCATG
ACGACCTCGTCTGGCAGCGCTCGACACAGGAGTATTTACGCGCGCACAGCGTGGCAGGAAAACCGCGCAAGCACAGCGCCAGG
CGCAGCTCCTCGACGACGCGTGGACGTGACGCGCGCGCCGAGGACATCTTCGGGCAGAAGATCTCGTCATCGCAGCTGTCCGCC
GACGCCGAGCTCAACCGCCCATGATGGCCGCTCCTCGCGAGCAGCCGCCGCCACCTTCCACCTTTGACGTGGGCCCGCACAACTGC
AGCCCCAAGGTCCTCCGCTCATCGAGATCCTCAAGTGCTTTGGCTGAGCCCTCTTCCCGCGCCGCTTCTCGGGCATCATCTTT
GTCCAGCGCCGACAGCGCCCGCCGCTCGCAGAGTGTCCGCGCGTCCCGGAGCTCGACTACCTCAAGCCCGAGTGGCTCATC
GGTACGACACGGCCCGCCGCTCGCCATGGACTGGCACGACAGCTGAGGTCGTCGACCCGCTCCCGCCGGCCAGCCACGACCAAC
CTTCTGATCGCCAGTCTGGTGCCGAGGAGGGCTCGACATCCAGGTCGCCAATGTCGTGGTCCGCTTCGACCTTCGATCGCCAC
AGCGGCCTCCTCCAGTCCGGGGGGCGAGCGGTTCCAGGACAGTCTGCTGCTCATGGCCGAGCGCAACAACCTCGCCACTAC
CGCGTATCGCCTCGGCCACCCTCACCGAGATGGGACGGCGGACTGGCTGGCCAAGTGGCCGAGAAGACCGGCGCAGCGCCGG
CCCGAGGTCGAGGAGGACGAGCTCGGATACGAATATTCTCGCCGAGCCCTCACCGGCCAGACTTTACCCGACAGGACGCGCCC
AACATTTGTTTCGCACTACGCCGGTACTTGCCTCGAGCAGGGCAAGGACTCGTTTGCCTGGCCCGAGTTTCGAGATCCGCATCGAC
GACACGGTGTGGCCCGGACGTTTGTCTGCCACCTCAAGCTGCGGGCCAATTCGCAGCTCCGCGAGGTGCTCACCGAGCCGTGGACC
ACCAAGCGCGCCAAAGCGCATGGCTGCGCTCGAGGCTGCAGGAGGCTGAGGGAGTGGACCTGCTCGACGACGACCTCATGCC
CGCATGCGCTACCGTACGCTGGATCCGCGCCGACGACAGCAACGGAGCCATCTACGCGGCCCGCCAGCTTGCAGCTTCCGCGATCCC
ACCCGGCTCCTGCACTTCCGGGTCCGCGACGAGTTCAGGGTTGGAACAGCTGCCTGGCCTCGGCCAAGCGTTGGGCTCGGATGGG
TCCCTGCGGGCGTTTTCGACGTTGGTCCGCTGGAACGCCCTCAGCCGCGACGGCGACGACGACGACGAAGACGAAGACGAAGACGAC
GGTGGCAAGATCCGGCACCGCTCCTTGTCTCTGTCAGGCACAGCTCTGCCGCCACGGCGTGTGACGCTGTACGGCGATCGG
GGACTCTCCAGCCTCGCGAAGTGGGACCGGCGCAGCCGCTGCTGTCGAGCGCCGAGCGCTTCGACGCGGCCAGCGCTTACCCGAG
ACGCTCCTGGGCTGGATCAGCACAGGACGAGATCCACGACTTGCAGGCCCCCTTCTCTGCTGCCCGCCGAAGCCGAAACCTCG
GGACCGGATCGACCCGTTGGTGCATGGTCCGCGCTGAGGCTGCTGCCCTCGGGCGCTCCGCAACGCGGGCGAGCTGCGCTC
GACGACATCTTCGACGCTGATCATCGACCGCCGACCTCGTCTGCGCCCGGCTCGTTCTACCGCTCGGGGTGCGCGGACCTC
ACGCCCTTTTCGCGCCCGCCCGGGCTCAAAGGAGTCCGAGTGGGACAGCACCAGCTACTTTGACCACTACTGCAAAATCCAAGGG
AGGTACAGCGCGCCGACGTTGGTCTGTCGCCCGCGGATCAGCCGCTGCTGTGGTACGAAAGTGGACAAGTGGCGCAACCAGCTC
GTGCCCGGCCACCTCGACCAACCAGGGACGGCGCGCCGCGCCGATGGTTCGGATACCGTTCGGCGTTCGCGAGCAAGAGGCAG
AGGCGGACGCTGCCCGGATGCTCATCCATTCTACGCCACGCTCCACCCGCTGCGCTCTCGGTGGCGCGCAGCGCCCTGCTGCTC
CCCTCGGTCTTCTACCGTACGACGACCTGCTCCTCTCGCAGGGTGCAGCGCGCCCTCTGTCCGACCGCTCGCCGGGCGACCTG
GTCTGACGGCTCTGACGCGCCGCGCAACCGCGCTTCTGACTCAGCAGCGCTCGAGTTCACGGGCTCGAGTTCACGGGCTCGAGCTG
CTGGCCGCTGCCAGTCTTTACCACGCGCTCAGCGAGACCGAGGCGAGCTGCACGTGGCGAGCAAGGATCTCTGTCACCCAG
GTCCTCGAGGTCACGCCATGAGGCTCAAGCTCTGGAAGTGGTGGCTTTCAGCGACAAGTGGATGAAAAAGAAGACCTTCTGGTTC
GACGGCTGGACCGAGGCGCACGAGCAGCGCGCACAGCGCGCGGACGGCAGCGACCCGGCTCAAGCCGAAGGGGACCGCGAGC
GCAGCGCCGCGCAGCAACGACGACGACGCGCCAGGACAACGAAGGCGACGACGACGCTGGCGAAAGAGGGTCTGGCGAGGTCGAG

GAGCGGCAGACCTGGCATCGACCGCCAACGCCGGTGCCGGAGGTCCCGCCGACAACGCCGCCGACGACGCCGACTCCGACGATCCG
 GACACGCCCCGACGACGCCGACTGACGCTGGCCAGCGCTCGTTGACGCTGACGCTGCGCTGCCGTCGCGGCGGGGACGTGGTG
 CCCTGCAAGGCGCTGTCCGACATGGTCGAGGCGCTGCTCGGCCTTCGCTCGTCCACTCGGGCATCGCCGGCGTGTGCAGACGGCC
 GTCTCGATCGGCATCCTGCCGACGATATCGCCGGCCCGTTCGTCGTTCCACGGGCAGCTGACGGCCCTCTCGCCGCCGCCGACCCG
 AGCTGGCGCTCGCGCTCGACACGTCGGCGTGTGCACTCGAACGGGTGTTGACTACACGTTTCCGCGCCGACCTCGCCCTC
 GAGGCTTCACTCACCCTGCGTGTGCTGCTCGCTCGGTGTTGCCCTCGTACAGCGCCTCGAGTACCTGGGAGACGCCCTTCTCGACTAC
 TGGCTCATCTCAAGATCCGCCGCTTACCCGATCTCGACGAGGGCGAGGGCAGCGGCTCAAGAGCAACATGGTCTCGAACGCC
 ACCTCTCGGGCGTGTGCGAGGTGCTCGACCTGACCAGCTTATCGCCAGCCACTCGGCGCCGCTCAAGGAGGCCGTCTCGACCTAC
 ACCGACGCCGTCGCCGACTGCGGCGCCGAAGAGGACAGGGCCGAGCTCGGTGCGGCGGCGCCGGAACCGCGGTGGCGAGCCG
 AGGCAGTACTGGTGGACGACGCGCAACCCGAAAGCCGTCGCCAGCTCGTTCGAGTTCGAGCTCGGCGCCGCTGCTGGTTCGATGCCCGC
 TTCGACTTTGACGGGCGGAGCGGCTTTGAGCACGTCTACTGGCTTTTCTGCGCCGGTGGTGACGCCCCGAGCTGGCCGTGCTA
 CCCAACATCAAGGTGTGACCAGCCTGCTGACGGGCAAGCGAAAGTGTCCGGCTGGGGGCTGGCCATCCAGTTTGCCTACAGCGTC
 GGGCCGGCCAAGAAGGACTGCGGTACTGTTCGGACGCTGGCCGCGCAACGGTGGCGGCAGCGGTGGCGACAGCGCGGCAACAGC
 GGTGGCAACAGCGGCGACGACGCGCAGCGATGGCAGCGACCGGGCCGACGGATGGCCGAGATGGGCGCGGAAGCGGTGCGATGC
 CGCATCTACTCGCACGGCGTGTCTTGGCCGAGACGACCGAGGATCCGCTCCCATGTCCAGCGACAGGCGCTGATCCAGGCCAAG
 AGGACGATGGCCTACCCGACGCGTCTGCCGTGGCCGCGTCCATCGCCGCGGACGCTCGATGCCGAGAACGGCGGCTACGGC
 GGCCACGACGACAAGGGCGACGCGAGCGACGCCGAAGAGCAGGAGTCCGAGCGCTCGTTCGTCGGGCGAGGTCTCGTCCCCACGTTT
 CGCGCAGTGATCAAGGCGATGCGCTGGATGCGGCCGTTTCGATGCGTCGACGCTCGTTCGCCGAGATCGCGCCAGGACGCCGCCAAG
 ATGGTCGACGCTCGTACGCTGCAGCTGCAAGAAGGGCCGCCGACACTGA

Sporisorium graminicola

Taxonomía

- Dominio: Eukaryota
- Reino: Fungi
- Filo: Basidiomycota
- Clase: Ustilaginomycetes
- Orden: Ustilaginales
- Familia: Ustilaginaceae
- Género: *Sporisorium*
- Especie: *S. graminicola*

DCL

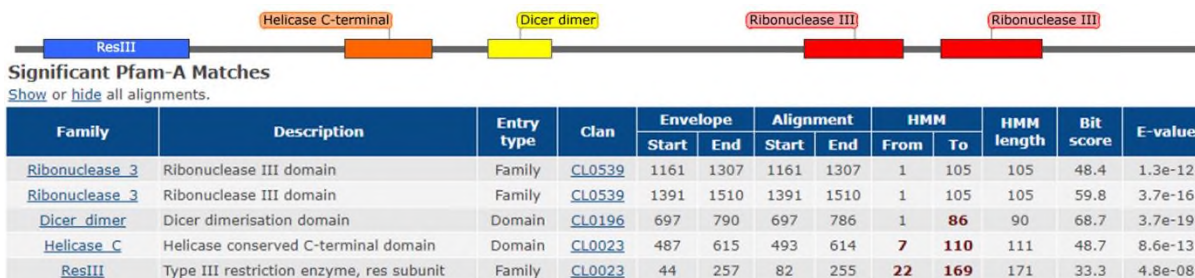


Ilustración k. Estructura de DCL de *S. graminicola*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

```
>tr|A0A4U7KR28|A0A4U7KR28_9BASI Uncharacterized protein OS=Sporisorium
graminicola OX=280036 GN=EX895_004169 PE=3 SV=1
MTKRSRGLADFEHPLARFHLGDDAEPTDQLAPSPQAGDRRKRRI LEHISAQTAVDPADQLSSDQLAFEHRTYQIELAELAKAGNV
LVCLDTGSGKTLISVLLLEHVHRLQNVQLPPSPAPRRPKVS FFLVNLVPLVHQSSYIAEHSNLSVGTKLYGELKGNLRGKGDKLHV
DSWREPQWSALLEAHQVI VSTAQCFLDAVMHGFIMNDINLLIFDEVHHALKNHPFRIMKYYRLAPENERPKIFGMTASPI FTGTG
HCS DASRYLQEVMNARIHTVSKGLLQDLREFRQKPELVIEFDPYLTVLDDSDGAMSALSKDMVARFGRNPALGEDAELDLAMEH
FETEVRPKLDYIMRHLGPLGCDLFWHSTLLEYSRARRWANI DRDDRTLINDDWI IDASLRKS IVTPEESQDEDESVDDGRSDAPAA
SSQLTTGSGLGLGQAVVHLSTHSELNQR I ILMHSPQKLPDKLTFDASNAS PKVLRLLIETLKCPEPSAQDFCAIIFVERRQTAKLLV
ELIKRVPGLFEFIHPEFLLGHEDDSAHGPTPGMDWHVQVQLNRFRRRKPNTLLVATSI AEEGLDIQAANLVIRFDLFRNHSFLQSR
GRARASQSRFILMAERNPNP SHAEVI LNAFNTEVSRKWL DIVAETVHEASNFSQDLQQQLRMATDEAVANEECIFEP T T GARLFAED
APSLISHYAATLHAEYLKDAVLAYKLGSTSN GASAPNTYSCVLELPSTSAVRSVESGEHRGKKQAKRMAAFKACQQLRELGELDEHL
MPKLLD KAALDDGALRTGTINPHHKAWRGSLPVHV PVKLDGWARLVCQRDAHSTAA YEATYLALDDFD PACQPLVLLTRGPLPPT
KLLKLVLSSTGRMKDVQATPLGPLPALGKAELELAKRFTRFVFR I I DRNDGHGSSNKGKSSKKQGDPAVLVVPVRKGGIKTVQSAS
```

DLQLDLPTSLNLSGFDLTQSDAEKFQGRILVRQHGCRSHAFYKIESIRHDLTPNSPLDASRPTTDNQARTYLSEHLRMYGRHHTSRN
IAPEQLFDVLSLELANSPLIQVTKLHLKLNLLMPSQPNHTARPAPPRRLIVPYFYKHLPLVPLLSILLPSILVRDQLLLAHAC
NTKIFAGRLHTDFVLEALTSFAARSADFYERLEFLGDTFLKLVATCTFTTRLGQTEAELHLANKAILTNVRLFAEARRLGLERFGV
FGSSAFVVRFEAPRVGWVGRLLDDAI CASEENRSDDDGSMVGEARQETGVAAMSEEEEGQCEAVKEKTLSDIVEALIGSALLS
SGTSLALFVCRTHFLIPPTIHTLSDFNLLVNLKQRSIAEGWEQRISRSGLDHLEGLFSHTYRYPHLEAFTHPSLLASVLPYSYQR
LEFLGDAWLDLYIVRSILRAHPGLSPGKLTAYKGLVLANHALCALGVRVGLHRYIASDSTVLRDTIARYAALGEVEDRKSQVWVGGQ
YWTLLPPSVVVPKAIADVVEASFASIVVDSGFDEPTIERVFERICRPFYERICRYDSLNIIPDTRMVEVVFATVRRGISHGRVVMVH
IQTNLTAPPALETAQEEQLVAALLTETRVELSIAGQVVAKAAVLPRS AEHVQRAVKLASEIDALQCVLLPLIAGIEEADGDGDTKA
AAVAVELDRLDELEHLVSQLARTLWKRVFQPLVPLGDEQCEVCSLAQLRRLILPDEKEEEEDDDGEQCAAAPIQEESTPDDFTKES
Q

>ENA|TKY86881|TKY86881.1 Sporisorium graminicola hypothetical protein

ATGACCAAACGCAGTAGAGGGCTGGCTGACTTCGAGACCCGCTCGTTCGATTCCATCTTGGTGATGATGCAGAGCCTACACCAGAC
CAACTTGCACCCTCTCTCAAGCAGGAGATCGAAGGAAGCGGCGGAGAATCTTGGAACACATCTCCGCTCAGACCCTGTGACCCT
CGACACCAACTCAGCTCCGACCAGCTCGCTTTCGAACATCGAACCTACCAGATCGAGCTCGCCGAGCTCGCCAAAGCCGGCAACGTC
CTCGTCTGCCGCGATACTGGCAGCGGAAAGACGCTCATCTCGGTACTCTGCTCGAACATGTTTCATCGACTGCAAAACGCTCCAGCTA
CCCCCTCTCTCCGCTCCGCGGCGTCCCAAGGTCTCACTCTCTCTAGTCAACCTTGTGCCTCTGGTCCATCAGCAGTCTTCTCTAC
ATTGCGGAACATTTCAACCTCTCTGTGCGAAAGCTTTATGCGGAGCTTAAAGGTAACCTACGCGGAAAGGGCGATAAGCTCCATGTT
GATAGCTGGCGTGAGCCGAATGGTCTGCGCTTCTCGAAGCTCACCAAGTCATCGTCTCCACCGCCAATGCTTTCTGTACGCCGTT
ATGCACGGATTTATCAAGATGAACGACATCAATCTGCTCATCTTTGACGAGGTACACCATGCGCTGAAGAACCATCCTTTCTTTTCGC
ATCATGAAGTACTACAGACTCGCTCCCGAGAACGAGCGCCCAAGATCTTTGGTATGACTGCGAGCCCCATCTTACCAGCAACCGGT
CACTGTAGCCAGCTTCTGCGCTACCTTCAAGAAGTTATGAACGCTCGTATTACACGCGGTGTCTAAGGCTTGTACAGGATCTTCGC
GAGTTCAGGCAGAAACCAGACGAGCTGGTCAATTGAGTTTGACCCCTATCTGACAGTCTCGATGATGAGTTCGGACGCGCTCAAATG
TCCGCCCTCAGCAAAGACATGGTTGCTCGATTTGGTAGAAATCCCGCATTGGGCGAAGACGCGGAGCTGGACCTGGCTATGGAGCAT
TTCGAAACGGAAGTGCAGCCCAAGCTCGACTATATCATGCGACATCTTGGCCACTTGGCTGTGATCTTTCTGGCATAGCACCTTA
CTCGAGTATCGCTCTCTGTCACGCAGATGGGCTAACATCGATCGCGACGACCGTACCTGATCAATGACGACTGGATTATCGATGCA
AGTCTCCGAAAGTCGATTGTCAACCCCGAGGAGAGCCAGGAGGATGAAGACAGTGTGATGGTGGCAGAAGCGATGCCCCCGCAGCT
TCGCTCAACTGACGACTGGGTCTGGACTCGGTCTCGGCAAGCCGTTGTCCACTTGTCAACACATAGCGAGCTGAATCAACGCATC
ATACTCATATGCATTCTCAGCCTAACTTCCGACAAACTCACATTTGATGCTTCAATGCGTCAAGGAGGTCCTGCTCTCATC
GAAACGCTCAAGTGCTTTGAGCCAGTGTCTCAGGATTTCTGCGCTATCATCTTTGTGCAACGCGCAGACGCGCAAGCTGTGGT
GAGCTCATCAAACGTGTCCCTGGTCTCGAGTTTATCCATCCTGAGTCTTGTGCTGGCCAGGAGTACTCAGCCACGGTGGTACG
CCGGCATGGATTGGCAGCTTCAAGTTCAGTTCATTCGATTCCGACGCCGAAAGCCGACCACTGCTTGTGCTACTTTCGATC
GCCGAAGAAGGTTCTCGACATCCAAGCCGCAACCTGCTGTTATTCGATTGATCTCTTCAACCGACACATTTCCCTTCCAGTCTCG
GGCGTGCACCTGCCAGCAAAGCCGATTCATCTCATGGCTGAAAGAGACAATCCGAGTACGCGCAAGTATCTGAAACGCGT
AACACGGAGGTTAGCCCGCCAAAGTGGCTCGATATGTGCTGAAACCGTACAGCAAGCAAGCAATTTCTCAGAGGATTCGACGAT
CAGCTGCGCATGGCGACGCAAGCTGTTGCAAACGAAGAGTGTATTTTTGAACCAACGACGCGGGCTCGCTATTTGCTGAAGAC
GCACCGAGCCTCATCTCGCACTACGCTGCCACGCTACATGCGGAGTATCTCAAAGATGCGGTGTTGGCGTACAAGCTGGGGTCTACT
AGCAATGGAGCAAGTGCGCCGAATACGTATTCATGCGTCTTGGAGCTGCCAGCAGCTCGGCTGTCCGAGCGTTCGAGTCCGGCGAA
CATCGGGCAAGAAGCAGGCTAAGCGCATGGCTGCGTTCGAAGGCATGTCAGCAGCTCAGAGAGCTGGCGGAGTTGGACGAGCATTTG
ATGCCCAAGTTGCTCGATTAAGGCTGCACTGGACGATGGTGTCTTTCGGGACGGGCACAATAAATCCGCACCACAAGGCTTGGCGTGGG
AGCGGACTACCGGTGCATGTGCCGGTGAAGAAACTGGATGGCTGGGCGAGGCTTGTATGCCAACCGATGCTCAGATACGGCTGCG
TATGAAGCCAGTACCTCGCTTAGATGACTTTGATCCAGTACGACCTCTTGTGTGCTCACGCGGGCTTTGGCCGCGCAGC
AAGCTGCTCAAGTGGTGTCTCTAGTACGGGTGCGATGAAGAGCTCCAGGCGACGCGGTTGGGTCCGCTTCCCGCACTTGGCAA
GCCGAATTTGAGCTCGCAAGCGATTTACTCGCTTTGTTTTCGAATCATCGATCGCAATGATGGGCATGGCAGCAGCAACAAGGG
AAATCGTCTAAGAAGCAAGGCGACCCGGCTGTACTGGTCTTCCGTTTCGCAAAGGACAAGGTATCAAGACCGTGCAGTCTGCATCC
GACCTGCAACTCGACTTGCCACCTCGCTCAACCTCTCGGGGTTTGACTCACCCAAATCCGACGCGGAGAAATTCGAAGTTCGCATC
CTGGTCCGACAACACGGCTGTGCTTCCGACGCGTCTATAAGATCGAATCTATCCGACACGATCTTACGCCCAACTCTCCCTCGAT
GCCTCCAGACCAACTGACAACCAGGCCGACGTAACCTCTCTGAGCATCTCAGGATGTACGGTGTCAACCATACGTCGCGCAAT
ATCGCGCCGAACAACCTTTCGACGTCCTTCTCTCGAATTTGCCAACTCCACCTGATCCAAGTGAACAGTGCACAAACTGCAA
AACCTGCTCATGCCCTCACCGCAAACACACCGCGGACCCGCTCCACCGCGCGCTTAATCGTGCCTACTTCTACAAGCTGCAC
CCACTGCCCGTCCCCCTCTGTCAAGCATCCTCTGCTCCCTCCATCCTCGTGCCTACGACCAGTGTGCTCGCGCACGCTGC
AACACCAAGATCTTCCCGGTCGGCTCCACACCGACTTCGTGCTGGAAGCGCTCACAGCCCTGCCGCGGAGTGGCTTCGACTAC
GAGCGGCTCGAGTTTCTAGGAGATACGTTTCTGAAGCTCGTCGCGAGCTGCCATACGTTTACGACCGGTTGGGGCAGACGGAGGG
GAGCTGCATCTGGCGAACAAAGCGATCCTGACGAATGTGCGGCTTTTTCGGGAGGCGAGGAGATTAGGACTGGAGAGATTTGGCGTG
TTTGGGAGCTCGCGTTTGTGGTGGCAGGTTTGGAGCGCGAGGTTGGGTGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CGGAGGAGGAGATGATGGTCTGACGATGATGGTCTATGGATGTTGGCGAGGCGGACAGGAGACTGGTGGCAGCGATCTCGGAG
GAGGAGGAGGAGGACAGTGTGAAGCCGTGAAGAGAAAACGCTGTGCGACATTGTCGAAGCGCTGATCGGATCAGCCCTTCTCTCA
TCCGGCACCTCACTGGCCCTCTTCTGCTGTGCAAGCTTCCACCTCATCCACCCACCATCCACACCTCTCTGACTTCAACACACTC
CTCGTCAACCTCAAGCAACGCTCGATCGCCGAAGGCTGGGAACAGCGCATCTCGCGCTCAGGGCTCGACCACCTCGAGGGCTCTTC
AGCCACACTACCGCTACCCGCACCTGGCGCTCGAAGCCTTACGCGACCCATCGTCTGCTCGCTCCGTCCTGCCAGCTACCAGCGT
CTCGAGTTTCTCGGCGATGCCTGGCTGGACCTGTACATTTGTGCGCAGCATTTGCGCGCGCACCCGGGGTGTCCGCGGGGAAGCTG
ACGGCTGTAAGGAGTGTGCGGAGCAATCACGCGCTGTGTGCGCTCGGAGTGCAGGCTGGGGTGCATCGGTATATTCGAGAGCAG
AGTACGCTGTTGAGGATACGATCGCGCGGTACGCTGCTGCTCGGGGAGGTCGAAGATCGTAAGAGCGGCTGGGTTCGGGGGCGAG
TACTGGACGCTGTTGCCCGGAGCGTGGTGGTGGCGAAAGCGATTGCCGACGTAGTAGAGGCGAGCTTTGCGTCTGATTGTGCTGGAT
AGTGGCTTCGACGAGCCACAATCGAGCGGATTCGAGCGCATCTGTGACCGTCTATGAGCGCATCTGTGCGTACGACTCCCTC
AACATCCCCGATACGCGCGCATGGTCAAGTCTCTTCGCCACGGTGCAGCGGATCTCGCACGAGCTGTGCGCATGGTCCAT

ATCCAAACAAACCTAACGGCGCCCCCGGCGCTTGAAACCGCACAGGAGGAAGAGCAGCTCGTCGCGGCGCTGCTGACCGAGACCCGC
 GTCGAGCTGAGCATCGCCGGCCAGGTGGTGGCCAAAGCGGCGGTGCTGCCGCGGAGCGGAGCAGTGCAGCGCGCCGCTCAAGCTC
 GCGAGCGAGATCGACGCGCTCCAGTGCCTGCTGCTTCCGCTGATCGCAGGTATTGAGGAAGCGGATGGCGACGGCGACACGAAAGCA
 GCGGCGGTGGCGGTGGAGCTGGATAGGCTGGACGAGTTGGAGCACCTCGTGTCTCAGCTGGCAGCGACGCTGGGGTGAAGCGCGTC
 TTCCAGCCGCTTGTCCGCTGGGGGACGAGCAGTGCAGGTGTGCAGCTGGCCAGTTGCGTAGGCTGATTCTACCTGACGAGAAG
 GAGGAGGAGGAGGACGATGACGGCGAGCAGTGCAGCAGCGCCATTCAGGAAGAGGAGCACTCCCGACGACTTACCAAAGAGTCA
 CAGTAG

Sporisorium reilianum f. sp. Reilianum

Taxonomía

- Dominio: Eukaryota
- Reino: Fungi
- Filo: Basidiomycota
- Clase: Ustilaginomycetes
- Orden: Ustilaginales
- Familia: Ustilaginaceae
- Género: *Sporisorium*
- Especie: *S. reilianum*

DCL



Ilustración 1. Estructura de DCL de *S. reilianum*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

```
>tr|A0A2N8UP32|A0A2N8UP32_9BASI Related to cell cycle control protein dicer
OS=Sporisorium reilianum f. sp. reilianum OX=72559 GN=SRS1_16838 PE=3 SV=1
MSKRTRATDELEDPLAQVHLDHAEPDLAPTISPQEEERRKRQRIVDRISSQTAVDLSQLRSDQLAFVPRSYQLELAEALAKAGNVL
VCLDTGSGKTLISVLLLQHVHEVQNAQRPPSPQPSPAPPAPQRPKVSFFLVNVLVPLVHQQSSVIAGHSNLSVKGKLYGELKDTVGRKG
NKLTVDGWREPQWSALLESHQVIVSTAQCFLDALIHGFIKMDLNLIFDEVHHALKNHFFFRIMKYRLAPEKERPKIFGMTASPI
FTSTGQFDDASRYLQKVMNARIHTVSKDTLQDLREVQKPEELVIEFDPYLTVLDDLDGVMQMSALSREMVAFGKDLALDEDAELD
LATEHFEKEVVRPKLEYTMRHLGPLGCDLLWHSTLLEYRSRARKWVNI DRDKRTL VNDWILDASMRKSI AVATPEESQESQDDLDSDG
DGDGDSPTASSQATTGSGGLGLAVAHLSSTNSELNQRILLHMRSQPTLADTLTFDASNTSHKVLRLIETLTKCFEPSAADFCAIIFVE
RRQTATLLVELIKRVAGLEFIHPEFLLGHENGSAANGGAPGMDWHQVQVNLNRRFRKPMNLLVATSI AEEGLDIQAANLVVRFDFLN
RHISFLOSRRARAKQSRFILMAERDNASHAQAILNAFNTEASRAKWLEGLIAEAHDAGFYAQEWQHQLRVERDEAGAGEECIFEPS
TGARLFPEDAPSLVSHYAATLHSEYLDKAVLAYKLDSPHGFVGPSTFSCSTLELPSTSAVRSVSEGEHRSKKQAKRMVAFKACQQLR
DMGELDDYLMPKLLDRAAVLEGAGAGTGKVNAAHKAWRGSLPVHVPVKNMDGWARFVAAQSGDAAYEATYLALDEFDAACQPLVLL
TRGALPPTKLLKLLLPAGAGRMKDVKATPLGPLQALSEEELDCAKRFTWVFRMLEPKDGHGGSAGKAWKGGELAVLVVPRKAHG
VTAVHSAADVQLDLPTSFNASFDVTRPDIAEHLQGRILVRQHGYHSYAFYRFECIRHDLGPN SPLDPSDDAAAPTYLSQHLKMYG
RPHASHTGQDMLDALSAQLATSPLISVTKMPKIQNLLSPSPRTTSPPARLVVPHFYAVHPLRAPLVSALLLPSLLVRYDQLLLAH
ACNATLFASRLDSDLVLEALTS PAAGSSFYERLEFLGDTFLKLVATCHTFTTHLGRTEAELHLANKAILTNVRLKKEARRVRLERW
GVFGSCRCVRRFAAPRVGGVGRLLVGE GEEVVVDEDECEAVKEKTLSDMVEALLGAALLTAGPDLALLVCRVFNLLPASITTLAS
FNDLLLTLKQQAIAENWQSRISRSGLDHLQSLFDHTYRPHLGLEAFTHPSLLASVLPYQRLEFLGDADWDFCIVRMIFAEGEDRS
PGEMTAHGKVLASNGALGALGVRLGLHAFVAVSDSAVLGDSIARYAALGVSVEKQYWRRLARGVVVPAKAVADVVEASFASIVVDSG
FDARVVQRFVFERMCPFYERFCRYDALQVSEVRRVLEFAFATVRRAITHALPVNTVRVTSNLLDIPIDGDEERIVEALLTQVHAEL
RIADTVVARITVLPRAAHLERAVAIARQIDTLQSSLQLIDHAEHDAQEAGGTAGTVDKLDELQHLTSQLARTLGWKRVFQSI VVE
TESEVCTLARLRVLLIGGEAEEGSRMEVE
```

>ENA|SJX66616|SJX66616.1 Sporisorium reilianum f. sp. reilianum related to cell cycle control protein dicer
ATGTCCAAACCGACCCGAGCGAGCTCGAGGACCCGCTCGCCCAAGTCCACCTCGATCACGCCGAGCCTTCCCTGGACGCA
CCCACCATCTCTCCTCAGGAAGAAGAGCGCAGGAAGGCCAAAGGATCGTCGACCGCATCTCCTCCCAAACCGCAGTCGACCTGTCC
GACCAGCTCCGCTCCGACCAGCTAGCCTTCGTACCTCGCTCCTACCAGCTCGAAGTCCGCCGAGCTCGCCAAAGCGGGCAACGTCCTC
GTCTGCCTCGACACGGGTAGCGGGAAGACGCTCATCTCTGTGCTGCTTCTTACGATGTCCACGAAGTGCAAAATGCGCAACGACCT
CCGTCGCCGCCCCAGTCTCCCGCTCCTCCGCTCCGACGCGCCCAAAGTCTCGTTCCTTCTCGTCAACCTCGTGGCGCTCGTGCAT
CAGCAGTCGTGGTCAATGCGGGTCAATCCAACCTCCTCGTCCGAAAGCTGTACGGCGAGCTCAAGGACACCGTGGCGGCAAGGGC
AACAAGCTGACCGTGCACGGCTGGCGCGAGCCGAGTGGTTCGGCGCTGCTCGAGTCGCATCAAGTCAATCGTCTCCACCGCGCAGTGC
TTCTCCGACGCTCTCATCCACGGCTTTATCAAGATGGACGACCTGAACCTGTCTATCTTCGACGAGGTGCACCATCGCTCAGAAAT
CATCCCTTCTTCCGCATCATGAAGTACTACCGCTTTCGCGCCGAGAAAGAGCGCCCAAGATCTTCCGATGACGGCCAGCCCGATC
TTTACCAGCACCGGTCAAGTTCGATGCTTCTCGTACCTGCAAAAGGTGATGAATGCGCGCATTCACACTGTGTCAAAGGATAACA
CTACAGGATCTGCGAGAGGTCAAGCAGAAGCCCGAAGAGCTGGTGTACGAGTTTGATCCCTACCTGACGGTGTGGATGATGAGCTG
GACGGCTACAGATGTCTGCGCTTAGCAGAGAGATGGTTGCTCTATTTGGCAAAGACCTCGCTCTGGACGAGGATGCGGAAGTGGAC
CTTGCCACGGAGCATTTTGGAAAGGAGGTGCGGCCAAAGCTCGAATACACTATGCGGCACCTTGGCCCGCTCGGCTGCGATCTTCTC
TGGCACAGCAGCTGCTCGAGTACCGCTCGCGTGCACGCAAGTGGTCAACATGACCGGATAAGCGCACGCTGGTCAACGACGAC
TGGATCCTCGACGCTCATCGAAAGTGCATTGCCGTTGCTACTCCGGAAGAAAGCCAGGAGATCAAGATGATGTGGACGCGGC
GATGGCGACGGCATTGCCCCACAGCATCGTCCCAAGCGACAACCTGGATCCGGACTCGGCTCGGACTGGCCGTCGACACTGTGCC
ACCAACAGCGAGCTCAACCAACGCATCCTGCTGCATATGCGCTCGCAGCCACCCTCGCCGACACGCTCACCTTTGATGCTTCCAAC
ACGTCGCACAAGGTGCTGCGCCTCATCGAAACGCTCAAATGCTTCGAGCCGAGCGCCGCCGATTTCTGCGCGATCATCTTTGTGCGAG
CGTCGCCAGACTGCTACTCTGCTAGTGCAGCTGATCAAGCGTGTGCGCGGACTCGAGTTCATCCACCCGGAGTTCCCTCTCGGCCAC
GAGAACGGCTCGGCCAACGGCGGGCGCCGGGCATGGACTGGCACGACCCAGGTGCAGGTGCTGAACCGCTTCCGCCGGCGCAAGCCG
ATGAACCTGCTCGTCCGACCTCAATCSCCGAAGAGGACTCGACATCCAGGCGGCCAACCTCGTGGTGCCTCGACCTGTTCAAC
CGCCACATCTCGTTCCTCGAGTTCGCGGGCGCGGGTGCACAGCAGCAGGTTCACTCCTATGGCCGAACGCGACAACGCGAGC
CACGCAAGGCGATCCTCAACGCGTTCAACACCCGAAGCGAGCCGCGCAAGTGGCTCGAGGGTATTGCGGAAGCCGACACGATGCC
GGCTTCTATGCGCAAGAGTGGCAGCACCAGCTGCGCGTTCGAGCGGGACGAGGCGGGTGCGGGCGAAGAGTGCATTTTCGAGCCTAGC
ACGGGCGCACGCTGTTCCCGGAGGACGCGCGTTCGCTCTCGCACTACGCGGGCAGCGTGCATTCCGAGTACCTCAAGGATGCG
GTGTTGGCGTACAAGCTCGACTCGATCCCCATGGCTTTGGTGTGCGGAGTACGTTTTCGTGCACCTCGGAGCTGCCGAGTACCTCG
GCGGTGCGCAGCGTAGAGTGGGGCAGCATCGGAGCAAGAAGCAGGCGAAGCGCATGGTTCGCGTTCAAGGCGTGTGACGAGTGGCG
GACATGGGGCAGCTGGACGATTATCTGATGCCAAGCTGCTGGACAGGGCTGCTGTGCTCGAAGTGCGGGTGCGGGCACGGGCAAG
GTCAACGCGCACCAAGGCGTGGCGGGCAGCGGGCTGCTGTGCAAGTGCAGTCCCGTGAAGAACATGGATGGATGGGCGCGCTTCGTC
GCCGCGCAAAGTGGCGACGCTGCGTACGAGGCGACGTATCTGGCGCTGGACGAGTTCGATGCGGGCTGCCAGCCTCTGTGCTGCTC
ACGCGCGGGGCGTTGCCGCCACCAAGCTGCTCAAGCTGCTGCTTCCCGCGCGGGGCGTATGAAGGATGTCAAGGCGACGCCGTTG
GGTCCGTCGAGGCGCTCAGCGAGGAGGAGTTGGACTGCGCCAAGCGATTACCTGGTTTGTGTTTCGGATGCTCGAGCCAAAGGAC
GGGATGGTGGCAGTGCGAAGGGCAAGGCGTGGGAGAGGGTGGCGAGCTCGCTGTGCTCGTACCCGTTCCGAAGCGCACGGT
GTCACGGCAGTCCACTCTGCCGCCGACGTCAGCTCGATCTGCCACCTCGTTCGACAACGCCAGCTTCGACGTCACCCGGCCAGAC
ATCGCCGACACCTCAAGGCCGATCCTCGTCCGACAGCAGGCTACCACCTGCTACGCAATTCACCGCTTCGAATGCATCCGCCAC
GATCTCGACCCCAACTCTCCGCTCGATCCTTCCAGCGACGACGCGCGGACCAGCATCTCTCACAGCATCTCAAGATGTACCGC
CGTCCGACGCGTTCGATCCACCGGGCAAGACATGCTCGACGCGCTATCCGCCAACTCGCCACATCGCCTCTGATCAGCGTAACC
AAAATGCCAAAGATCCAAAACCTGCTCTCGCCCTCTCCACGCACCACCAGCCACCAGCGCGCTGGTGTGCGCACTTCTACGCC
GTGCACCCGCTGCGGGCCCCCTCGTCTCGGCGCTCCTGCTGCTCCCTCGCTCCTGCTGCGCTACGACCAGCTGCTGCTCGCGCAC
GCGTGC AACGCCACGCTGTTCCGACGCGCCTCGACACGGACCTGGTGTGCGAGGCGCTCACATCCCTGCGGCGGGGAGCAGCTTC
GACTACGAGCGGCTCGAGTTTTTGGGCGATACGTTCTCAAGCTCGTTCGCGACGTCGCATACGTTTACGACGCACTGGGGCGGACG
GAGGCGGAGTGCATCTGGCGAACAAGGCGATCCTGACGAATGTGCGGTTGCTCAAGGAGGCGCGGCGCTGCGCTTGGAGCGGTGG
GGGGTGTGTTGGGAGCTGTCGGTGTGTTGTAAGGCGGTTTGGCGCGCGAGGGTGGGTGGCGTGGGTGGGAGGTTGGTGTGGGGGAG
GGAGAGGAGGTTGTGGTAGACGAGGACGAGTGCGAAGCGGTGAAGGAAAAACCCGTGATGATGGTCAAGCGCTGCTGGGCGCA
GCGCTGCTCACCGCGGGCCCGGACCTCGCCCTGCTGCTGCTGCCGCTTCAACCTGCTCCCCGCTCCATCACCAGCTCGCCTCG
TTCAACGACCTGCTGCTCACCCTCAAGCAACAGGCCATCGCCGAAACTGGCAGTCCCGCATCTCGCGCTCGGGGCTCGACCATCTG
CAATCGTCTTCGACCACACGTACCGCTACCCGCATCTGGGGCTCGAGGCGTTCACGCACCCGCTCGCTGCTGGCCTCGGTGCTGCC
AGCTACGAGCGGCTCGAGTTTTCTCGGCGATGCTTGGCTGGATTTCTGTATTGTGCGTATGATCTTCGCCGAGGGTGAAGCAGGAGT
CCGGGCGAGATGACGGCGCACAAAGGGGTGCTGGCGAGCAACGGGGCGCTGGGGGCGCTCGGGGTGCGGCTGGGGCTGCATGCGTTT
GTGGCGAGCGACGCGCGTGTGGGGGACAGTATTGCGCGGTATGCTGCGGCGTGGGGAGCGTAGACGAAAAAGGGCAGTACTGG
ACGCGGCTGGCGCGGGGGTGGTGGTGGCGAAAGCGGTGGCGGACGTTGGTTCGAGGCGAGCTTTCGCTCGATTGTGGTGGACAGTGGG
TTTGATGCGCGCGTGGTGCAGCGCGTGTTCGAGCGCATGTGCGTGGCGTTCACGAGCGCTTCTGCCGCTACGACGCGCTGCAGGT
AGCGAGTGCGGCGCGTGTTCGAGTTTGCCTTCGCCACCGTGCGCCGCGCCATCACCACGCTCTCCCTGTCAACACGGTCCCGCT
ACATCGAACTTGTGGACATAACCACGATTGACGGCGACAGGAACGCATCGTCAAGCGCTCCTCAGCAAGTCCACGCCGAACG
CGTATCGCCGACACGGTGTGCGCGCATCACCCTACTCCGCGCAGCGCCGACACCTCGAGCGCGCTCGCCATCGCGCGCCAA
ATCGACACTCTCAACAAAGCTTACTGCAGCTCATCGACCATGCCGAGCACGACGCTCAAGAGGACGAGGGACAGCGGGCAGCTG
GACAAGCTCGACGAGTGCAGCACCTCAGGAGCCAGCTCGCGCGCACGTTGGGCTGGAAGCGGTTTTCCAGTGCATTGTTGTGGAA
ACGGAAGCGAGGTGTGTACGCTGGCGCGGTTGAGGTTGTTGATTTTGGGTGGCGAGGCGGAAGGGGAGGGGAGCAGGATGGAGGTC
GAGTAG

Taxonomía

- Dominio: Eukaryota
- Reino: Fungi
- Filo: Basidiomycota
- Clase: Ustilaginomycetes
- Orden: Ustilaginales
- Familia: Ustilaginaceae
- Género: *Sporisorium*
- Especie: *S. scitamineum*

DCL



Ilustración m. Estructura de DCL de *S. scitamineum*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

```
>tr|A0A127Z7K8|A0A127Z7K8_9BASI Related to cell cycle control protein dicer
OS=Sporisorium scitamineum OX=49012 GN=SPSC_00615 PE=3 SV=1
MSKRTRGLAELDPLARAHLDLDDAATFLNKPTDSSQEQRKRKRIFNNILSQTAVDPSDQLRSDQLAFVPRSYQLELAELAKAGNV
LVCLDTGSGKTLISVLLQHVHKLQTVQRPPSPPEPAPSAPPKPKVSEFLVNLVPLVHQQSSVIAGNSDLSVGKLYGELKDTFRGK
NNKQVVDGWREPQWSALLESHQVIVSTAQCFLDALIHGFIKMDDLNLLIFDEVHHALKNHPFFRIMKYYRLAPQQERPKIFGMTASP
IFTGTGFHDDASRYLQKVMNARIHTVSKDTLQDLRAVKQKPEELVIEFDPYLTVLDDQVDGTQMSALSMDIARFGKDPALDEDAEL
DVATEHFEKEVRPKLYTMRQLGSLGCDLLWHSTLLEYRSRACKWINIDRDKRTLVDNGWIIDASLRKAIATPEETQESQDSVNSGE
GDSQTTSQATTGSGGLSLAVAHLSNSELNQRI LLHMRSQPTPPDLAFDATNTS HKVLRRLIETLKCPEPSAKDFCAIIFVERRQT
ASLLVELIKRVPGLEFIHAEFLLGHENGSA NSGAPGMDWHQVQVNLNFRFRNRNPTNLLIATSI AEEGLDIQAANLVIRFDLFRNHIS
FLQSRGRARAKQSRFILMAEKDNPNTHEVILNFAFNTEVGRANWLDIIAASEHDASFFAEDWQQQLRIEPEDEAATSQECIFEPTGAR
LFPEAPSLISQYAATLHSEYLLKDAVLAYKLDLSIYNGPGVPNTFSCVLELPTSTSAVRSVESGECSSKKQVCRMVAFKACQQLRELGE
LDEYLMPKLIDKAVLEGAGLGIGKTNPHHKVWRGSLPVHVPVKKLDGWARFAAEAEWGGADGEEIAYEATYFALDDFDPACQPLVL
LTRGPLPPTKLLKLLPSVGRMKDIQATPLGPLRALGKEELESARFTRFVFRIVDRKDGQSSPKSKSKKEGEPVIVVVPVRKAQ
GVDNVQSAADLQDFPASLDLTSFDLTQDDIEQLAGRI FVRQHGYPYAFYKYESVRHDLTPNSPLDPSATPNPDGVPPTYLSQHLKM
YGRHSSCDVAPEQILDALSLELATSPLLQVTKMPKVQNLSPAPHAVTPPPPRILIVPHFYKLHPLSTLLCSVLLLPVLLVRYDQ
LLLAHYCNTTFLDNRNLNTDSVLEALTSPTAGSAFDYERLGLGDTFLKLVATCHTFTTKLGRTEAELHLANKGILTNVRLLEKARM
RLERFGVFGSSSCLVRRFEAPRVGGVGGKLV EAGVEGVMEEGEGEESIKEKTLSDIVESLIGSALLTSTSLALFVCRTRFLIPAT
ILTLSDFNLLDLKQRSVTEGWQRI SRSGLDHLEQLFQHRYRPHLGLEAFTHPSLLASVLP SYQRLEFLGDAWLDFYIVRLIFH
RHPSLSPGEMTAYKGLLASNNALSALGVRMGLHKFIASDSTVLSDTISLYAEALSQVEGGKSEQYWTLLPPTIVVPKAVADVVEASF
ASIVVDTA FDEVVMVGMKMFSCICLPFYDTFCRYDSLKVVEMHRVNFIFATLRQRI THRGVVMVQITSNLTITLRAIEDAE EEEEPVVE
ALLTELWVLELIAEEVAVKVVSLPRS AVHLQRAVKI VREIEAVKEALAGGAGEEGSGLVEKLDKQLYLTWQLTKTVGWKSVFQSVT
LQEEEREVYSLAQLRRLIILPNEVEE
```

```
>ENA|CDU21985|CDU21985.1 Sporisorium scitamineum related to cell cycle control
protein dicer
ATGTCCAAACGCACTAGAGGGCTGGCTGAGCTCGAGGATCCACTCGCTCGGGCCCATCTTGATGATGATGCAGCACTTTTCTAAAC
AAGCCTACAGACTCTCCAGGAGCAAGAGCGGAGGAAACGGAACGATATTTTCAACAACATATTGTCTCAAACCGCTGTCGACCCT
TCCGATCAGCTTCGCTCCGACCAGCTCGCTTTTCGTACTCGATCCTACCAGCTCGAATCGCTGAGCTCGCCAAAGCCGGCAACGTC
CTCGTTCGCTCGACACGGGCGAGCGGGAAGACACTCATCTGTGCTTCTCCTCCAACATGTACATAAGCTGCAAACCGTCCAACGC
CCACTTCTCCGCTGAATCTCCCGCGCTTCCGCTCCGCGTCCCAAAGTCTCTTCTTCTCGTCAACCTCTGTCCTCTGGTC
CACCAACAGTCCTCTGTCATTCGCGGAACTCCGACTCTCCGCTCGGAAACTCTACGGCGAGCTCAAGGACACTTTCCGCGGCAAA
AACAAACAGCAAGTCGTCGACGGCTGGCGCGAGCCGAATGGTCTGCGCTTCTCGAATCCACCAAGTCATCGTCTCCACCGCCCAA
```

TGCTTTCTCGATGCCCTGATTACGGTTCATCAAGATGGACGACCTCAACTTGCTCATCTTTGACGAGGTGCACCATGCCCTCAAG
AACCACCCCTTCTCCGCATTATGAAATACTATAGACTTGTCCGCAGCAAGAGCGGCCAAGATCTTCGGTATGACTGGCAGCCCT
ATCTTTACCAGGCACGGTCACTTTGACGATGCCTCCCGCTATCTTCAGAAGGTGATGAATGCTCGAATTCATACCGTCTCCAAGGAC
ACTTTGCAGGATCTTCGAGCGGTGAAACAAAAGCCAGAGGAGCTGGTTATCGAGTTTGATCCCTATCTTACGGTGTGTGATGACCAG
GTGGACGGCAGCAGATGTGGCGCTCAGCAAGGATATGATTGCTCGATTGGCAAAGATCCCGCTCTGGACGAGGATGGGAGCTC
GATGTAGCAACGGAACATTTGAAAAGGAGGTGGCGCCAAGCTCAAATACACCATGGCGCAACTTGGCTCGCTCGGTGCGATCTG
CTTTGGCATAGCACTCTGCTCGAGTACCGTTCGCGTGCATGCAAGTGGATCAATATCGACCGGATAAGCGTACCTGGTCAACGAT
GGTTGGATTATCGATGCCAGTCTGCGAAAGGCGATTGCTACTCCCGAGGAACTCAGGAGAGCCAAGACAGTGTGAATAGCGGGCAA
GGTGACTCGAAACAACATCTCAGGCAACGACTGGATCAGGACTCGGTCTGAGCTGGCCGTTGCACACTTGTCCACCAACAGCGAA
CTCAACCAACGCATCTGCTGCACATGCGCTCTCAGCCTACTCCGCCGACACCCCTAGCGTTTGATGCAACCAACACGTCG CACAAG
GTGCTGCGCCTTATCGAAACGCTCAAGTGCTTCGAGCCAGCGCCAAAGACTTCTGCGCCATCATCTTTGTGAGCGCAGACAGACG
GCTAGTCTGCTGGTTCGAGCTGATCAAACGCGTCCCGGTCTCGAGTTCATTATGCAGAGTTTCTGCTCGGCCACGAGAACGGTTCA
GCGAACAGTGGCGCTCCTGGCATGGACTGGCAGCATCAGGTGCAAGTTTGAACCGCTTTCGACGTCGAAACCCGACCAACTTGCTC
ATTGCCACTTCGATC CCGAAGAAGGTTCTCGACATTCAGCCGCCAAG CTCGTTATCCGCTTCGACCTGTTCAACCGACACATTTCC
TTCCTCCAATCTCGCGGCCGTGCCCCG GCCAAACAGAGCAGATTCATCTGATGGCTGAAAAGACAATCCGAATCACACAGAAGTC
ATCCTCAACGCGTTCAACACCGAAGTGGTCCGCTAAGTGGCTTACGACATCGCGCATCCGCGCATCCGAGACTGGCAGCTTTTTCGCA
GAAGATTGGCAGCAACTGCGCATCGAGCCGAGCAAGCGGCTCAGGACCAAGAGTGCATCTTTGACCAACAACAGGCGCCCGG
CTGTTCCCGGAGGATGCACCGTTCGCTCATCTCGCAATACGCTGCTACGCTGCATTCAGAGTACCTTAAAGACGCGGTGCTGGCGTAC
AAGCTGGATTTCGATCTACAATGGGCCAGGCGTGCCAAACACATTTTCGTTGCGTTTTTGGAGCTGCCGAGTACGTCGGCGGTTTCGTAGT
GTCGAGTCCGGTGAATGCAGTAGTAAAAGCAGGTCAGCGGATGGTTGCATTCAGGCGGTGTCAGCAGCTGAGGGAGCTGGGGCAG
CTGGATGAGTATTTGATGCCAAGTTGATTGATAAGGCTGTGCTGGAAGGTGCGGGTTTGGGTATTTGGGAAGACGAATCCGCACCAC
AAGTTTGGCGTGAAGTGGGCTGCCGGTGCATGTCCGGTCAAGAAGTTGGATGGATGGGCAAGGTTTCGACCGGAAGCTGAGTGG
GGTGGTGCAGATGGTGGAGATTGCGTACGAGGCGAGTATTTCCGCTGGATGACTTTGATCCAGCGTGCAGCTCTTTGTACTG
CTCAGCGAGGGCCTTTGCCGCAACAAGCTGCTGAAATGCTGCTTCCAGTGTGGACGCATGAAGGATATCCAGGCGACGCCG
TTGGGCCCTCTTCGAGCACTCGGCAAGGAGGAGCTGGAATCCGCCAAGCATTACACGCTTTGTGTTCAGAATTTGTCGATCGCAAG
GACGGCAAGGGAGCAGCCAAAAGCAAATCGTCAAGAAGGAGGGGAGCCATTGTGTTGGTCTACCCGTTCCGAAAGCCCAA
GGTGTGATAACGTGCAGTCCGCTGCCGACCTGCAATTCGATTTCCCGCCTCGCTCGACCTCACCAGCTTCGACCTCACCACAGAC
GACATCGAGCAGTTCAGGCGCATCTTCGTCGACAACACGGCTACCACCCATATGCGTTCACAAAATACGAATCTGTCCGACAC
GATCTCACCCCAACTCTCCCTTGATCCCTCTGCGACCCCTAACGACGGTCTGTTCCGACATATCTCTCACAGCACCTTAAAATG
TACGGTCTGCACCACTCTTCTTGGCAGCTTGCACCCGAAACAATCTCGACGCCCTATCCCTCGAACCTCGCCACATCGCCCTTGCTG
CAAGTAAACAAAATGCCAAAAGTGCAAAACCTCCTCTCCTCCGACCCGACGCAGTAAACACCCCTCCTCCTCCGCGTCTAATCGTG
CCGCACTTTTACAACCTCACCCCTCTCCCTCTACCCTCCTCTGCAGCGTCTCCTCCTCCTCCTCGCTCCTGGTGGGTACGACCAG
CTTCTTCTCGCGCACTACTGCAACACCACACTTTTCGACAACAGACTGAATACAGATTCAGTGTCTGAGGCGCTGACGAGCCCGACG
GCGGGGAGCGGTTTCGACTATGAGCGCTTGGGGTTTTTGGGGGATACGTTTTTGAAGTTGGTAGCGAGCTGTACATACGTTTACGACG
AAATGGGACGGACCGAGGCGGAATGCATTTAGCGAATAAGGGGTTTTGACGAATGTGAGTTGTTGAAGGAGGCGAGGAGGATG
CGGTTGGAGAGGTTTTGGGTTTGGAACTTCGAGTTGTTGGTGGAGGTTTTGAGGCGCCGAGGTTGGTGGGTTGGTGGGAAAG
CTTGTGAAAGCTGGAGTTGAGGGTGTGATGGAGGAGGGGGAGGGGAGGAGTGTGAATCGATCAAAGAGAAAACCCCTCTCCGACAT
GTCGAATCCCTCATCGGACGCGCTCTCTTAACCTCGACCTCGCTGGCTCTTTTCGTTGTGTCGGACGTTCCGCTCATACCAGCGACT
ATTTTGACGCTCAGCGATTTCAACACCCCTCCTGTTGGACCTCAACAACGTTCCGTCATGAAGTTGGGAACAGCGTATCTCCCGT
TCGGGCTAGACCATCTCGAGCAGCTCTTCCAACATCAATACCGATACCCGATTTGGGACTGGAAGCCTTACGCACCCCTCGCTC
CTCGCATCCGTTCTACCCCTTAC CAGCGACTAGAGTTCTTAGGCGATGCATGGTTAGACTTCTACATTTGTCGACTCATCTCCAC
CGACACCCATCGTATCCCGGGAGAGATGACCGGCTACAAGGTTCTACTCGGAGCAATAACGCTCTCTCCGCGCTGGGGTTCAGG
ATGGGCTGCACAAGTTTATCGCGAGTGACAGCACCGTGTGAGGATACGATCTCGCTCTATGCGGAAGCACTGTCTCAAGTGGAG
GGTGGCAAAATCGGAGCAGTACTGGACACTTCTCCACCCACCATCGTTGTTCCAAAAGCAGTAGCCGACGTAAGTGAAGCGTCTTC
GCATCCATCGTTGTCGACACAGCCTTTGACGAAGTCATGGTAGGAAAAATGTTCTCGTGCATCTGCTTACCCTTCTACGACACCTTC
TGTCGCTACGATTCGCTCAAAGTCTGAGATGCACAGAGTCTCAACTTCATCTTTGCCACCCCTCCGCGAGCGCATCACCACCGA
GGCGTACGAATGGTTCAGATCACCCTGAACTTGACCACATTTCTTCGCGCCATCGAAGACGCAGAGGAAGAGGAGCCGGTAGTCGAA
GCGCTGTTAACAGAGTTATGGGTTGAGTTGCGCATCGCCGAGGAGGTTGGTGAAGGTTGGTGGTTGCGGAGAAGCGCTGTGCAC
CTGAGAGGGCGGTGAAGATTGTGAGGAGATCGAGGCTGTGAAGGAAGCGCTGGCCGTTGGTGGGGCAGGAGGAGGGGAGTGGG
TTGGTGGAAAAGCTAGACAAGCTGCAATATTTGACCTGGCAGTTGACCAAGACTGTGGGGTGAAGAGCGCTTTCCAATCGGTTACC
CTCCAAGAGGAGGAGCGGGAGGTTGACAGTCTGGCTCAATTGCGAAGGTTGATTCTACCGAACGAGGTGGAAGAATAA

Ustilago bromivora

Taxonomía

- Dominio: Eukaryota
- Reino: Fungi
- Filo: Basidiomycota
- Clase: Ustilaginomycetes
- Orden: Ustilaginales
- Familia: Ustilaginaceae

- Género: *Ustilago*
- Especie: *U. bromivora*

DCL

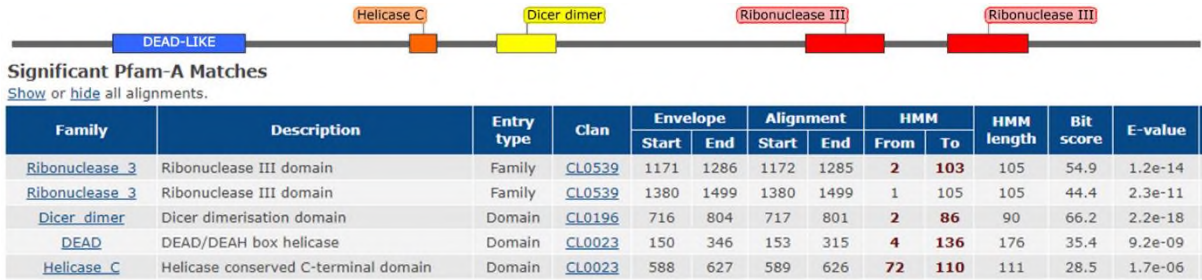


Ilustración n. Estructura de DCL de *U. bromivora*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

```
>tr|A0A1K0GEH5|A0A1K0GEH5_9BASI Related to cell cycle control protein dicer
OS=Ustilago bromivora OX=307758 GN=UBRO_08937 PE=3 SV=1
MLSHGNRDEQRRLTFVDADDTYSPTLQPTPSSSSSAPPFVEQGP RPSSSAPAQVASPLSSLKVS DTMKRTRADSLPHGPRVPRSG
YTATSSSSSSDLDLPI PPLEDNDDDDTEESASRRRQKVIAHISAQTSVDFSNQLRSDQLATVPRSYQLELAELAKAGNVLVCLDTGSG
KTLISVLLLLQYVHQHSSPARTSSLAPSSAQPFSSPAPQRKVA FFLVNLVPLVHQQSSVIAGNSRSLVSGKLYGELKDSLRSKSSQLA
VDNWRSPQWSALLASHQVIVSTAQCFLDALIHGFIKMSDLNLLI FDEVHHALKNHPFFC IMKYRRLAKEEERPKIFGMTASPIFTGS
GRFDEASEYLQRTMDARIHTVSRGALRELEEVKRRPEEMVVEFEPYLTVVDEPNWAGAVKYSELSDMIELFSKKVDLEICLDDEE
VVDPRTLVSDWEIVEAASAHRSASVAPSDSQGPPNSQT TTTITTTQPLGLGLTLVAHLSTNSDLNSRILLHMRSQPCIPD TLGLNAT
NSSPKLLRLIELLHCFEPSKSSFCGIIFVERRQTATLLVELIKRIPGLEFIHPEFLGHGDNAA GATSIAEEGLDQAANLVIRFD
LFNRHISFLQSRGRARAKESRFILMAEKGNEHAGAILNAFKTEANRAKWL DGIAPHLAMRDWGEDWQOKLRIDADNQEGVGVGG
KEEECMFEPTTGARLFPEDAPTLVSHYATTLHSEYLDKAVLAYRIEKVDGLPSYKAVLELPSTAAVRSVESDGCGRSKAKRMAAFR
ACQQLRALGELDEWLMPKLV PRLKAKDGVVGLVNP HHQAWRSGKPINVPSK KLDGWARFAS SHHATGQGWCATLLQLDKFDEGY
EPLLLLTRGALPETKLLKLLHAGSGQMKDLHPKPLRIAAELDSELMGKVVEFTKVFVKLISRKDGHLPKGKRLSWQTIEKQPTVLV
LPVRIAAEEVQSVGDVALDFPPSLDLTQLDLNAEGSEQKLGKRTLVRQHGYSHSLYQFESIRSGLCPN SPLSSGAAGETYL TQHMK
MYARHQASADEHEVEVLAAQLANQPFLSVRKLPKISNLLSPPSISFSATPAATQGARLIVPHFYALHPLPSTLLRSILLLPSIFTR
YDQLLLAQACNNDLLEGRLDKDKVLEAL TSPSAGSAFDYKRLEFLGDTFLKLVATC HFTTTHLGRTEAELHMANKGIVTNVRLLEKA
KRLGLEKYAILPSCNLLPRRFTAPVIGSVGGALTNDSSMDHDGQVDVVEK ETKLSDIVESLIGAALLSPSSSSPSSPSSTALFVCR
ILHLIPSTISTLSDFNKLEELKHESVERNWSSRLNPPSLRHLQSLFSHTYRYPHLALESFTHPSLLASILPSYQRLGFLGDAWIDF
FIVSRIYTEGGGLVLDPGEMTALKGVLASNAALSALGVKLG LHKFIASNSAVLVESIAKYGKGLEKVL RKGGGEGQYWTKAGMVQV
PKAVADVVEASFASIVVDSGFDQDTAQRVFGRIFTPFYDEHRKWEDLRVGE STFPVSRGEGVGGVMLEVSTNLVDLPAIASDVG
NDGEEAIMRALLTPVNVEFKVRGNTIAKIKGVLAKTPLHLTRALS KLRPLSMDDSPILALNSSDDEEEEMQTDQPSNLEQPDEEMP
QANAAI PNHQDDQAGPTEALKPQTNQNWEDMIDYQEHLLQLARTL GWKSTIQTPLTSPATAEEKEEVVMTLAKIRDLILPPSSSS
SSDSAK
```

```
>ENA|SAM86482|SAM86482.1 Ustilago bromivora related to cell cycle control
protein dicer
ATGCTCTCGCATGGGAACAGGGACGAGCAGAGAAGGCTTACCTTTGTGCGATGCGGATGATACATATAGCCCACTCTGCAGCCACT
CCCTCTCATCCTCTTACGACCTCCCTTCGTCGAGCAAGGTCCCGTCCTCCCTCTCTCCGACACGACAAGTAGCCTCACCA
CTCTCTCCCTCAAGGTCTCCGACACCATGTCCAAGCGTACACGAGCTGACTCTCTCCACATGGCCCCGTGTCCCTCGATCGGGT
TACACTGCAACTTCGTCTCCTCGTCATCCGACGACCTCCCAATCCACCCCTCGAAGACAACGATGACGACGACACCGAAGAATCC
GCCTCGCGCAGACGCCAGAAGGTGATAGCTCACATCTCCGCTCAAACCTCCGTCGATCCTTCCAATCAACTCCGCTCCGATCAGCTC
GCCACGTACCCCGCTCTTACCAACTCGAGCTCGCTGAGTTAGCAAAGCGGGAAACGTTCTGGTCTGTCTAGATACAGGAAGCGGA
AAGACTCTCATCTGTCTGCTTTTGCAGTATGTTACCAACACTTCTCTCTGCTCGTACTTCTATCTCTGGCTCCGCTCTCGGAG
GCTCAACCTTCTCTCTCCCGCTCCGACGCAAGCTCGCC TTCTTCTCTGTAACCTAGTCCCTCTAGTTCACCAACAAATCATCC
GTCATCGCCGTAACCTCCGCTCTCGTCCGTAAGCTCTATGGCGAATCAAGAGTCTCTCCGACGCAAACTCCCAACTGTCT
GTCGACAATTGGCGTTCTCCGCAATGGTCCGCCCTGCTCGCATCGCACCAAGTGATCGT TTTCAACCGCACAAATGCTTCTCGACGCT
CTAATTCACGGTTTTATCAAGATGTCCGATCTCAACCTTCTCATTTTTCGATGAAGTTCACCATGCCCTCAAAAATCACCTTTCTTT
TGCATCATGAAGTATTATAGACTGGCCAAGGAGGAAGAGCGGCCAAAGATCTTTGGGATGACGGCTAGTCCATTTTTACGGGGTCA
GGCAGATTTGATGAAGCGAGCGAGTATTTGCAACGGACGATGGATGCTAGGATTCACACTGTCAGTAGGGGAGCGTTGAGGGAATTG
GAGGAGGTGAAGAGCGACACAGAGGAAATGGTGGTTGAGTTTGAGCCTTATCTTACTGTGGTTGATGAACGTGGAATGCAGGTGCG
GTCAGTATTCGGAGCTGAGTATGGATATGATTGAGTTGTTGAGCAAGAAGTTCGATCGAAATTTGCCTAGACGATGAGGAGGAG
GTGGTGGATCCGAGGACTTGTAGTATGATGAATGGATAGTCAAGCTGCTTCCGCCCATCGCTCGCAGTGTAGCTGCCCTCTGAC
AGTCAAGGCCCGCGAACTCCCAAACCACCACCACCATCACACCCTCAACCTGGCTTAGGACTGGGCTAACAGTAGCCCATCTC
TCCACCAACTCCGACCTAAATTTCTCGCATCTCTCCATATGCGATCCCAACCTTGCATCCCCGACACTCGGCCTCAACGCCACC
AATTCCTCCCCGAAACTTCTCCGCCTAATCGAGCTACTCCACTGCTTTGAACCCAGCAAGTCTCTTTTGCGGTATCATCTTCGTC
GAGCGCCGTCAAACAGCCACACTTCTTGTCGAGCTCATCAAGCGCATCCCCGGTCTCGAATTCATCCATCCCGAGTTCTTGCTAGGA
```

CACGACAATGGCGCTGCGAATGGTGGCAGATCTATC **SCCGAAGAAGGCTTGGATATTCAGGCTGCCAAC**CTCGTCATCCGGTTTGAT
CTGTTTTAATCGGCATATTTCC **TCCTGCAGTCGAGAGGGAGGGCGAGA**GCGAAGGAGAGTAGGTTCAATTTGATGGCTGAGAAAGG
AATAAGGAGCACGCCGGGCCATTCTGAATGCGTTTTAAAACCGAGGCTAATAGAGCGAAGTGGTTGGATGGAATGCTGAACCGCAT
CTCGCTATGCGGGATTGGGGTGAGGATTGGCAGCAAAAACCTCGCATCGACGCCGATAACCAGGAGGGAGTTGGGGTGAGGGGGGG
AAGGAGGAAGAGTGTATGTTGCAACCAACCACAGGCGCACGTTTGTTCGGAAGAC **GCACCCACGCTTGTCTCTCACTATGCTACC**
ACCCTGCATTCCGAGTATCTTAAGGATGCGGTTCTTGCTTACCCGCATCGAAAAAGTAGATGGTCTTCCGAGTTACAAAGCTGTACTC
GAGCTACCCTCTACCCGCGCGGTAAGGAGTGTAGAGTCTGATGGGTGTAGGAGCAAGAAAGCGGCTAAACGAATGGCTGCTTTCCGC
GCATGCCAACAACTCCGAGCTTTGGGAGAACTGGATGAATGGTTAATGCCAAGCTCGTTCCTCGACTCAAAAAGGCTAAGGATGGT
GTAGTGGGATTGGTTAACCTCATCATCAGGCTTGGCGGGGAAGCGAAAACCGATCAATGTGCCGAGTAAAGAGCTGGACGGTTGG
GCGCGCTTCGCTCTTCCCACCACCAGCTACGGGACAGGGATGGTGCACAACGTTATTGCAACTGGATAAAATTCGACGAAGGATAT
GAGCCACTATTGCTGCTAACCCGCGGTGCTTTACCCGAGACGAAGCTCTTGAAGCTGCTCCATGCGGGTTCGGGCCAGATGAAGGAT
CTGCATCCCAAACCTCTCCGATTGCTGCCGAGCTTGATTGCGAGCTCATGGGAAAGGTGGTAGAGTTACGAAATTCGTTCTCAAG
CTTATCAGCCGAAAGATGGGCATTTGCCAAAAGGGAGAGGTTGAGTTGGCAGACGATTGAGAAGGGGCGCCGACGGTACTCGTT
CTTCCGTTTCGCATTGCTGCTGAGGAGGTGCAAAGTGTGGGTGATGTAGCATTGGATTTTCCCCATCGCTGGATCTCACTCAACTA
GATCTGAACGCGGAGGGATCGGAGCAGAAAACGAAGGTGAACTCTGGTTAGGCAGCAGGGTACCCTCGACTCGCTTTACCAG
TTTGAGAGCATTCGATCGGGTCTCTGTCCCACTCGCCACTCTCGTTGGTGACAGGGGAAACATATCTAACTCAGCATGTAAG
ATGTACGCTCGTACCAGCATCGGCCGACGAGCAGAGGTGGAAGTCTGCTAGCTGCTCAACTCGCGAATCAACCTTCTGAGTGT
CGGAAGTTGCCAAGATCAGCAATCTTCTCTCTCTCCCCCTCGATTTCTTCTCCGCCACTCTGCTGCGACGAGGGCGCAAGG
TTGATCGTGCCGACTTTTACGCACTTCACTCCGCTCCCTTCCACTCTTCTCCGCTCGATCCTTCTCTTACCCTCCATCTTTACTCGG
TATGACCAACTTCTTTGGCTCAAGCTGCAATAATGATCTCCTCGAGGGGAGATTGACAAAAGATAAAGTCTCGAAGCCCTCACC
TCCCCCTCCGCGGCTCTGCGTTCGACTAT**AAACGGCTAGAGTTCTCGGAGACACCTTCTTAAACTCGT**CGCTACATGT**CACACC**
TTCAACACCACCTCGGCCGAACAGAGGCAGAGCTACACATGGCTAACAAAGGCATTGTTACCAATGTTGCGCTTCTGAAAGAAGCA
AAGCGATTGGGGTTGGAAAAGTATGCTATTCTACCCAGCTGTAATCTCTTGCCGCTCGGTTTACTGCTCTGTTATCGGCAGTGT
GGAGGTGCACT**CACAAACGATT**CA**TC**CA**TGGATC**AG**CAGCGGCAGGTGGATGTAGT**GAAAGAAAAAACT**CTAAGCGATATAGTAGAA**
TCTCTCATCGGCGTGTCTCTCTCCCCTTCTCTCTCTCCCCCTCTCTCTTCTCTCCACGTCTACTGCGCTTTTCGTATGTCGA
ATTTTGCACCTGATCCATCTACCATCTCAACGTTGTCCGATTTCAACAAGCTCTTGAAGAACTCAAACACGAATCGGTAGAAAGA
AACTGGTCTTCCCAGCTCAACCTCCGCTCTAAGGACCTACAATCGCTCTTCTCCATACATACCAGATACCCGCATCTGGCATA
GAATCTTACCCACCCCTCTTTGCTCGCTTCCATCCTGCCCTCTAC **CAGCGTTGGGATTTCTGGGAGATGCTTGGATAGACTTT**
TTTATTTGCTCCCGAATCTACACCGAAGGCGGGGTTTGGTGGTGTGGATCCTGGAGAAATGACGGCACTCAAAGGCGTACTAGCC
AGCAATGCCGCGCTGAGTGCGT**TGGGGTTAAGTTGGGACTG**CA**TAAGTTTATTGCTAGTAACAGT**CGGGT**TCTTGTGGAGAGCATT**
GCAAAATACGGCAAGGGGTTGGAGAAGGTGTTGCGAAAAGGTGGGGTGAAGGACAGTATTGGACAAAAGCAGGGATGGTGCAGGTG
CCTAAGGCGGTTGCGGATGTAGTAGAGGCTAGCTTTGCGAGTATAGTTGTGGATAGTGGGTTT**GATCAAGATACTGCCAGCGGGTT**
TTTGGGAGGATTTTTACGCCGTTTTATGACGAGCATCGCAAATGGGAGGATTTGAGGTTGGGCGAGAGTACCTTTCCAGCTGTTTCA
AGAGGCGAGGGGTTGGAGGAGGGGTGATGTTGGAGGTGAGCAGCAACTTGGTTGATTTGCCTGCGATCGCAAGCGATGTCCGGGAC
AACGATGGGAGGAGGCTATCATGCGCGCTCTTCTTACGCCGTTCAACGTCGAGTTAAGGTGCGCGGGAACACGATTTGCGAAGATT
AAAGGCTGCTGGCTAAGACTCCCTTACATCTGACCCGAGCTCTTTGGAAGCTCAGACCTCTTTCCATGGACGACAGCCCTATTCTG
GCGTTGAATTGAGCGACGATGAGGAGGAGGAGATGCAAACCTGATCAACCATCCAATCTGGAGCAACCGGACGAAGAGATGCCA
CAAGCCAACGCCCATTTCCGAACCATCAAGACGATCAAGCTGGACCAACGGAGGCATTGAAACCGCAAACAAACCAGAATTGGAA
GACATGATCGACTACCAAGAGCATCTCTTCTTACGCTAGCTAGGACCTTGGGTTGGAAGTCAACCATCAAACCCCTCACTTCT
CCCGCCACTGCTGAGGAAAAGGAAGAGGTAGTGATGACTCTGGCTAAGATTGAGATCTCATCTTGCCTCCCCCTCTCTCTCTCC
TCCTCTGACTCTGCTAAGTGA

Ustilago trichophora

Taxonomía

- Dominio: Eukaryota
- Reino: Fungi
- Filo: Basidiomycota
- Clase: Ustilaginomycetes
- Orden: Ustilaginales
- Familia: Ustilaginaceae
- Género: *Ustilago*
- Especie: *U. trichophora*

DCL1

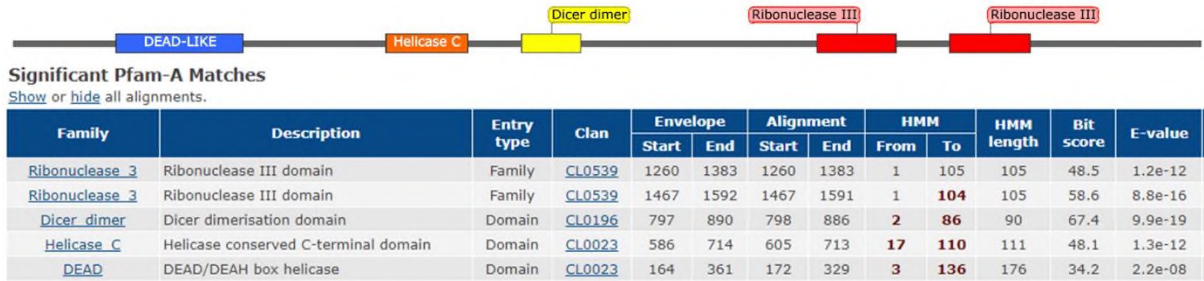


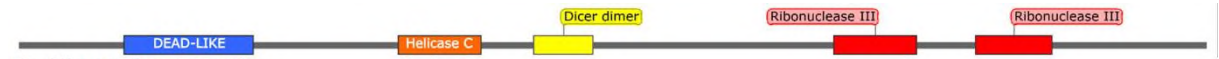
Ilustración o. Estructura de DCL1 de *U. trichophora*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

```
>tr|A0A5C3EQ4|A0A5C3EQ4_9BASI Related to cell cycle control protein dicer
OS=Ustilago trichophora OX=86804 GN=UTRI_06681_B PE=3 SV=1
MSRQGDHEVREGQFALAGSLCAPIDSSFQHTGAGEEVSADPTFRSFRVHEIHSSDTRTRAMGAPSSSDLPPLSDLKSELLHTTAPA
QLAQDLVALQISENMTKFRDLGDSFGAGQDDTPTSSPDAIPSPVEDEDRKRQRILHHISAQTSVDFCDQLRSDQLAFI PRAYQL
ELAELAKSGNVLVCLDTGSGKTLISVLLQLQVHVHQSSVERPFPSPESHASASRSRKVSFFLVNVLVPLVHQSSSVIAGNSTLSVGKLYG
ELKDSIRGKNDKLTVDTWREPQWSALLVSHQVIVSTAQCFLDALIHGFIKMDLNLILFDEVHHALKNHPFFRIMKYRLAPDHQRP
KIFGMTASPIFTGTGEFDEASRYLQKTMHARIHTVSKETLQSLKEVKQRPEEMVVEYDSYRTVLDDDDVDGAQLSDLSLEMIATFGKN
PDVDDEEVLDSVTEHFEKEVVRPKLEYTMRHLGPLGCDLLWHSTLLEYRSRARKWINIDRDKRTLVSDDWIVDASMRSTLTPPESQG
SSNGDGGSPGSGSQSSGSGSLGLGLAVAHLSNSELNQRILLQMRSRPILPNALSINTNNASPKVLRLEIMLKCFEFSKAFCGII
FVERRQTATLLVELIKRVPGLEFIHPEFLLGHENGSSASGGAPGMDWDHQVQVLNFRFRRKPTNLLVATSIAEEGLDIQAANLVIRFD
LFNRHISFLQSRGRARAKESRFIIMAE TGNRDHAQAILNAFNTEANRSTWLEGIAENHDAGCWDEEWQHKLRVEADDDVDVAGGEVCI
YEESTGARLFAEADAPTLISHYAATLHTEYLDQDAILAYKMQVADEVISDAKSFNCVLELPSTSAVRRVBSGQCRNKKQAKRMAAFKAC
QQLRELGELEDEWLMPLKIIDRTEVQKANSAGGKVNPHHKAWRGSGKPIDVPVKKMDGWARFIVSRDAGEEEAKGVYHATYLPDGFDFG
SFQPLVLLVRGGALPETKLLKLFHSSGRLKDVPRKSLGAI PSLSKDDVEAATRFTKFIFKLVGRKDIHRANDKSNLTPRSDDEDEGE
PAVLILPVRRAAGVTEVHTPSDLESDFPTSLDCIFDLSESQNLDRVLVRQHGYSHSLYRFNSIRPDLTPNSPLSNTDITYLTQH
LRMYGRFHSTRSIPPEDMSTVLALELANTPLEVTLMKAVQNLVSPNPAQQRNTLPAASRLIVPYFYLHVPLPLSLHLSVLLPSIL
TRYDQLLAQACNVDFLFSQIDTDLVLEALTSPSAGSGFDYERLEFLGDTFLKLVATCHFTTTHLSRTEAEHLANKGILTNVRLLS
EAKRLRLDKYGLFAGSRMVAKRFGVPMVGGVGRVLVDRGMVVVDDVEVGKEFEVDRIKEKTLADITEALIGAALLTSGTQCALSICR
RFHLIPIHTILTLSDFNLLLDLKSQSVVESWQSRVLSALHHLQHLFSHEYRYPHLGLEAFTHPSLLASVLPSPYQRLEFLGDAWLD
HIVMRIYQNEQLSPGELTALKGLLANSTLSALGHRGLDKYVASNSAVLCDTIRNYADSLDSIVKSLDKNKDGAEEEQGYWHD
PSHVIVPKAIADVVEASFASIVVDSFDEETTQRVFDRI FVFPFYDYCRFDVAVRVDVKRMVEYLFIVRRGVVGS LGMSFGRVCT
NLMELGLELEGEEGEELVRAMLSEIIVELKVGDMVVGRCVLPKSPHLGRAVGVKEIEKLQHWFCSSFFTASSLLAAVKGDDD
DDDDHDDMEPDEQATRSEIDQVQHDQNLQLEETESSKDKPICTTLLSSEATNLVDQLDKHQHLLLELIRTLGWKSFQSLNTSSLIN
HDDGDGDGDGRGYSLGQLRRLIWHQE
```

```
>ENA|SPO31957|SPO31957.1 Ustilago trichophora related to cell cycle control
protein dicer
ATGTCTCGTCAAGGAGACCACGAAGTGCAGGGAAGGCAATTTGCCCTCGCGGTTCCCTTTGCGCCCTATAGACTCAAGCTTTCAG
CACACCGGTGCTGGCGAAGAAGTAAGCGCAGACGAGCTACTTCCGACGCTACGACATGAAATTCCTCTTCGGATACACGAACC
CGCGCAATGGGTGCCACCACATCTCGTCCGACCTCCCACCACTTCCGATTTGAAATCAGAGCTCCTCCATACTACTGCTCCCGCC
CAGCTAGCACAAAGATCTCTACGCACCTCAGATTTCCGAAAATATGACCAAGCGGTTTCGTGATCTAGGAGACTCACCTGGTGCAGGC
CAAGATGATACACCGACCTCATCACCTGATGCCATCCCATCTCCTCCCGTGAAGACGAAGATCGAAGGAAACGGCAGAGGATTCTC
CACCACATCTCTGCTCAAACCTCCGTCGACCTTGGCAGCAGCTACGCTCCGATCAGCTAGCATTATATCCCTCGCGCTTATCAACT
GAACTTGCTGAGCTCGCAAGTCCGGCAACGCTCCTCGTCTGTCTCGATCTGCGCAGCGGAAAGACTCTCATCTGTCTGCTACTTCTG
CAACATGTTACCAACAAAGCTCGAAGCAGCTTTTTCTCCCGCAATCTCAGCTTCCGCTTAGATCCCGCAAGTCTCCCTCC
TTCCCTCGTCAATCTGGTCCCCCTCGTCCACCAGCAA TCCCTCCGTCATCGCAGGCAACTCCACCCTCTCCGTCGGAAAACCTCTACGGT
GAGCTCAAGGACTCCATCCGCGGCAAGAACGACAAGCTCACCGTCGACACCTGGCGTGAACCTCAGTGGTCTGCGCTATTGGTATCA
CATCAAGTCATCGTTTTCCACCGCCCAATGCTTCCCTCGACGCCCTCATCCACGGTTTCATCAAGATGGACGATCTCAACCTGCTCATC
TTTGACGAGGTCCACCATGCCCTTAAACCACCCCTTTTTCCGCATCATGAAGTACTATAGGCTCGCACCTGATCATCAGAGACCC
AAGATCTTTGGCATGACTGCAAGTCCCAATTTTACAGGCACAGGAGAGTTTGTATGAAGCGTGCAGGTATTTGCAGAAGACGATGCAT
GCTAGGATCCATACGGTATCAAAGGAGACGCTGCAAGTTTGAAGGAGGTGAAGCAGAGGCGGAGGAAATGGTTGTCGAATACGAT
TCGTATAGGACTGTGCTCGATGACGATGTGGATGGGACAGTTTGTGGATCGGATCTCAGCTCAGCCTGGAGATGATCGTACCTTTGGCAAGAAT
CCTGATGTGGACGACGAAGAGGTGCTCGACTCAGTCACGGAGCACTTTGAAAAGGAAGTGCAGGCAAGCTCGAATACACCATGCGG
CATTGGGCCCGCTCGGCTGCGACCTGCTTTGGCACAGCACCTGCTCGAGTACAGATCCCGCGCACGAAATGGATCAACATCGAT
CGAGATAAGCGCACCTCGTTCAGCGAGACTGGATCGTAGATGCCAGATGCGCACTTCGACCCTCACTCTCCCGAGAGTCAAGGT
AGCTCCAATGGAGACGGGGTAGTCTGGGAGTGGATCCCAATCGTCCGGCTCCGGGCTCGGGCTTGGGACTTGGTCTGGCGGTGCGCA
CATCTCTTACCAACAGCGAGCTGAATCAGCGCATCCTTCTGCAGATGCGATCGAGGCTATACTGCCGAACGCTCTCTCGCTCAAC
ACAAACAACGCTTCGCTAAGGTGCTCAGGCTGATCGAGATGCTGAAATGCTTCGAGCCGAGCAAAGCCGAGTTTTGCGGCATCATC
```

TTTGTGCGAGCGTCGCCAGACGGCTACTCTTTTGGTGGAACTGATTAACCGTGTACCTGGTTGGAGTTTATTCATCCCGAATTCCTG
 CTGGCCACGAGAATGGTAGTGCCCTCCGGTGGCGCTCTGGGATGGACTGGCATGACCAAGTGAAGTGTGAATCGCTTCCGCCGT
 CGTAAACCCACCAACTTGGCTCGTGGCCACCTCGATC**FCCGAGGAAGGACTCGACATTC**AAAGCAGCCAA**CTCGTTATCCGCTTCGAC**
CTCTTCAACCGCCACATTTCC**TTCTTCCAATCACGTGGACGAGCCCGT**GCCAAAGGAAAGCAGATTTCATATTATGGCCGAGACCGGC
 AACCGGATCACGCACAAGCGATCCTCAACGCTTTCAACACAGAAGCCAATCGGAGCACTTGGCTTGAAGGGATCGCCGAGAACCAC
 GATGCGGGTGTGGGATGAAGAATGGCAGCACAAGTTGCGGGTGAAGCGGACGATGATGATGTTGCGGGGGCGAAGTGTGCATC
 TATGAGGAAAGTACGGGTGCAAGGCTGTTGCGGAAGAT**GCGCCGACGCTGATCTCCCACTATGCGGCGACTCTCCATACGGAATAC**
CTTCAAGATGCAATTTTGGCGTACAAGATGCAAGTCGCTGATGAGGTTATCAGTGTATGCCAAATCGTTCAACTGTGTTTTGGAGCTA
CCCAGTACAAGCGCAGTGGGAGGGTAGAATCGGGCAATGTCCGAAACAAGAAGCAGGCCAAGCGAATGGCCCGCTTCAAAGCCCTGT
CAGCAGCTGAGAGAGCTAGGAGAGCTGGATGAGTGGTTGATGCCAACTCATCGACAGGACTGAAGTCCAAAAGGCCAACAGTGCA
 GGCGGAAAGGTGAATCCGCATCACAAGGCTGGAGGGGCGAGTGGAAAGCCGATCGATGTGCGGGTAAAAAGATGGATGGTTGGGCG
 AGGTTTCATGTGACGAGGGATGCAGGAGAGGAAGAGGCGAAGGGAGTGTATCATGCGACCTATCTTCCACTGGATGGCTTTGACGGG
 TCGTTCCAGCCGCTGGTCTGCTTGTGCGTGGCGGGCTTTGCCGGAGACGAAACTGCTGAAGCTATTTTCATTCGTCGGGTGGTGTG
 AAGGATGTCCTCAAAGTCACTCGGCGGATTCCTTCGCTTAGCAAGGACGATGTCGAAGCTGTACGCGCTTCCCAAGTTTCATA
 TTCAGCTCGTTGGCCGTAAGACATCCATCGCGCTAATGACAAATCGAAGAATTTGACTCCTCGTAGCAGCAGCAAGACGAGAGAG
 CCGGCGATCTTCCCTTCCGAGAGCCGGCTTACAGAGGTACATACGCCCTCCGAACTCGAATCGATTTTCCACC
 TCGCTCGATTGCATCCCTTCGACTTTCGGAATCACAACGCGAGACGCGCTCCTGGTCCGACAGCAGGCTACCACTCGCATTCC
 TTGTATCGGTTCAACAGCATCCGACCCGATCTGACGCCAACTCACCCCTCACATCCAACGATACTGACACCTACCTACCCAGCAT
 CTTCGAATGTACGGTCGATTCCACTCGACCCGATCCATCCACCCGAAGACATGTCTACCGTCTTGCCTCGAGCTGGCCAACACA
 CCCCTCTTGAAGTACCAAGATGGCCAAAGTGCAGATGTTTTGTCTCCCAACCTGCACAACAGCGAAACACTTTTACCAGCAGCA
 TCTCGTTGATCGTTCCATATTTCTACCTTGTCCATCCACTCCCCCTCTCCCTCCTCCATAGCGTCTTACTCCTCCCTCGACTTTG
 ACGCGTATGACCGCTTCTATTGGCGAAGCTTGAATGTGCATGATTTCTTGGCCAGATCGACACCGAATTTGGTGTAGAGCG
 CTGACCGCCGTCAGCGGATCTGGATTCGACTAC**GAA**CGGTTGGAGT**TTTTGGGAGATACATTTTCAA**ACTCGTCC**CCACCTGT**
CATACGTTTACGACTCATTTGAGTAGGACAGAGGCAGAATGCATTTGGCCAACAAGGGGATTTT**GACCAATGTGAGATTGTTGAGC**
GAGGCAAAGAGGTTGAGGTTGGACAAGTATGGTTGTTGCGGGATCGAGGATGGT**GCAAAGAGATTTG**GGTCCGATGGTGGT
 GGGTGGTGGGAGACTTGTGACCGGGAAATGGTGTGGTGGATGATGTCGAGGTGGCAAGGAGTTCGAGGTGGATAGGATCAA
 GAAAGACTCTTGTGACATCACTGAAGCCTT**GATCGGCGAGCTCTCTCACCTCG**GGCACACAATGCGCTCTCTCCATCTGTGCGA
 AGATTTACCTTATCCCTCACACCATCTT**GACGCTTTCGGATTTCA**CAACTGTCTGCTTCTCGACCTAAAATCGCAATCTGTGCTCGAA
 TCCTGGCAATCCCGCTCTCCTTATCCGCCCTGCATCATGCAACACCTTTCTCTCAGCAATATCGATACCTCATCTTGGTTG
 GAAGCCTTACCCTTACCTTACCTTGCCTGCTTGGCTTGTGCTAGTTAC**CAGCGGTTGGAGTCTTGGGAGATC**ATTTGGTGGATTT**C**
CACATTTGATGCGCATCTATGGGCAAACGAGCAACTTCTCTGGAGAGCTGACCGGTTGAAGGGTTACTGGCGAGCAATTTCT
ACGCTGTCTGCGTTGGGCATCGCTTGGGCTTGATAAATATGTGGCGAGTAACAGTGCGGTGTATGCGATACGATTAGGA**ACTAT**
GCCGATTTCTCTGACTCTATAGTGAATCTTTGGATAAAACAAGATGGAGCAGAAGAGGAACAAGGGCAGTACTGGCATGATTTG
CCTTCACATGTGATTTGCCAAAGGCAATTGCGGATGTGGTAGAAGCGTCTTTTGGCAGCATTGTGGTGGATAGCGAATTTGATGAG
 GAGACTACGAGAGGTTGTTGATCGGATTTTGTGCTTTTTATGACACTTATTTGCGATTTGATGCGGTTAGGGTTAGGGATGTC
 AAGAGGATGGTGAATATTTGTTGGATTTGTGAGGAGGGGGTGGTGGTGGAAAGTTTGGGGATGATTTGGGCGGGTGTGACG
 AATCTGATGGAGTTGGTTTGGAGTTAGAAAGGTGAAGAGGGGGGAAGATGTTGGTGGGAGCAATGCTAAGGAGATATAGTGGAA
 TTAAAGTGGGGATATGGTGGTGGGAGATGTGAGGTTTGGCCAAAGAGTCCAACGCATTTGGGTAGAGCGGTTGGGATTGTGAAA
 GAGATAGAGAAGTTGCAGCATTGGTTTTGCTCTTCTCATTCTTTACTGCTTCTTCTTCTGCTTGTGCTGCTTGGTAAGGATGACGAT
 GATGACGATGACGATCAGATGATATGGAGCCGACGAGCAAGCAACTAGAAGCGAGATTGATCAAGTTCAACACGATCAGAACC
 CTTGAAGAAACAGAATCATCAAAAGATAAACCGATTTGCACCCTCTCTTCTTCTCAGAAGCGACAAATTTGGTGGATCAACTGGAT
 AAACATCAACATCTCATTTTGAACATACGTACTCTAGGATGGAAGTCAATTTTCCAATCTCTCAACACCTCTCCCTTATCAAT
 CATGATGATGGTGTGGGATGGGATGGGATCGAGGTTACAGTTTGGGTCAATTGCGAAGGTTGATTTGGCATCAAGAGTAA

DCL2



Significant Pfam-A Matches

Show or hide all alignments.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value
				Start	End	Start	End	From	To			
Ribonuclease_3	Ribonuclease III domain	Family	CL0539	1263	1391	1263	1391	1	105	105	49.1	7.8e-13
Ribonuclease_3	Ribonuclease III domain	Family	CL0539	1475	1600	1475	1599	1	104	105	61.2	1.3e-16
Dicer_dimer	Dicer dimerisation domain	Domain	CL0196	799	892	800	888	2	86	90	69.5	2.1e-19
Helicase_C	Helicase conserved C-terminal domain	Domain	CL0023	589	716	641	715	36	110	111	46.2	5.4e-12
DEAD	DEAD/DEAH box helicase	Domain	CL0023	165	364	173	331	3	136	176	34.6	1.6e-08

Ilustración p. Estructura de DCL2 de *U. trichophora*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

```
>tr|A0A5C3EMF5|A0A5C3EMF5_9BASI Related to cell cycle control protein dicer
OS=Ustilago trichophora OX=86804 GN=UTRI_06681 PE=3 SV=1
MSRRGNHKMRQAQFAHAHAVCAPLDDSSQHAGADGEGSADEPAFRVTKQTYEAHFSDTYPRAMDLPSSSDFPNLDTELLHTTA
PVQLSQHLSALQISEMTKTRTRGLEESPGAGQYDTPSSPDTPSPPEQDDRRKRQRIIDHISAQTSVDPDQLRSDQLACIPRSYQ
LELAELAKSGNVLVCLDTGSGKTLISVLLQHVHQQSIEPPLSPSPGSHASAFERRKVSFFLVNLVPLVHQQSSVIAGNSNLSVGLK
```

YGELKDTIRGKNNKLTVDTWREPOWSALLASHQVIVSTAQCFLDALIHGFVKMDHLNLLIFDEVHHALKNHPFFRIMKYRVLAPVHQ
RPKIFGMTASPIFTSTGEFDEASRYLQKTMADARIHTVSNETLQSLKEVKQKPEEMVVEYDSYNTVLDDEEDGAQLSELSLEMIATFG
KSPDGDVVLDPVTEHFEKEVRPKLEYTMRHLGLPLGCDLLWHSTLLEYRSRARKWVNIHRDKRTLVSDDWIVDASMRSTLTPPES
QGSSSGDGGSPGSGSQSTGSGSRLGLGLAVAHLSSTNSELNQRILLHMRSQPTLPNTLSLDANNVSPKVLRLIETLKCFEPSKAFCG
IVFVERRQATALLVELIKRVPGLEFIHPEFLLGHENGNASGGAPGMDWHQVQALNRFRRRNPTNLLVATSI AEEGLDIQAANLVIR
FDLNRHIS FLOSRGRARAKESRFI IMAETGNRDHAQA I LNAFNTEANRSTWLKGI AENHDAEYWEEEWLQKLRVEADHDVEAGEEE
CIFEEATGARLFAEDAPT LISHYAATLHTEY LQDAVLAYKMEVAEEGFGDAKMFNCVLELPSTSAVRRVESGECRSKKS AKRMAAFK
ACQQLRELGELEDEWLLPKL I DRSEVKRANSAGGKVNPHHKAWRGS GKP I DV PVKMDGWARFVASRDAGEEEGKGVYHAI FLPLDDF
DGSFQPLVLLTRGGALPETKLLKLLHSSGRLKDVPRKSLGAIASLNDVVEAATRFTRFVKLIGRKPDRHVHGKSKDSTSRSDRD
GEPTVLVLPVRRVAGVTKVQTASDVESDFPPLSDRAPFDLSESQLQGRVLRVQHSYHSHSLYRFNRI RPDLPNS PLASNDTDTYLT
QHLRMYGRFHSTRS I PPEMSTVLSLELANMPLLEVTKMAKVQNLLSPTPAQQRDTRPTSASRLI V P Y F Y L L H P L S L N L V Q S V L L L P
S I L T R Y D Q L L L A R A C N A D L F S G R I D T D L V L E A L T S P S A G S G F D Y E R E F L G D T F L K L V A T C H T F T T H L S R T E A E L H L A N K G I L T N V R
L L N E A R L K L E K Y G L F A G A R I V A K R F V G P M A G E V G G R L V A E P G K E E M G V V V D D V E V V K G E D V D R I K E K T L S D I T E A L I G A A L L T S G T
S C A L F I C R T L H L I P G T I L T L S D F N A L L L D L K S Q S V A E S W Q S R V S L S A L H H L Q H V F S H V Y R Y P H L G L E A F T H P S L L A S V L P S Y Q R L E F
L G D A W L D F Y I V T R I Y A Q H D R L S P G E L T A L K G L L A S N S T L S A L G H R L G L H S Y V A S N S T V L C E T I K H Y A R S L D T I V T A L N E S K D E A E T E
H G Q Y W Q L P S D V I P K A I A D V V E A S F A S I V V D S E F D E T I A Q R V F D R I F A P F Y D A Y C R F D R V R V R D A K R V V E F L F G I Q R V R E V V V D V A
G S G Y V R V V E V R T N L I E L G M E R E G E E E E R L V R A M L T E I K V E L K V A D M V V G R C E V L P K S A M H L T R A I G I V T E I E K L Q H L V I F S S Y L T A
S P S P Q A V D D D D K D E N D P D E P S Q Q D A S Q D K P S Y T S P A Q V V E Q L D E F Q H L L L E L A Q T I G W K Y I F Q S T S S P L D D D H G D A G R P Y S L A Q L R K
F V L G E G

>ENA|SPO31844|SPO31844.1 Ustilago trichophora related to cell cycle control protein dicer

ATGTCTCGTCGAGGTAACCAAAAATGCGGCAAGCACAAATTTGCCACGCCCATGCCGTCTGCGCACCTTTAGACTCAAGCTCTCAG
CACGCCGGCGTGATGGAGAAGGAAGTGCAGACGAACCTGCTTTCCGCACCGTCAAACAGACGTATGAAGCCCACCTTTTCGGATACA
TATCCTCGCGCAATGGATCTCCACCATCCTCGTCCGACTTCCCACCACCTTCCAATTTAGATACAGAGCTACTCCACACCCTGCT
CCCGTTCAACTGTACAGCATCTTTCCGCCCTTCAGATCTCGAAACTATGACCAAACGTACTCGTGGTCTAGAAGAGTCACCTGGT
GCAGGCCAGTATGATACACCGACCTCTTACCCGATACGACCCCATCTCCTCCAGACGAAGACGATCGCAGGAAACGGCAGAGGATT
ATCGACCACATCTCTGCCAAACCTCTGTGACCCCTTCTGACCGCTCCGCTCCGATCAGCTAGCATGCATCCCTCGTTCATACCAG
CTTGAACCTCGCCGAGTCCGCAAGTCCGAAACGTTCTGTCTGTCTGATACCTGGCAGTGGCAAGACGCTCATCTCTGTCTACTG
CTGCAGCATGTTACACGCAAGTATCGAACCCCTCTTCTCCCGCAGTGGTTCGCCACGCTTCCCGCTTCGAGCGCCGCAAGTT
TCATTCCTTCTCGTCAACCTAGTTCGCCCTCGTCCACCAGCAA TCCTCCGTCATCGCAGGCAACTCGAACCTCTCCGTCGGAAAACCT
TATGGCGAGCTCAAGGATACCATCCGTGGCAAGAACAACAAGCTCACCGTCGATACCTGGCGTGAACCTCAATGGTCTGCGCTCTTG
GCATCGCATCAAGTCACTGCTCTCCACGCCCAATGCTTCTCGACGCCTCATCCAGGTTTCGTCGAAGATGGACCATCTCAACCTG
CTCATCTTTGACGAGGTGCATCATGCGCTCAAGAACCATCCCTTTTTCCGCATCATGAAGTACTACAGGCTCGCACCTGTGCATCAG
AGACCCAAGATCTTTGGAATGACTGCAAGCCCGATTTTCAACAGCACGGGGAGTTTATGAAGCATCGAGGATTTTCGAGAAGC
ATGGATGCCAGGATTCATACGTTTTCGAACGAGACATCTGACAGCTTGAAGAGGTGAAACAGAAGCGAGGAAATGTTGTAGAG
TACGATTCCGTACAACACTGTGCTCGATGATGAAGAGGATGGGGCACAGTTGTCCGAGCTCAGCCTCGAAATGATCGCCACCTTTGGC
AAGAGTCCAGATGGAGACGACGATGTGGTGTGGATCCAGTCACGGAGCATTTTGAAGGAAGTGCGGCCTAAGCTCGAATATACC
ATGCGACATCTGGGACCGCTCGGATGCGATTTGCTGTGGCACAGCACCTGCTCGAGTACAGATCTCGCGCTCGCAAATGGGTCAAC
ATCCATCGAGATAAGCGACCCCTCGTACGCGACGACTGGATCGTACGCGCCAGTATGCGCACTTCGACCCCTCACGCTCCCGAAAGT
CAAGGTAGCTCCAGTGGAGACGGTGGTAGTCTGGGAGTGGATCTCAATCCACCGGCTCTGGGTGCGCTTGGGACTGGGTCTGGC
GTGGACATCTCTTACCAACAGCGAGCTGAATCAGCGCATCTCTGCTGCATATGCGATCGCAGCTACACTGCCAAGACTCTATCG
CTCGATCGAACAATGCTCGCCC AAAGTACTCGCTTGATCGAGACGCTGAAATGCTTTGAGCCGAGCAAAAGCGAGTTCTGCGGG
ATTGTCTTTGTGAGCGCTCGCCAGACGGCTACTCTTTTGGTGGAACTGATCAAACGTTGCTGCTGGTTTGGAGTTTTATTCATCCCGAA
TTCCTGCTTGGCCACGAGAACGGTAATGCCTCAGGTGGCGCTCCTGGGATGGACTGGCATGACCAAGTGAAGCGCTCAACCGATT
CGGCGTGTAAATCCCAACTTGTCTGCTAGCCACTCGATCGCTGAAGAAGGGCTCGACATCCAAGCCGCCAAC CTGCTGATCCGC
TTTGACTCTTCAACCGCCACATCTCG TTCTCCAATCGCGCGGACGAGCCCGA GCCAAAGAGAGCGGTTTCATCATATGCGCCGAG
ACCGGCAATCGCGATCACGCACAAGCGATCTCAACCGGTTCAACACAGAAGCTAATCGCAGTACATGGCTCAAAGGCATCGCCGAG
AATCACGATGCGGAATACTGGGAGGAAGAATGGCTGCAAAAGTCCGGGTCGAAGCAGATCATGACGTGGAGGCGGGTGAAGAGGAG
TGCATCTTTGAGGAGGCTACGGGTGCAAGGCTGTTTCCCGAGGA CGCACCGACGCTGATCTCGACTACGCGGGCACCCCTTCATACC
GAGTACCTTCAAGATGCGGTAAGTGGCATAACAAGATGGAAGTGGCTGAGGAGGGGTTTGGTGTGCAAAAGATGTTCAACTGCGTTTTG
GAGCTACCGAGTACGAGTGCAGTGGGAGAGTGAATCGGGGAGTGTAGGAGCAAGAAAAGTGCCAAAAGCAATGGCCGCTTTCAAG
GCCTGTACGAGCTGAGAGAGCTAGGAGAGCTGGACGAGTGGTTGTTACCCAAGCTC ATCGATCGGTCGAAAGTGAAGGGCCAAC
AGTGCAGGTGGAAGGTGAATCCGCATCAACAAGGCTTGGAGGGGCGAGTGGGAAACCGATCGATGTGCCGGTGAAGAGATGGATGGC
TGGCGGAGGTTCTGTTGCCAGCCGGGATGCGGGAGGAGAAAGGGGAGTGTATCATGCGATTTTCTTCCACTGGATGACTTT
GACGGTGTGTTTACGCGCTGGTCTGCTCAGCGGGGCGGGGCTTTCCCGGAGACAAAAGTGCACAGCTGCTCTCATTCGTCGGGT
CGGTTGAAGGATGTCCTGTCACAAAGTCACTCGGCGGATGCTCCTCGCTTAGCAACGACGATGTCGAGGACGCTACCGGCTTCACCAG
TTCGTATTCAAGCTGATCGGCCGTAAGATCCCCATCGGCTCCATGGCAAGTGAAGGATTGACCTTCTCGCAGCGACGACCGAGAC
GGTGAGCCGACAGTCTCGTTTTGCGGTTGCGAGAGTTGCCGGCGTCAAAAAGTGAACCCGCTCGGACGTCGAATCTGATTTT
CCCCCTCGCTCGATCGTCCCCCTTCGACCTCTCCGAATCGCAATTGCAAGGCCGTGACTCGTTGACAGCACAGCTACCACTCG
CACTCTCTGTATCGGTTCAACCGCATCCGACCCGATCTGACACCCAACTCACCCCTCGCATCCAACGATACAGACACCTACCTCACC
CAGCATCTCGAATGTACGGTCGATTCCTACTCGACCCGATCCATCCCAAGACATGTGACCGGTTCTCTCGCTCGAGCTGGCC
AACATGCTCTGTTGGAAGTCAACAAGATGGCCAAAGTGA AAAATCTTCTCTCCACCCTGCACAGCAGAGACACTCGGCCA
ACATCAGCATCTCGATTGATCGTTCCCTATTTCTACCTCCTTACCCGCTTTCCCTCAACCTCGTTCAAAGCGTCTTACTTCTCCCT
TCCATTTGACGCGGTACGACAGCTTCTCTGGCGGAGCTTGCAACGCCGATCTGTTCTCCGGCCGAATCGATACCGATCTGGT

CTGGAAGCGCTGACCTCCCCTCCGCGAGGATCTGGATTGCGACTACGAACGGTTGGAGTTTTAGGAGATACATTTCTCAAGCTCGTC
 GCCACCTGTATACGTTTACCACGCATCTGAGTAGGACAGAGGCAGAGTTGCATTTGGCCAACAAGGGGATTTTGACCAATGTGAGG
 TTGTTGAACGAGGCGAGGAGTTGAAGTTGAAAAGTATGGGTTGTTGCGGGGGCGAGGATTGTTGCGAAGAGATTTGTTGGCCCT
 ATGGCTGGGAGGTGGGTGGAAGGCTTGTGCGCAACCGGGGAAGGAGGAGATGGGGTGGTGGTGGATGATGTTGAGGTGGTCAAG
 GGGGAAGATGTGGATAGGATCAAAGAGAAGACTCTGTCCGACATCACTGAGGCTCTCATCGGTGCAGCTCTCCTCACCTCCGGTACA
 TCATGTGCGCTCTTCATCTGTGCGAACACTCCACCTTATCCCTGGTACCATCTTGACGCTCTCGGATTTCAACGCTCTGCTTCTCGAC
 TTGAAATCGCAGTCGGTCGCCGAATCCTGGCAATCCCGGTATCCTTATCCGCCCTACATCACCTGCAACACGCTCTTCTCGCACGTG
 TATCGATACCCGCATCTGGGCTTGAAGCCTTACCATCCATCGTTGCTCGCCTCGGTATTGCCTAGCTACCAGCGGTTGGAGTTT
 TTGGGAGATGCATGGTTAGACTTCTACATTTGTGACGCGGATCTACGCGCAACACGACCGACTTTCACCTGGAGAGTTGACGGCGTTG
 AAAGGCTACTGGCGAGCAACTCCACCTGTCTGCGCTGGGTATCGGTGGGTCTGCACAGCTATGTGGCGAGTAACAGTACCCTG
 CTTTGGCAAACGATCAAACACTATGCCAGATCTCTAGACAGATCGTAACAGCTCTCAACGAGAGCAAGGATGAAGCCGAAACAGAA
 CACGGGCAGTACTGGCAGGACTTGCCATCCGACGTGATCGTACCAAAGGCAATTGCGGATGTGGTGAAGCGTCTTTTGGCAGCATA
 GTGGTGGATAGCGAATTTGACGAGACGATTGCGCAGCGCTCTTCGATCGGATCTTTGCACCTTTCTACGATGCGTATTGTGATTT
 GATCGGGTGAGGGTTAGGGATGCGAAGAGGGTGGTTGAGTTTTTGTGGGATTTGTGAGGAGGGAGGTGGTGGTGGTGGATGTAGCT
 GGAAGTGGTGGGGTGAAGGTGGTTGAGGTGCGTACGAATCTGATCGAGTTGGGAATGGAAGAGAAGGTGAAGAGGAGGAAGAGAGA
 TTAGTTGCGGCGATGCTAACCGAGATCAAAGTGGAGCTCAAGTGGCGGATATGGTGGTGGGAGATGTGAGTTTTTGGCCCAAGAGT
 GCAATGCATTTGACGAGGCGATTGGGATTTGTGACAGAGATCGAGAAGTATACGACCAACTTTATTTTTTCGTCCTACCTCAAGTGC
 TCTCCTTACCTCAAGCTGTGATGATGATGACAAGGACGAAAACGATCCGACGAACCATCGCAGCAGGATGCATCCCAAGACAAA
 CCGAGCTACACCTCACCAGCCCAAGTAGTCAACAACCTCGACGAGTTTACGATCTCCTCTTGGAACTGGCACAACAATTGGATGG
 AAGTACATTTTCCAATCTACCTCCTCCTCTCGATGATGACCATGGTATGCGGGACGACCGTACAGTTTGGCTCAATTGCGAAAG
 TTTGTTTTGGGCGAAGGGTAA

Ustilago hordei (strain Uh4875-4)

Taxonomía

- Dominio: Eukaryota
- Reino: Fungi
- Filo: Basidiomycota
- Clase: Ustilaginomycetes
- Orden: Ustilaginales
- Familia: Ustilaginaceae
- Género: *Ustilago*
- Especie: *U. hordei*

DCL

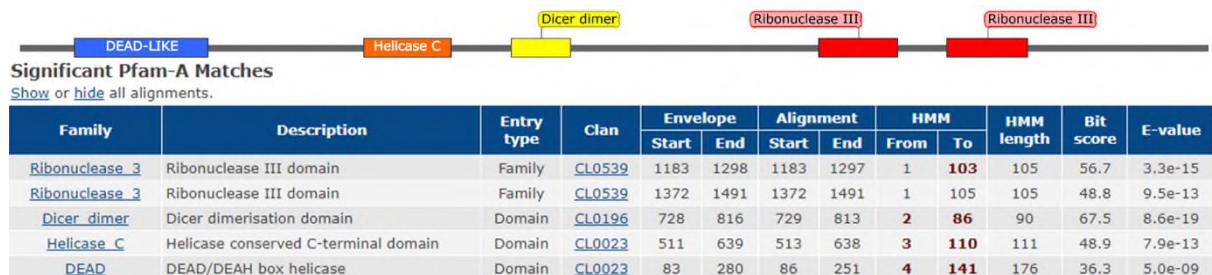


Ilustración q. Estructura de DCL de *U. hordei*. Imagen elaborada en SnapGene a partir de información en Pfam.

```
>tr|I2FNB7|I2FNB7_USTH4 Related to cell cycle control protein dicer
OS=Ustilago hordei (strain Uh4875-4) OX=1128400 GN=UHOR_08937 PE=3 SV=1
MSKRTRADSLPHGPRI PRSGYIATSSSSSSNDLPI PPLVDSDDDDTEESASRRRQKI IARI SAQTSVDPDQLRSDQLATVPRSYQL
ELAELAKAGNVLVCLDTGSGKTLISVLLLQYVHQHSSPPPTPSLAPSSGAQPFSSPAPQRKVA FFLVNLVPLVHQSSSVIAGNSRLS
VGKLYGELKDSLRSKSSQLAVDDWRS PQWSALLASHQVIVSTAQCFDLALIHGFIKMSDLNLLIFDEVHHALKNHPFRIMKYRRLA
KEEERPKIFGMTASPIFTGSGRFDEASQYLQRAMDARIHTVSRGALRELEEVKRRPEEMVVEFEPYLTVVDEPNWADAVKYSELSME
MIELFSKKVDLEICLDDEEEVDPLTEAFEKEVRPKLEYTMRHLGPIGCDFFWHSTLLEYRSRARKWANIDRNQRTLVSDEWIVEAA
STHRSSSVAPSDSQPPNSQTTTTTTITTTTQPGFGLGLTVAHLSTNSDLNSRILLHMRSQPCIPDTLGLNATNSS PKLLRLIELLHC
FEPKSSFCGIIIFVRRQATLLVELVKRIPGLEFIHPEFLLGHNGAANGGAPGMDWHDQVQVNLNRRRRKPTNLLIATSI AEEGI
DIQAANLVIRFDLFRHIS FLOSRGRARAKESRFILMAEKGNQEHAGTILNAFKTEANRAKWLGDIAEPHLAMPDWGEDWQKLRID
TDSQEGVGVGEEEEKCMFEPTTGARLFPEDAPTLVSHYAASLHSEY LKDAVLAYRIEKVDGLPSYKAVLELPSTA AVRSVESDGC
```

SKKAAKRMAAFRACQQLRALGELDEWLMPKLV PRLKKAQDGVVGLVNAHQAWRGSQKPINVPSKLLDQWARFASSHHHAMQGWCA
TLLQLDKFDEGEYPLLLLTRGPLPETKLLKLLHAGSGQMKDLHPKPLRIAPELDSELIGKVVEFTKVFVKLISRDKGHS PKGRKLSW
QTIEKGQPTVLVLPVRIAABEVQSVGVDVALDFPPSLDLTQLDLNAEGSEQKLGKRTLVKQHGYSHSLSYQFESIRSDLCPN SPLSSG
AAGETYLTQHMKMYARHQASADEHEVEVLAAQLANQPLLSVRKLPKISNLLSPPPSISFSATPATTQGARLIVPYFYALHPLPSTLL
RSILLPSIFTRYDQLLAQACNNDLEGRLDNDKVL EALTS PSAGSAFDYERLEFLGDTFLKLIATCHFTTTHLGRTEAELHMANK
GIVTNVRLKEAKRGLGEKYAILPSCNLLPRRFTAPVICNVGGALTNDFSMHDGQVDVVKKETS DIVESLIGAAALS PSSSSPSS
SSPFFLLPFLSFLHVYCAFQRNWSRLNPPSLRHLQSLFSHTYRYPHLALESFTHPSILLASILPSYQRLEFLGDAWIDFFIVSRIYT
EGGGLVLDPGEMTALKGVLASNAALSALGVKLGHLKF IASNSAVLVESIAKYGKLEKVLVRKGGGEGQYWTAKGMVQVPAVADV
EASFASIVVDSGFDQDTAQRVFGRIFTP FYDEHKWEDLRVGEVKRVI EYLS SFCRRRGGGGVMLEVSTNLVLDLPAIASDVGDKDG
EEAIMCALLTPVNVEFKVRGTTIAKIKGVLAKTPLHLTRAVGIARELHELEPQMAKLSKLRPLSMDSPVLALNSDDEEEEEEMQT
DQSSNLEQPDEEMPQANTAI SNHQDDQAAPTEASKPQTENWEDLDI HQEHL LQLARTLGWKSTIQTPLTSPATAEKEEVVMTLA
KIRD LILPPLLF

>ENA|CCF48410|CCF48410.1 Ustilago hordei related to cell cycle control protein dicer

ATGTCCAAGCGTACACGAGCTGACTCTCTCCACATGGCCCCGATCCCTCGATCGGGTTACATTGCAACTTCGTCTCCTCGTCA
TCCAACGACCTCCCAATTCCACCCCTCGTAGACAGCGATGACGACGACACCGAAGAAATCCGCCTCGCGCAGACGCCAGAAGATCATA
GCTCGCATCTCCGCTCAAACCTCCGTCGACCCTTCCGATCAACTCCGCTCCGATCAGCTCGCCACCGTACCCCGCTCTTACCAACTC
GAGCTCGCTGAGTTAGCAAAGCGGAAACGTTCTGGTCTGTCTAGATACAGGAAGCGGAAAGACCCATCTCTGTCTGCTTTTG
CAGTATGTTACCAACACTCTTCTCCTCCTACTCCATCTCTGGCTCCGTTCTCGGGGCTCAACCTTTCTCCTCACCCGCTCCG
CAGCGCAAAGTCGCCCTCTCTCTCGTAAACCTAGTCCCTCTAGTTACCAACAATCATCCGTCATCGCCGGTAACTCCCGCTCTCG
GTCGGTAAGCTCTATGGCAACTCAAAGATTCTCTCCGACGAAATCTCCCAACTTGCTGTCCGACGATGGCGTTCTCCGCAATGG
TCCGCCCTGCTCGCATCGCAGCAAGTGATCGTTTCAACCGCAATCTCCTCGATGCTTTAATTACGGTTTTATCAAGATGCTCC
GATCTCAACCTTCTCATTTTCGATGAAGTTCATCATGCCCTCAAAAACCACCCCTTCTTCCGATCATGAAGTATTATAGGCTGGCC
AAGGAGGAAGAGCGGCCAAAGATCTTTGGCATGACGGCTAGTCCCATTTTACGGGGTCAGGGAGATTTGATGAAGCGAGCCAGTAT
TTGCAACGGGCGATGGATGCTAGGATTCACACTGTCAGTAGGGGAGCGTTGAGGGAATTGAGGAGGTGAAGAGGCGACCAGAGGAA
ATGGTGGTTGAGTTTGAAGCCATCTTACTGTGGTTGATGAACCGTGAATGCAGATCGGGTCAAGTATTCGGAGCTGAGTATGGAG
ATGATTGAGTTGTTGACGAAGAAGTTCGATCTCGAAATTTGCCTAGACGATGAGGAGGAGGAGGTGGATCCGCTGACAGAGGCATTC
GAGAAGAAGTAGACCAAAGCTAGAGTATACGATGCGACATCTCGTCTATAGGATGCGACTTTTCTGGCATAGCACTCTTCTC
GAGTATCGATCCCGTCGAGGAAGTGGCCAATATCGATCGTAATCAGAGGACCGTTGTAGTATGAATGGATGATCAAGATGCT
TCCACCCATCGCTCTTCCAGTGTAGCTCCCTCTGACAGTCAAGGCCCGCGAACTCCCAAACCACCACCACCACCATCACCACCACC
ACTCAACCTGGCTTCGGACTGGGCCTAACAGTAGCCATCTCTCCACCAACTCCGACCTAAATTCCTGATCCTCCTCCATATGCGA
TCCCAACCTTGATCCCTGACACACTGGCCCTCAACGCCACCAATTCCTCCCGAAACTTCTCCGCCATAATCGAGCTACTCCACTGC
TTTGAACCCAGCAAGTCTCCTTTTGGCGTATCATCTTCGTCGAGCGCCGTCAAACAGCCACACTTCTTGTGCGAGCTCGTCAAGCGC
ATCCCGGCTCGAATTCATCCATCCCGAGTTCTTGGTAGGACAGCAATGGCGCTGCAAACGGTGGTCTCCGGGCATGGACTGG
CATGATCAAGTTCAAGTCTGAACAGGTTTAGGAGGAGGAACCCAGCAATTTACTCATAGCAGATCTATC GCCGAAAGAGGGTTG
GATATTCAGGCTGCCAAGCTCGTCATCCGGTTTGTATCTGTTAATCCGCATATTTCCCTCGAGTTCGAGAGGGGAGGGCGAGA GCG
AAGGAGAGTAGGTTCAATTTGATGGCTGAGAAAGGGAATCAGGAGCACGCCGGGACCATTCTGAATGCGTTTAAAACCAGGCTAAT
AGAGCAAAGTGGTTGGATGGAATTGCTGAACCGCATCTCGCTATGCCGATTGGGGTGAGGATTGGCAGCAAAAACCTCGCATCGAC
ACCGATAGCCAGGAGGAGTGGGGTGGAGGGGGGAGAGGAGAAAAGTGTATGTTGGAACCAACACAGGCGCACGTTTGTTCGG
GAAGACGCACCCACGCTTGTCTCTCACTATGCTGCCAGCCTGCATTCGAGTATCTTAAGGATGCGGTTCTTGCTTACCGCATCGAA
AAGTAGATGGTCTCCGAGTTACAAGCTGTACTCGAGTACCCCTACCCGCGGGTAAGGAGTGTAGAGTCTGATGGGTGTAGG
AGCAAGAAAGCGGCTAAACGAATGGCTGTTTCCGCGCATGCCAACACTCCGAGCTTTGGGAGAACTGGATGAATGGTTGATGCC
AAGCTCGTTCTCGACTCAAAAAGGCTAAGGATGGTGTAGTGGGATTGGTTAACGTCATCATCAGGCTTGGCGGGGAAGCGGAAAA
CCGATCAATGTGCCGAGTAAAGAAGCTGGACGGTGGGCGCGCTTCGCTCCTCCACCACCACGCTATGGGACAGGGGTGGTGGCGA
ACGTTATTGCAACTGGATAAATTCGACGAGGGATATGACCCTATGCTGCTAACCCGCGGTTCTTACCCGAGACGAAGCTCTTG
AAGCTGCTCCATGCGGGTTCGGGCCAGATGAAGGATCTGCATCCCAAACCTCTCCGGATTGCTCCCGAGCTTGATTCCGGAGCTCATA
GGAAAGTGGTAGAGTTACGAAATTCGCTTCAAGCTTATCAGCCGAAAGATGGGCATTCCGCAAAAAGGGAAGAGGTTGAGTTGG
CAGACGATGAGAAGGGGAGCCGACGGTACTCGTCTTCCGCTTCGATTGCTGCTGAGGAGGTCAAAGTGTGGGTGATGTAGCA
TTGGATTTTCCCCATCGCTGGATCTCACTCAACTAGATCTGAACCGGAGGGATCGGAGCAGAAGCTGAAGGGTAGAACTCTGGTT
AAGCAGCACGGCTATCACTCGCACTCGCTTACCAGTTGAGAGCATTCGATCGGATCTCTGCCCAACTCGCCACTCTCGTCTGGT
GCAGCGGGGAAACATATCTAACCCAGCATATGAAGATGTACGCTCGTCACCAAGCATCGGCCGACGAGCAGAGGTGGAAGTGCTA
GCTGCTCAACTCGGAATCAACCTTGTGAGTGTTCGGAAGTTGCCAAGATCAGCAATCTTCTCTCCTCCCCCTCGATTTCT
TTCTCCGCCACTCCTGTACGACGCGAGGGCGAAGTTGATCGTGCCGACTTTTTACGCACTTATCCGCTCCCTTCCACTCTTCT
CGTCTGATCCTTCTCACTCCATCTTACTCGGTATGACCAACTCTCTTGGCTCAAGCGTGAATATGATCTCTCCAGGGG
AGATTGGACAACGATAAAGTCTCGAAGCCCTCACTCCCTCCGCTGCTGCTGATTGAACGACTAGACTTCTGCTTCCGAACTTCTCGGA
GACACTTCTTAAACTCATCGCTACATGTACACCTTCAACACCCTCGGTGCAACAGAGGCGAGCTACACATGGCTAACAAA
GGCATTTGTACCAATGTTTCGCTTCTGAAAGAAGCAAAGCGATTAGGGTTGGAAAAGTATGCTATTTACCCAGCTGTAATCTCTTG
CCGCTCGGTTTACTGCTCTGTTATCTGCAATGTAGGAGGTGCACTCAAAACGATCCATCCATGGATCACGACGGGCGAGGTGGAT
GTAGTGAAGAAAAAATCTAAGCGATATAGTAGAATCTCTCATCGCGCTGCTCTCCTCTCCCTTCTCCTCCTCCCTTCTCCT
TCCTCCCTTTTTTCTCCTCCCTTCTCCT
CCGCTCTAAGGCACTACAATCGCTCTCTCCCATACATACCGATACCCGATCGGACTAGACTTCTTACCCACCCCTCCTTTG
CTCGTTCCATCCTGCCCTCTACAGCGGTTGAAATTTCTGGGAGATGCTGGATAGACTTTTTTATTTGCTCTCCGAACTACACC
GAAGGTGGGGTTGGTGGTGGTGGATCCTGGAGAAATGACGGCACTCAAAGGCGTACTAGCCAGCAATGCCGCGTGAAGTGGTGG
GGGGTTAAGTTGGACTGCATAAGTTTATGCTAGTAAAGTGGGTTCTTGTGGAGAGCATTGCAAAAACCGCAAGGGGTTGGAG

AAGGTGTTGCGAAAAGGTGGGGGTGAAGGACAGTATTGGACAAAAGCAGGGATGGTGCAGGTGCCTAAGGCGGTTGCCGATGTAGTA
GAGGCTAGTTTTGCGAGTATAGTTGTGGATAGTGGGTTGATCAAGATACTGCCAGCGGGTTTTTGGGAGGATTTTTACGCCGTTT
TATGACGAGCATTGCAAATGGGAGGATTTGAGGGTGGGCGAGGTGAAGAGGGTCATAGAGTACCTTTCCAGCTGTTTCAAGAGGCGA
GGGGGGGAGGAGGGGTGATGTTGGAGGTGAGCACGAACTTGGTTGATTTGCCTGCGATCGCAAGCGATGTCGGGGACAAGGATGGG
GAGGAGGCTATCATGTGCGCTCTTCTTACGCCGGTCAACGTGCGAGTTCAAGGTGCGCGGGACCACGATTGCCAAGATTAAGGCGTG
CTGGCTAAGACTCCCTTACATCTGACCCGAGCTGTGGGTATTGCGAGGGAGCTGCACGAACTTGAACCTCAAATGGCGAAGCTTTTCG
AAGCTCAGACCTCTTTCCATGGACGACAGCCCTGTTCTGGCGTTGAATTCGAGTGACGATGAGGAGGAGGAGGAGGATGCAAAC
GATCAATCATCCAATCTGGAGCAACCCGACGAAGAGATGCCGCAAGCCAACACCGCCATTTTGAACCATCAAGACGATCAAGCTGCA
CCAACGGAGGCATCGAAACCGCAAACAACGAGAATTGGGAAGACCTGATCGACCACCAAGAGCATCTCCTTCTTCAGCTAGCTAGG
ACCTTGGGTGGAAGTCAACCATTCAAACCCCTTACTTCTCCCGCCACTGCTGAGGAAAAGGAAGAGGTAGTGATGACTCTGGCT
AAGATTCGAGATCTCATCTTGCCTCCCTCCTCTTCTGA

Anexo 3. Evidencia de las corridas experimentales

Cuadro a. Datos de corridas experimentales para inhibición de germinación de esporas con lds y sdsAspt.

Corrida experimental 1 ldsAspt						
Concentración de ldsRNA	No. De colonias			Promedio	DS	TUKEY
0 µg	116	157	87	1533.3333	35.6417	a
0.25 µg	112	61	75	82.6667	26.3502	b
0.5 µg	106	88	108	100.6667	11.0151	ab
1 µg	81	57	50	62.6667	16.2583	b
Corrida experimental 2 ldsAspt						
0 µg	132	110	130	124	12.1655	a
0.25 µg	117	147	116	126.6667	17.6162	a
0.5 µg	114	195	162	157	40.7308	a
1 µg	252	156	146	184.6667	58.5263	a
Corrida experimental 2 sdsAspt						
0 µg	9	19	16	14.6667	5.1316	a
0.25 µg	6	10	21	12.3333	7.7674	a
0.5 µg	8	25	33	22	12.7671	a
1 µg	25	21	13	19.6667	6.1101	a
Corrida experimental 3 sdsAspt						
0 µg	79	87	93	86.3333	7.0237	a
0.25 µg	32	54	53	46.3333	12.4230	b
0.5 µg	31	37	48	38.6667	8.6216	b
1 µg	46	42	46	44.6667	2.3094	b

Cuadro b. Análisis de varianza de las corridas experimentales para inhibición de germinación de esporas con lds y sdsAspt.

ANÁLISIS DE VARIANZA ldsAspt 1

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5417	3	1805.6667	3.1172	0.08819	4.0661
Dentro de los grupos	4634	8	579.25			
Total	10051	11				

ANÁLISIS DE VARIANZA ldsAspt 2

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	7369.5833	3	2456.52778	1.7728	0.2299	4.0662
Dentro de los grupos	11085.3333	8	1385.66667			
Total	18454.9167	11				

ANÁLISIS DE VARIANZA sdsAspt 2

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	177.6667	3	59.2222	0.8254	0.5159	4.0662
Dentro de los grupos	574	8	71.75			
Total	751.6667	11				

ANÁLISIS DE VARIANZA sdsAspt 3

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4279.3333	3	1426.4444	20.1380	0.0004	4.0662
Dentro de los grupos	566.6667	8	70.8333			
Total	4846	11				

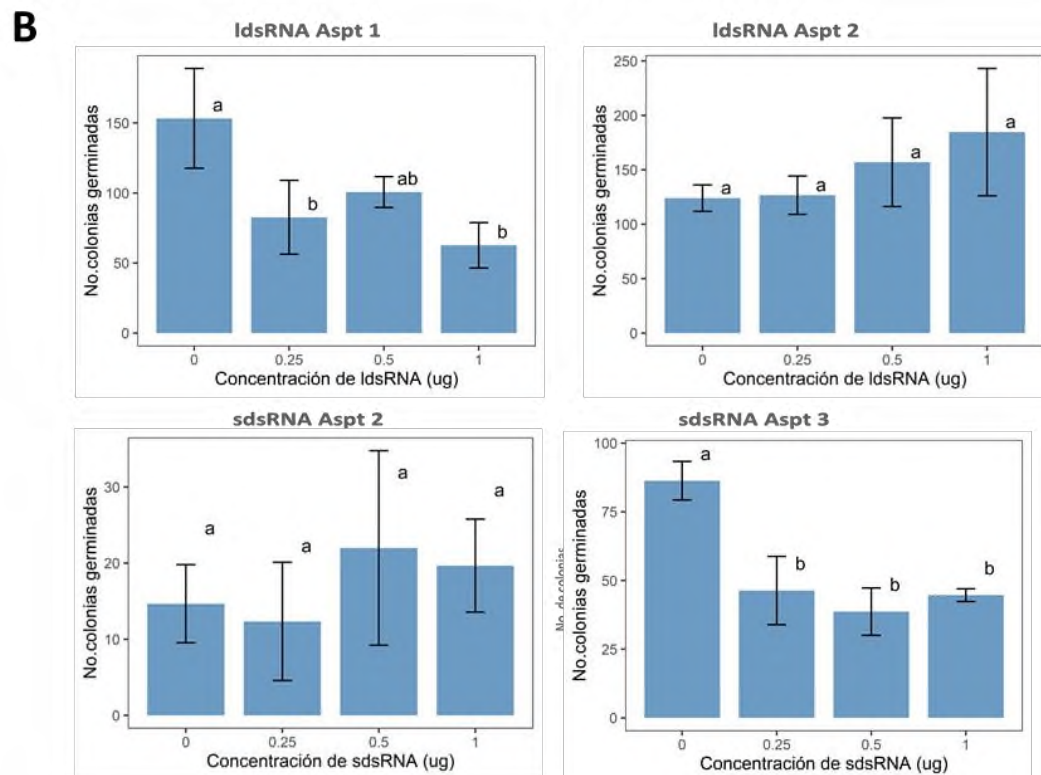
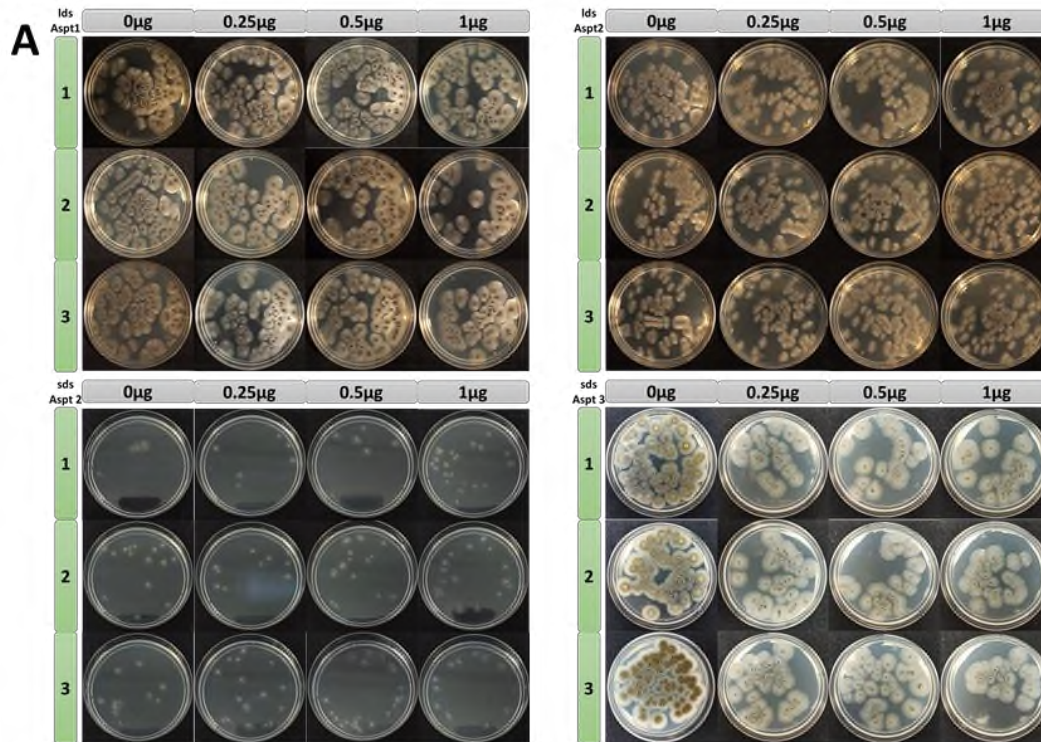


Ilustración r. Repeticiones de bioensayo de inhibición de germinación de esporas. A Placas con crecimiento de esporas de *A. tubingensis*. B Gráfico de columnas del promedio número de colonias obtenidas para cada tratamiento. Las barras de error muestran la desviación estándar (\pm SD).

Cuadro c. Datos de la 2da corrida experimental para efecto de sdsAspt en uvas.

Cantidad de sdsAspt	Diámetro de infección (cm)					Promedio	DS	TUKEY
0µg	0.82	1.06	0.96	1.02	1.16	1.004	0.1260	a
0.5µg	0.90	0.70	0.81	0.90	0.10	0.682	0.3355	a

Cuadro d. Análisis de varianza para 2da corrida experimental de efecto de sdsAspt en uvas.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.2595	1	0.2592	4.034	0.0795	5.3176
Dentro de los grupos	0.5140	8	0.0642	F < F _{crit} No hay diferencias significativas entre las medias		
Total	1.14344	9				

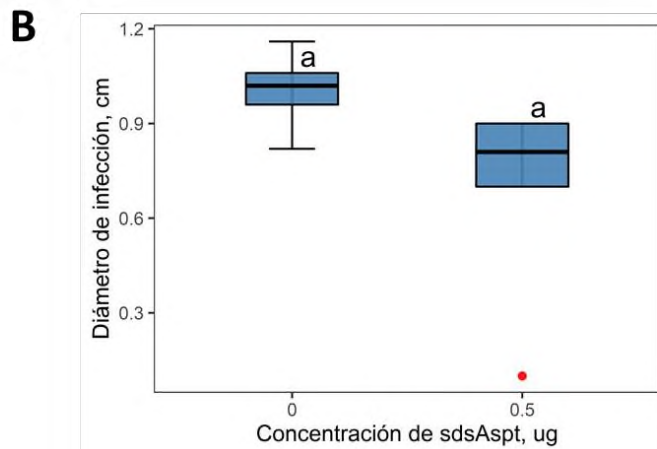


Ilustración s. 2da corrida experimental efecto de sdsAspt. A diámetro de infección en uvas tratadas con sdsAspt y agua, se observan ligeras diferencias en el tamaño de la lesión. B Boxplot con los datos de diámetro de infección, no hay diferencias significativas, pero se observa una tendencia de menor tamaño de lesión en las uvas tratadas con sdsAspt.

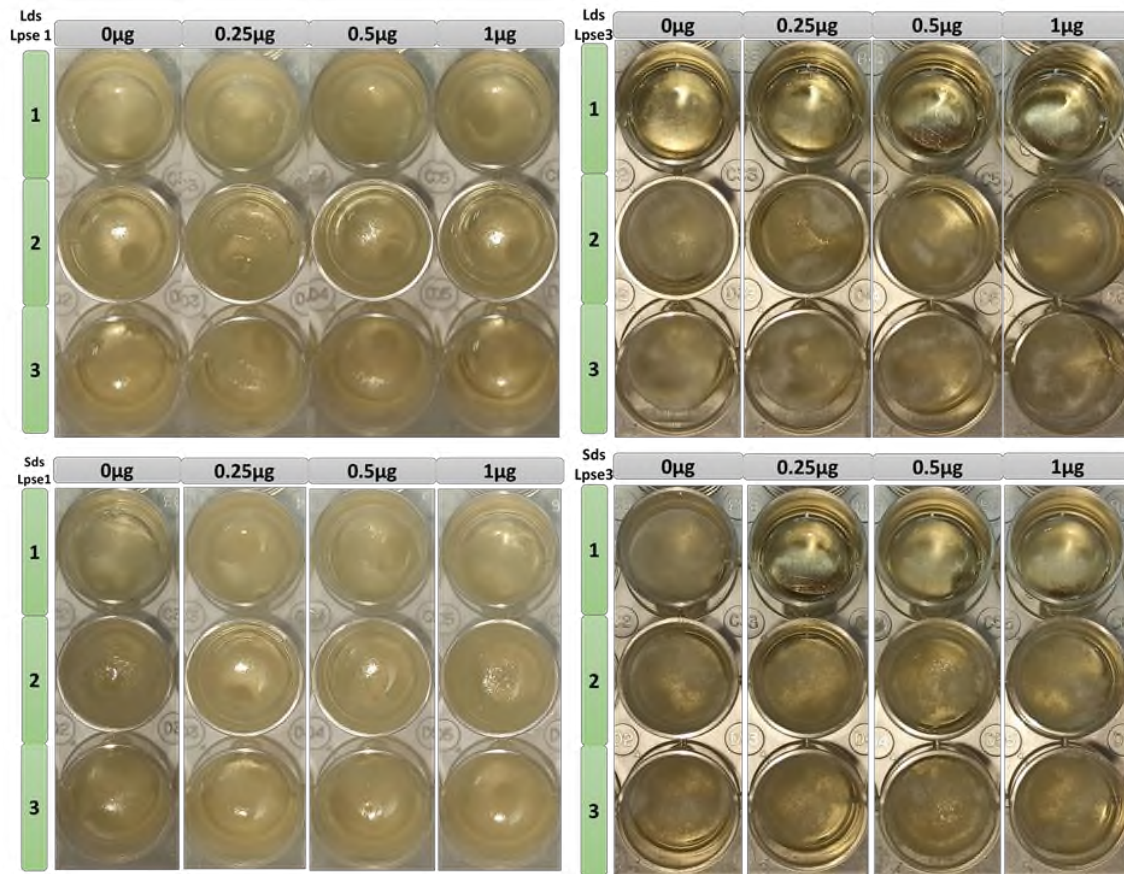


Ilustración t. Repeticiones de bioensayo de crecimiento de micelio de *L. pseudotheibromae* en medio líquido adicionado con dsRNAi (LdsRNA y sdsRNA).

Cuadro e. Datos de la segunda corrida experimental, porcentaje de área infectada en mango por *L. pseudotheobromae*.

Concentración de LdsRNA	%Área infectada					Promedio	DS	Tukey
0 µg	29.38	29.15	12.10	8.60	45.17	24.88	17.1220	a
0.5 µg	64.08	26.30	28.08	23.68	45.31	37.49	14.82	a

Cuadro f. Análisis de varianza correspondiente a la 2da corrida experimental de LdsLpse-mango.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	397.4909	1	397.4909	1.5503	0.2483	5.3176
Dentro de los grupos	2051.0744	8	256.3843	F < F _{crit} No hay diferencias significativas entre las medias		
Total	2448.5654					

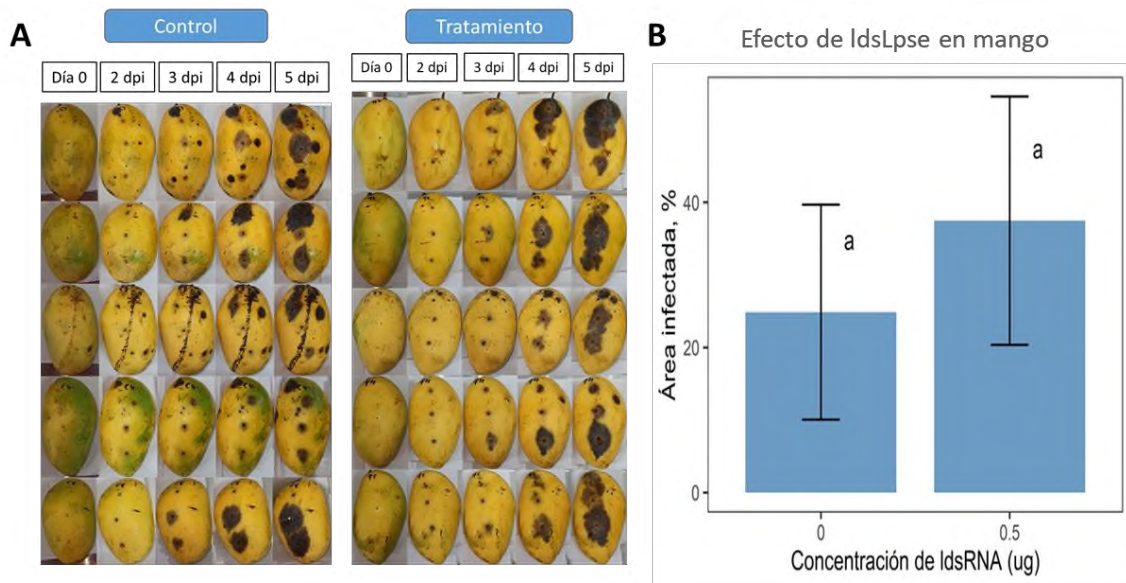


Ilustración u. Repetición de bioensayo in vivo. A área infectada por *L. pseudotheobromae* en mangos tratados con agua y dsRNA-Lpse. A Progresión de la enfermedad en mango tras 5dpi. B Gráfico de barras que muestra el promedio de área infectada en mango. Las barras de error muestran la desviación estándar (\pm SD) de 5 réplicas biológicas.