

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

“Identificación de los genes DCL en el hongo de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) y propuesta de diseño de sRNAs, para su aplicación en un fungicida de RNA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniera en Biotecnología

PRESENTA:

STEPHANIA MARILYN LOPEZ LOPEZ

Directora: Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

Copia de Acta de Revisión de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 31 de julio de 2019 a las 16 hr, 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 "Identificación de los genes DCL en el hongo de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) y propuesta de diseño de eRNAs, para su aplicación en un fungicida de RNA" presentada por la alumna **Stephanía Maritlyn López López**, con número de matrícula 13090167, aspirante al título de Licenciatura.


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

Tuxtepec, Oaxaca, a 31 de julio de 2019

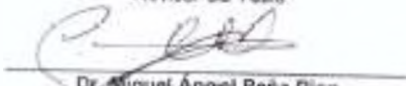
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA

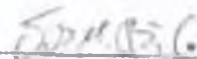

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis


Dr. Oscar Núñez Gaona
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Edgar García López
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Edgar Balbino Sepúlveda García
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Julián Mario Peña Castro
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Copia de Oficio de Autorización de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 01 de agosto de 2019
Oficio No. JCIB/001/08/2019

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

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Stephanie Marilyn López López** titulado "Identificación de los genes DCL en el hongo de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) y propuesta de diseño de sRNAs, para su aplicación en un fungicida de RNA", 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:

Presidente: Dr. Óscar Nuñez Gaona
Vocal: Dr. Edgar García López
Secretario: Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García
Primer Suplente: Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Segundo Suplente: Dr. Julián Mario Peña Castro

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.



UNPA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Atentamente

*Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji ju*



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

c.c.p. Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, Directora de tesis. Para su conocimiento.
c.c.p. Stephanie Marilyn López López, Alumna. Para su conocimiento.
c.c.p. Archivo

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 y Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, bajo la dirección de la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa.

Partes de este trabajo se presentaron en el evento Expociencias Oaxaca 2018, en su etapa regional (Cuenca del Papaloapan) el 11 de Septiembre del 2018, con el título:

Santiago-Tapia LB, Esquivel-Aguilar KF, Solano-García F, Lopez-Lopez SM, “Identificación molecular de hongos fitopatógenos de la Cuenca del Papaloapan para el diseño de biofungicidas con la proteína DICER como blanco”, obteniendo el segundo lugar y la acreditación para participar a nivel estatal que se realizó del 25 al 26 de Octubre en la Capital del Estado Oaxaqueño.

Dedicatoria

A la base que guía mi sendero: Dios y mi familia. A mis amistades en las cuales encuentro regocijo en momentos de angustia y a mis asesores por brindarme conocimientos invaluable tanto en el ámbito académico como en lo personal. Gracias a todos ustedes por haberme acompañado con paciencia en esta travesía.

Índice general

Resumen	XII
Abstract.....	XIII
Abreviaturas	XIV
1. Introducción.....	1
1.1 La planta de café.....	1
1.2 Importancia económica mundial del café	5
1.3 Importancia económica nacional del café	7
1.4 Problemática agroindustrial del café.....	11
1.5 La roya del café.....	12
1.6 Ciclo biológico.....	14
1.7 Resistencia a la infección de <i>Hemileia vastatrix</i>	18
1.8 Estrategias tradicionales para el manejo de la enfermedad.....	19
1.8.1 Control genético	19
1.8.2 Control biológico	20
1.8.3 Control agronómico.....	21
1.8.4 Control químico	21
1.8.5 Manejo integrado.....	22
1.9 Nueva estrategia biotecnológica para la protección vegetal: Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS).....	22
1.9.1 Fundamento de la estrategia de Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS): respuesta natural mediada por RNAs pequeños en la interacción planta: patógeno	23
1.9.2 Genes DCL como blancos de la estrategia de Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS).....	25
1.9.3 Estructura de proteínas Dicer fúngicas.....	26
1.9.4 Criterios de potencial de silenciamiento para el diseño de RNAs pequeños en la estrategia Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión.....	29
2. Justificación.....	30
3. Hipótesis	31
4. Objetivo general	31
4.1 Objetivos específicos.....	31
5. Materiales y métodos.....	32
5.1 Material biológico.....	32
5.2 Microscopía.....	34
5.3 Extracción de DNA genómico por el método fenol-cloroformo	34

5.4 Identificación molecular de <i>Hemileia vastatrix</i>	35
5.4.1 Amplificación del ITS	35
5.5 Análisis de secuencias y filogenia	38
5.6 Identificación de los genes DCL en <i>Hemileia vastatrix</i>	39
5.6.1 Diseño de primers específicos.....	39
5.6.2 Diseño de oligonucleótidos degenerados.....	40
5.6.3 Amplificación de los genes DCL de <i>H. vastatrix</i> con primers específicos y degenerados	40
5.7 Secuenciación por MinION.....	43
5.8 Diseño de sRNAs para su aplicación en la estrategia de Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS).....	45
6. Resultados y discusión	46
6.1 Identificación de <i>Hemileia vastatrix</i> en lesiones de roya de café	46
6.1.1 Análisis de las lesiones de la roya	46
6.1.2 Calidad del DNA genómico	49
6.1.3 Identificación de las muestras de roya por secuenciación de la región ITS con primers universales	49
6.1.4 Identificación de las muestras de roya por secuenciación de la región ITS con primers específicos.....	59
6.1.5 Secuenciación por MinION.....	67
6.2 Secuenciación de DCLs de <i>Hemileia vastatrix</i>	73
6.2.1 Amplificación de DCLs con oligonucleótidos específicos	74
6.2.3 Amplificación de DCLs con oligonucleótidos degenerados.....	77
6.2.4 Secuenciación de los productos F1 y F2.....	85
6.2.5 Análisis de la secuencia del producto F2	87
6.3 Análisis de homología entre DCLs de <i>Coffea arabica</i> y <i>Hemileia vastatrix</i>	90
6.4 Diseño de la estrategia para proponer la región de síntesis de sRNAs para el silenciamiento de DCL1 de <i>Hemileia vastatrix</i>	92
7. Conclusiones	94
8. Perspectivas	95
9. Referencias	96
10 Anexos.....	105
10.1 Anexo A. Preparación de soluciones.....	105
10.2 Anexo B. Ladders	108
10.3 Anexo E. Secuencia reconstruida a partir del contig 148667, de la enzima Dicer-1 de <i>H. vastatrix</i>	109

Índice de figuras

FIGURA 1. ESQUEMAS DE PLANTAS DE CAFÉ.....	4
FIGURA 2. LA CEREZA DEL CAFÉ. A) PARTES DE LA CEREZA DEL CAFÉ.....	5
FIGURA 3. PRINCIPALES PAÍSES EXPORTADORES DE CAFÉ A NIVEL MUNDIAL.....	6
FIGURA 4. COMPARATIVO DE LA EXPORTACIÓN DE CAFÉ DE MÉXICO CON EL PRODUCTOR NÚMERO 1 (BRASIL) Y EL RESTO DEL MUNDO.....	8
FIGURA 5. COMPARATIVOS DE: A) PAÍSES CON LA PRODUCCIÓN Y B) ÁREA DE COSECHA DE CAFÉ MÁS ALTOS EN EL 2000 Y 2013.....	9
FIGURA 6. RENDIMIENTOS DEL CAFÉ A NIVEL MUNDIAL EN EL 2013.....	10
FIGURA 7. EFECTO DE LA ROYA EN EL CAFÉ.....	13
FIGURA 8. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ROYA DEL CAFETO (<i>H. VASTATRIX</i>).....	14
FIGURA 9. CICLO DE LA ENFERMEDAD DE LA ROYA DEL CAFÉ CAUSADA POR <i>H. VASTATRIX</i>	15
FIGURA 10. PROCESO DE TRANSPORTE TRANSMEMBRANAL EN LA INFECCIÓN POR ROYA.....	17
FIGURA 11. UREDINIOSPORAS. MICROSCOPIO DE LUZ 40X.....	18
FIGURA 12. PROCESO DE INTERCAMBIO DE RNA.....	24
FIGURA 13. MECANISMO DE DEGRADACIÓN DE MRNA POR SIRNAS.....	25
FIGURA 14. ESTRUCTURA CONSENSO EN ROYAS DEL GEN DCL POR DOMINIOS.....	27
FIGURA 15. RIBOINTERFERENCIA ENTRE REINOS Y EL EMPLEO DE SIGS EN LA INTERACCIÓN PATÓGENO-HOSPEDERO PARA ATENUAR LA PATOGENICIDAD DEL HONGO.....	28
FIGURA 16. LOCALIZACIÓN EN EL MAPA DE MÉXICO DE LOS SITIOS DE COLECTA DE HOJAS DE CAFÉ CON ROYA.....	33
FIGURA 17. PRIMERS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS.....	35
FIGURA 18. SITIO DE INTERÉS PARA LA ELABORACIÓN DE PRIMERS ESPECÍFICOS.....	39
FIGURA 19. SITIOS DE COLECTA.....	46
FIGURA 20. APARIENCIA VISUAL DE LAS ESPORAS COLECTADAS DEL ENVÉS DE LAS HOJAS DE CAFÉ CON ROYA.....	47
FIGURA 21. EXTRACCIÓN DE DNAG DE MUESTRAS DE ROYA EN GELES DE AGAROSA (1%) A 100 V POR 40 MIN.....	49
FIGURA 22. GEL DE AGAROSA (2%) CON PRODUCTOS DE PCR AMPLIFICADOS MEDIANTE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ITS1 E ITS4R A 30 Y 35 CICLOS.....	50
FIGURA 23. ELECTROFEROGRAMA OBTENIDO CON EL PRODUCTO AMPLIFICADO POR PCR QUE ABARCA LA REGIÓN ITS1-5.8S-ITS2 DEL ADN _R DE <i>H. VASTATRIX</i> , DE LA MUESTRA DE LA UNPA MEDIANTE LA SECUENCIACIÓN CAPILAR CON EL OLIGONUCLEÓTIDO UNIVERSAL DIRECTO ITS1.....	51
FIGURA 24. ELECTROFEROGRAMA OBTENIDO CON EL PRODUCTO AMPLIFICADO POR PCR QUE ABARCA LA REGIÓN ITS1-5.8S-ITS2 DEL ADN _R DE <i>H. VASTATRIX</i> DE LA MUESTRA DE RANCHO GRANDE, MEDIANTE LA SECUENCIACIÓN CAPILAR CON EL OLIGONUCLEÓTIDO UNIVERSAL REVERSO ITS4R.....	52
FIGURA 25. RESULTADOS DEL BLASTN EN LA SECCIÓN DEL NCBI ESPECIALIZADA EN IDENTIFICACIÓN MOLECULAR POR ITS.....	54
FIGURA 26. RELACIÓN FILOGENÉTICA DE LA MUESTRA DE ROYA DE LA UNPA.....	55
FIGURA 27. GEL DE AGAROSA (2%) DEL PRODUCTO DE ITS OBTENIDO EN UN SEGUNDO INTENTO DE AMPLIFICACIÓN.....	56
FIGURA 28. BLASTN DE LA SECUENCIA ITS1 EN LA SECCIÓN DEL NCBI ESPECIALIZADA PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS. EL TAMAÑO DE LA SECUENCIA INGRESADA FUE DE 503 PB.....	57
FIGURA 29. BLASTN DE LA SECUENCIA ITS4R EN LA SECCIÓN DEL NCBI ESPECIALIZADA PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS. EL TAMAÑO DE LA SECUENCIA INGRESADA FUE DE 503 PB.....	58
FIGURA 30. GEL DE AGAROSA (2%) DEL PRODUCTO DE PCR DEL ITS DE <i>H. VASTATRIX</i> OBTENIDO CON PRIMERS ESPECÍFICOS.....	59
FIGURA 31. ELECTROFEROGRAMA OBTENIDO CON EL PRODUCTO AMPLIFICADO POR PCR QUE ABARCA LA REGIÓN ITS1-5.8S-ITS2 DEL ADN _R DE <i>H. VASTATRIX</i> DE LA MUESTRA DE RANCHO GRANDE, MEDIANTE LA SECUENCIACIÓN CAPILAR CON EL OLIGONUCLEÓTIDO ESPECÍFICO DIRECTO HV-ITS-F.....	61
FIGURA 32. ELECTROFEROGRAMA OBTENIDO CON EL PRODUCTO AMPLIFICADO POR PCR QUE ABARCA LA REGIÓN ITS1-5.8S-ITS2 DEL ADN _R DE <i>H. VASTATRIX</i> DE LA MUESTRA DE LA UNPA, MEDIANTE LA SECUENCIACIÓN CAPILAR CON EL OLIGONUCLEÓTIDO ESPECÍFICO REVERSO HV-ITS-R.....	62
FIGURA 33. BLASTN DE LA SECUENCIA HV-ITS-F DE LA COLECTA DE RANCHO GRANDE.....	63
FIGURA 34. BLASTN DE LA SECUENCIA HV-ITS-R DE LA COLECTA DE LA UNPA.....	64
FIGURA 35. RELACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS MUESTRAS DE ROYA DE RANCHO GRANDE Y LA UNPA, A PARTIR DE LOS AMPLICONES OBTENIDOS CON LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS PARA <i>H. VASTATRIX</i>	67

FIGURA 36. GEL DE AGAROSA (2%) DE LA AMPLIFICACIÓN DEL ITS DE LA MUESTRA DE ROYA DEL CAFÉ DE RANCHO GRANDE, PARA LA SECUENCIACIÓN METAGENÓMICA.....	68
FIGURA 37. RESULTADOS DEL ESTUDIO METAGENÓMICO DEL ITS	71
FIGURA 38. ALINEAMIENTOS DE LAS ESPECIES CON MAYOR REPRESENTACIÓN DEL ESTUDIO METAGENÓMICO EN BLASTN.....	73
FIGURA 39. LOCALIZACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS Y PRODUCTOS ESPERADOS DE LA AMPLIFICACIÓN DE DCL.	74
FIGURA 40. GEL DE AGAROSA (1%) DE LOS AMPLICONES F1 Y F2.....	75
FIGURA 41. GEL DE AGAROSA (1%) DE LOS PRODUCTOS F1 Y F2 AMPLIFICADOS CON OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS, EMPLEANDO DNAG DE <i>H. VASTATRIX</i> DE RANCHO GRANDE, VALLE NACIONAL.	76
FIGURA 42. GEL DE AGAROSA (1%) DE LOS PRODUCTOS F1 Y F2 AMPLIFICADOS CON OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS (HVA-DCL-F1, HVA-DCL-F2 Y HVA-DCL-R1), A PARTIR DE DNAG DE <i>H. VASTATRIX</i> DE RANCHO GRANDE, VALLE NACIONAL.	77
FIGURA 43. MOTIVO DEL DOMINIO HELICASA ELEGIDO PARA EL DISEÑO DEL OLIGONUCLEÓTIDO DEGENERADO DIRECTO (DF1) EN T-COFFEE.	78
FIGURA 44. MOTIVO DEL DOMINIO DE DIMERIZACIÓN ELEGIDO PARA EL DISEÑO DE UN OLIGONUCLEÓTIDO DEGENERADO DIRECTO (DF2) EN T-COFFEE.	79
FIGURA 45. MOTIVO DEL DOMINIO RNASA IIIa SELECCIONADO PARA EL DISEÑO DE UN OLIGONUCLEÓTIDO DEGENERADO REVERSO (DR1) EN T-COFFEE.....	80
FIGURA 46. MOTIVO DEL DOMINIO DE RNASA IIIb SELECCIONADO PARA EL DISEÑO DE UN PRIMER DEGENERADO REVERSO (DR2) EN T-COFFEE.	81
FIGURA 47. LOCALIZACIÓN EN LA PROTEÍNA DICER DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS ASÍ COMO DE LOS AMPLICONES.....	82
FIGURA 48. GEL DE AGAROSA (1%) DEL GRADIENTE DE LA PCR CON OLIGOS DEGENERADOS CON DNAG DE RANCHO GRANDE..	83
FIGURA 49. GEL DE AGAROSA (1%) DE LOS PRODUCTOS DE PCR D2, D3 Y D4 CON OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS A 53°C.	85
FIGURA 50. ELECTROFEROGRAMA OBTENIDO CON EL OLIGONUCLEÓTIDO DIRECTO DE LA SECUENCIACIÓN CAPILAR DEL PRODUCTO DE PCR D2_F, DEL GEN DCL DE <i>H. VASTATRIX</i> DE LA MUESTRA DE RANCHO GRANDE.	86
FIGURA 51. ANÁLISIS TBLASTX EN EL NCBI DE LA SECUENCIA DIRECTA F2.	88
FIGURA 52. ANÁLISIS TBLASTX EN LA FUENTE WGS, DE LA SECUENCIA F2. EL PUNTAJE MÁS ALTO CORRESPONDE AL CONTIG 148667.....	89
FIGURA 53. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE PROTEICO EN T-COFFEE DE LA REGIÓN SECUENCIADA DE DCL.	91
FIGURA 54. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE NUCLEOTÍDICO EN T-COFFEE DE LA REGIÓN DE MENOR HOMOLOGÍA ENTRE <i>H. VASTATRIX</i> Y <i>COFFEA ARABICA</i>	92

Índice de tablas

TABLA 1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DEL CAFÉ.....	1
TABLA 2. EJEMPLOS DE VARIETADES DE <i>C. ARABICA</i> ECONÓMICAMENTE RELEVANTES Y SUS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS.	2
TABLA 3. INFORMACIÓN GEORREFERENCIADA DE LAS ZONAS DE MUESTREO DE LA ROYA DEL CAFÉ EN MÉXICO	32
TABLA 4. SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO	35
TABLA 5. COMPONENTES DE LA MEZCLA DE REACCIÓN PARA LA PCR CON OLIGONUCLEÓTIDOS UNIVERSALES.....	36
TABLA 6. COMPONENTES DE LA MEZCLA DE REACCIÓN PARA LA PCR CON OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS	36
TABLA 7. CONDICIONES DE CICLADO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ITS CON OLIGONUCLEÓTIDOS UNIVERSALES.	37
TABLA 8. CONDICIONES DE CICLADO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ITS CON OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS.....	37
TABLA 9. COMPONENTES DE LA MEZCLA PARA LA PCR DEL GEN DCL CON OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS.....	41
TABLA 10. COMPONENTES DE LA MEZCLA PARA LA PCR DE LOS GENES DCL CON OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS.....	41
TABLA 11. CONDICIONES DE CICLADO PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN DCL CON OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS.....	42
TABLA 12. CONDICIONES DE CICLADO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DCL CON OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS.....	42
TABLA 13. PREPARACIÓN DE REACCIONES DE PCR CON DREAMTAQ PCR.	44
TABLA 14. CONDICIONES DE CICLADO PARA LA REACCIÓN CON DREAMTAQ PCR.	44
TABLA 15. MICROGRAFÍAS DE LAS ESPORAS DE <i>H. VASTATRIX</i>	48
TABLA 16. ESPECIES IDENTIFICADAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN METAGENÓMICA MINION	69
TABLA 17. SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS EMPLEADOS.	74
TABLA 18. OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS DISEÑADOS PARA AMPLIFICAR DCL EN <i>H. VASTATRIX</i>	82
TABLA 19. COBERTURA Y PRODUCTOS ESPERADOS DE LA PCR CON OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS.	82
TABLA 20. OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN NO CONSERVADA	93
TABLA 21. OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS PROPUESTOS PARA INCORPORAR EL PROMOTOR T7 AL PRODUCTO AMPLIFICADO.	93

Resumen

A nivel mundial, México ocupa el cuarto lugar en superficie cosechada de café y el décimo en producción, con uno de los rendimientos más bajos. Esto obedece a una plétora de variables, destacando el efecto devastador de la roya del cafeto causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, lo cual resulta en el abandono de la cafecultura. La Cuenca del Papaloapan es una región con esta problemática y se buscan estrategias de impacto positivo. De acuerdo a trabajos previos, una estrategia para la protección vegetal contra hongos fitopatógenos es el Silenciamiento Génico por Aspersión (SIGS), que se basa en la aspersión de moléculas pequeñas de RNA (sRNAs) dirigidas específicamente contra genes que codifican proteínas vitales para el hongo. Se ha demostrado que una proteína involucrada en la biosíntesis de sRNAs, esencial para el hongo y su patogenicidad, es Dicer, por lo que se ha convertido en blanco de la tecnología SIGS, con efectividad demostrada en diversos patosistemas. Sin embargo, no existen aún reportes de su empleo en el patosistema *Coffea-H. vastatrix*. Mediante la secuenciación de la región ITS con primers universales, por el método de Sanger y el análisis metagenómico fue posible determinar en las lesiones de roya del café de la región, la presencia de diversos hongos endófitos, patógenos o ambientales. No obstante, mediante la secuenciación Sanger con primers específicos para *H. vastatrix* se encontró evidencia de su presencia en las muestras de roya del café. Adicionalmente, se procedió a realizar un análisis de secuencias de DCLs en hongos ortólogos, para ello se realizó la identificación bioinformática del gen DCL1 a partir de contigs de *H. vastatrix* y se diseñaron oligonucleótidos para abarcar los dominios de helicasa, de unión de RNA de doble cadena y de RNasa III presentes en DCL. La secuencia del producto de PCR confirmó la presencia de un gen DCL específico de *H. vastatrix* en las muestras. Esta secuencia fue útil para el diseño de RNAs pequeños que serán probados en un trabajo posterior para evaluar su efectividad como biofungicida en una estrategia SIGS.

Abstract

Worldwide, Mexico ranks fourth in harvested coffee and tenth in production, with one of the lowest yields. This is caused by a plethora of variables, among them, the devastating effect of plant diseases, such as coffee rust caused by the fungus *Hemileia vastatrix*, which results in the abandonment of coffee growing. The Papaloapan Basin is a region with this problem and strategies of positive impact are sought. According to previous works, a strategy for plant protection against phytopathogenic fungi is the Spray-Induced Gene Silencing (SIGS), which is based on the spraying of small molecules of RNA (sRNAs) directed against genes that encode proteins vital for the fungus. It has been shown that a protein involved in the biosynthesis of sRNAs, vital for the fungus and its pathogenicity, is Dicer (DCL), which has become a target of the SIGS technology, with proven effectiveness in various pathosystems. However, there are still no reports of its use in the *Coffea-H. vastatrix* pathosystem. The use of universal ITS primers for Sanger and metagenomic analysis of rust spots revealed the presence of diverse endophytic, environmental and pathogenic fungi. Moreover, ITS sequencing with *H. vastatrix* specific primers revealed the presence of this pathogen in rust spots. Additionally, it was performed a homology analysis with sequences of DCLs in orthologous fungi. For this, the identification of the DCL1 gene was performed from contigs of *H. vastatrix* and primers were designed for PCR amplification of helicase, double-strand RNA binding and RNase III domains present in DCL. The sequence of the PCR product confirmed the presence of a *H. vastatrix*-specific DCL gene in the samples. This sequence was useful for the design of sRNAs that will be assayed in further work in order to evaluate its effectiveness as a biofungicide in a SIGS strategy.

Abreviaturas

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNAg	Ácido desoxirribonucleico genómico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
Car	<i>Coffea arabica</i>
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa
°C	Grados centígrados
g	Gramos
Hva	<i>Hemileia vastatrix</i>
h	Horas
L	Litros
µg	Microgramos
µL	Microlitros
miRNA	MicroRNA
mg	Miligramos
mM	Milimolar
Min	Minutos
M	Molaridad
nM	Nanomolar
Bp	Pares de bases

sRNA	RNA pequeño
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SIGS	Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión
T	Temperatura
V	Volt

1. Introducción

1.1 La planta de café

La planta de café, también llamada cafeto, es una planta perenne dicotiledónea de regiones tropicales o subtropicales (Murthy y Naidu, 2012). Sus orígenes se remontan al Cuerno de África, en Etiopía, probablemente en el territorio denominado Kaffa, de cuyo nombre se deriva el café (Charrier y Berthaud, 1985; International Coffee Organization [ICO], 2018).

El cafeto es parte del subreino de las Angiospermas, reproduciéndose por semillas encerradas en el ovario, localizado en la base de la flor. Pertenece a la familia Rubiaceae, que tiene unos 500 géneros y alrededor de 6000 especies (Farah y Dos Santos, 2014). El café pertenece al género *Coffea*, siendo el miembro económicamente más importante.

En la Tabla 1 se presenta la clasificación botánica del café. Se han descrito alrededor de 90 especies del género *Coffea*, de las cuales 25 son las más estudiadas (Davis, Govaerts, Bridson y Stoffelen, 2006; National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2018).

Tabla 1. Clasificación botánica del café. (Linneo, 1753).

Taxón	Café
Reino	Plantae
Subreino	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Subclase	Sympetalae o Metachlamydae
Orden	Rubiales
Familia	Rubiaceae
Género	<i>Coffea</i>

Las especies de mayor importancia económica a nivel mundial son dos: *Coffea arabica*, que representa aproximadamente el 60% de la producción, y *Coffea canephora*, con el 40% (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2015; ICO, 2018; Prado y Cárdenas, 2018). *C. arabica* es un alotetraploide natural, híbrido entre las dos especies diploides *C. canephora* y *C. eugenioides* o ecotipos relacionados a estas especies diploides (Lashermes *et al.*, 1999). En la Tabla 2 se muestran ejemplos de variedades económicamente importantes de *C. arabica* y sus principales características.

Tabla 2. Ejemplos de variedades de *C. arabica* económicamente relevantes y sus principales características. (Farah y Dos Santos, 2014; FAO, 2005).

Variedad	Origen	Principales características		
		Crecimiento	Resistencia a la roya	Calidad de taza
Typica	Probablemente Yemen	Vv	No	Excelente
Java	Indonesia	V	No	Excelente
Caturra	Brasil	S	No	Razonable
Catuai	Brasil	S	No	Bueno
Catimor	Colombia	Sc	Si	Razonable/pobre
Mundo novo	Brasil	C	No	Excelente

S: Semienano y follaje denso; Sc: Semienano compacto; C: Cultivares semienanos; V: Vertical y Vv: Vertical vigoroso.

C. arabica presenta una tendencia genética estable por ser autopolinizable. Las variedades más conocidas son Typica y Borbón, a partir de las cuales se desarrollaron cepas y cultivares distintos, como son Caturra, Mundo Novo y Tico (ICO, 2018). *C. arabica* es muy apreciada por sus propiedades sensoriales, tamaño y forma de sus granos. *Coffea canephora* es un árbol diploide compuesto de poblaciones polimórficas (Coffee Genome Hub [CGH], 2018).

Los árboles de *C. arabica* alcanzan hasta 6 metros de altura. Su crecimiento es óptimo a altas elevaciones y temperaturas medias. En tanto, los árboles de *C. canephora* pueden cubrir una altura de hasta 10 m, crecen a bajas elevaciones y climas más cálidos, y sus árboles tienen

mayor resistencia a las enfermedades, son más vigorosos y de mayor producción. Las propiedades organolépticas y calidad en taza de *C. canephora* son menores respecto a *C. arabica* (Prado y Cárdenas, 2018). La producción de *C. canephora* cuenta con una representación en el mercado internacional menor al 40%, siendo el cultivo de esta variedad predominante en Vietnam, China e Indonesia (FAO, 2015).

La tercera especie más importante es *Coffea liberica*, que es diploide y su participación en el mercado es menor al 1% (FAO, 2005; ICO, 2018). Crece arriba de los 18 m, de climas cálidos, de bajas elevaciones, tiene pobre calidad en taza y es susceptible a enfermedades. Sirve de fuente genética de otras especies como la S795, la cual es común en Indonesia (Farah y Dos Santos, 2015).

Aunque la forma del cafeto cambia respecto a la especie y variedad, en general, el árbol de café consiste en un tallo principal vertical (tronco) con ramas laterales primarias, secundarias y terciarias (Davis *et al.*, 2006). Estas ramas se llaman retoños en la etapa de desarrollo y tallos en la etapa final. Las hojas son decusados opuestos en los retoños. Cada par de hojas está en posición cruzada con el siguiente par de hojas. Las hojas son brillantes, onduladas y de color verde oscuro con venas conspicuas (Department: Agriculture, Forestry and Fisheries [DAFF], 2012).

En cuanto al sistema radicular, posee raíces poco profundas, que comprenden una raíz principal (40-60 cm) y raíces de alimentación laterales y pequeñas (30 cm). (FAO, 2005; Murthy y Naidu, 2012). En la Fig. 1 se muestran imágenes de la planta de café.



a



b

Figura 1. Esquemas de plantas de café. a) Esquema de una planta de café (Farah y Dos Santos, 2014).
b) Planta de café joven [Fotografía de Blanca Estela Barrera Figueroa]. (Rancho Grande, Valle Nacional, Oaxaca. 2018).

El árbol suele vivir de 10 a 15 años de forma silvestre, aunque la producción frutal decrece con el paso del tiempo, por lo que los cultivos deben renovarse regularmente. El café es una planta de día corto pues su iniciación floral se lleva a cabo en condiciones de 8-11 h de luz diurna. En los nodos, a partir de la madera de las ramas laterales ligeramente endurecida de 1 año de edad, se forman las flores. La polinización se efectúa 6 h después de la floración (apertura de la flor dada su fase reproductiva). El proceso de fertilización finaliza en un periodo de 24-48 h posterior a la polinización (Murthy y Naidu, 2012). Seguido de la polinización, el fruto se desarrolla en una cereza de 10 a 15 mm de largo que contiene dos semillas (granos de café) (Fig. 2).

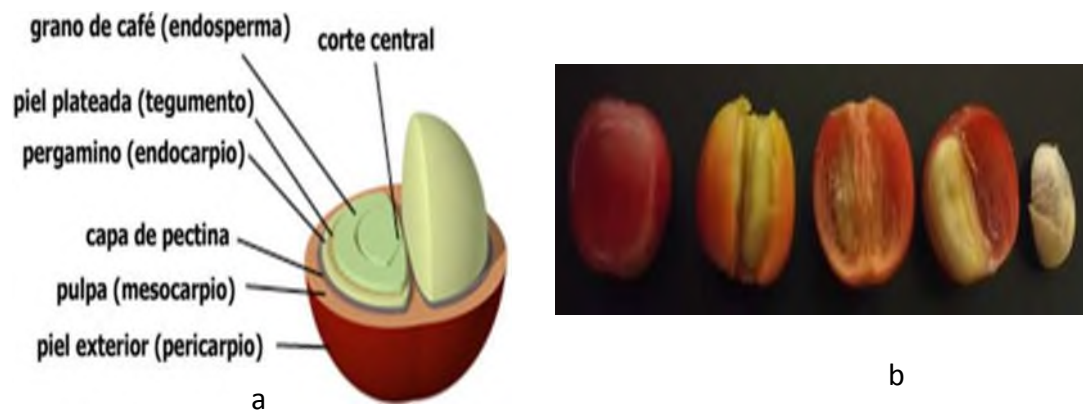


Figura 2. La cereza del café. a) Partes de la cereza del café (Farah y Dos Santos, 2014). b) Capas reales de la cereza de café [Fotografía de Stephania Marilyn Lopez Lopez]. (UNPA, Tuxtepec, Oaxaca. 2018).

1.2 Importancia económica mundial del café

Actualmente, el café es el segundo bien genérico más comercializado en el mundo, sólo superado por el petróleo (Arneson, 2000; Talhinhos *et al.*, 2017). Aunque existe un amplio espectro de productos obtenidos del café, como fertilizantes, aromatizantes y saborizantes, el de mayor valor comercial son los granos secos del fruto para prepararlos en extracto, que es de consumo cosmopolita y está arraigado fuertemente a la cultura y tradición de diversos países, gracias a sus propiedades organolépticas y energizantes.

El café es de gran valor en las exportaciones de los países productores (Fig. 3), sobretodo en las naciones menos desarrolladas, siendo una parte clave en sus ingresos en divisas. Por ejemplo, para Burundi, Etiopía y Uganda, representa el 27, 24 y 14% de los ingresos, respectivamente (FAO, 2015; The Observatory of Economic Complexity [OEC], 2016; ICO, 2018). Por lo anterior, las fluctuaciones en el rendimiento y/o costos de producción del café los afectan de sobremanera (Talhinhas *et al.*, 2017).



Figura 3. Principales países exportadores de café a nivel mundial, acorde al continente y % de representación, de un total de 33.6 billones (mil millones) de dólares en exportaciones (OEC, 2016).

La cadena productiva del café otorga empleo a millones de personas alrededor del mundo. Sin embargo, en muchos de los principales países productores de café, más del 10% de su población vive por debajo de los \$1.25 dólares diarios (FAO, 2015). En el plano mundial, las exportaciones de café en el periodo octubre-febrero del año cafetalero 2017/2018 se cifraron en 50.98 millones de sacos respecto a los 49.41 del año pasado, lo que representa un aumento del 3.2% (ICO, 2018).

Más de 70 países producen café y más del 30% de la producción proviene de solo tres países: Brasil, Vietnam y Colombia (OEC, 2016). Cabe resaltar que Estados Unidos, a pesar de su escasa

producción de café verde proveniente de los estados de Hawai y California, ostenta el precio más alto en dólares por tonelada a nivel mundial, reflejándose en sus exportaciones, de las que obtiene un rendimiento 3 veces superior (10,748hg/ha) respecto a México (3,308 hg/ha) (FAO, 2015).

1.3 Importancia económica nacional del café

En el año 2017, México se posicionó como el décimo país productor de café, con una producción de 4 millones de sacos, después de Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia, Honduras, Etiopía, India, Uganda y Perú (ICO, 2018). En la Fig. 4, se presenta un comparativo de los valores de exportación de café de México con respecto a Brasil, el principal país exportador, y el resto del mundo. Se puede observar que entre 2000 y 2004 hay una disminución del ingreso por exportaciones que se relaciona con la caída del precio internacional. Adicionalmente, en la Fig. 5, se aprecia que la distancia que hay entre el ingreso obtenido por Brasil y el de México es muy grande. La ganancia en exportación es 7 veces menor a la de Brasil. México siembra un 33.6% del área de Brasil y tiene un rendimiento 4 veces menor, indicando el gran reto que tiene México para mejorar sus rendimientos y posicionarse como uno de los principales productores.

EXPORTACIONES DE CAFÉ, 1995-2016

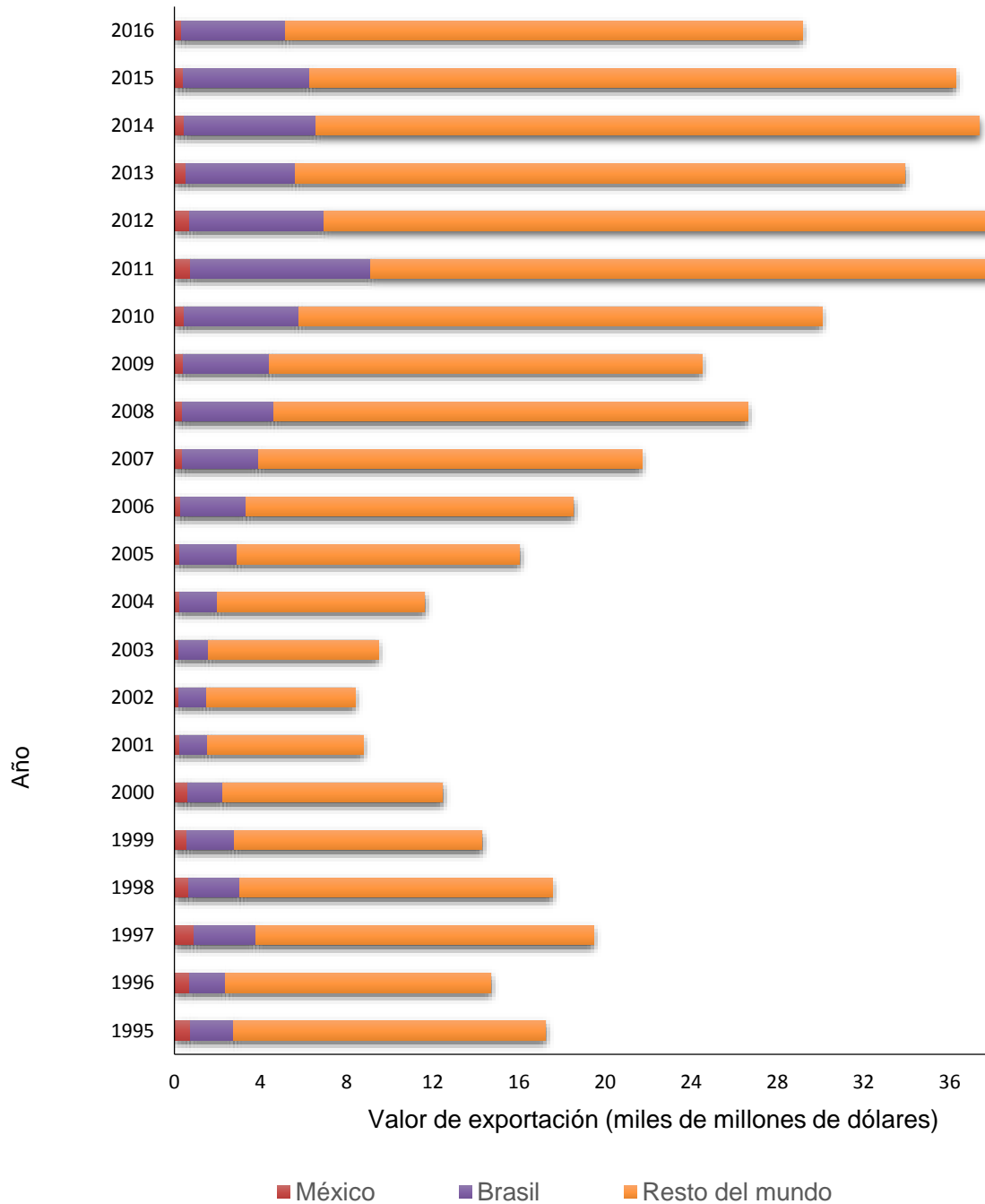


Figura 4. Comparativo de la exportación de café de México con el productor número 1 (Brasil) y el resto del mundo (Elaboración propia con datos del OEC, 2016).

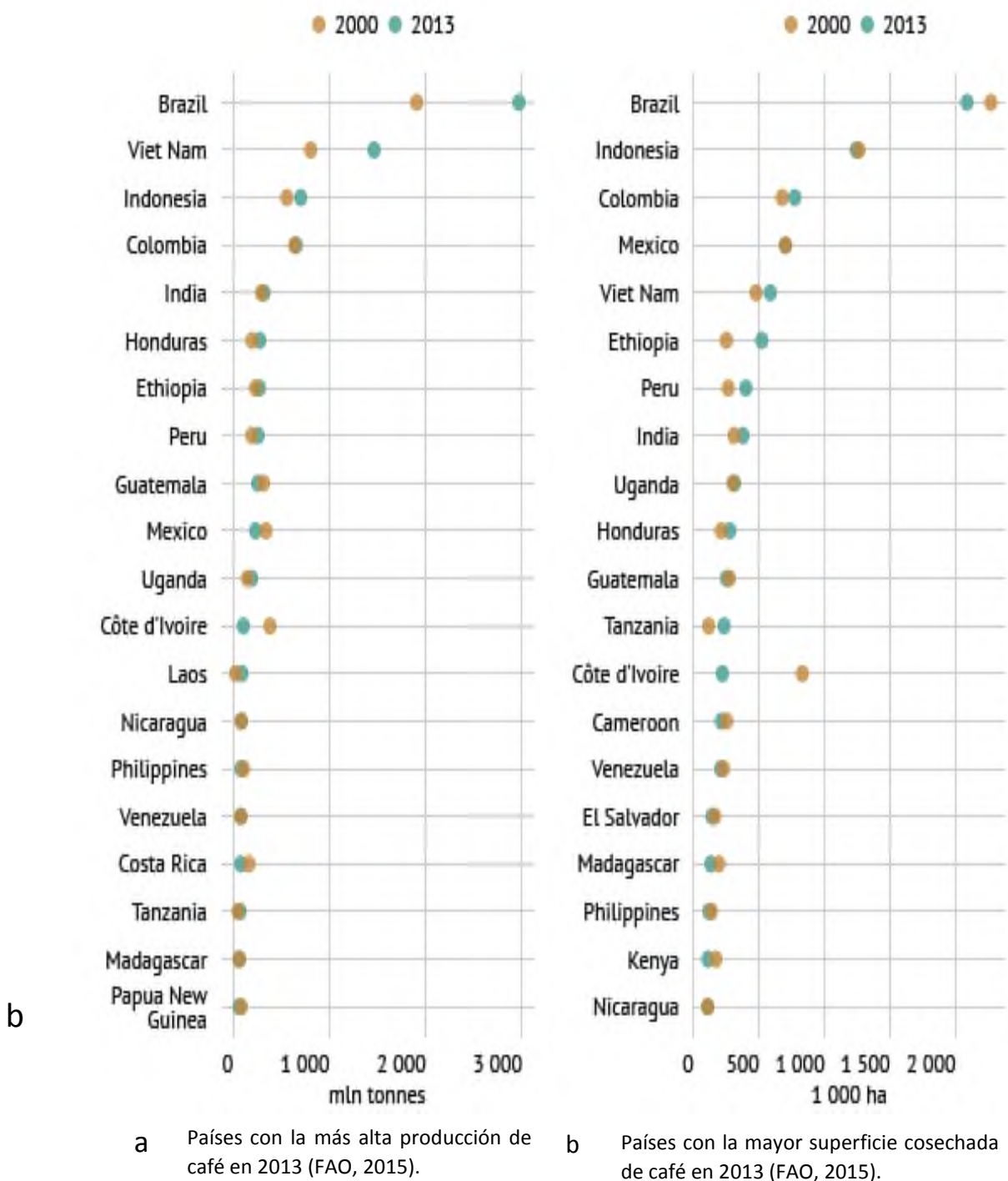


Figura 5. Comparativos de: a) Países con la producción y b) área de cosecha de café más altos en el 2000 y 2013 (FAO, 2015).

Además de que la exportación y el rendimiento de café nacional no son competitivos con respecto a otros países productores (Fig. 6), México importa café. En el 2016 el valor de las exportaciones fue de \$369 mil millones de pesos y se destinaron \$263 mil millones en importaciones de este aromático (OEC, 2016), obteniendo un balance positivo, aunque dada la extensión del país con cultivo de café, la importación debería ser mínima.

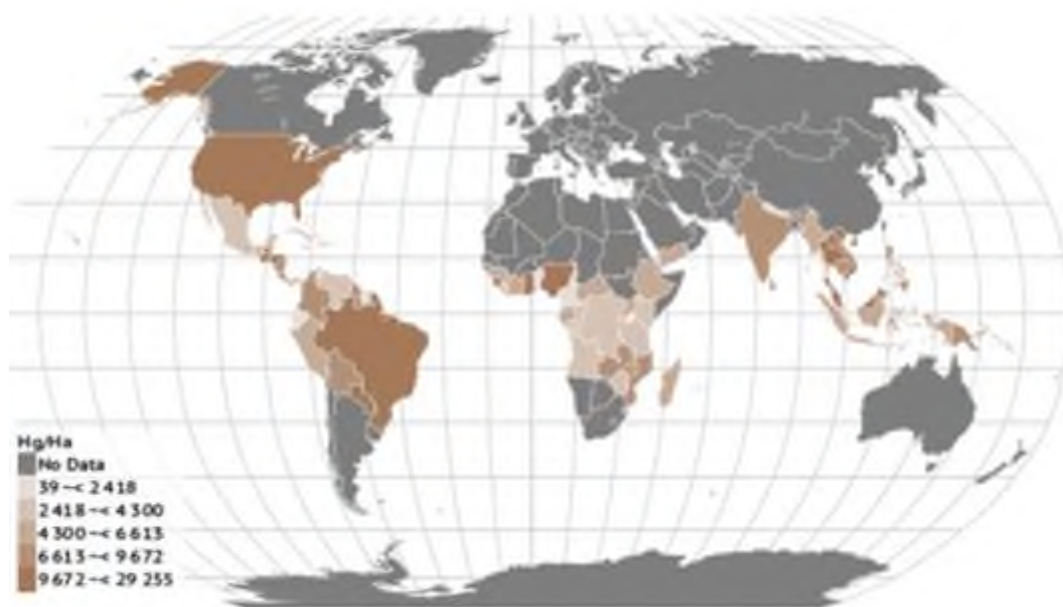


Figura 6. Rendimientos del café a nivel mundial en el 2013. En el mapa se indica el país y no la zona de cultivo (FAO, 2015).

La siembra de este cultivo en el país se distribuye en 13 estados productores que representan el 99% de la producción nacional total: Chiapas, Colima, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Estado de México, Tabasco y Veracruz. Cabe señalar que aproximadamente el 93% de la superficie se concentra en Chiapas, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Puebla (Flores, 2015), y que 0.5% del territorio se destina al cultivo de café orgánico (FAO, 2015). La cafeticultura en México abarca una superficie cosechada de 700,117.28 ha, posicionándola en el cuarto lugar a nivel mundial, pero con un rendimiento de apenas 3,308 hg/ha, siendo de los más bajos del mundo (Fig. 6), y una producción de 232 millones de toneladas. Este desbalance de superficie cosechada/producción obedece a los efectos adversos

del cambio climático, fitoenfermedades, malas prácticas de manejo del cultivo y regulación de los precios (Berlangua, 2018).

1.4 Problemática agroindustrial del café

A pesar del gran valor económico del cultivo de café, se encuentra expuesto a problemáticas de diversa índole que afectan a la cadena productiva en diferentes puntos. Por ejemplo, las fluctuaciones de los precios a nivel internacional que promueven el abandono y descuido de los cafetales. También se cuenta al cambio climático que se relaciona con brotes atípicos de enfermedades. Estas últimas, ocasionan la sustitución de las variedades arábicas de mayor calidad y valor en mercados especializados, por otras, como *C. canephora*, que aunque son más resistentes a la roya y proveen una mayor producción, implican replantear las prácticas agronómicas con resultados negativos en la bioculturalidad de las comunidades y la rentabilidad económica (Prado y Cárdenas, 2018). Finalmente, esta sustitución también contribuye a la pérdida de la biodiversidad ya que las variedades *arabica* son co-cultivadas con otros árboles.

A nivel de la producción, uno de los problemas más importantes es el ataque de enfermedades. De forma sobresaliente, la enfermedad foliar conocida como roya del café provoca pérdidas mundiales de 1 a 2 billones de dólares anualmente (Talhinhas *et al.*, 2017). En México, la producción del ciclo 2015-2016 fue mermada por efecto de la roya, con tan sólo 2.4 millones de sacos de los 3 esperados en comparación al ciclo 2014-2015 (Berlangua, 2018).

La cafecultura mexicana en los próximos años tiene dos posibles rutas para hacer frente a su rezago tecnológico con respecto al control de enfermedades que lo tiene entre los países con menor rendimiento por hectárea (Berlangua, 2018). La primera alternativa plantea el control químico y el genético (Prado y Cárdenas, 2018), ofrecidos de manera vertical como paquetes tecnológicos de parte de las políticas públicas de las instancias de gobierno en asociación con las empresas transnacionales como Nestlé, interesadas en las plusvalías y no necesariamente en un comercio justo o el desarrollo social de las zonas productoras. Una segunda alternativa, haría uso del manejo agronómico integral con alternativas cada vez más amigables al ambiente,

efectivas y costeables, empleando variedades de alto valor en calidad de taza que permitan vender el café a un precio justo mediante el posicionamiento en mercados internacionales, acompañar al agricultor con instrucción en avances científicos y tecnológicos, y fomentar asociaciones de productores que tengan como objetivo el progreso común (Prado y Cárdenas, 2018).

1.5 La roya del café

La roya es una enfermedad causada por hongos del género *Hemileia* pertenecientes al Phylum Basidiomycota, Subphylum Pucciniomycota, Clase Pucciniomycetes, Orden Pucciniales y Familia Mikronegeriaceae (Aime, 2006; Grasso, Sierotzki, Garibaldi y Gisi, 2006; Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA], 2016). Las características macroscópicas que indican el establecimiento de la roya en los cafetales son la presencia de un polvo amarillo-naranja en el envés de las hojas, a lo que prosigue la defoliación y el debilitamiento general del árbol. El nivel de daño es inversamente proporcional a la producción, calidad y amarre del fruto (SENASICA, 2016).

Las especies reportadas que producen la roya en el café son dos: *Hemileia vastatrix* y *Hemileia coffeicola*. *H. vastatrix* la más destructiva y de mayor importancia económica a nivel mundial (DAFF, 2012). *H. vastatrix* provoca la caída prematura de las hojas (Fig. 7), propiciando la reducción de la capacidad fotosintética, el amarre de fruto del siguiente ciclo de cultivo, así como el debilitamiento de árboles enfermos. En infecciones severas puede ocasionar muerte regresiva en ramas e incluso la muerte de árboles completos (SENASICA, 2016).

H. coffeicola afecta cafetales en regiones más frías y altas; actualmente su distribución está delimitada en el centro y occidente de África (Arneson, 2000). Sus urediniósporas poseen verrugas más grandes y menos numerosas que las de *H. vastatrix*. Sus soros están dispersos en la superficie de la hoja, mientras que en *H. vastatrix* están asociados a manchas foliares que se unen y se vuelven necróticas (Hernández, 2005).



Figura 7. Efecto de la roya en el café. a) Cafeto sano. b) Cafeto defoliado por la roya [Fotografías de Blanca Estela Barrera Figueroa]. (Rancho Grande, Valle Nacional, Oaxaca. 2018).

H. vastatrix ataca a diferentes especies del género *Coffea* spp. como *Coffea arabica*, *Coffea canephora* y *Coffea liberica* (Arneson, 2000). Se encuentra distribuida en la mayoría de países productores de café en el mundo, como se muestra en la Fig. 8 (European and Mediterranean Plant Protection Organization [EPPO], 2014). En México se ha reportado en los estados con cultivo de café (SENASICA, 2016).

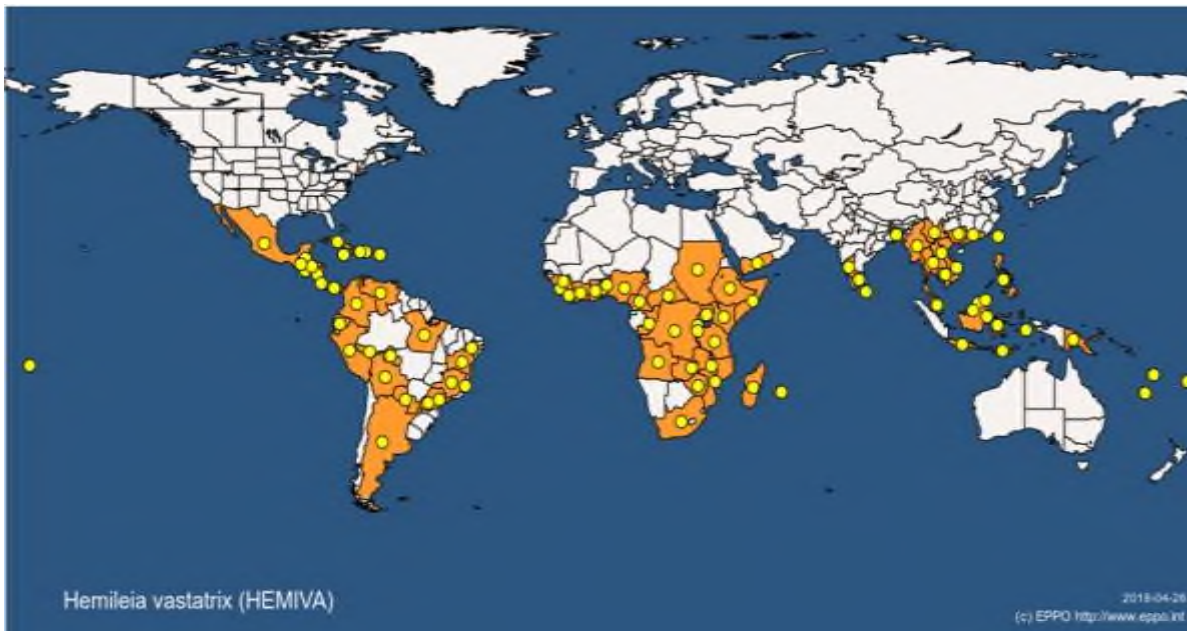


Figura 8. Distribución geográfica de la roya del cafeto (*H. vastatrix*). Actualmente, sólo está ausente del estado de Sumatra en Indonesia (Asia), considerando únicamente a las regiones cafeticultoras a nivel mundial. (EPPO, 2014).

1.6 Ciclo biológico

H. vastatrix es un parásito obligado (McTaggart *et al.*, 2016) que se alimenta de células vivas de su hospedero (biótrofo) y existe principalmente en estado dicariótico (Arneson, 2000), por lo tanto, su ciclo biológico está directamente relacionado con el ciclo de la enfermedad. Se han descrito más de 50 razas de *H. vastatrix* alrededor del orbe que atacan al café, siendo la raza II la más frecuente y el posible inóculo inicial a partir del cual se desarrollaron naturalmente todas las nuevas razas del hongo (Cristancho, Escobar y Ocampo 2007; Zambolin, 2016). Respecto a las condiciones idóneas para la germinación de esporas se requiere de la presencia de al menos 6 horas de agua disponible, temperaturas de 21-25°C y condiciones de baja intensidad luminosa (SENASICA, 2016).

La infección se manifiesta en el envés de las hojas con la presencia de manchas traslúcidas y de color amarillo claro, de 1-3 mm, que incrementan su tamaño con el tiempo y se unen, formando

las características manchas amarillas o naranjas con presencia de polvo fino amarillo donde se originan las esporas del hongo (Fig. 9, d) (Rivillas *et al.*, 2011). Al inicio de la temporada, las lesiones se propagan de abajo hacia arriba en el árbol. Las lesiones se focalizan donde las gotas de rocío y la lluvia se acumulan, aunque se pueden desarrollar en toda la hoja (Arneson, 2000). Una vez instalada la infección, las lesiones viejas se necrosan, en tanto los bordes de las lesiones se expanden. El periodo de latencia abarca desde la infección hasta la producción de nuevas esporas (SENASICA, 2016).

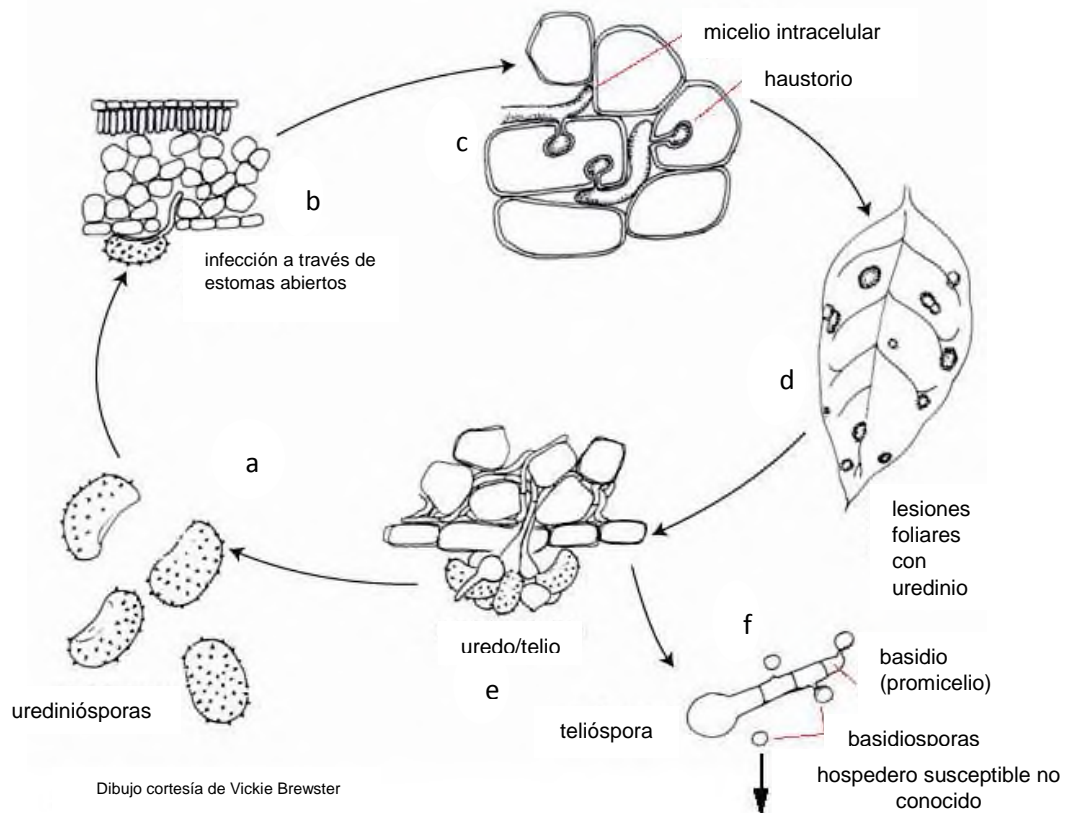


Figura 9. Ciclo de la enfermedad de la roya del café causada por *H. vastatrix*. a) Urediniósporas maduras de *H. vastatrix* dispersas en el ambiente. b) En condiciones óptimas ocurre la germinación de esporas y la posterior formación de hifas de penetración de estomas. c) El micelio alcanza la cámara subestomática y se diferenciará en el haustorio. d) Síntomas de la enfermedad en el envés de las hojas caracterizadas por un polvo fino naranja-rojizo. e) Formación de nuevas esporas f) No se conocen hospedantes alternos de las otras etapas de la espora (Arneson, 2000).

La dispersión de este fitoparásito se favorece por el viento, la lluvia, altas densidades de población en los cafetales, insectos como trips, moscas y avispas y la intervención humana, y se lleva a cabo por las urediniosporas. Estas estructuras reproductivas sobreviven hasta 6 semanas en condiciones ambientales secas (Arneson, 2000; Rivillas *et al.*, 2001). Respecto a datos históricos en México, durante el invierno (noviembre-febrero) ocurre el incremento de roya. El exceso de lluvia indica una correlación negativa, ya que, al parecer, la lluvia tiene un efecto de lavado sobre las esporas de los hongos. Además, la altitud es inversamente proporcional a los niveles de ocurrencia; a 800 msm se mostró la mayor incidencia de daño, siendo menor a más de 1,000 msm (SENASICA, 2016).

Dadas las circunstancias ambientales óptimas, inicialmente ocurrirá la adhesión de la espora a la hoja del café, y posteriormente germinará. Subsecuentemente, el tubo germinal se diferenciará en el apresorio en un periodo de 5.3-8.5 h, que a su vez se convierte en hifas de penetración de los estomas (Fig. 9, b). En conjunto, forman el micelio que se ramifica intercelularmente en las hojas de café donde la hifa alcanza la cámara subestomática y se diferenciará en el haustorio (Fig. 9, c). Ahí, absorbe los nutrientes de la planta para su crecimiento (Rayner, 1961; Hahn y Mendgen, 2001; Florez *et al.*, 2017). En la Fig. 10 se ilustra el proceso de transporte transmembranal hipotético que ocurriría en la interfaz de la interacción biotrófica planta-hongo.

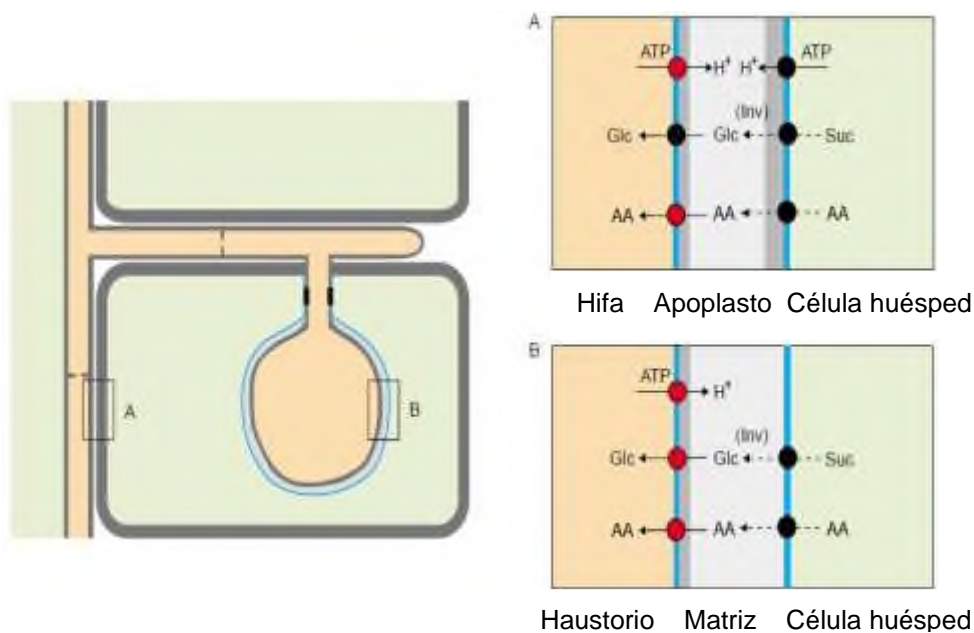


Figura 10. Proceso de transporte transmembranal en la infección por roya. Los componentes celulares son distinguidos por el color: membranas plásmaticas y membranas interfaciales (azul), paredes celulares (gris), citoplasma fúngico (naranja) y citoplasma vegetal (verde). Las líneas punteadas indican el fenómeno de flujo para los cuales los transportadores son postulados pero aún no conocidos. AA, aminoácidos; Glc, Glucosa; INV, Invertasa extracelular que divide la sacarosa en glucosa y fructosa; Suc, Sacarosa. (Hahn y Mendgen, 2001).

Después de 30 días a partir de la colonización, el hongo ya maduro se diferenciará en soros, los cuales se encargarán de producir las nuevas urediniosporas (periodo de latencia) (Fig. 9, a), de aspecto reniforme (30 μm de largo x 20 μm de ancho), rugosas en su cara externa y lisas en la cara interna (Fig. 11). De forma esporádica a finales de temporada, al ser las condiciones frescas y secas, se originan teliósporas que aparecen entre las urediniosporas en las hojas más viejas aún adheridas a la planta.

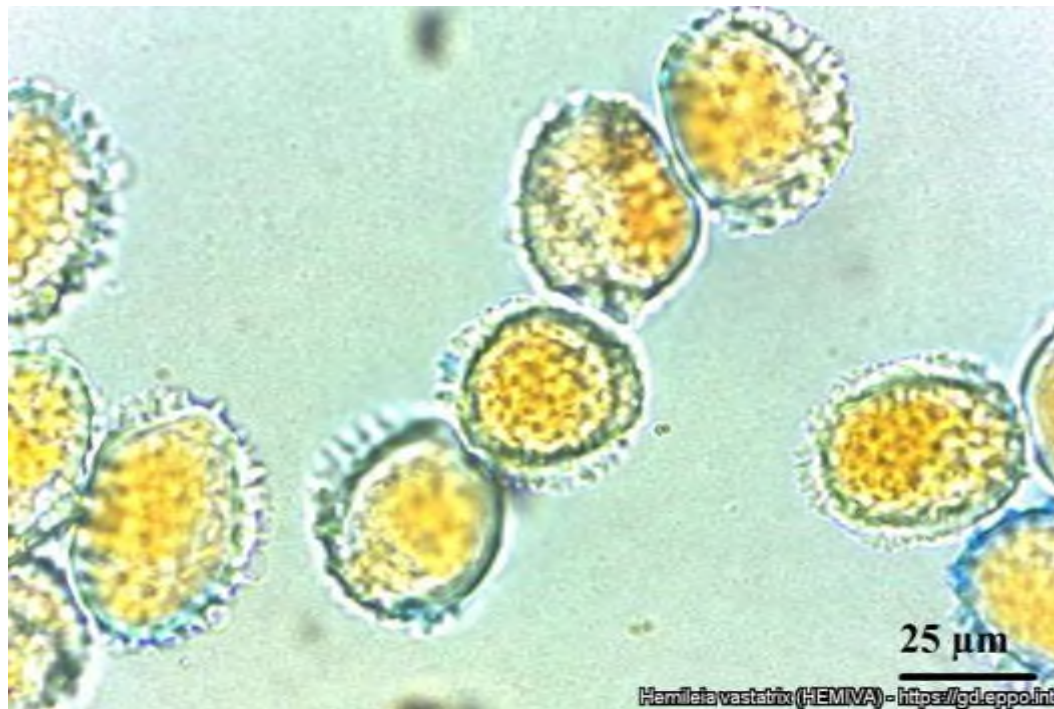


Figura 11. Urediniosporas. Microscopio de luz 40X (EPP0, 2014).

Después de la cariogamia (proceso de fusión de dos núcleos eucariontes haploides) y la meiosis, las teliósporas germinan para producir basidios, cada uno de los cuales forma cuatro basidiosporas haploides (Arneson, 2000). Se desconoce si las basidiosporas son funcionales o sólo restos de una roya macrocíclica ancestral (en la que se podrían presentar 5 etapas de esporas) (Fig. 9, f y e). Las teliosporas, cuya representación es baja, son redondas de 20-25 μm . (Fig. 9, f) (Castro *et al.*, 2009). No existen reportes que reconozcan hospedantes alternos del hongo (Fig. 9, f), y no sobrevive en los restos de los cultivos (Arneson, 2000), ni crece en medios de cultivo estándar en el laboratorio (Hahn y Mendgen, 2001).

1.7 Resistencia a la infección de *Hemileia vastatrix*

En respuesta al ataque de *H. vastatrix*, las plantas de café han desarrollado diversos mecanismos de defensa que intervienen en diferentes etapas del proceso de infección. De hecho, entre las variedades de café, existen algunas que muestran resistencia a la infección. En

la resistencia prehaustorial (12-24 h después de la infección) en variedades resistentes al ataque por *H. vastatrix* (como en el Híbrido de Timor), se han identificado por medio de análisis transcriptómicos la expresión regulada de al menos 13 genes, en comparación a variedades susceptibles, como Caturra (Florez *et al.*, 2017). Estos genes codifican proteínas implicadas en funciones como receptoras del tipo quinasa, receptoras de flujos de iones, protectoras de especies reactivas de oxígeno, fosforilación de proteínas, biosíntesis de etileno y deposición de callosa. Resaltan 5 genes en la variedad resistente, de los cuales hay una clara sobreexpresión respecto a la variedad Caturra, y que supuestamente hacen incompatible la relación hongo-planta; estos genes codifican una proteína de dominio hélice-loop-hélice básica (bHLH) de unión a DNA, un factor de transcripción de respuesta a etileno (ERF 1B), proteínas putativas de resistencia (RGA1 y dirigent-like), y una oxipremnaspiridiona oxigenasa. En el análisis de expresión mencionado, sólo se observaron respuestas de defensa basales en la resistencia posthaustorial íntimamente ligada con genes clave de defensa contra el fitopatógeno. Estas respuestas varían según el genotipo del café (Florez *et al.*, 2017).

En el NCBI está almacenada la secuencia del genoma crudo de *H. vastatrix* (txid1291517), la cual fue obtenida por las técnicas NGS Illumina y 454 a partir de 8 aislados, la secuencia genómica está compuesta de 333 Mb, con 396,264 contigs y 302,466 scaffolds (Cristancho *et al.*, 2014).

1.8 Estrategias tradicionales para el manejo de la enfermedad

Los productores de café han implementado una serie de estrategias para combatir el ataque de *H. vastatrix* y así evitar las pérdidas causadas por la enfermedad, que incluyen el control genético, el control biológico, el empleo de prácticas agronómicas adecuadas, el control químico y el manejo integrado.

1.8.1 Control genético

Este tipo de control consiste en la búsqueda, desarrollo y empleo de cultivares resistentes como estrategias para limitar la infección por roya. Sin embargo, tiene la desventaja de que las razas de este fitopatógeno tienen un alto potencial evolutivo superando continuamente los

mecanismos de defensa del hospedero por su alta tasa de mutación (Cristancho *et al*, 2007) y criptosexualidad, el cual es un tipo de reproducción sexual oculto dentro de las esporas asexuales (Carvalho, Fernandes, Carvalho, Barreto y Evans, 2011). Además de la resistencia a la roya, las variedades deben de contar con buenas características agronómicas y uniformidad en la calidad del café (Arneson, 2000).

El Híbrido de Timor es una de las variedades más exitosas en el control genético, siendo un cruce natural entre *C. arabica* y *C. canephora*. Además, la introducción del Híbrido de Timor 1343 se usó para la producción de la variedad Colombia (Cristancho *et al.*, 2007), que es afectada por la enfermedad ojo de gallo en hojas (Centro Nacional de Investigaciones de Café [Cenicafe], 2011). La resistencia vertical coordinada y efectiva en estadios tempranos de la infección, es el común denominador en estas variedades, no obstante, las razas al volverse más virulentas pueden superar estas barreras fácilmente, lo cual es menos probable en la resistencia horizontal. El resultado de la interacción del patosistema es incompatible y por ende la proliferación de *H. vastatrix* se detiene, además de la ruptura del contenido citoplasmático de las estructuras de infección fúngicas (Florez *et al.*, 2017).

1.8.2 Control biológico

Una de las estrategias de control alternativas es la inoculación de enemigos naturales del patógeno. Para el caso de la roya, se aplica el hongo *Lecanicillium lecanii*, el cual es uno de los hiperparásitos más comunes de la roya del café presentándose de forma natural en los cafetales. *L. lecanii* coloniza lesiones de la roya del café reduciendo la viabilidad de las urediniósporas, pero con bajo impacto en el desarrollo general de la roya (Arneson, 2000). Una de las dificultades es la reproducción masiva que permita obtener estructuras de reproducción en corto tiempo, bajo costo y con alta viabilidad. También debe considerarse que el efecto de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix* depende de la presencia y el mutualismo entre la escama verde *Coccus viridis* y la hormiga *Azteca instabilis* en el agroecosistema cafetalero, como un todo que actúa en un contexto espacialmente específico (Jackson, Skillman y Vandermeer, 2012).

1.8.3 Control agronómico

En cuanto a las prácticas agronómicas, se recomienda mantener en buen estado nutricional a las plantas mediante una adición constante de materia orgánica y un adecuado balance de micronutrientes como N y P, evitar la sombra excesiva, así como disminuir densidades de plantación altas, propiciar policultivos con especies sinérgicas fijadoras de nitrógeno (frijol) o con efecto alelopático, el reemplazo de plantas de cafeto infectadas con plantas sin infección y un buen control de malezas (Arneson, 2000). Por otra parte, reducir la sombra en los cafetales tiene un efecto perjudicial en la biodiversidad.

1.8.4 Control químico

El control químico está intrínsecamente relacionado con la fenología de la planta y el inicio de la estación de lluvias. Se realiza bajo un enfoque preventivo con la aplicación de oxiclورو de cobre. También se realiza con un enfoque curativo con cyproconazol, azoxistrobin y triadimefon. En 2013 la SAGARPA empezó a distribuir el fungicida DR43 y el biofertilizante AITIA, aunque por no contar con la certificación requerida los cafeticultores se muestran renuentes e inconformes con la aplicación de estos productos, sobre todo en las parcelas orgánicas (Comisión Interamericana de Agricultura Orgánica [CIAO], 2013). En un estudio de comparación de acción entre cinco fungicidas de contacto (caldo viscoso, caldo bordelés, caldo sulfocálcico, oxiclورو de cobre, trilogy 64 EC) que se aplicaron en un área que mostró previamente un 11.20% de incidencia promedio de infección, ninguno mostró una reducción en los porcentajes de infección después de 72 días de aplicación, apreciándose que todos tuvieron una tendencia a la alza (Asociación Nacional del Café [Anacafé], 2013).

El control químico se lleva a cabo con base en el análisis de riesgos regionales, monitoreo constante del patógeno y sobre todo la disponibilidad económica del productor. Se recomienda aplicar un producto sistémico y otro de contacto (SENASICA, 2016).

El control químico es una alternativa eficaz pero costosa y perjudicial para la salud humana y medio ambiente (Talhinhas *et al.*, 2017), además, el patógeno puede desarrollar resistencia a

los fungicidas, y éstos, principalmente los basados en cobre, aumentan la abundancia de minadores de la hoja y ácaros (Jackson, Skillman y Vandermeer, 2012), por lo cual no se considera como la solución ideal al problema.

1.8.5 Manejo integrado

En esta estrategia se implementan de forma sinérgica los métodos anteriores con el fin de potenciar un mejor manejo de la plaga. Se plantea que el manejo agronómico que consiste en la eliminación de malezas, poda y fertilización, aunado a la aplicación del fungicida orgánico caldo bordelés, disminuye el nivel de enfermedad (Obando, Iberico y Oliva, 2015). En México, la SAGARPA (2016), mediante el componente PROCAFÉ e Impulso Productivo del Café, promueve acciones en la política nacional cafetalera con el fin de revertir la caída de la producción. Estas acciones incluyen: la renovación de cafetales, asistencia técnica especializada y con inclusión social, paquetes tecnológicos integrales e inversión y ocurrencia. De forma específica cuenta con el Programa de Vigilancia Epidemiológica de la Roya del cafeto (*H. vastatrix*).

1.9 Nueva estrategia biotecnológica para la protección vegetal: Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS)

Una estrategia de reciente generación llamada silenciamiento génico inducido por aspersión (SIGS), es una herramienta novedosa, no transgénica por basarse en la secuencia de bases nitrogenadas no es susceptible a resistencia o a tolerar cepas patógenas mutadas y no interfiere con la respuesta de defensa innata de los huéspedes (Koch *et al.*, 2016; Wang y Jin, 2017). SIGS se basa en la aspersión de RNAs pequeños de doble cadena (dsRNAs) y monocatenarios (sRNAs) específicos sobre la superficie del huésped, para silenciar genes clave para la patogenicidad o integridad del patógeno en cuestión, otorgándole protección a la planta (Koch *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Dicha estrategia ya ha sido probada en el combate de la infección por *Fusarium graminearum* en la cebada (Koch *et al.*, 2016) y en *Botrytis cinerea* en vegetales, frutas y en pétalos de flores (Wang *et al.*, 2016). Además de ser efectiva para controlar enfermedades causadas por hongos y omicetos (E.U.A. Patente N°. 14/809,063, 2016), su implementación se

podría extender a diferentes patosistemas, inclusive de otros reinos, con las adaptaciones necesarias en cada caso.

1.9.1 Fundamento de la estrategia de Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS): respuesta natural mediada por RNAs pequeños en la interacción planta: patógeno

El mecanismo de SIGS emplea la maquinaria eucariótica evolutivamente conservada de silenciamiento génico por interferencia de RNA (RNAi), que regula procesos biológicos como el crecimiento, respuesta a estímulos ambientales, mecanismos de defensa y la regulación de la expresión génica (Mukherjee Campos y Kolaczowski, 2012; Borges y Martienssen, 2015), por medio de entidades bioquímicas que incluyen la actividad enzimática de proteínas como Drosha, Dicer, Argonauta y el complejo RISC (Bernstein *et al.*, 2001).

El fundamento de SIGS parte de que ciertos hongos inician el proceso de patogenicidad por medio de la emisión de RNAs pequeños (sRNAs, o siRNAs) para suprimir la inmunidad de la planta, este fenómeno también se observa de forma inversa, la planta emite sRNAs hacia el patógeno para atenuar su capacidad infectiva (Fig. 12) (Weiberg *et al.*, 2013).

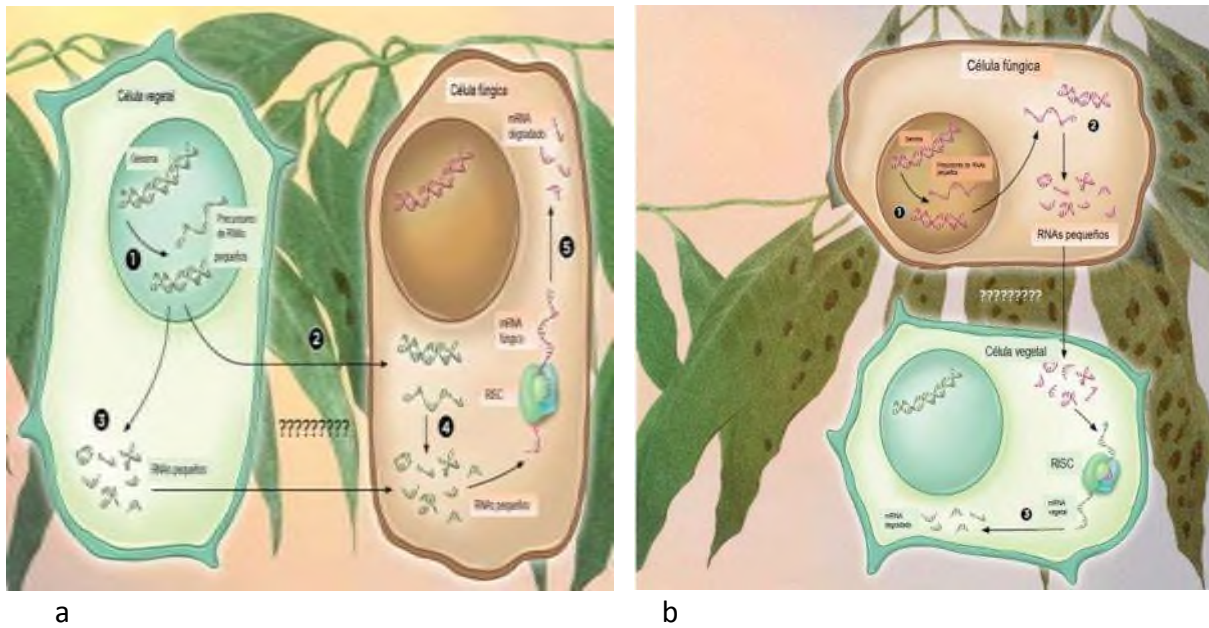


Figura 12. Proceso de Intercambio de RNA a) planta-patógeno b) patógeno-planta (Modificada de Grens, 2017).

Recientemente, se describió el mecanismo mediante el que se transportan los sRNAs del huésped al patógeno, en el caso del patosistema *Arabidopsis-Botrytis cinerea*. La planta encapsula en exosomas los sRNAs y los envía al hongo fitopatógeno (Cai *et al.*, 2018). Este mecanismo también ha sido observado en *Plasmodium falciparum*, el protozoo parásito causante de la malaria (Cai *et al.*, 2018) y en nemátodos (Buck *et al.*, 2014).

Una vez en el hongo, los dsRNAs (Fig. 13, a) se procesan por DCL (Fig. 13, b) e incorporan al complejo RISC d (Fig. 13, c), etiquetando finalmente a transcritos blanco por complementariedad de secuencia (Fig. 13, d) y dirigiendo su degradación o bloqueando su traducción (Koch *et al.*, 2016) como se aprecia en la Figura 13, e.

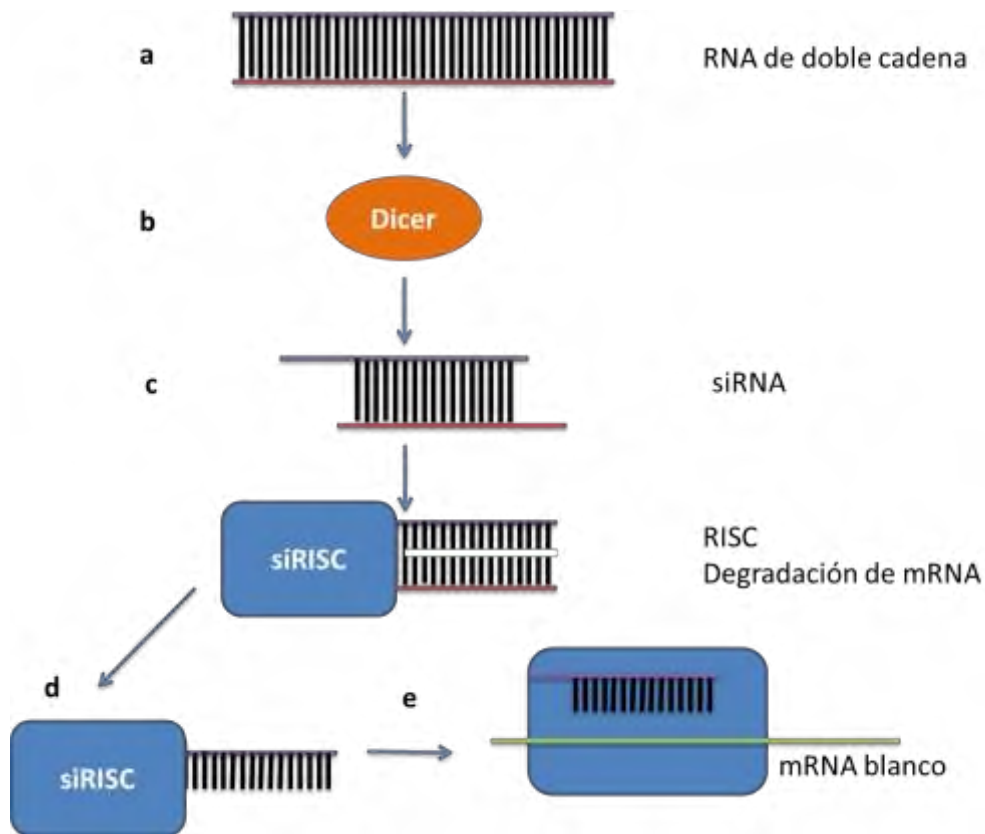


Figura 13. Mecanismo de degradación de mRNA por siRNAs. (Modificada de López, Silva, López y Arias, 2007).

En un estudio de SIGS dirigido al silenciamiento de DCLs, se corroboró que el hongo *Botrytis cinerea* adquiere sRNAs aplicados por aspersión y que silencia eficazmente a sus DCL para atenuar su patogenicidad y crecimiento (Wang *et al.*, 2016). Los sRNAs fueron localizados en partes distales del sitio de aplicación (pétalos de flores, superficies de hojas y superficies de frutas), extendidos por toda la planta a través del tejido vascular. La vida útil de estas biomoléculas es de 7-8 días y varía según las condiciones climatológicas de la región geográfica en cuestión (Koch *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

1.9.2 Genes DCL como blancos de la estrategia de Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS)

En busca del gen diana para aplicar la tecnología SIGS, se probaron genes involucrados en procesos infectivos y de propagación, como los involucrados en la síntesis de componentes de la

pared celular (Weiberg *et al.*, 2013; Koch *et al.*, 2016). Las primeras demostraciones de efectividad se aplicaron en el patosistema cebada-*Fusarium graminearum*. Mediante la aspersión de dsRNAs dirigidos a silenciar tres genes involucrados en la biosíntesis de ergosterol: CYP51A, CYP51B y CYP51C, inhibiendo la producción de biomasa fúngica y transcritos, tanto en las superficies directamente asperjadas como las distales (Koch *et al.*, 2016). Concluyendo que el procesamiento por la maquinaria de RNAi es un prerrequisito para la actividad antifúngica.

Además de estos tres genes, se demostró que cualquier gen podría en principio ser silenciado con esta tecnología (Koch *et al.*, 2016). Es de suma importancia señalar que las otras enzimas componentes actúan de forma conjunta: Drosha-Pasha y Ago-RISC (Tomari y Zamore, 2005; Burger y Gullerova, 2015), por lo cual es más factible encauzar la tecnología SIGS hacia el silenciamiento de Dicer.

1.9.3 Estructura de proteínas Dicer fúngicas

Cada gen DCL codifica una enzima Dicer, que son endoribonucleasas de ~220 kDa, cuyo papel primario es la identificación y procesamiento de dsRNA y ssRNA, cortándolos en fragmentos de ~21 bp llamados sRNA (Taylor *et al.*, 2013). La estructura de dominios de Dicer en el clado de las royas, generalmente consta de 5 dominios (ScanProsite, s.f.): DEAD, helicasa, dsRBD y los gemelos RNasa III, organizados de N-terminal a C-terminal (Fig. 14). El núcleo catalítico corresponde a los dominios RNasa III (Hu *et al.*, 2013), aunque algunos estudios incluyen dominios de unión del dsRNA (Mukherjee *et al.*, 2012; Burger y Gullerova, 2015).

La caja DEAD está relacionada con la afinidad y el desenrollamiento de los ácidos nucleicos, la unión a ATP y la actividad ATPasa (Linder *et al.*, 1989), siendo similar al factor de iniciación de la traducción eucariótica: eIF4A (Hernández y Vazquez-Pianzola, 2005). El dominio par DEAD/Helicasa facilita el movimiento de la proteína a través del dsRNA, además, su ausencia en las proteínas Dicer indica su especialización en el procesamiento de miRNAs, un tipo específico de sRNAs (Mukherjee *et al.*, 2012). El dominio dsRBD ha sido localizado en proteínas que reconocen específicamente RNAs de doble cadena (Burd y Dreyfuss, 1994). Los dos dominios

RNasa III están adyacentes uno del otro y separados por un heterodímero interno, cada uno de ellos corta una cadena del precursor (Hu *et al.*, 2013).

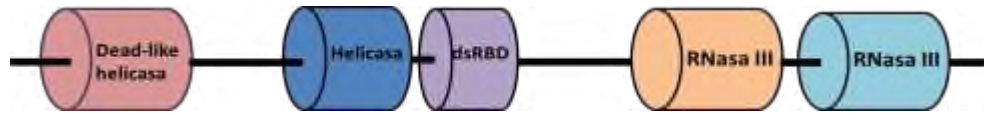


Figura 14. Estructura consenso en royas del gen DCL por dominios. (Modificado de ScanProsite, s.f.).

La tecnología SIGS dirigida a DCL, por lo tanto, se puede expandir a otras especies para proteger diversos cultivos vegetales, entre ellos, el patosistema *Coffea-Hemileia vastatrix* del cual no existen antecedentes sobre el uso de esta tecnología. En la Fig. 15 se esquematiza la estrategia SIGS.

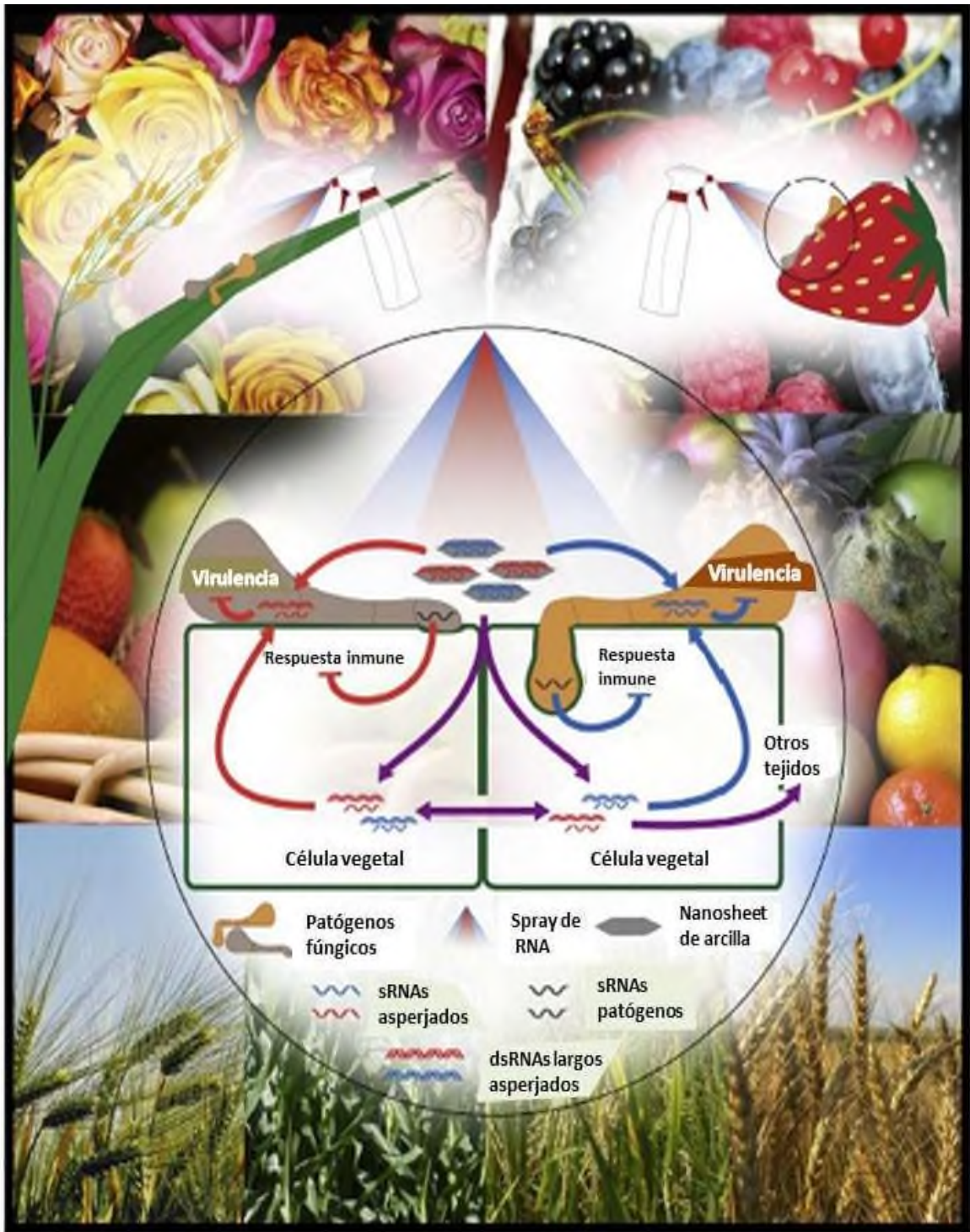


Figura 15. Ribointerferencia entre reinos y el empleo de SIGS en la interacción patógeno-hospedero para atenuar la patogenicidad del hongo (Wang, *et al.*, 2017).

1.9.4 Criterios de potencial de silenciamiento para el diseño de RNAs pequeños en la estrategia Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión

A partir de casos exitosos de la tecnología SIGS publicados en la literatura especializada (Koch *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017), se ha logrado extraer criterios importantes para aumentar la probabilidad de efectividad y especificidad de los sRNAs para el control de hongos patógenos:

Los sRNAs deberán diseñarse en regiones de DCL de baja identidad y no conservadas entre *H. vastatrix* y *C. arabica*, para evitar una respuesta colateral de silenciamiento de DCLs no blanco. Para ello se emplean las bases de datos biológicas de libre acceso para obtener las secuencias y compararlas.

El diseño se basa en una región intermedia del gen DCL que garantiza, al menos teóricamente, la separación de los dominios funcionales que caracterizan a las proteínas DCL, que son un dominio amino de helicasa y dos dominios carboxilo de RNasa. Se han empleado fragmentos desde 151-164 bp.

Empleo de RNA bi o monocatenario que posea una secuencia idéntica al DCL de *H. vastatrix*.

Es importante determinar si los sRNAs podrían tener actividad sobre otros patógenos (considerando especies ortólogas). De esta forma se puede establecer el espectro de actividad, si se requiere amplio, o específico para controlar exclusivamente un patógeno.

Además de los criterios anteriormente mencionados, y que se refieren exclusivamente a las características de diseño de los RNAs, deben cumplirse otras condiciones, como la disponibilidad de los RNAs pequeños hacia el hongo, la capacidad del hongo de ingresarlos, y la estabilidad de los RNAs pequeños en la escala espacio-temporal durante las etapas críticas de establecimiento de la infección (Wang *et al.*, 2016).

2. Justificación

En México y el mundo, el fitopatógeno *H. vastatrix* es el principal causante de pérdidas en la producción del café. La roya constituye un gran problema que impacta negativamente las exportaciones de las regiones subdesarrolladas que dependen de este producto agrícola. Por lo anterior, es necesario desarrollar la protección del cultivo del café con énfasis en el control de la roya, que no dañen al medio ambiente ni la salud humana, ya que de ello depende su éxito y aceptación por el mercado.

En este trabajo, se propuso el diseño de una biofungicida basado en la estrategia SIGS, dirigida al silenciamiento génico de DCL, un gen clave en la interacción con la planta y la patogenicidad del hongo. El principio activo de esta estrategia son RNAs pequeños diseñados para silenciar y deshabilitar a DCL. Para la determinación de las secuencias potencialmente óptimas se aprovechó el conocimiento de la relación planta-patógeno obtenido a partir del estudio del hongo *B. cinerea*, que ha sido el modelo para el desarrollo de la tecnología de nueva generación SIGS.

Al momento, no existe un protocolo de SIGS en el control de la roya del café. Como primer paso, es necesario determinar la secuencia del gen DCL en *H. vastatrix*. A partir de ahí se pueden diseñar sRNAs encauzados a inactivar la expresión de los genes DCL de *H. vastatrix*. Con este trabajo, se establecen los primeros pasos para desarrollar una propuesta biotecnológica de última generación para el control de la roya, que en un futuro coadyuve la protección del cultivo y permita mantener su viabilidad económica.

3. Hipótesis

Los genes DCL en *H. vastatrix* tendrán secciones útiles sobre las que se pueden diseñar sRNAs para su uso en SIGS, de acuerdo a los criterios de potencial de silenciamiento.

4. Objetivo general

Secuenciar los genes DCL en *H. vastatrix* y diseñar sRNAs, para su posterior aplicación en el combate de la roya del café mediante silenciamiento génico inducido por aspersión (SIGS).

4.1 Objetivos específicos

4.1.1 Identificar a *H. vastatrix* en hojas de café con los síntomas característicos, mediante amplificación del ITS

4.1.2 Clonar y secuenciar las regiones genómicas DCL de *H. vastatrix*.

4.1.3 Determinar secciones de baja homología entre los genes DCL de *H. vastatrix* y los de *Coffea arabica*.

4.1.4 Diseñar sRNAs para su aplicación en SIGS.

5. Materiales y métodos

5.1 Material biológico

La colecta del tejido vegetal se llevó a cabo en un cafetal de la localidad Rancho Grande, perteneciente a San Juan Bautista Valle Nacional, y en la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec, ambas zonas en Oaxaca, México (Fig. 16), con los datos de localización en la Tabla 3. En los laboratorios de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal de la UNPA se procesaron los tejidos recolectados de ambos sitios con síntomas de infección.

Tabla 3. Información georreferenciada de las zonas de muestreo de la roya del café en México (Google, s.f.).

Zona de muestreo	Latitud (S)^x	Longitud (W)^y	Altitud (m)
UNPA, campus Tuxtepec	18.014614	-96.171605	47
Rancho Grande, Valle Nacional	17.932337	-96.331438	830

^xS=Sur

^yW=Oeste

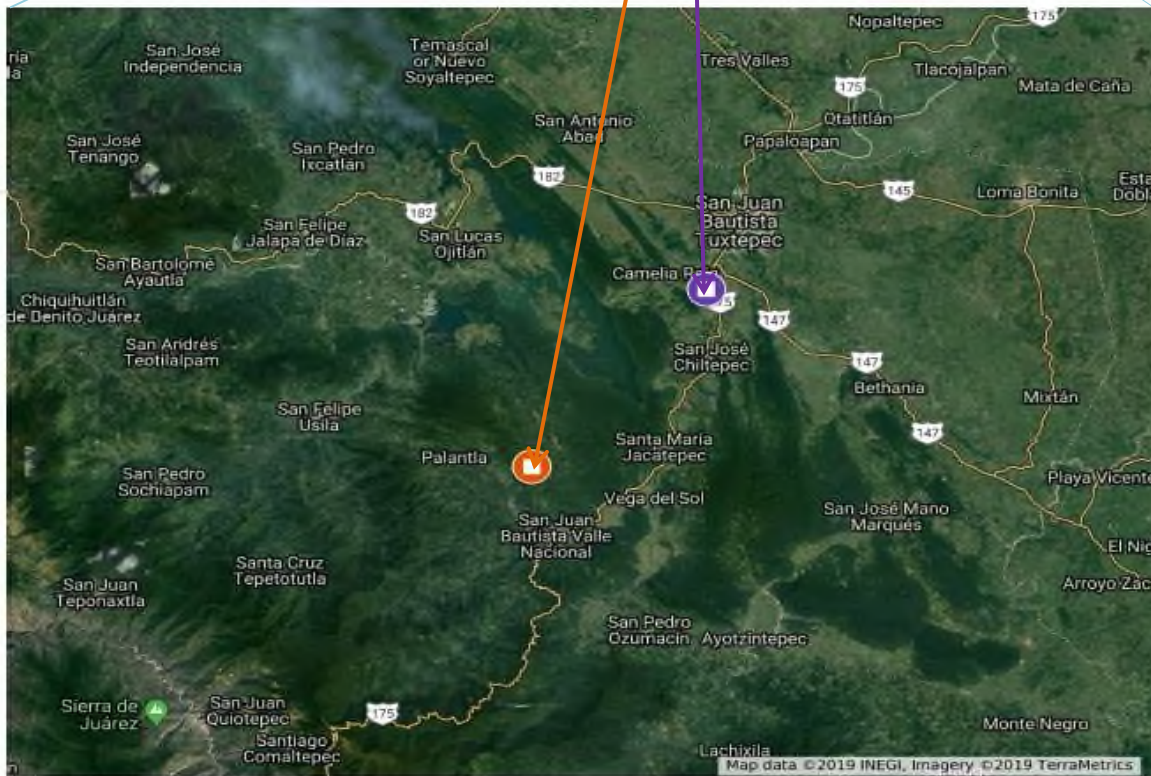
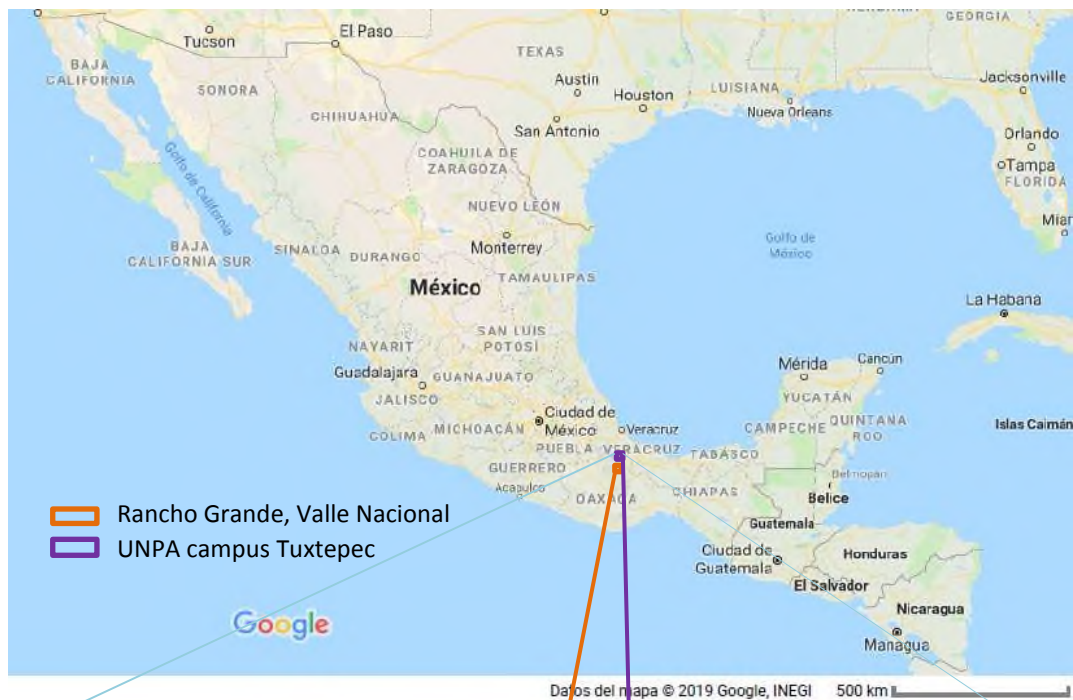


Figura 16. Localización en el mapa de México de los sitios de colecta de hojas de café con roya (Google, s.f.).

5.2 Microscopía

Bajo el microscopio invertido (Eclipse Ti-U, Nikon) se observaron las estructuras de las lesiones y para observar fúngicas, mediante el método de la cinta. Se tomó un trozo de cinta adhesiva transparente y por el lado pegajoso se presionó ligeramente sobre las lesiones de roya para adherirlas posteriormente a un portaobjetos. Se observó con los objetivos 10X, 20X y 40X y se capturaron las fotos con una cámara digital (Evolution™ MP, Media Cybernetics), adaptada al microscopio invertido (Eclipse Ti-U, Nikon). Las esporas de las lesiones de las hojas con característica de roya, fueron colectadas frotando el envés de las hojas con una espátula, se depositaron en tubos Eppendorf y se almacenaron a -80°C para su posterior procesamiento.

5.3 Extracción de DNA genómico por el método fenol-cloroformo

Se empleó el protocolo de Cristancho *et al.*, (2007) con algunas modificaciones. A las esporas colectadas se les adicionaron 300 µL de buffer de lisis (50 mM de tris HCl pH 7.5; 50 mM de EDTA pH 8.0; 3% de SDS; 1% de Mercaptoetanol) (Anexo A) y se maceró con pistilos de polipropileno. Una vez homogenizado se adicionaron 300 µL adicionales de buffer de lisis, los tubos se agitaron en un vortex, y se incubó en un baño María a 80°C durante 10 min. Cuando los tubos se enfriaron hasta llegar a una temperatura de 50°C, se agregaron 700 µL de la mezcla Fenol-Cloroformo-Isoamilalcohol (25:24:1). Se mezcló suavemente hasta obtener una emulsión y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionaron dos volúmenes de etanol puro y 1/10 volumen de solución 3M de acetato de sodio (Anexo A) para precipitar durante 2 horas a -20°C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y obtuvieron los pellets, que se lavaron con 480 µL de etanol al 80%. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 40 µL de agua DEPC (Anexo A). Se adicionó 1 µL de RNasa A y se incubó a 37°C por 30 min para eliminar el RNA contaminante. Finalmente, para desactivar la RNasa A se incubó a 65°C por 10 min y se almacenó a -20°C para su análisis posterior.

5.4 Identificación molecular de *Hemileia vastatrix*

5.4.1 Amplificación del ITS

Para la identificación de *H. vastatrix*, a partir de DNA genómico obtenido de las lesiones se amplificó por PCR la región que se muestra en la Fig. 17, y que abarca parte del 18S, la región ITS1-5.8S-ITS2 completa y parte del 28S. Para esto se emplearon los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4 (White, Bruns, Lee y Taylor, 1990; Cristancho *et al.*, 2007; Quispe-Apaza *et al.*, 2017). Adicionalmente, se usaron los oligonucleótidos específicos para *H. vastatrix* Hv-ITS-F y Hv-ITS-R amplificando la región ITS1 parcial, 5.8S completa e ITS2 parcial (James, Marino, Perfecto y Vandermeer, 2016). Los oligonucleótidos están representados en la Tabla 4 y mostrados esquemáticamente en la Fig. 17, así como el segmento del gen de rRNA que abarcan.

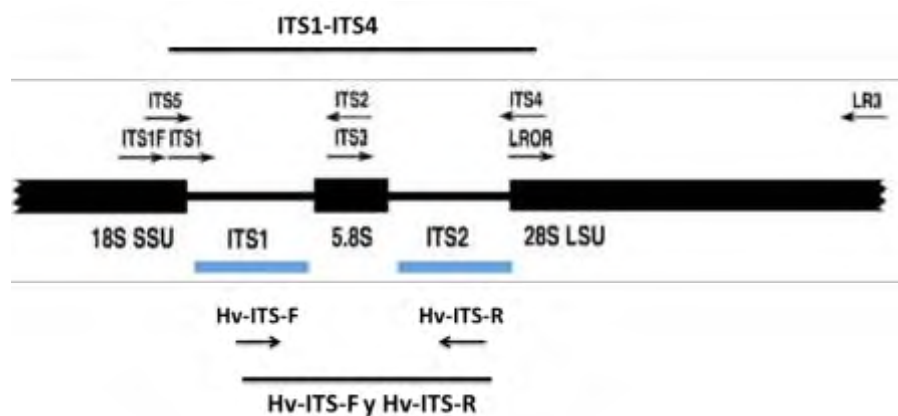


Figura 17. Primers para la amplificación de la región ITS (Modificada de Raja *et al.*, 2017).

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos empleadas en este trabajo

Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)
ITS1 directo	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	57
ITS4R reverso	TCCTCCGCTTATTGATATGC	53
Hv-ITS-F	CTGCGGCAATTTATTGCTTA	63
Hv-ITS-R	TATTGGGTGCTTGCCATT	62

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en microtubos de 0.2 mL, agregando los componentes especificados en la Tabla 5 y 6, y se llevaron a un termociclador (Veriti™ 96 Well, Applied Biosystems), de acuerdo al programa indicado en la Tabla 7 y 8.

Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR con oligonucleótidos universales

Componente	Volumen (μL)
DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo Scientific)	25
Oligonucleótido directo (10 μM)	2.5
Oligonucleótido reverso (10 μM)	2.5
Templado (50-250 ng)	2.5
Agua libre de nucleasas	17.5
Total	50

Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR con oligonucleótidos específicos

Componente	Volumen (μL)
HF 5X Buffer (B0518S, New England)	4
dNTP's (N0447L, New England)	0.4
Oligonucleótido directo (10 μM)	1
Oligonucleótido reverso (10 μM)	1
Templado (50-250 ng)	1
Phusion® High Fidelity (M0530L, New England)	0.2
Agua libre de nucleasas	12.4
Total	20

Tabla 7. Condiciones de ciclado para la amplificación de ITS con oligonucleótidos universales.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	15 s	
Hibridación	57	30 s	35
Extensión	72	3 min	
Extensión final	72	7 min	1
Mantener	4		

Tabla 8. Condiciones de ciclado para la amplificación de ITS con oligonucleótidos específicos.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	98	30 s	1
Desnaturalización	98	15 s	
Hibridación	62	30 s	35
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	7 min	1
Mantener	4		

Los productos de PCR se separaron por electroforesis empleando un gel de agarosa al 2% (Anexo A) a 100 V por 40 min. Se añadió en el carril del marcador de peso molecular 4 µL de GeneRuler DNA Ladder Mix/GeneRuler 1 Kb DNA Ladder para las reacciones de 50 µL y 3 µL de marcador para las de 20 µL. Los productos se revelaron con bromuro de etidio (Anexo A) y se

adquirieron las imágenes por medio del equipo fotodocumentador (Ingenius, LHR Syngene) y el programa GeneSnap.

Posteriormente a la visualización de productos, se escindió el fragmento de DNA del tamaño esperado y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL para proceder a su purificación por el kit MinElute PCR Purification (28004, QIAGEN) o GeneJET Gel Extraction (K0692, Thermo Scientific™) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Se cuantificó la concentración de DNA extraído mediante el uso del Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Los amplicones purificados se enviaron para su secuenciación individual en la unidad de secuenciación LANGEBIO en el CINVESTAV-Irapuato, mediante la metodología Sanger. Los amplicones se secuenciaron en las dos direcciones, empleando el oligonucleótido ITS1 y Hv-ITS-F por un extremo e ITS4R y Hv-ITS-R por el otro.

5.5 Análisis de secuencias y filogenia

Se visualizó el electroferograma de las secuencias crudas mediante el programa Chromas, se realizó una limpieza manual de las bases de mala resolución de los extremos 5' y 3', además de emplear las herramientas bioinformáticas EMBOSS-Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) y Reverse and/or complement DNA sequences (<http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html>) para obtener la secuencia consenso de ser posible. De acuerdo a Raja *et al.*, 2017 se realizó la identificación filogenética en diversas bases de datos biológicas (Barcode of Life Database, BOLDSYSTEMS, CBS-KNAW, Fungal Barcoding, Fungal MLST database Q-Bank, UNITE, Naïve Bayesian Classifier, Mycobank) pero se optó por las mejores puntuaciones en RefSeq Target Loci y blast del NCBI, seleccionando los más altos puntajes respecto a identidad, número de expectativa y cobertura (Raja *et al.*, 2017). Se realizó el alineamiento múltiple de secuencias en el programa MEGA 7 (Kumar, Stecher y Tamura, 2016), incluyendo la secuencia obtenida en este trabajo, para finalmente obtener el árbol filogenético. Los árboles se realizaron con el método Neighbor-Joining con un valor bootstrap de 1000 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski y Kumar, 2013).

5.6 Identificación de los genes DCL en *Hemileia vastatrix*

A partir de DNAg de esporas, se realizaron reacciones de PCR con la finalidad de amplificar las regiones genómicas de los DCL. Para esto se emplearon oligonucleótidos de dos tipos: específicos y degenerados.

5.6.1 Diseño de primers específicos

Debido a que la secuencia del gen DCL de *H. vastatrix* aún no está anotada funcionalmente. Para encarar esta ausencia de datos, se procedió a localizar en bases de datos biológicas secundarias y especializadas, genes DCL ortólogos tomando como referencia los del orden Pucciniales. Una vez obtenidos se procedió a realizar la comparación de secuencias mediante el programa bioinformático tblastn, usando como query cada uno de los Dicer anotados y como subject el genoma de la roya del café (txid1291517). Con base en los mejores hits de los parámetros de cobertura, identidad y valor de expectativa se filtraron los contigs. Se consideró que el diseño de los oligonucleótidos se ubicara en las regiones no conservadas entre los dominios helicasa (incluyendo dsRBD, ver Fig. 18) y los dominios RNasa III de los genes DCL. Una vez adquirida la región de interés, se procedió a elaborar los oligonucleótidos específicos en el programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) con los siguientes parámetros de diseño: 40-60% de contenido GC, 18-27 pb, Tm de 57-63°C, evitando la formación de horquillas y dimerización.

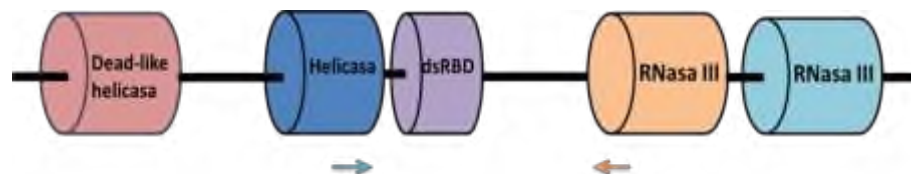


Figura 18. Sitio de interés para la elaboración de primers específicos.

5.6.2 Diseño de oligonucleótidos degenerados

Se implementó la PCR degenerada debido a la ausencia de DCLs reportados de *H. vastatrix* y en caso de que la(s) secuencias predichas mediante tblastn no se encontraran anotadas correctamente en la base de datos. Inicialmente y de acuerdo a metodologías establecidas (Linhart y Shamir, 2005; Iserte *et al.*, 2013) se obtuvieron en UNIPROT, MycoCosm JGI, funRNA y el NCBI las secuencias proteicas y nucleotídicas de genes DCL del orden Pucciniales. En T-coffee (Notredame, Higgins y Heringa, 2000) y MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016), se realizaron alineamientos múltiples de aminoácidos y bases nucleotídicas entre los Dicer y DCL reportados. Se localizaron los motivos que abarcaran los dominios de interés para el diseño de sRNAs: helicasa, dsRBD y RNasa III. Se incluyeron 7 aminoácidos para los cebadores que equivalen a ~20 bases, estos se evaluaron acorde al menor número de degeneración y se seleccionaron los mejores puntajes. El orden de selección aminoácida fue inversamente proporcional al número de codones que la codificaran. Por último, se evitó la degeneración en el extremo 3' ya que puede inhibir la actividad de la polimerasa en el alineamiento. Se elaboraron tanto primers con total degeneración como otros en los cual su diseño se basó solo en las secuencias disponibles de DCL del orden Pucciniales. Es de remarcar que se desconoce la tabla de uso de codones de *H. vastatrix* por lo cual se implementó el diseño manual, y no se optó por programas bioinformáticos (j-CODEHOP, CEMASUITE y Genius).

5.6.3 Amplificación de los genes DCL de *H. vastatrix* con primers específicos y degenerados

Una vez diseñados los primers tanto específicos como degenerados se realizó la PCR con cada uno por separado. Las reacciones PCR se efectuaron en microtubos de 0.2 mL, agregando los componentes especificados en las Tablas 9 y 10, y se llevaron a un termociclador (Veriti™ 96 Well, Applied Biosystems), de acuerdo a los programas indicados en las Tablas 11 y 12.

Tabla 9. Componentes de la mezcla para la PCR del gen DCL con oligonucleótidos específicos

Componente	Volumen (μL)
DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo Scientific)	25
Oligonucleótido directo (10 μM)	2.5
Oligonucleótido reverso (10 μM)	2.5
Templado (50-250 ng)	2.5
Agua libre de nucleasas	17.5
Total	50

Tabla 10. Componentes de la mezcla para la PCR de los genes DCL con oligonucleótidos degenerados

Componente	Volumen (μL)
HF 5X Buffer (B0518S, New England)	4
dNTP's (N0447L, New England)	1
Oligonucleótido directo (10 μM)	2
Oligonucleótido reverso (10 μM)	2
Templado (50-250 ng)	1
Phusion® High Fidelity (M0530L, New England)	0.5
Agua libre de nucleasas	9.5
Total	20

Tabla 11. Condiciones de ciclado para la amplificación del gen DCL con oligonucleótidos específicos.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	
Hibridación	60	30 s	40
Extensión	72	3 min	
Extensión final	72	5 min	1
Mantener	4		

Tabla 12. Condiciones de ciclado para la amplificación de los genes DCL con oligonucleótidos degenerados.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	98	30 s	1
Desnaturalización	98	15 s	
Hibridación	53	30 s	35
Extensión	72	3 min	
Extensión final	72	7 min	1
Mantener	4		

Los productos de PCR se separaron por electroforesis empleando un gel de agarosa al 1% (Anexo A), a 140 V por 40 min para los amplicones con oligonucleótidos degenerados y a 100 C por 35 min para los amplicones con oligonucleótidos específicos. Se añadió en el carril del

marcador de peso molecular 4 μ L de GeneRuler 1 Kb DNA Ladder para las reacciones de 50 μ L y 3 μ L de marcador para las de 20 μ L. Los productos se revelaron con bromuro de etidio (Anexo A) y se adquirieron las imágenes por medio del equipo fotodocumentador (Ingenius, LHR Syngene) y el programa GeneSnap.

A partir de este paso se continuó sólo con los productos obtenidos con los oligonucleótidos específicos. Posteriormente a la visualización de productos, se escindieron los fragmentos de DNA del tamaño esperado y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL para proceder a su purificación por el kit GeneJET Gel Extraction (K0692, Thermo Scientific™) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Se cuantificó la concentración de DNA extraído mediante el uso del Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Los amplicones purificados se enviaron para su secuenciación individual en la unidad de secuenciación LANGEBIO en el CINVESTAV-Irapuato, mediante la metodología Sanger. Los amplicones se secuenciaron en las dos direcciones, empleando los oligonucleótidos específicos obtenidos de la sección 5.6.1.

Para el análisis de secuencias se depuró manualmente los productos crudos obtenidos de la secuenciación mediante el programa Chromas, para obtener la secuencia consenso de ser posible. Esta secuencia se ingresó al Blast y se seleccionaron los más altos puntajes respecto a identidad, número de expectativa y cobertura.

5.7 Secuenciación por MinION

Se aplicó la secuenciación por MinION para tener una aproximación metagenómica. Con el objetivo de identificar a nivel molecular la presencia de *H. vastatrix* en una muestra ambiental. Se realizó *de novo* la amplificación del ITS a partir de la muestra de roya de Rancho Grande, Valle Nacional, con los primers ITS1 (directo) e ITS4R (reverso). Los componentes de la PCR así como el programa del termociclador se describen en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13. Preparación de reacciones de PCR con DreamTaq PCR.

Componente	Volumen (µL)
Dream Taq PCR Master Mix (2X)	25
Oligonucleótido directo (10 µM)	2.5
Oligonucleótido reverso (10 µM)	2.5
Templado (50-250 ng)	2.5
Agua libre de nucleasas	17.5
Total	50

Tabla 14. Condiciones de ciclado para la reacción con DreamTaq PCR.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	15 s	
Hibridación	57	30 s	40
Extensión	72	3 min	
Extensión final	72	7 min	1
Mantener	4		

Los productos se separaron en una cámara de electroforesis horizontal, mediante un gel de agarosa al 1%, en el buffer de corrida TAE 1X (Anexo A) a 130V por 45 min, se revelaron por 5 min en BrEt (Anexo A) y se obtuvo la imagen en el transiluminador. Posteriormente, se realizó la purificación de la banda deseada por medio del kit GeneJET Gel Extraction. Para la secuenciación se envió a la empresa ALPHAGEN 20 µL del amplicón de ITS y 5 µL de DNAg de *H. vastatrix* de Rancho Grande, Valle Nacional.

La empresa ALPHAGEN realizó la secuenciación a través de nanoporos. Para ello primero la muestra se preparó mediante la fragmentación del DNA, adición de la cola poli-A en los extremos 3' y proteínas nanopore que dirigieron las secuencias al nanoporo, ambas cadenas se ligaron mediante adaptadores y purificaron con un campo magnético, para posteriormente cargar la muestra en una celda de flujo. La secuenciación se obtuvo por los cambios en la corriente eléctrica obtenidos al pasar las bases de la cadena por los nanoporos. Mediante el programa MinKNOW se analizaron y guardaron los datos en un archivo FAST5 y se convirtieron en una secuencia de nucleótidos (basecalling). Los resultados se mostraron gráficamente en el programa Krona.

5.8 Diseño de sRNAs para su aplicación en la estrategia de Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS)

El diseño de sRNAs para SIGS dirigido contra *H. vastatrix* y otros hongos identificados, se realizó considerando los criterios de potencial de silenciamiento especificados en la sección 1.8.3, para lo cual se realizaron alineamientos de la secuencia del contig 148667 para *H. vastatrix* contra la secuencia de DCLs de la planta de café en la herramienta T-Coffee, tanto en nucleótidos como aminoácidos. El diseño se realizó en la región no conservada entre los dominios funcionales dsRBD y RNasa III.

6. Resultados y discusión

6.1 Identificación de *Hemileia vastatrix* en lesiones de roya de café

6.1.1 Análisis de las lesiones de la roya

El paso inicial en este trabajo fue la ubicación y recolección de esporas en lesiones de roya en plantíos de café. Esto se llevó a cabo en un cafetal de Rancho Grande, Valle Nacional (Fig. 19a-b) y en cafetos de la UNPA, campus Tuxtepec (Fig. 19c-d) para lo cual en el envés de las hojas se debieron percibir los síntomas característicos de esta fitoenfermedad que corresponden a lesiones en el envés de la hojas de color amarillo-naranja (Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria [CNRF], 2018).



Figura 19. Sitios de colecta. a) Cafetal b) Envés de la hoja del cafeto. [Fotografías de Blanca Estela Barrera Figueroa]. (Rancho Grande, Valle Nacional, Oaxaca. 2018). c) Cafetos d) Envés de una hoja de café con roya. [Fotografías de Stephania Marilyn Lopez Lopez]. (UNPA campus Tuxtepec, Oaxaca. 2018).

La apariencia externa color amarillento, polvo fino y suave del material biológico coincide con las características que definen al conglomerado de esporas de *H. vastatrix* (Fig. 20).

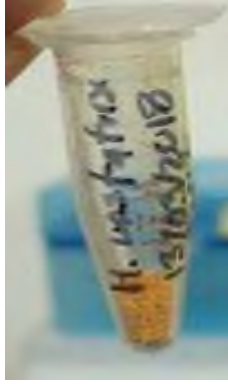
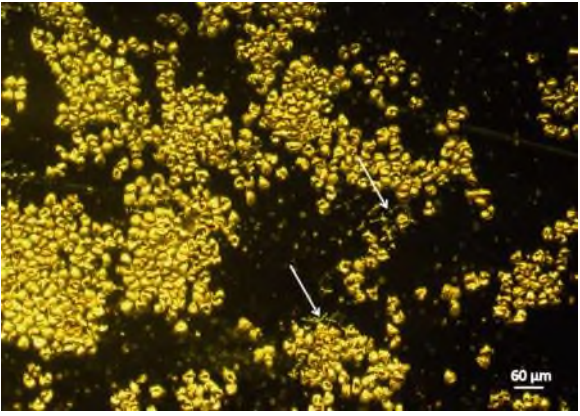
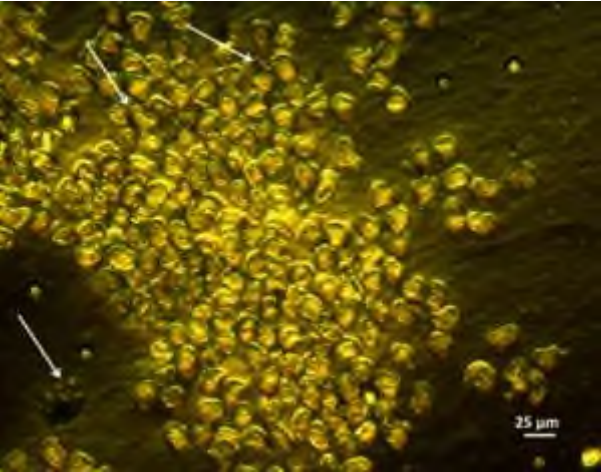
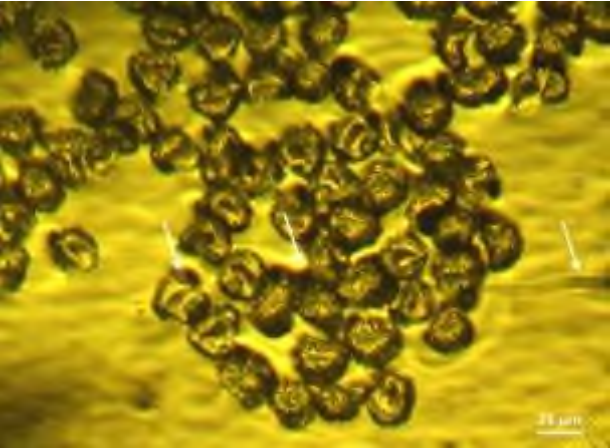


Figura 20. Apariencia de las esporas colectadas del envés de las hojas de café con roya. [Fotografía de Stephania Marilyn Lopez Lopez]. (Tuxtepec, Oaxaca. 2018).

Las estructuras de las uredosporas, visualizadas mediante micrografías (Tabla 15) corresponden a lo reportado en la literatura de referencia para la identificación de *H. vastatrix*, (CNRF, 2018). Por lo cual este análisis sugiere la presencia de *H. vastatrix* en las muestras empleadas en este trabajo.

Tabla 15. Micrografías de las esporas de *H. vastatrix*.

Micrografía	Descripción
	<p>Masa de uredosporas visualizadas a 10X. Se perciben algunas hifas en el entramado de esporas, las cuales se señalan con flechas.</p>
	<p>Visualización de esporas a 20X. Se notan en las secciones marcadas con flechas la presencia de otros hongos.</p>
	<p>Visualización de esporas a 40X. En las secciones indicadas con una flecha se percibe la presencia de hifas.</p>

6.1.2 Calidad del DNA genómico

El protocolo empleado en este trabajo resultó idóneo para la obtención de DNAg de esporas obtenidas de lesiones de roya del café. El DNA se apreció como una banda de alto peso molecular en la parte superior de los geles en la Fig. 21, donde se aprecia el DNA extraído de una muestra en la UNPA (Fig. 21a) y dos en Rancho Grande (Fig. 21b y 21c).

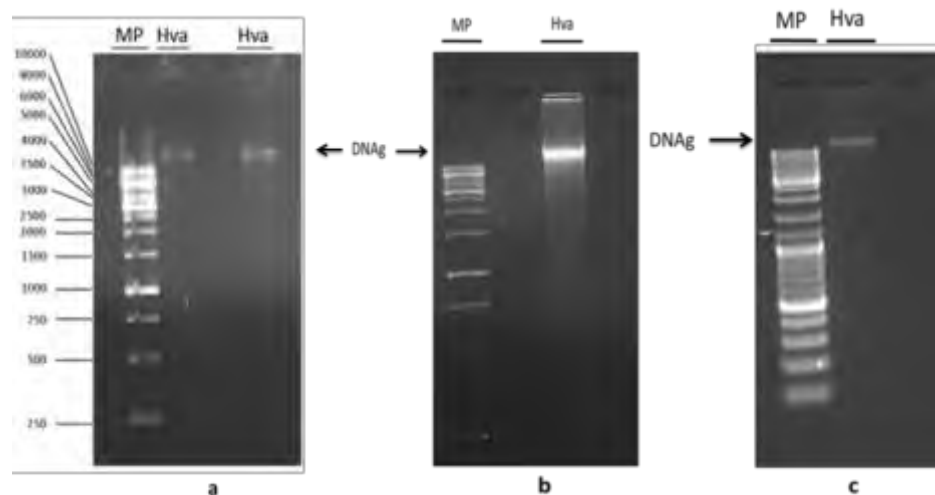


Figura 21. Extracción de DNAg de muestras de roya en geles de agarosa (1%) a 100 V por 40 min. a) Material biológico de la UNPA (3.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), b) Muestra de la primera extracción de Rancho Grande (3.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y c) Muestra de la segunda extracción de Rancho Grande (4.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Hva: Carriles con las muestras de DNAg de la roya del café. MP: GeneRuler 1 Kb DNA Ladder en las Figs. 19a-b y GeneRuler DNA Ladder Mix en la Fig. 19c. Las flechas indican las bandas de DNAg, que están encima del MP, siendo lo esperado para un DNAg.

6.1.3 Identificación de las muestras de roya por secuenciación de la región ITS con primers universales

Con la finalidad de realizar la identificación de *H. vastatrix* por métodos de biología molecular en la muestra de roya, específicamente mediante la secuenciación del ITS, se empleó el DNAg extraído como molde en reacciones de PCR, el fragmento se amplificó a 30 y 35 ciclos. Se tomó el producto obtenido a 30 ciclos, ya que se consideró que el amplicón obtenido a 35 ciclos pudiese ser inespecífico (Fig. 22). Una vez realizada la purificación del amplicón por el kit MinElute PCR Purification, la concentración del amplicón resultó óptima (13.9 $\text{ng}/\mu\text{L}$), con un

volumen total de 30 μ L. Para la secuenciación se emplearon los primers ITS1 e ITS4R, de tal forma que se obtuviera la secuencia directa y la complementaria.

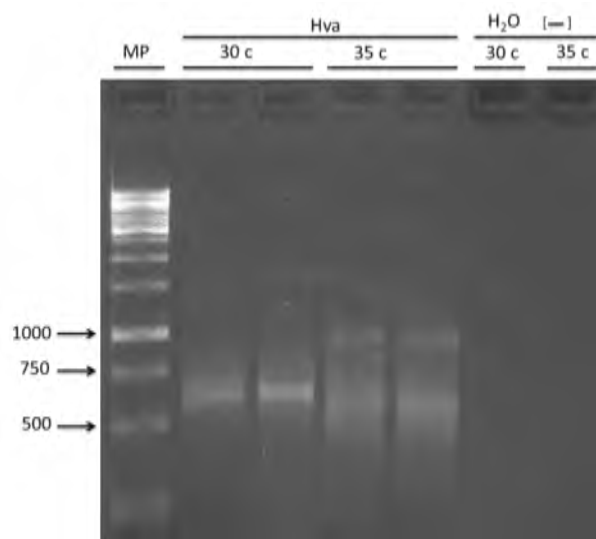


Figura 22. Gel de agarosa (2%) con productos de PCR amplificados mediante los oligonucleótidos ITS1 e ITS4R a 30 y 35 ciclos. Hva: Carriles con las muestras de DNAG de la roya del café de la muestra de la UNPA. Se consideró únicamente la banda de ~600 bp a 30 ciclos para la secuenciación Sanger. La presencia de una banda de ~1000 pb a 35 ciclos podría indicar la presencia de más de una especie en la muestra de roya del café a esas condiciones. MP: Marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder.

Una vez obtenidos los resultados del servicio de secuenciación para el fragmento amplificado las secuencias se analizaron y se observó un resultado característico de la mezcla de varios ITS, con baja definición de secuencia, pero con una versión preponderante reconocida por el software. Por lo anterior, se consideraron únicamente las secciones de mejor resolución de los electroferogramas (Fig. 23 y 24) para el análisis de solapamiento de las dos cadenas secuenciadas, correspondiendo a las regiones: ITS1 parcial, 5.8S completa e ITS2 parcial.

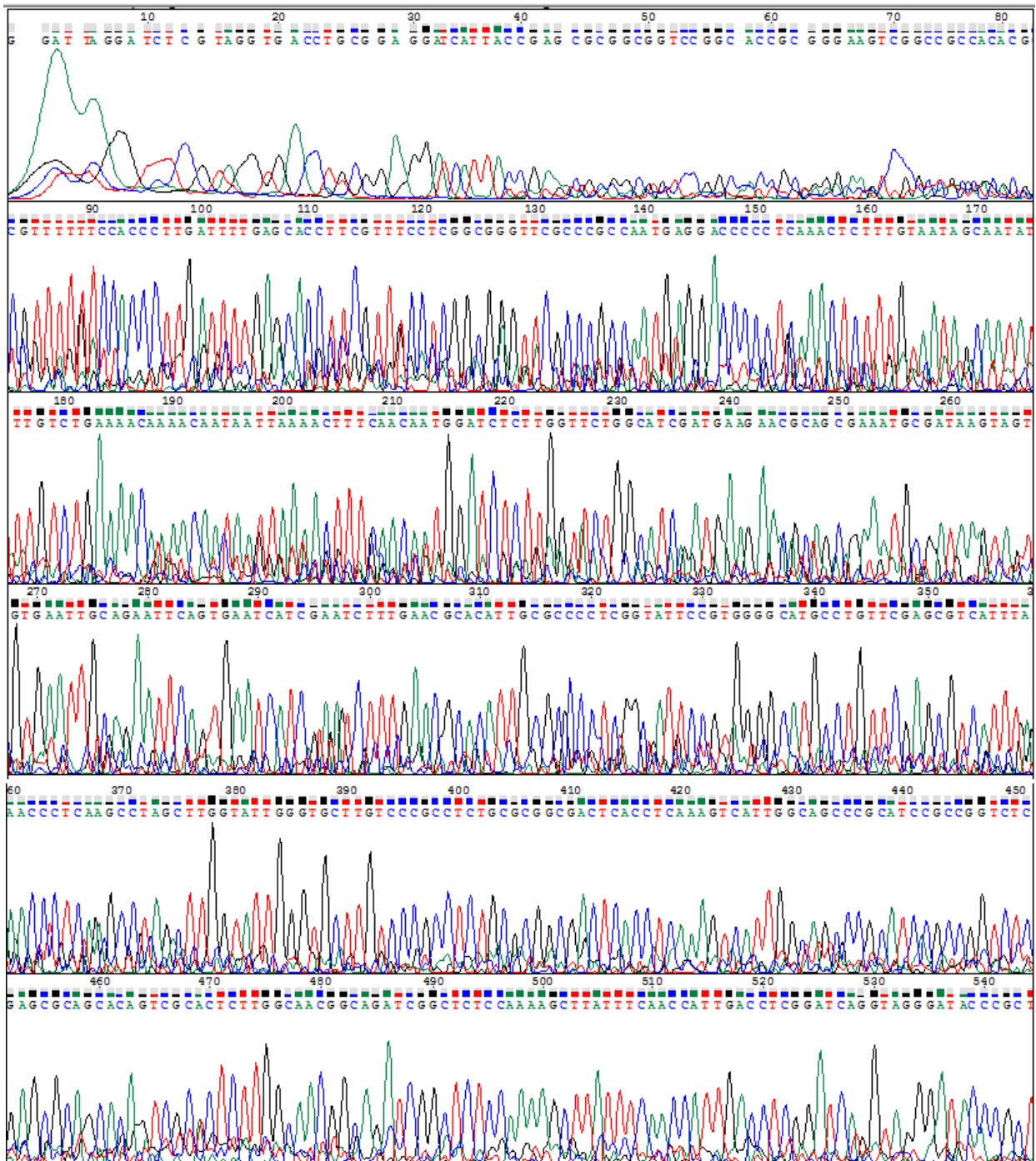


Figura 23. Electroferograma del producto amplificado por PCR (primers universales ITS1 e ITS4R) que abarca la región ITS1-5.8S-ITS2 de *H. vastatrix* de la muestra de la UNPA mediante secuenciación capilar con el oligonucleótido universal directo ITS1.

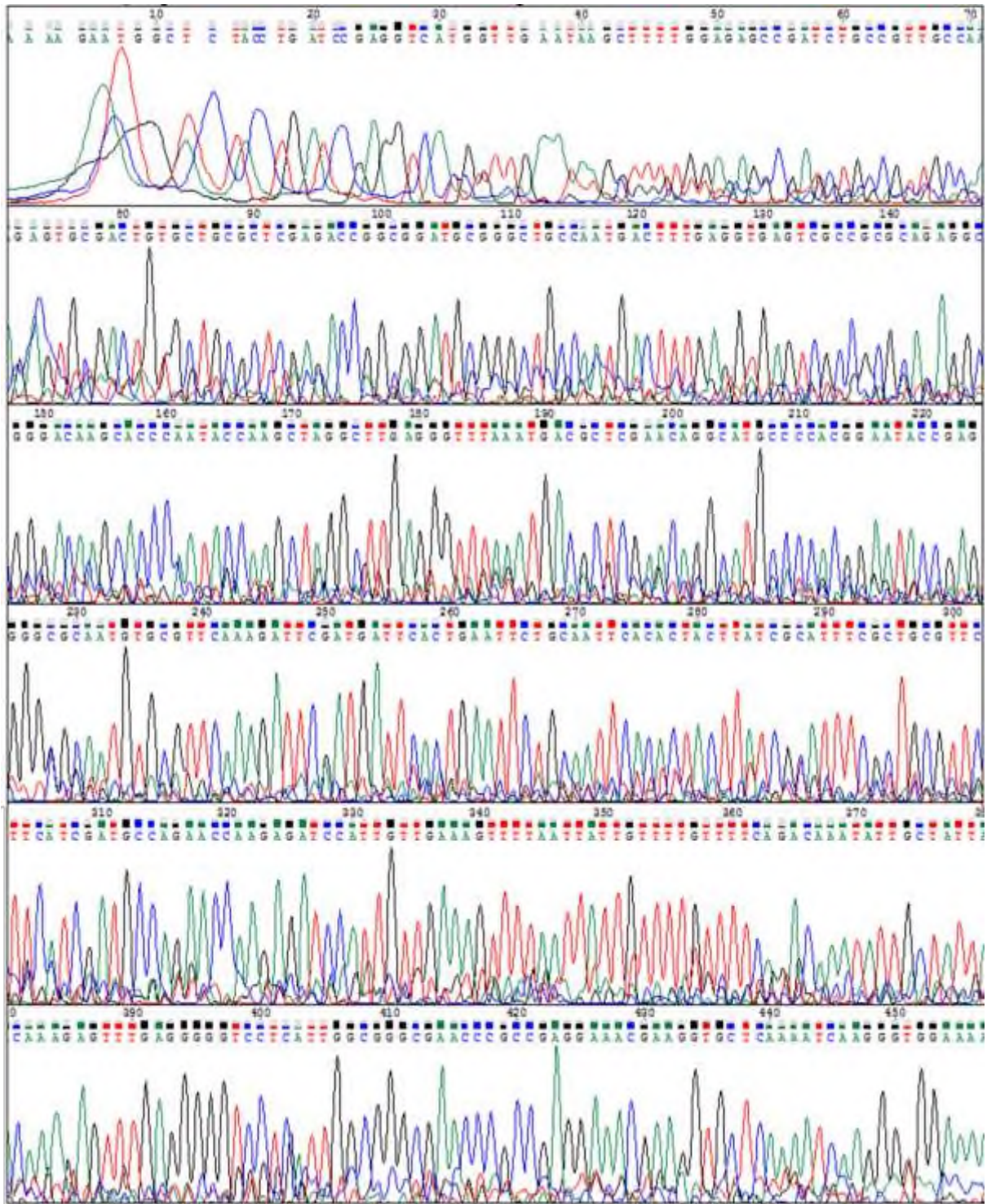


Figura 24. Electroferograma del producto amplificado por PCR (primers universales ITS1 e ITS4R) que abarca la región ITS1-5.8S-ITS2 de *H. vastatrix* de la muestra de Rancho Grande, mediante secuenciación capilar con el oligonucleótido universal reverso ITS4R.

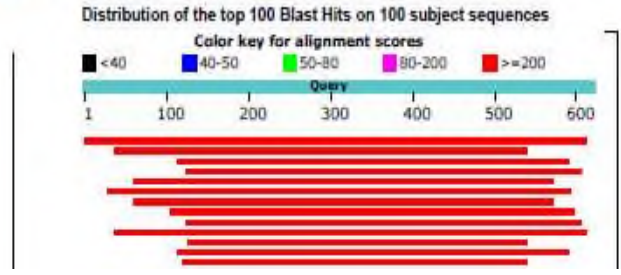
A partir del análisis de solapamiento de las dos cadenas secuenciadas, se obtuvo la secuencia consenso, la cual se empleó para realizar el blastn en bases de datos especializadas en identificación por ITS (Fig. 25), tomándose a consideración los más altos puntajes en los parámetros de identidad, cobertura y valor E. Además se consideraron los resultados obtenidos en las bases de datos mencionadas en la sección 5.5.

Si bien hay una especie con identidad predominante, las demás especies que se consideraron para la inferencia filogenética (Fig. 24), pertenecen a nivel de especie o género al complejo de micoparásitos identificados en lesiones características de roya (generalmente, más de una especie es capaz de parasitar las esporas de *H. vastatrix*, son parte de la microbiota que se encuentra en sinergia natural con el café, patógenas o especies ambientales que en conjunto intervienen en el metabolismo del café (Carrión y Rico-Gray, 2002; James, Marino, Perfecto y Vandermeer, 2015; James *et al.*, 2016).

Query ID |cl|Query_73227
 Description RUNPA
 Molecule type nucleic acid
 Query Length 607

Database Name rRNA_typestrains/ITS_RefSeq_Fungi
 Description Internal transcribed spacer region (ITS) from fungi type and reference material
 Program BLASTN 2.9.0+

Graphic Summary



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Parathyridaria ramulicola CBS 141479 ITS region; from TYPE material	713	713	98%	0.0	87.95%	NR_147657.1
Rousoella mukdahanensis MFLU 11-0237 ITS region; from TYPE material	686	686	82%	0.0	91.57%	NR_155722.1
Rousoella neopustulans MFLUCC 11-0609 ITS region; from TYPE material	671	671	77%	0.0	92.42%	NR_155715.1
Rousoella japonensis MAFF 239636 ITS region; from TYPE material	638	638	78%	0.0	90.72%	NR_155713.1
Pararousoella rosarum MFLU 17-0654 ITS region; from TYPE material	636	636	83%	0.0	89.55%	NR_157529.1
Rousoella solani ITS region; from TYPE material	632	632	92%	0.0	86.88%	NR_145198.1
Neoconiothyrium rosae MFLU 18-0117 ITS region; from TYPE material	627	627	83%	5e-100	88.24%	NR_157523.1
Rousoella siamensis MFLUCC 11-0149 ITS region; from TYPE material	616	616	80%	1e-176	89.49%	NR_155716.1
Rousoella verrucispora CBS 125434 ITS region; from TYPE material	610	610	78%	6e-175	89.69%	NR_155714.1
Thyridaria broussonetiae CBS 141481 ITS region; from TYPE material	592	592	93%	2e-169	85.96%	NR_147658.1
Rousoella Chianggrain MFLUCC 10-0556 ITS region; from TYPE material	579	579	67%	2e-165	92.07%	NR_155712.1
Rousoella thailandica MFLUCC 11-0621 ITS region; from TYPE material	564	564	77%	4e-161	88.24%	NR_155717.1
Parathyridaria percutanea CBS 868.95 ITS region; from TYPE material	540	540	88%	7e-154	90.02%	NR_147931.1

Figura 25. Resultados del Blastn en la sección del NCBI especializada en identificación molecular por ITS. El tamaño de la secuencia ingresada fue de 607 pb.

Mediante el árbol filogenético obtenido con el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) se logró ubicar con un valor bootstrap del 98% a la secuencia “Muestra Roya UNPA” con la especie *Rousoella mexicana* (Fig. 26). Esta inferencia filogenética es concordante dado que esta especie patógena tiene como huésped al café. *R. mexicana* es un hongo de forma globosa que se puede encontrar individualmente o formando agregados y fue aislada en manchas foliares de la variedad Caturra en Puebla, México (Crous *et al.*, 2015).

En los trabajos anteriores realizados por Cristancho *et al.*, (2007) y Quispe-Apaza *et al.*, (2017) se obtuvieron amplicones de 909-918 bp, usando el mismo par de oligonucleótidos empleados

en el presente trabajo (ITS1/ITS4R). En otros estudios de identificación molecular se han empleado las regiones 18S y 28S (Aime, 2006; Aime, Bell y Wilson, 2018).

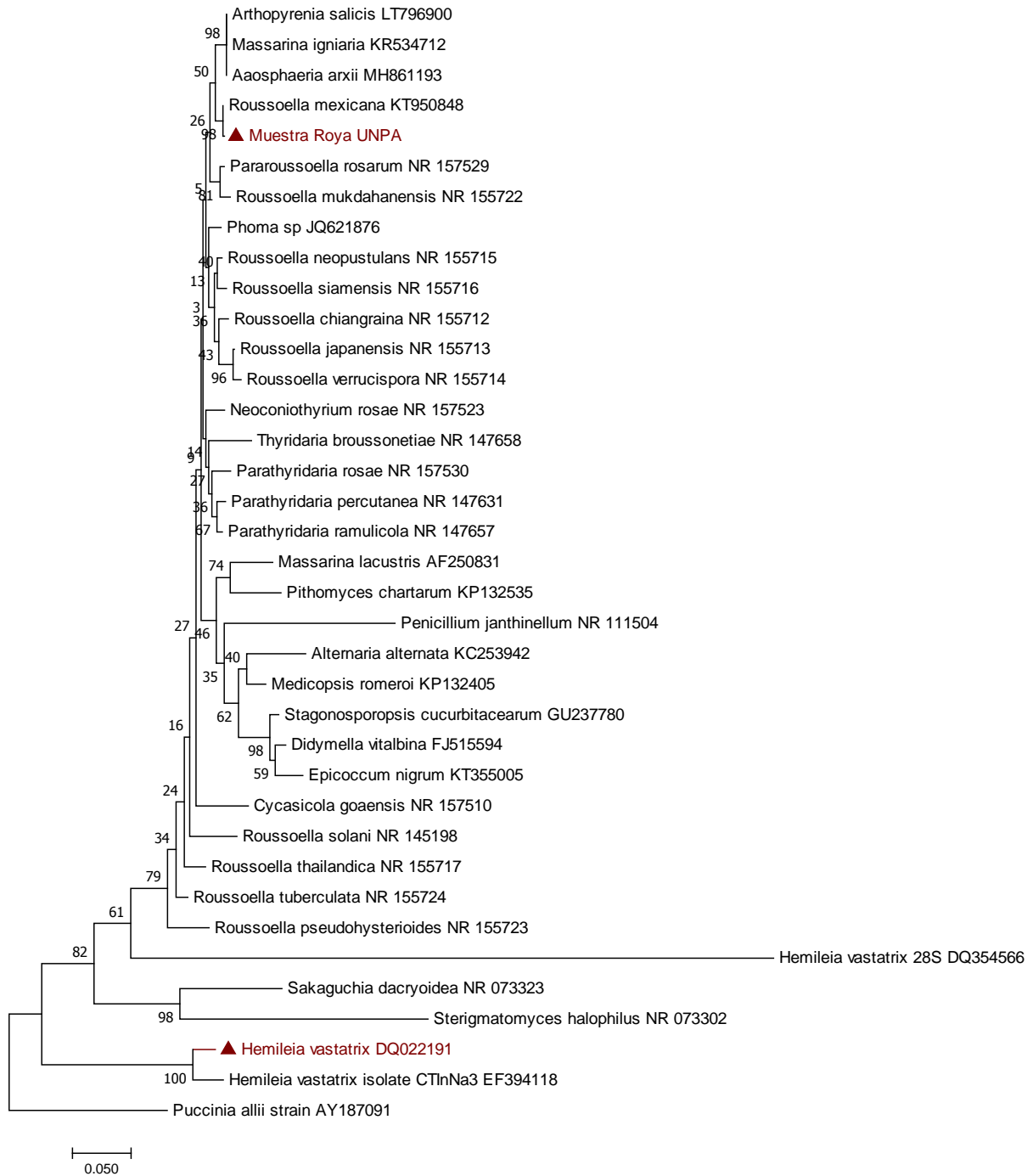


Figura 26. Relación filogenética de la muestra de roya colectada en la UNPA. Árbol filogenético elaborado con el método Neighbor Joining, enraizado para la roya con *Puccinia allii* (GenBank AY187091) (Anikster *et al.*, 2004) y con *Massarina lacustris* (GenBank AF250831) (Camara, Palm,

Berkum y Stewart, 2001) para *Rousoella* sp. En negritas está marcada la especie resultante de este trabajo (Muestra Roya UNPA) y la esperada, *H. vastatrix* (DQ022191) (Grasso *et al.*, 2006). La secuencia preponderante de esta secuenciación se identificó como *R. mexicana* (KT950848) (Crous y Groenewald, 2015). Los números de acceso están en seguida de los nombres de las especies y se seleccionaron por poseer identidades parciales en el análisis Blastn de identificación molecular.

En un segundo intento de amplificación con el mismo par de oligonucleótidos, se obtuvieron amplicones de entre 900-1000 bp (Fig. 27), siendo del tamaño esperado por reportes previos de identificación molecular por ITS de *H. vastatrix* (Cristancho *et al.*, 2007; Quispe-Apaza *et al.*, 2017).

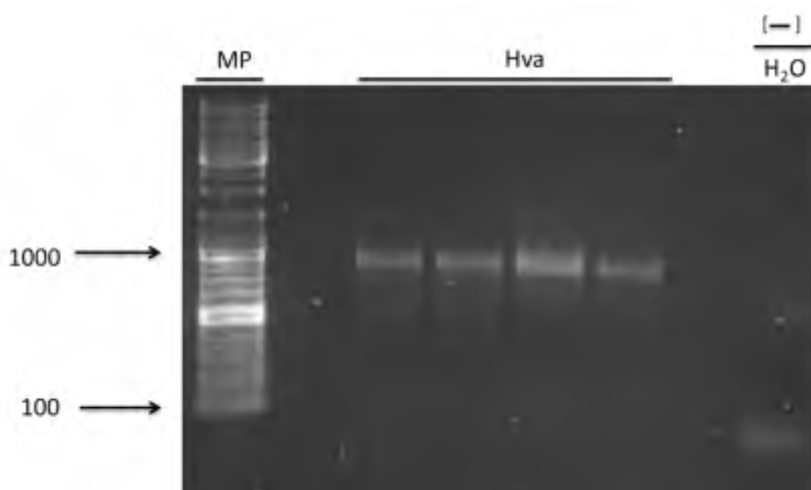


Figura 27. Gel de agarosa (2%) del producto de ITS obtenido en un segundo intento de amplificación. Se empleó el material biológico de Rancho Grande. La muestra se corrió en cuatro carriles diferentes. En esta ocasión la banda es de ~900 pb. Hva: Carriles con las muestras de DNAg de la roya del café. MP: Marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix.

Los resultados de la secuenciación del amplicón muestran una secuencia predominante que parece ser resultado de una mezcla de secuencias de ITS, para ello se consideraron las zonas mejor definidas y se usaron para el blastn. En cuanto a la secuencia directa, predominan especies del género *Cladosporium* spp., (Fig. 28) y en la secuencia reversa no hubo algún resultado significativo, no obstante al cambiar la base de almacenamiento de secuencias (de ITS a wgs) hubo un fragmento de ~35 bp que se alinea perfecta y únicamente con *H. vastatrix* (Fig.

29), aunque se trata de un fragmento de longitud limitada que no permite obtener resultados confiables en la identificación.

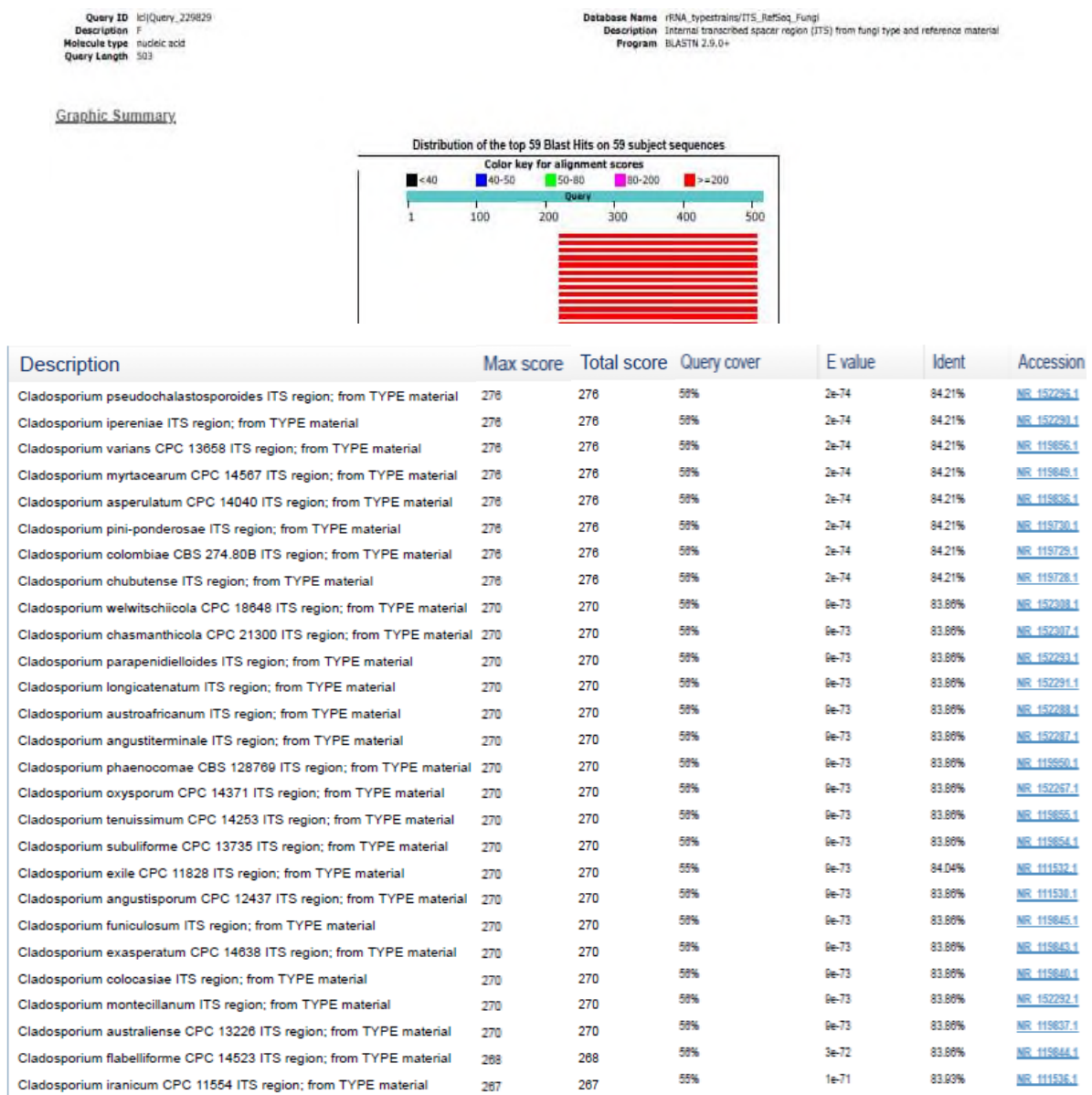


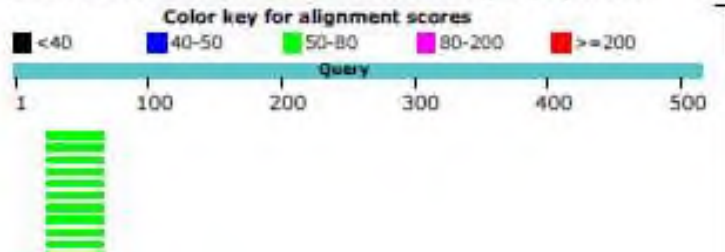
Figura 28. Blastn de la secuencia ITS1 en la sección del NCBI especializada para la identificación molecular de hongos. El tamaño de la secuencia ingresada fue de 503 pb.

Query ID |clj|Query_152737
Description |None
Molecule type |nucleic acid
Query Length |503

Database Name |nr
Description |Nucleotide collection (nr)
Program |BLASTN 2.8.1+

Graphic Summary

Distribution of the top 100 Blast Hits on 100 subject sequences



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Hemileia vastatrix isolate Coimbra_7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	73.4	73.4	7%	7e-09	100.00%	MF627828.1
Hemileia vastatrix isolate Coimbra_6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	73.4	73.4	7%	7e-09	100.00%	MF627827.1
Hemileia vastatrix isolate Coimbra_5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	73.4	73.4	7%	7e-09	100.00%	MF627826.1
Hemileia vastatrix isolate Coimbra_4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	73.4	73.4	7%	7e-09	100.00%	MF627825.1
Hemileia vastatrix isolate Coimbra_3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	73.4	73.4	7%	7e-09	100.00%	MF627824.1
Hemileia vastatrix isolate Coimbra_2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	73.4	73.4	7%	7e-09	100.00%	MF627823.1
Hemileia vastatrix isolate Coimbra_1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	73.4	73.4	7%	7e-09	100.00%	MF627822.1

Figura 29. Blastn de la secuencia ITS4R en la sección del NCBI especializada para la identificación molecular de hongos. El tamaño de la secuencia ingresada fue de 503 pb.

6.1.4 Identificación de las muestras de roya por secuenciación de la región ITS con primers específicos

En este trabajo se continuó considerando que *H. vastatrix* estaba presente dados los signos y síntomas característicos, pero que la metodología empleada no contaba con la sensibilidad/especificidad suficiente para su detección, dada la diversidad de especies encontradas en la muestra y la naturaleza de la secuenciación capilar.

Debido a que la identificación molecular de *H. vastatrix* mediante el empleo de primers universales no fue posible por tratarse de una mezcla de especies en la muestra de roya, se optó por emplear primers específicos para *H. vastatrix* reportados por James *et al.*, (2016). En las muestras de roya de Rancho Grande (RG) y la UNPA, se obtuvieron amplicones de tamaño esperado (~439 pb; Fig. 30).

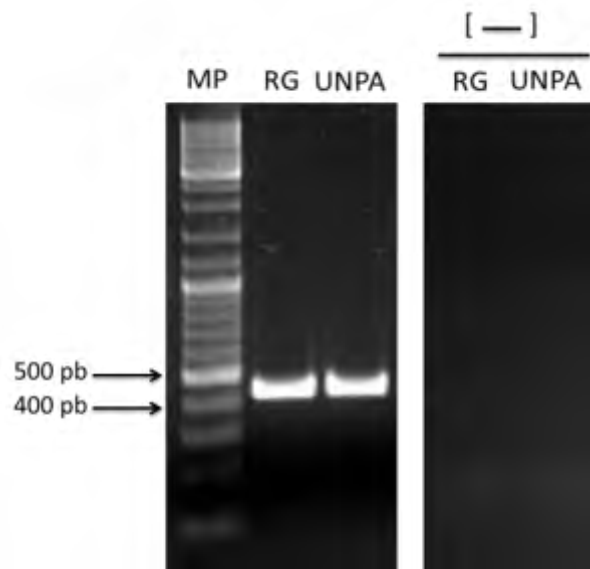


Figura 30. Gel de agarosa (2%) del producto de PCR del ITS de *H. vastatrix* obtenido con primers específicos en muestras de esporas colectadas en la UNPA y en Rancho Grande (RG). MP: Marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix. Los amplicones esperados de acuerdo a la literatura (James *et al.*, 2016) son de ~439 pb.

Después de la purificación, la concentración de los amplicones fue de 16.4 ng/ μ L para la muestra de Rancho Grande y de 14.8 ng/ μ L para la muestra de la UNPA. Del análisis de los electroferogramas de la secuenciación se observa que, a pesar de usarse primers específicos, aún existe una mezcla de secuencias (Fig. 31 y 32), tanto en la colecta de la UNPA y Rancho Grande. De tal forma, tanto el análisis con primers universales como específicos, indican que existen más de un hongo en las lesiones del café.

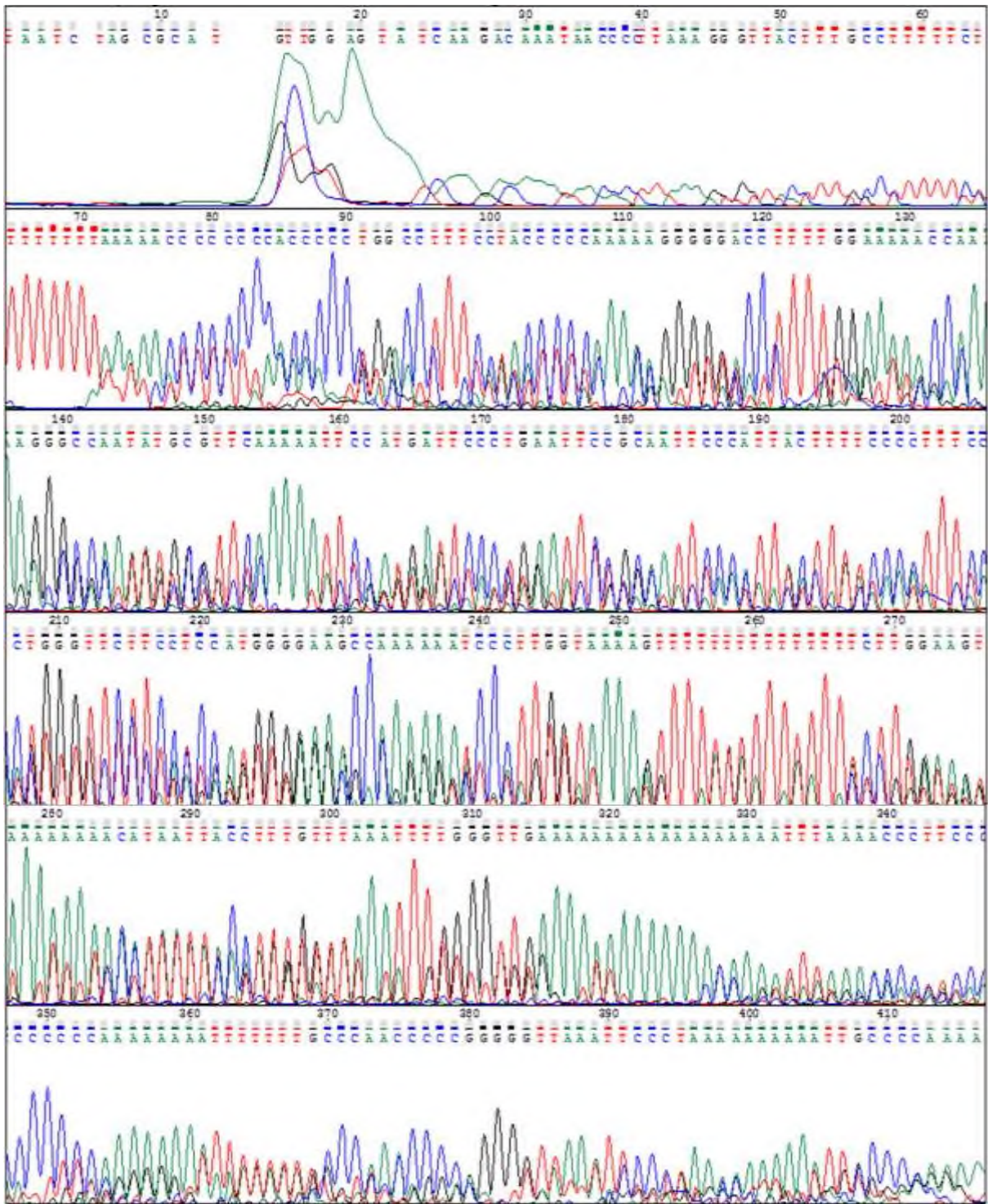
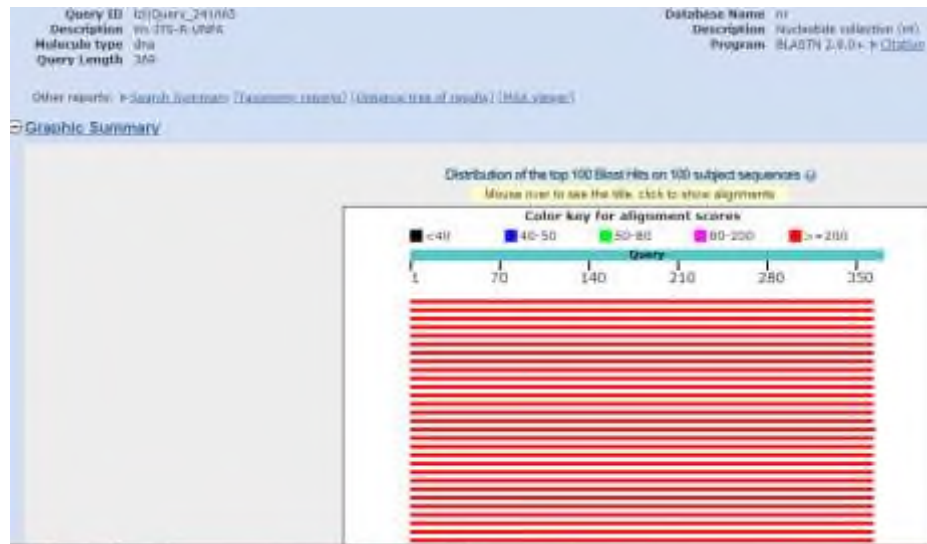


Figura 32. Electroferograma del producto amplificado por PCR (primers específicos Hv-ITS-F y Hv-ITS-R) que abarca la región ITS1-5.8S-ITS2 de *H. vastatrix* de la muestra de la UNPA mediante secuenciación capilar con el oligonucleótido específico reverso Hv-ITS-R.

Para realizar la comparación Blastn, se tomaron las bases con mayor intensidad de señal, para Rancho Grande (RG) fueron 400 pb y para la UNPA fueron 369 pb. En las figuras de blastn, se puede observar que las secuencias que corresponden a *H. vastatrix* son preponderantes teniendo una cobertura del 99% (Fig. 33) y 97% (Fig. 34), sin embargo el porcentaje de identidad es del 76% (Fig. 33) y 80% (Fig. 34). Lo anterior se debe a las características del método Sanger de secuenciación que está diseñado para analizar sólo una secuencia a la vez. De tal manera, este resultado indica que aunque *H. vastatrix* sí existe en las muestras colectadas, es necesario una metodología de secuenciación que permita observar la totalidad de la diversidad biológica.



Figura 33. Blastn de la secuencia Hv-ITS-F de la colecta de Rancho Grande. La secuencia ingresada fue de 400 pb.



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments: 0

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accessión
Hemilea vastatrix isolate CVPH-52 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	309	309	97%	4e-80	79.56%	GQ202961.1
Hemilea vastatrix isolate CVPH-33 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	309	309	97%	4e-80	79.56%	GQ202971.1
Hemilea vastatrix isolate Saco-1120 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	305	305	97%	2e-78	79.28%	FJ364129.1
Hemilea vastatrix isolate CVPH-35 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	304	304	97%	2e-78	79.01%	GQ202951.1
Hemilea vastatrix isolate CVPH-37 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	304	304	97%	2e-78	79.01%	GQ202973.1
Hemilea vastatrix isolate Saco-1120 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	304	304	97%	2e-78	79.01%	FJ364131.1
Hemilea vastatrix isolate CVPH-34 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	300	300	97%	2e-77	79.01%	GQ202953.1
Hemilea vastatrix isolate CVPH-31 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	300	300	97%	2e-77	79.01%	GQ202957.1
Hemilea vastatrix isolate CVPH-32 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	300	300	97%	2e-77	79.01%	GQ202959.1
Hemilea vastatrix isolate CVPH-36 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	300	300	97%	2e-77	79.01%	GQ202963.1
Hemilea vastatrix isolate CVPH-34 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	300	300	97%	2e-77	79.01%	GQ202965.1
Hemilea vastatrix isolate CVPH-34 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	300	300	97%	2e-77	79.01%	GQ202967.1
Hemilea vastatrix isolate Saco-1120 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	300	300	97%	2e-77	79.01%	FJ364133.1
Hemilea vastatrix isolate CT-7, 8 internal transcribed spacer 1, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	300	300	97%	2e-77	79.01%	FJ364135.1
Hemilea vastatrix isolate Aracopya, 8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.0S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	299	299	98%	9e-77	78.95%	GQ172344.1
Hemilea vastatrix isolate CT8e, 1 internal transcribed spacer 1, 5.0S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	299	299	97%	9e-77	78.73%	FJ364137.1

Figura 34. Blastn de la secuencia Hv-ITS-R de la colecta de la UNPA. La secuencia ingresada fue de 369 pb.

Para comprobar la pertenencia de estas secuencias a *H. vastatrix*, se realizó una inferencia genética con secuencias publicadas del ITS previamente reportados de *H. vastatrix* (Aime, 2006; Grasso *et al.*, 2006; Cristancho *et al.*, 2007; Pelayo-Sanchez y Yanez-Morales, 2017). Adicionalmente, se incluyeron las especies de los resultados de la secuenciación capilar

anterior, por ser parte del nicho ecológico del café (ver sección 6.1.3) y las dos especies con mayor representación del estudio metagenómico (*Sterigmatomyces halophilus* y *Sakaguchia dacryoidea*) de la sección 6.1.5.

La inferencia filogenética obtenida del programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) demuestra que las muestras tanto de Rancho Grande (Hv-ITS-F-RG) como de la UNPA (Hv-ITS-R-UNPA), pertenecen a la especie *H. vastatrix* (Fig. 35) con valores de bootstrap altos (68 y 58) además de agruparse a nivel de especie con los otros aislados de *H. vastatrix*. Con ello se comprueba la especificidad de los primers específicos para *H. vastatrix* y que este hongo se encuentra en las muestras de este trabajo.

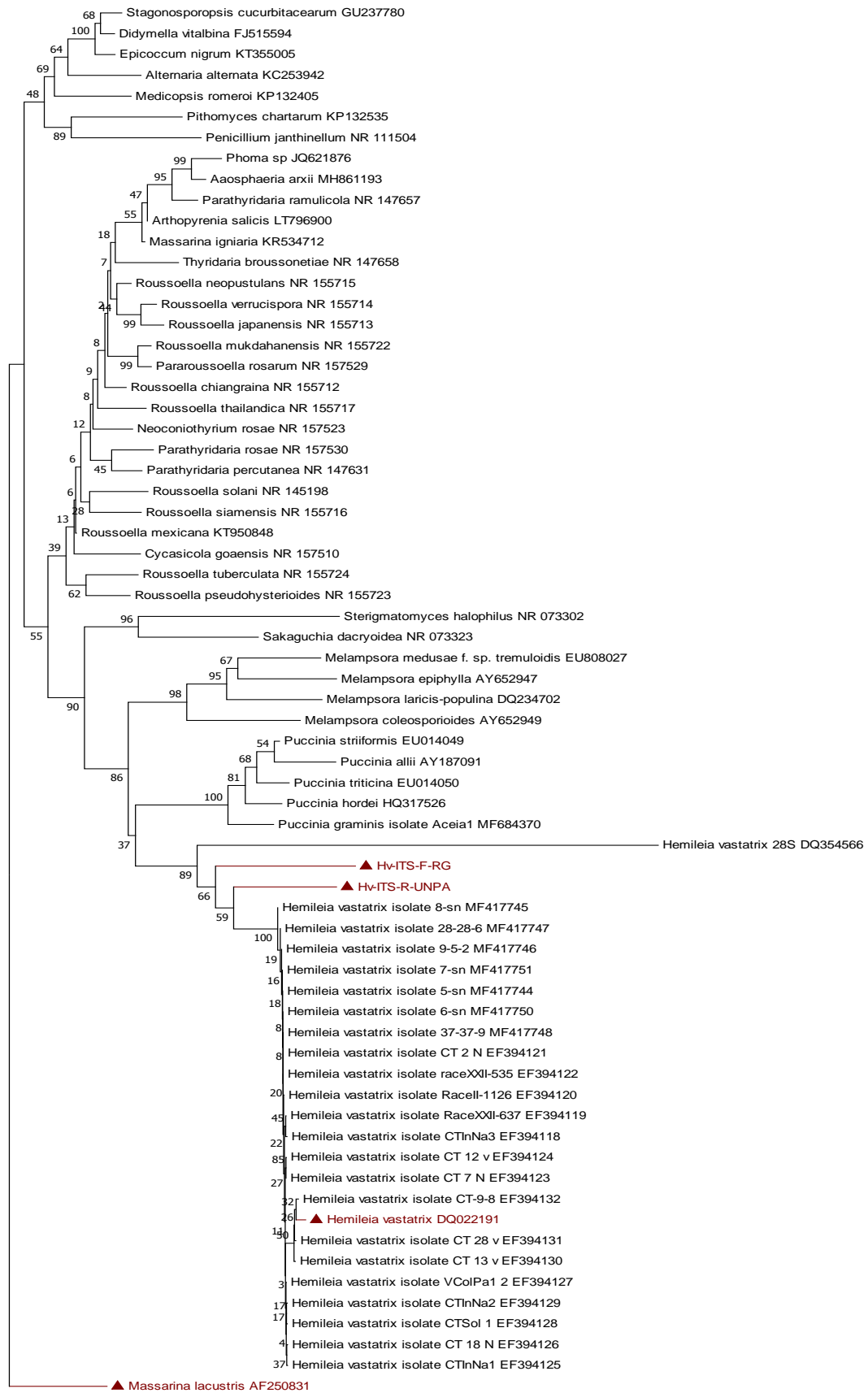


Figura 35. Relación filogenética de las muestras de roya de Rancho Grande y la UNPA, a partir de los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos específicos para *H. vastatrix* (James *et al.*, 2016). Árbol filogenético elaborado con el método Neighbor Joining, enraizado con *M. lacustris* (GenBank AF250831) (Anikster *et al.*, 2004). En negritas están marcadas las muestras resultantes de este trabajo (Hv-ITS-F-RG y Hv-ITS-R-UNPA), la secuencia con la que se enraizó el árbol (*M. lacustris*) y la secuencia de ITS de referencia reportada para *H. vastatrix* (DQ022191) (Grasso *et al.*, 2006), además de su secuencia 28S que contiene la región 5.8S e ITS2 (Aime, 2006). Los números de acceso están en seguida de los nombres de las especies y fueron seleccionadas con los mismos criterios de la Figura 26 (Aime, 2006; Cristancho *et al.*, 2007; Pelayo-Sanchez y Yanez-Morales, 2017).

6.1.5 Secuenciación por MinION

Debido a resultados de secuenciaciones con primers universales y dada la imposibilidad de obtener cultivos axénicos de *H. vastatrix*, se concluyó que siempre se obtendrán resultados de una muestra que contiene diversas especies, en cuyo caso, la secuenciación capilar o Sanger del producto de PCR no discrimina entre mezclas, por su naturaleza. Además, anteriormente empleando la secuenciación SMRT (Secuenciación a tiempo real de una única molécula de DNA por PacBio) y el mismo par de primers universales (ITS1F/ITS4R), no fue factible la amplificación del ITS de *H. vastatrix*, y por lo tanto, esta especie resultó subrepresentada en las lesiones de roya (James *et al.*, 2016). Las clases predominantes en el estudio por James *et al.*, (2016) fueron Sordariomycetes y Dothideomycetes, a pesar de que la biomasa fúngica de la roya del café era predominante en la muestra. Además se encontraron menos especies en las hojas con lesiones de roya a las que estaban libres de ésta. Muchas especies encontradas no se encuentran relacionadas a la roya del café pero pueden estar implicadas en el triángulo de esta fitoenfermedad de forma directa o indirecta (James *et al.*, 2016).

Con este conocimiento previo, en este trabajo se optó por un análisis metagenómico mediante la técnica MinION con la intención de caracterizar la microbiota de las lesiones de roya. Se empleó DNAg de la muestra de Rancho Grande, Valle Nacional, obteniendo dos bandas de 800-1,000 pb (Fig. 36), tomándose en consideración este rango en base a trabajos previos de identificación filogenética de *H. vastatrix* (Cristancho *et al.*, 2007; Quispe-Apaza *et al.*, 2017).

Estas se cortaron y purificaron por el kit GeneJET Gel Extraction. Se enviaron 0.17 μg del producto purificado (33.9 $\text{ng}/\mu\text{L}$) y 1.4 μg (281.9 $\text{ng}/\mu\text{L}$) de DNAg a la empresa ALPHAGEN para su secuenciación metagenómica.

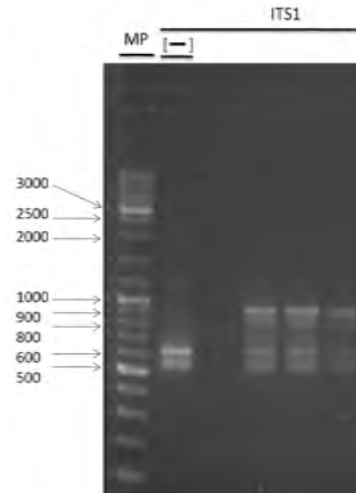


Figura 36. Gel de agarosa (2%) de la amplificación del ITS de la muestra de roya del café de Rancho Grande, para la secuenciación metagenómica. MP: GeneRuler DNA Ladder Mix.

Como resultado de la secuenciación metagenómica de dichos amplicones, se obtuvo el diagrama de la Fig. 37a, en el que se identificaron a 10 especies, siendo *Fusarium aethiopicum* y *Hannaella pagnoccae* las especies predominantes, con un 17% de representación cada una.

Se realizó un segundo análisis por iniciativa de ALPHAGEN empleando primers diseñados para identificación molecular de hongos. Dichos primers fueron diseñados por la empresa con fines comerciales, por lo que no es posible revelar la secuencia. En la Fig. 37b se muestran los resultados del análisis, en donde se especifica la identificación de 18 especies, siendo las más abundantes *Wallemia canadiensis* y *Sterigmatomyces halophilus* con un 20% de representación cada una. La única especie presente en ambas identificaciones fue *S. halophilus*, una levadura presente en áreas marinas (Mycobank, s.f), por lo cual el que haya sido encontrada en nuestra muestra es desconcertante, aunque puede tratarse de un artefacto.

Las demás especies son hongos cosmopolitas, endófitos del café, géneros de especies micoparásitas o viajeros accidentales del café, (Santos y Tavares, 2017; Wang, Liu, Crous y Cai, 2017; Muller *et al.*, 2009; Mycocosm, s.f.). Con estos resultados, se repite la observación del trabajo previo referido (identificación molecular de *H. vastatrix* en base al ITS por primers universales), para la detección molecularmente de *H. vastatrix* en las lesiones de roya que cuentan con una diversidad de organismos. En la Tabla 16 se enlistan los géneros predominantes identificados del estudio metagenómico y su relación con *Coffea arabica* o con otros organismos que interactúan con la planta.

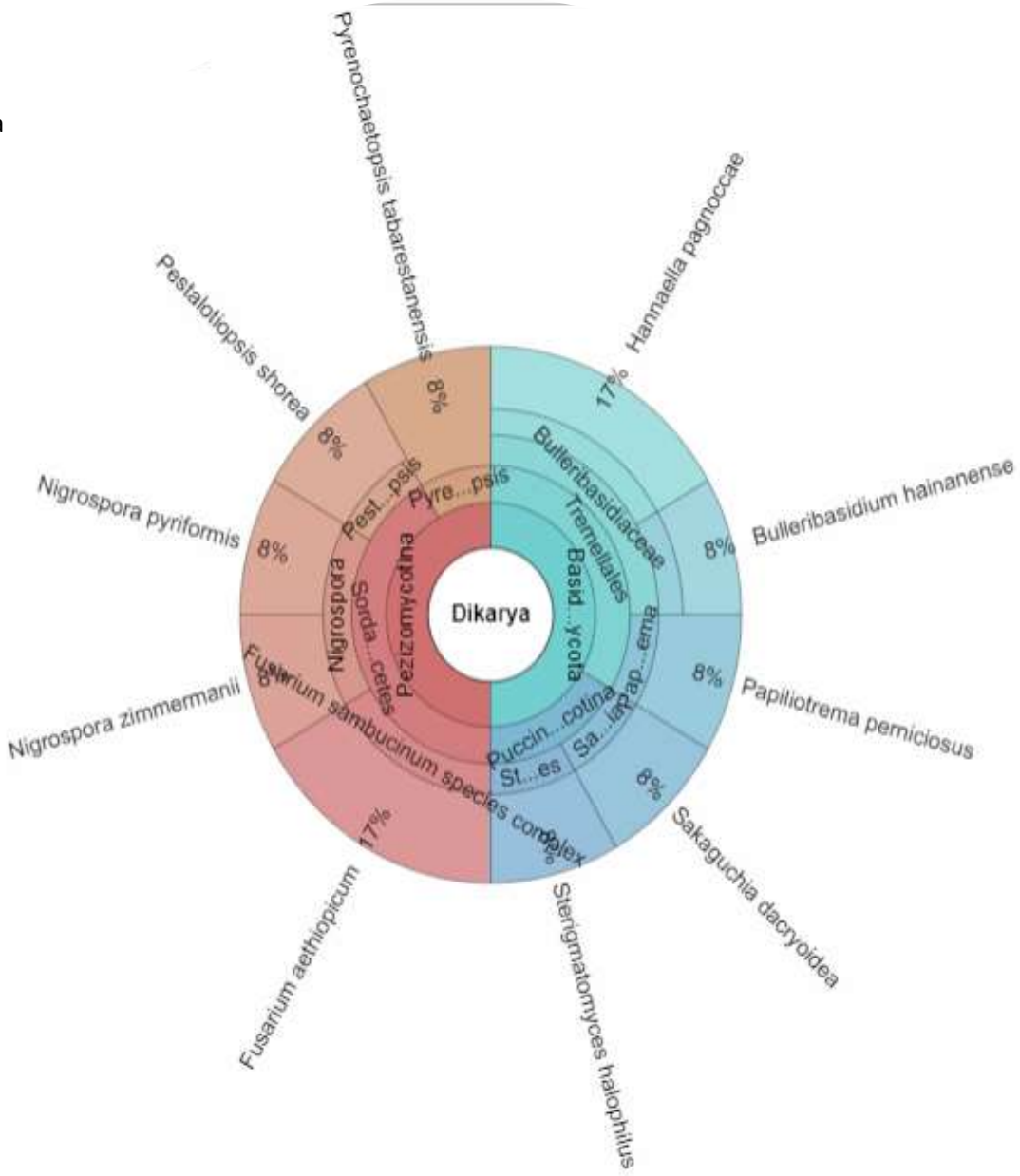
Adicionalmente se esquematizan dos alineamientos de las especies con mayor % de representación obtenidas en este estudio metagenómico (Fig. 38).

Tabla 16. Especies identificadas mediante secuenciación metagenómica MinION

Organismo	Tipo de secuenciación	Representación	Relación con <i>Coffea</i>	Referencia
<i>Penicillium spp.</i>	Metagenómica	3%	Endófitos	Vega <i>et al.</i> , (2006).
<i>Cladosporium spp.</i>	Metagenómica	25%	Micoparásitos	James <i>et al.</i> , (2016).
<i>Fusarium spp.</i>	Sanger	17%	Micoparásitos	Haddad <i>et al.</i> , (2014).
<i>Aspergillus spp.</i>	Sanger	3%	Micoparásitos	Haddad <i>et al.</i> , (2014)

Estudio metagenómico de la muestra de roya de café: a) con los oligos ITS1 e ITS4R b) Con los oligos de la empresa ALPHAGEN.

a



b

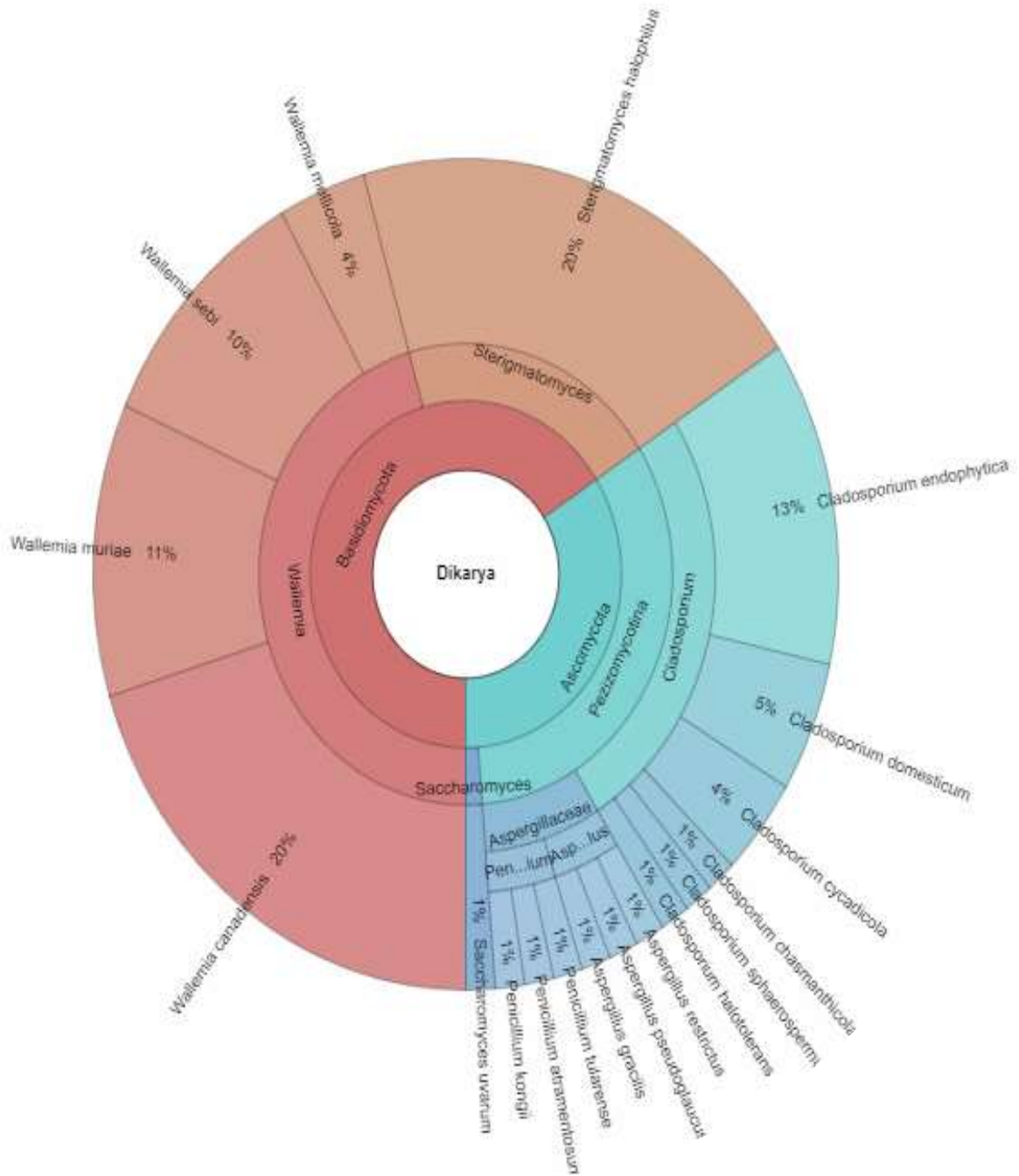


Figura 37. Resultados del estudio metagenómico del ITS a) Muestra de roya del café, % de representación de las especies mediante el programa Krona™. b) Resultados del estudio metagenómico en el cual la empresa amplificó *de novo* el ITS con los oligos ITS de la compañía. % de representación de especies encontradas en la muestra en el programa Krona.

```

Lambda      K      H
  0.634    0.408  0.912

Gapped
Lambda      K      H
  0.625    0.410  0.780

```

Effective search space used: 2332934848

a

```

Query= 812421ef3-7e7a-419d-a4ec-013c0ddf861e
runid=2283ebfd21dfcf84dc2100e8c84e66a2686a6e4a sampleid=drab2
read=35904 ch=187 start_time=2019-02-14T23:05:34Z

```

Length=1295

```

Sequences producing significant alignments:
                                     Score      E
                                     (Bits)    value
  NR_073302.1 Sterigmatomyces halophilus CBS 4609 ITS region; fro... 549      3e-156

```

```

> NR_073302.1 Sterigmatomyces halophilus CBS 4609 ITS region; from
TYPE material
Length=656

```

```

Score = 549 bits (608), Expect = 3e-156
Identities = 427/485 (88%), Gaps = 33/485 (7%)
Strand=Plus/Minus

```

```

Query 547  TATATA-ATTC--CTTGTGGCCATTTCCTCCAGCAGTTCTGCTAGCGCATT---GCAA 600
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 470  TATATAGATTACAGCTTGTGTG--ATTTCAATCCAGCAGTTCTGCTAGCGCATTACTGEAA 413

Query 601  AGATCATGATC--AAGCCCAAGCTGCCATACGCAATAAAGCATEGAGCGGGGTTGAGAGT 659
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 412  AGATCATGATCCAAAGCCCAAGCTACCCACACGCAATAAAGCATEGAGCGGGGTTGAGAGT 353

Query 660  TTCCGCGAC--CTCAAACAGGCATACTCTCGATATTGATTCGAG--TGCA-GATCGTTCA 715
          |||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 352  TTC-GCGACACTCAAACAGGCATACTCTCGATAGTGATTCGAGAGTCAAGATCGTTCA 294

Query 716  AAGATTCAAGATGATTCAGTACTCTGCAATTCACACATTACATTTCTCGCGTTTTCA 775
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 293  AAGATTTCG--ATGATTCAGTGAAT-TCGCAATTCACA--TTACATTTCCCG--TTTCG 242

Query 776  ACTGCGTTCTTCATCGATACGAGAGCCCAAGAGATCCACC GTTTGTAGTTGTTTTACAA 835
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 241  -CTGCGTTCTTCATCGATACGAGAG--CCAAGAGATCCACC GTTTGTAGTTGTTTTACAA 185

Query 836  CTTATTTCAAATTC--ATTCACATCTGGACTTGATTAAAATCAC AAGGTACCACAGAAA 894
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 184  CTTATT--CAAATTCGATTCACATCTGGACTTGATYAAAATCAC AAG--AGCTTTTCAAA 128

Query 895  CTCTCCC GAAGGAAAGATGAAAAATGT-TACAAGTGTGAAGTGGATT-AGAAATGGGGC 952
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 127  CTCTCCC GAAGGAAAGT AGGAAAAATGTGCAAGTGTGAAGTGGATT AAGAAATGGGGC 68

Query 953  CTATCTCAATATTTCCAGAGTCGAGCGCCCGAATTCATTAGTCAATGTTCC--CAGGTTAC 1010
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 67  CGATCTCAATATTTCCAGAGTCGAGCGCCCGAATTCATTAAATGATCC TTCCGAGGTTCA 8

Query 1011 CTACG 1015
          |||||
Sbjct 7  CTACG 3

```

```

Lambda      K      H
0.634      0.408  0.912

Gapped
Lambda      K      H
0.625      0.410  0.780

Effective search space used: 2835907040

Query= @d6262136-4b02-4c0e-9de6-3a88060e02ca
runId=2283ebfd21dfcf84dc2100e8c84e66a2686a6e4a sampleId=drab2
read=84961 ch=431 start_time=2019-02-15T00:09:58z

Length=641

Sequences producing significant alignments:
                                     Score      E
                                     (bits)    Value
NR_155961.1 wallenia canadensis MUCL 15061 ITS region; from TYP... 672      0.0
NR_155952.1 wallenia mellicola CBS 633.66 ITS region; from TYPE... 668      0.0
NR_131988.1 wallenia sebi CBS 818.96 ITS region; from TYPE mate... 659      0.0
NR_132075.1 wallenia muriae CBS 116828 ITS region; from TYPE ma... 612      1e-175

> NR_155961.1 wallenia canadensis MUCL 15061 ITS region; from TYPE
material
Length=493

Score = 672 bits (744), Expect = 0.0
Identities = 464/505 (92%), gaps = 25/505 (5%)
Strand=Plus/Minus

Query  53  GTCGATTTGATC--GTTTGTGGCCAATGGCAGTT--GAAGCAATCACTACAAATTACCCCA 110
      |||
Sbjct  492  GTCGATTTGATCAGGTTGTT--GCCAATGGCAGTTAGAGCAATCACTACAAATTACTA--A 435

Query  111  GGCGAGATTACTCTCTGACTGGTGGATGTAATCEATTATAACACACAGTATTAACCC 170
      |||
Sbjct  434  GGCGAGATTACTCTCTGACTGGTGGATGTAATCCATTATAACACACAGTATTAACCC 375

Query  171  ATTCATAAGGTCATCGCTAATTATTTT--AGGGAGTCATTGTTTATATGACAACCTCAAA 228
      |||
Sbjct  374  ATTCATAAGGTCATCACTAATTATTTTAAAGGGAGTCATTGTTTATATGACAACCTCAAA 315

Query  229  ACCCACAAATCAATTTAAAAAATACTAATTATGGAGATGTTTCGCGACGCTCAAAACAGCAG 288
      |||
Sbjct  314  ACCCTCAACTAATTTTAAAAAATACTAATTGTTGGAGATGTTTCGCGACGCTCAAA--CAG 258

Query  289  ACGTACTCTACGGGAATACATAGGGGTGCCATTTGCGTTCAAGATTCGATGATTC--CTG 347
      |||
Sbjct  257  ACGTACTCTACGGGAATACCATA--GAGTGCCATTTGCGTTCAAGATTCGATGATTCACCTG 199

Query  348  TATCTGCAATTCACATTGCTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCTGAACCA 407
      |||
Sbjct  198  TATCTGCAA--TTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCTGAACC-- 141

Query  408  AAGAGATCCGTTACTGAAAAGTTTTATTAACATTTTAATATTTCA--AGC--AACTGCTT 463
      |||
Sbjct  140  AAGAGATCCGTTGCTG--AAAGTTTTATAAACTTTTAATATTTCAACAGCTTAACCTGCTT 82

Query  464  GGACATTCTAGTAAACATTTTAAAAACAGTGGTTTTGTATAGAAGATTAT--GGTTTTTA 521
      |||
Sbjct  81  GGACATTCTAGTAAACA--TTTTAAAAACAGTGGTT---TGTAGAAGATTATGAGTTTTTTA 26

Query  522  CACTCAATAATTAATC--GTAATGAT 545
      |||
Sbjct  25  CACTCAATAATTAATCACTAATGAT 1

```

b

Figura 38. Alineamientos de las especies con mayor representación del estudio metagenómico en blastn.

a) *Sterigmatomyces halophilus*. b) *Wallemia canadensis*.

6.2 Secuenciación de DCLs de *Hemileia vastatrix*

De acuerdo a los resultados de secuenciación de productos obtenidos a partir de las muestras de roya del café, se obtuvo evidencia de que se trata de una infección mezclada. Sin embargo, dado que se ha reconocido a *H. vastatrix* como el agente causal, que por sí solo es capaz de producir lesiones de roya en la planta de café, se continuó con el objetivo de secuenciar de forma específica sus genes codificantes de DCLs.

6.2.1 Amplificación de DCLs con oligonucleótidos específicos

Una primera aproximación hacia la amplificación de DCLs de *H. vastatrix* consistió en realizar una búsqueda en bases de datos para investigar si existen DCLs reportados para esta especie. Como resultado de la búsqueda, se encontró el Contig 148667, que contiene el núcleo catalítico presente en la estructura típica de la proteína DICER, de acuerdo a lo mostrado en la sección 5.5.1. A partir de este contig se diseñaron los oligonucleótidos específicos enlistados en la Tabla 17.

Tabla 17. Secuencias de los oligonucleótidos específicos empleados.

Primer	Dominio	Secuencia	Tamaño (bp)
HvaDCL-F1	Helicasa	CAAATGGTGGATGTGGAATG	20
HvaDCL-F2	dsRBD	ATAGCGAAAATTGGGCAAC	19
HvaDCL-R1	RNasaIII	GCCAGCTTAAGAAAAGCATCA	21

En la Tabla 17 se presentan tres oligonucleótidos específicos. El oligonucleótido 1 y 2 son directos, mientras que el 3 es reverso. Con este trío de oligonucleótidos se esperaba obtener dos productos. En primer lugar, con los oligonucleótidos 1 y 2 se obtendría un producto (F1) de 2901 pb. Con los oligonucleótidos 1 y 3 se obtendría un producto (F2), de 1885 pb aproximadamente (Fig. 39).

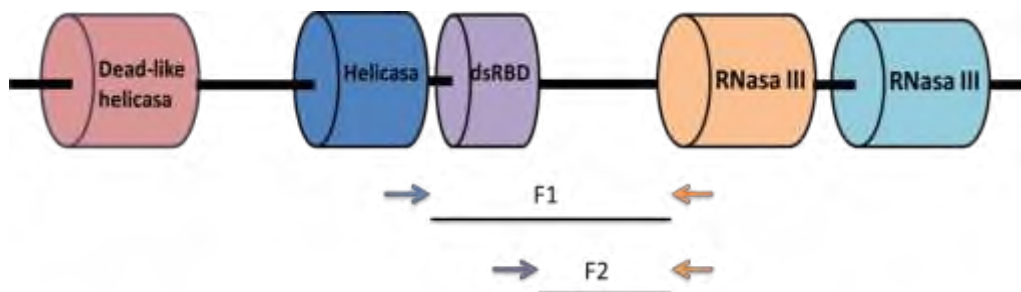


Figura 39. Localización de los oligonucleótidos específicos y productos esperados de la amplificación de DCL.

Para verificar la utilidad y parámetros óptimos de los oligonucleótidos diseñados, se procedió a la amplificación los dos productos F1 y F2, empleando DNAg de la muestra obtenida en la UNPA campus Tuxtepec. Esta prueba no rindió los resultados de amplificación deseados (Fig. 40). La única muestra amplificada corresponde a un producto de aproximadamente 650 pb (ITS) tanto en el control positivo como negativo, siendo el último un factor no deseable y debido a la contaminación con hongos ambientales.

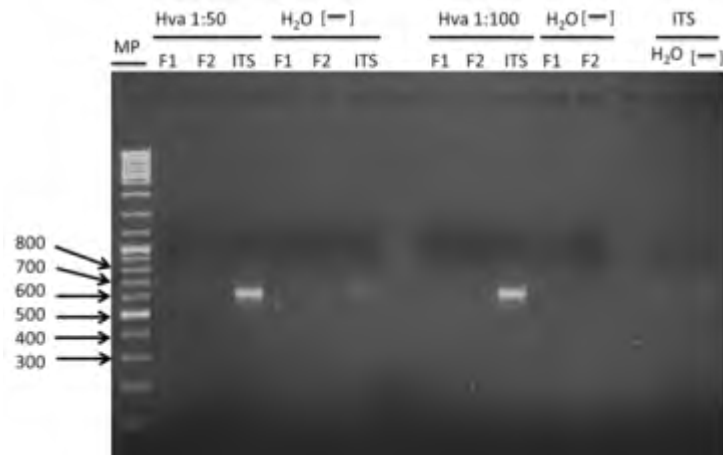


Figura 40. Gel de agarosa (1%) de los amplicones F1 y F2. Se percibe la amplificación del control en las dos diluciones. MP: GeneRuler DNA Ladder Mix.

Debido a que no se obtuvo la amplificación de los productos, se procedió a realizar nuevas reacciones de PCR empleando para este fin DNAg de la muestra de roya colectada en Rancho Grande, Valle Nacional. Como resultado a partir de DNAg los oligonucleótidos diseñados no amplificaron el producto F1, pero esta vez se obtuvo una banda nítida de alrededor de 2,000 2,500 pb para el amplicón F2 siendo acorde a lo esperado, y dos bandas de distinto peso molecular adjudicadas a la amplificación incompleta o inespecífica del segmento diana (Fig. 41).

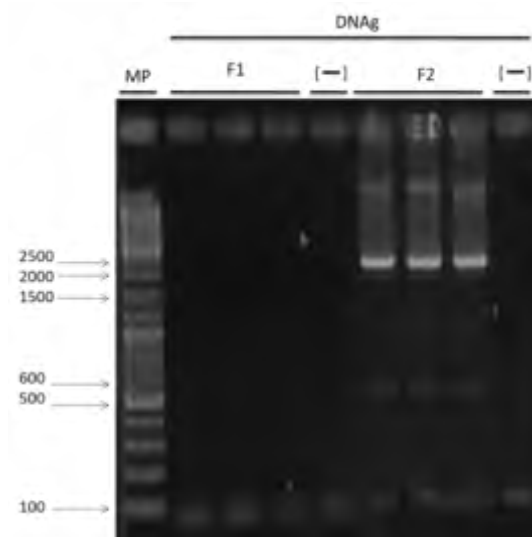


Figura 41. Gel de agarosa (1%) de los productos F1 y F2 amplificados con oligonucleótidos específicos, empleando DNAg de *H. vastatrix* de Rancho Grande, Valle Nacional. MP: GeneRuler DNA Ladder Mix.

Las bandas obtenidas del amplicón F2 (Fig. 41) se purificaron (GeneJET Gel Extraction Kit) para enviarse a secuenciar. Los resultados de la secuenciación se muestran más adelante, en la sección 6.2.5.

Con la finalidad de amplificar el producto F1, se realizaron reacciones empleando la enzima DreamTaq Green PCR (K1081, ThermoFisher Scientific). Como resultado se obtuvieron ambos amplicones, F1 y F2 (Fig. 42). Los controles negativos evidencian la ausencia de amplificación inespecífica (Fig. 42). El amplicón F1 obtenido en esta prueba se purificó a partir del gel para enviarse a secuenciar. Los resultados de la secuenciación se presentan en la sección 6.2.5.

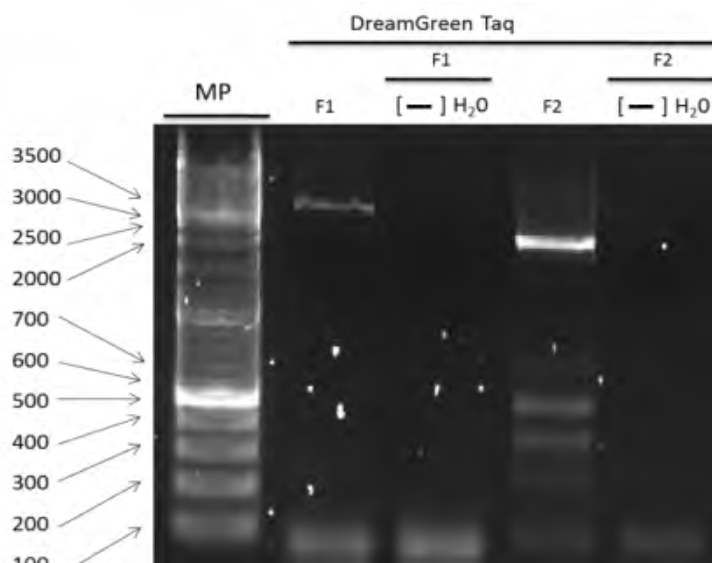


Figura 42. Gel de agarosa (1%) de los productos F1 y F2 amplificados con oligonucleótidos específicos (Hva-DCL-F1, Hva-DCL-F2 y Hva-DCL-R1), a partir de DNAG de *H. vastatrix* de Rancho Grande, Valle Nacional. MP: GeneRuler DNA Ladder Mix.

6.2.3 Amplificación de DCLs con oligonucleótidos degenerados

Dado que es probable que exista más de un gen DCL en el hongo, fue necesario implementar un ensayo de PCR empleando oligonucleótidos que permitieran mayor flexibilidad para amplificar la diversidad de genes DCL presentes en *H. vastatrix*. Para este fin se diseñaron oligonucleótidos degenerados de acuerdo a lo especificado en la sección de Materiales y Métodos. En las Figs. 43-46 se muestran alineamientos y las regiones empleadas para el diseño de los oligonucleótidos degenerados en los dominios de interés.

Pgraminis	LAGHGGGNENDLLIGIKMDSRAONKTVAKFRTGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDOITT
Pgraminis_1	LTGHGSGNENDLIGIKMDSRTONRTVAKFRTGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
Pgraminis_2	LTGHGSGNENDLIGIKMDSKTONRTVAKFRTGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
Pstriiformis	LTGHGGHNENDIIGIKMDSRTOKKTVAKFRTGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
Pcoronata	LTGHGASHEIDLIGIKMDSKTONKTVEKFRAGEHNLTIVTSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITS
Pcoronata_1	LTGHGASHEIDLIGIKMDSKTONKTVEKFRAGEHNLTIVTSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITS
Pgraminis_3	LTGHAGGNVNDLIGIKMDSRTONKAVAKFRTGEYNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
Pgraminis_4	LTGHAGGNVNDLIGIKMDSRTONKAVAKFRTGEYNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
Ptriticina	LTGLSGGNETDSLIGIKMDAKTONKNVAKFRTGEHNLIATNV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDEITT
Ptriticina_1	LTGHGGSKENDLIGIKMDORSONKTVAKFRTGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
Mlarici-populin	LTGHGGTVASSGGNRGMDSKSONOTVEKFRNREINLAIATNV	AEEGLDF	RACRLVIRFDDITT
Pstriiformis_1	LIGHGGGSVND SAR NK MDSKSONETVAKFKTGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDOIST
Ptriticina_2	LTGLSGGNETDSLIGIKMDAKTONKNVAKFRTGEHNLIATNV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDEITT
Pcoronata_2	LTGHGASHEIDLIGIKMDSKTONKTVEKFRAGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITS
Pcoronata_3	LTGHGASHEIDLIGIKMDSKTONKTVEKFRAGEHNLIATSV	AD	-----
Pcoronata_4	LTGHGTSHEIDLIGIKMDSKTONKTVEKFRAGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITS
Pcoronata_5	LTGHGASHEIDLIGIKMDSKTONKTVEKFRAGEHNLTIVTSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITS
Ptriticina_3	LTGHGGGNERDLSA IK MDSKT --- TVAKFRTG ENNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
Pstriiformis_2	LTGHGGHNENDIIGIKMDSRTOKKTVAKFRTGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
Psorghi	LTGHGAGNEVDLIGIKMDSKTONKTVAKFRTGEHNLIATSV	AEEGLDF	RACRVIRFDLITT
Ptriticina_4	LTGHGGGNERDLSA IK MDSKTONKTVAKFRTG ENNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
Ptriticina_5	LTGHGGSKENDLIGIKMDORSONKTVAKFRTGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
Ptriticina_6	LTGHGGSKENDLIGIKMDORSONKTVAKFRTGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
Pstriiformis_3	LIGHGGGSVND SAR NK MDSKSONETVAKFKTGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDOIST
Pstriiformis_27	LTGHGGHNENDIIGIKMDSRTOKKTVAKFRTGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
Pstriiformis_PS	LTGHGGHNENDIIGIKMDSRTOKKTVAKFRTGEHNLIATSV	AEEGLDF	ASCRVWIRFDLITT
cons	* * . . ** :: * ** : * ** . * . ** :		

A-E-E-G-L-D-F

Figura 43. Motivo del dominio helicasa elegido para el diseño del oligonucleótido degenerado directo (DF1) en T-coffee. Los asteriscos "*" indican un 100% de identidad entre los residuos, los dos puntos ":" muestran posiciones conservadas y los puntos "." sustituciones menos conservativas.

Pgraminis	GLLNDVCOLIPODEFLPVLAPYEYIMCLGESFKSOVTLPPMAA	PPSORTFMGLEMSTKKEAK
Pgraminis_1	SLLNDVCOLIPPDEFLLPVAPEYEMMELGERFKCRVTLPPMAA	PPSRRTFTGLEMGTKNKAK
Pgraminis_2	SLLNDVCOLIPPDEFLLPVAPEYEMMELGERFKCRVTLPPMAA	PPSRRTFTGLEMGTKNKAK
Pstriiformis	SLLNDVCOLIPPDEFLLPVAPEYEMTCLGDNFICQVTLPPMAA	DPSORTFKGLEMTTKKEAK
Pcoronata	SLLNDVCOLVPLDEFLLPAAAPNYTMMCLGESFOCEVTLPPMAA	DPSRRTFIGLEMPTKKDAK
Pcoronata_1	SLLNDVCOLVPLDEFLLPAAAPNYTMMCLGESFOCEVTLPPMAA	DPSRRTFIGLEMPTKKDAK
Pgraminis_3	SLLNDVCOLIPPDEFLLPVAPOYEITWLGDNFQCOVTLPPMAA	HPSORTFTGLAMATKKDAK
Pgraminis_4	SLLNDVCOLIPPDEFLLPVAPOYEITWLGDNFQCOVTLPPMAA	HPSORTFTGLAMATKKDAK
Ptritricina	ALLNGVCOLIPKDEFLLPVPEYEVTCCLGASFKSRVTLPPMAA	RPSORTFTGKIMSTKKEAK
Ptritricina_1	GLLNDVCOLIPPDEFLLPFTPEYEITSVGDSEFRQVTLPPMAA	PPSORTFTGVEMSTKDAK
Mlarici-populin	SLLNEVCOLLPHDEYAEILKPKFEDIORSGGFVCRVTLPPMAA	SPSERVFESEPFTKKNKAK
Pstriiformis_1	GILNGVCOLIPPDEFLLPDIAPYEYVTCCLDGFOCKVTLPSMAA	DPSORSFTGLIMSTKDAK
Ptritricina_2	ALLNGVCOLIPKDEFLLPVPEYEVTCCLGASFKSRVTLPPMAA	RPSORTFTGKIMSTKKEAK
Pcoronata_2	SLLNDVCOLVPLDEFLLPAAAPDYTMMCLGESFOCEVTLPPMAA	DPSRRTFIGLEMPTKKDAK
Pcoronata_3	SLLNDVCOLVPLDEFLLPAAAPDYTMMCLGESFOCEVTLPPMAA	DPSRRTFIGLEMPTKKDAK
Pcoronata_4	SLLNDVCOLVPLDEFLLPAAAPDYTMMCLGESFOCEVTLPPMAA	DPSRRTFIGLEMPTKKDAK
Pcoronata_5	SLLNDVCOLVPLDEFLLPAAAPNYTMMCLGESFOCEVTLPPMAA	DPSRRTFIGLEMPTKKDAK
Ptritricina_3	SLLNDVCOLIPPDEFLLPVLLPEYEMSWLGDTFKQVTLPPMAA	PPSORTFTGLEMPTKRDAR
Pstriiformis_2	SLLNDVCOLIPPDEFLLPVAPEYEMTCLGDNFICQVTLPPMAA	DPSORTFKGLEMTTKKEAK
Psorghii	SLLNDVCOLVPADEFLLPVAPEYVMTCLAESFRQVTLPPMAA	LPSORTFTGLEMPTKRDAR
Ptritricina_4	SLLNDVCOLIPPDEFLLPVLLPEYEMSWLGDTFKQVTLPPMAA	PPSORTFTGLEMPTKRDAR
Ptritricina_5	GLLNDVCOLIPPDEFLLPFTPEYEITS-----	-----RTFTGVEMSTKDAK
Ptritricina_6	GLLNDVCOLIPPDEFLLPFTPEYEITS-----	-----RTFTGVEMSTKDAK
Pstriiformis_3	GILNGVCOLIPPDEFLLPDIAPYEYVTCCLDGFOCKVTLPSMAA	DPSORSFTGLIMSTKDAK
Pstriiformis_27	SLLNDVCOLIPPDEFLLPVAPEYEMTCLGDNFICQVTLPPMAA	DPSORTFKGLEMTTKKEAK
Pstriiformis_PS	SLLNDVQLIPPDEFLLPVAPEYEMTCLGDNFICQVTLPPMAA	DPSORTFKGLEMTTKKEAK
cons	..** ****;* **;	*. ;. ;. ;.

T-L-P-[P/S]-M-A-A

Figura 44. Motivo del dominio de dimerización elegido para el diseño de un oligonucleótido degenerado directo (DF2) en T-coffee. Los asteriscos "*" indican un 100% de identidad entre los residuos, los dos puntos ":" muestran posiciones conservadas y los puntos "." sustituciones menos conservativas.

```

Pgraminis      SLTRLLHDALOAKFLFKRLDFPAISLPHGIHALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Pgraminis_1    SLTRLLHDSIOATALFMRLDFPMTLLPRGIOALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Pgraminis_2    SLTRLLHDSIOATALFMRLDFPMTLLPRGIOALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Pstriiformis   SLTRLVHDSLOATALFEQLNFPTISLLLGMOALTPPGVG--VWDYOTLET  GDTFLKLATSV
Pcoronata      SLTRLLHDGLOTTFLFKRLELPTSALLGIEALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Pcoronata_1    SLTRLLHDGLOTTFLFKRLELPTSALLGIEALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Pgraminis_3    SLTRLLHDTLOATALFKRLDFPTISLLHGIOALTPPGGG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Pgraminis_4    SLTRLLHDSLOATLTKRLDFPTISLLHGIOALTPPGGG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Ptriticinā     SLTRLLHDALOATALFKRLDFPAVSLPLGIKALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATTV
Ptriticina_1   SLTRLLHDSLOATALFKRLDFPMISLOLGIOALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Mlarici-populin ALTRRLHDASVOALLKKIDVPHVSLDLATMALTOPGID--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Pstriiformis_1 SLTRLLHDAFOATALFKRMNVVSLPLAIEALTPPGVDRVWDYOTLET  GDAFLKFATSV
Ptriticina_2   SLTRLLHDAFOATALFKRLDFPAVSLPLGIKALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATTV
Pcoronata_2    SLTRLLHDGLOTTFLFKRLELPTSALLGIEALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Pcoronata_3    SLTRLLHDGLOTTFLFKRLELPTSALLGIEALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Pcoronata_4    SLTRLLHDGLOTTFLFKRLELPTSALLGIEALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Pcoronata_5    SLTRLLHDGLOTTFLFKRLELPTSALLGIEALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Ptriticinā_3   SLTRLVHDSIOATALFKRLDFPMISVOLGIOALTPPGAG--LWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Pstriiformis_2 SLTRLVHDSLOATALFEQLNFPTISLLLGMOALTPPGVG--VWDYOTLET  GDTFLKLATSV
Psoorghi       SLTRLIHDAIOTALMKRLESPTMRILLAIEALTPPGVG--AVWDYOTLET  GDAFLKLATTV
Ptriticina_4   SLTRLVHDSIOATALFKRLDFPMISVOLGIOALTPPGAG--LWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Ptriticina_5   SLTRLLHDSLOATALFKRLDFPMISLOLGIOALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Ptriticina_6   SLTRLLHDSLOATALFKRLDFPMISLOLGIOALTPPGVG--VWDYOTLET  GDAFLKLATSV
Pstriiformis_3 SLTRLLHDAFOATALFKRMNVVSLPLAIEALTPPGVDRVWDYOTLET  GDAFLKFATSV
Pstriiformis_27 SLTRLVHDSLOATALFEQLNFPTISLLLGMOALTPPGVG--VWDYOTLET  GDTFLKLATSV
Pstriiformis_PS SLTRLVHDSLOATALFEQLNFPTISLLLGMOALTPPGVG--VWDYOTLET  GDTFLKLATSV
cons           :*** :** * . . . * . *** ** ***** **.***.*

```

W-D-Y-Q-T-L-E-T

Figura 45. Motivo del dominio RNasa IIIa seleccionado para el diseño de un oligonucleótido degenerado reverso (DR1) en T-coffee. Los asteriscos "*" indican un 100% de identidad entre los residuos, los dos puntos ":" muestran posiciones conservadas y los puntos "." sustituciones menos conservativas.

Pgraminis	AHDKLDPSMLLTCE0IERKINIVVFKEKLLVVOALTHRSANSFLTNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
Pgraminis_1	AHDKLASSILLKCOALEEKIGYVFKEKLLVVOALTHRSANSFMTNCYE	EEWLGDA	VDMWIV
Pgraminis_2	AHDKLASPILLKCOALEEKIGYVFKEKLLVVOALTHRSANSFMTNCYE	EEWLGDA	VDMWIV
Pstriiformis	ALSRLDPSILLKCE0TLOOKIGYVFKE0LLVVOALTHRSANSFMTNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
Pcoronata	AKKTLKPSVRAGCEELOR0IGYVFKEPLLVOALTHRSANSLVTNCYE	EEWLGDA	IDMWII
Pcoronata_1	AKKTLKPSVRAGCEELOR0IGYVFKEPLLVOALTHRSANSFVTNCYE	EEWLGDA	IDMWII
Pgraminis_3	THDALEPSILLKCOALEEKIGYVFKEKLLVVOALTHRSANSFMTNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
Pgraminis_4	THDALEPSILLKCOALEEKIGYVFKEKLLVVOALTHRSANSFMTNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
Ptriticina	AHEKLPSTLLKCOALEEKIGYVFKEKLLVVOALTHRSANSFLTNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
Ptriticina_1	SLDRLEPSIRL0FOALODKIDYTFKEPLLVOALTHRSANSFITNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
Mlarici-populin	YPDAASSOWTKSHTALOCHKIYGFK0PLLMOALTHRSADSFVTNCYE	EEWLGDA	VDLWIT
Pstriiformis_1	VHEKLEPSMILKYEHLEKIGYVFKEKLLVVOALTHRSANSFLTNCYE	EEWLGDA	IDMWII
Ptriticina_2	AHEKLPSTLLKCOALEEKIGYVFKEKLLVVOALTHRSANSFLTNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
Pcoronata_2	AKKTLKPSVRAGCEELOR0IGYVFKEPLLVOALTHRSANSFVTNCYE	EEWLGDA	IDMWII
Pcoronata_3	AKKTLKPSVRAGCEELOR0IGYVFKEPLLVOALTHRSANSFVTNCYE	EEWLGDA	IDMWII
Pcoronata_4	AKKTLKPSVRAGCEELOR0IGYVFKEPLLVOALTHRSANSFVTNCYE	EEWLGDA	IDMWII
Pcoronata_5	AKKTLKPSVRAGCEELOR0IGYVFKEPLLVOALTHRSANSFVTNCYE	EEWLGDA	IDMWII
Ptriticina_3	AHSRL0PSILASC0TLOOKVGYKFKPLLVOALTHRSANSFITNCYE	EEWLGDA	IDMWII
Pstriiformis_2	ALSRLDPSILLKCE0TLOOKIGYVFKE0LLVVOALTHRSANSFMTNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
Psorghi	AOCALKESVLLKYEALOEKIGYVFNK0LLVVOALTHRSANSFMTNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
Ptriticina_4	AHSRL0PSILASC0TLOOKVGYKFKPLLVOALTHRSANSFITNCYE	EEWLGDA	IDMWII
Ptriticina_5	SLDRLEPSIRL0FOALODKIDYTFKEPLLVOALTHRSANSFITNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
Ptriticina_6	SLDRLEPSIRL0FOALODKIDYTFKEPLLVOALTHRSANSFITNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
Pstriiformis_3	VHEKLEPSMILKYEHLEKIGYVFKEKLLVVOALTHRSANSFLTNCYE	EEWLGDA	IDMWII
Pstriiformis_27	ALSRLDPSILLKCE0TLOOKIGYVFKE0LLVVOALTHRSANSFMTNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
Pstriiformis_PS	ALSRLDPSILLKCE0TLOOKIGYVFKE0LLVVOALTHRSANSFMTNCYE	EEWLGDA	IDMWIV
cons		:: ::* *:: *::*****:.*:*****:.*:***	

E-E-W-L-G-D-A

Figura 46. Motivo del dominio de RNasa IIIb seleccionado para el diseño de un primer degenerado reverso (DR2) en T-coffee. Los asteriscos “*” indican un 100% de identidad entre los residuos, los dos puntos “:” muestran posiciones conservadas y los puntos “.” sustituciones menos conservativas.

A continuación, en la Tabla 18 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos degenerados sintetizados, y en la Tabla 19 se nombran los pares de oligonucleótidos usados en experimentos posteriores de acuerdo a su clave y tamaño esperado de los productos y esquematizados en la Fig. 47.

Tabla 18. Oligonucleótidos degenerados diseñados para amplificar DCL en *H. vastatrix*.

Nombre_Dominio	Degeneración total	Secuencia aminoacídica
DF1_Helicasa	GCNGARGARGGNYTNGAYTT	AEEGLDF
DF2_DsRBD	ACNYTNCCNHSNATGGCNGC	TLP[P/S]MAA
DR1_RNasa III a	TCNARNGTYTGRTARTCCCA	WDYQTLET
DR2_RNasa III b	GCRTCNCCNARCCAYTCYTC	EEWLGDA

Tabla 19. Cobertura y productos esperados de la PCR con oligonucleótidos degenerados.

Par de oligonucleótidos	Nombre del producto	Cobertura de dominios	Tamaño del producto
DF1-DR2	D1	Helicasa-RNasa IIIb	2,226 pb
DF1-DR1	D2	Helicasa-RNasa IIIa	1,644 pb
DF2-DR2	D3	dsRBD-RNasa III b	1,743 pb
DF2-DR1	D4	dsRBD-RNasa III a	1,167 pb

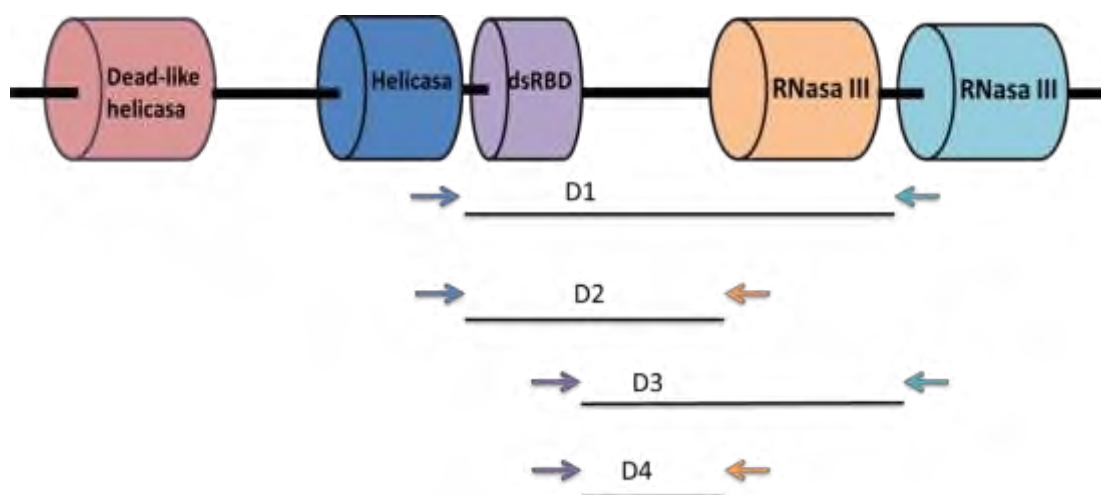


Figura 47. Localización en la proteína Dicer de los oligonucleótidos degenerados así como de los amplicones.

A juzgar por los resultados obtenidos hasta este punto del trabajo, se llegó a la conclusión de que el DNAg obtenido a partir de la muestra de roya colectada en la UNPA, presenta dificultad como molde para amplificar los DCLs con oligonucleótidos específicos y degenerados a 10 μ M y/o que probablemente la extracción de DNAg acarreo inhibidores.

La única muestra a partir de la cual fue posible amplificar con los oligonucleótidos específicos fue el DNAg de la colecta de Rancho Grande, Valle Nacional. Por lo tanto, dicha muestra se empleó para realizar la PCR degenerada, aplicando el gradiente de temperatura de alineamiento de 45-60°C.

Los resultados de la PCR con primers degenerados para las cuatro amplicones se muestran en la Fig. 48. De acuerdo a estos resultados, la temperatura de 53°C es la óptima para el alineamiento de los oligonucleótidos. También se observa la baja especificidad del amplicón D1, y la obtención del producto D2 y presuntivos D3 y D4 (Fig. 48).

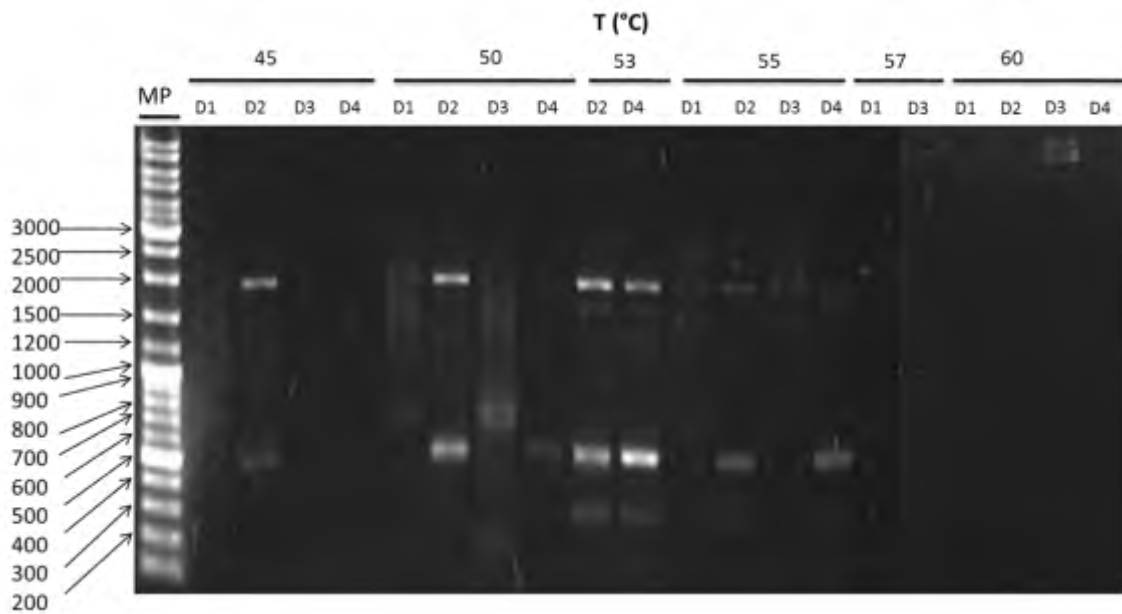


Figura 48. Gel de agarosa (1%) del gradiente de la PCR con oligos degenerados con DNAg de Rancho Grande. Rango de Temperatura de 45-60°C con los 4 pares de primers degenerados. La temperatura óptima es de 53°C. MP: GeneRuler DNA Ladder Mix.

En una PCR posterior se efectuó la amplificación de los segmentos D2, D3 y D4, incluyendo como control positivo el ITS y los controles negativos correspondientes. En la Fig. 49 se muestran los resultados de la amplificación con dos DNA polimerasas. En todos los casos se empleó DNAg como molde. La enzima que dio mejores resultados de amplificación fue la Phusion® HF Phusion (M0530S, New England Biolabs), al amplificar nítidamente el amplicón D2 mientras la enzima DreamTaq Green PCR (K1081, ThermoFisher Scientific) sólo amplificó el control de ITS.

Respecto a la región amplificada por el par D2, en genes ortólogos se encuentran ~4 intrones y el rango del tamaño de DNAg es de 1,720-1,802 pb (Joint Genome Institute [JGI], s.f.). Cabe señalar además que a pesar de que el amplicón D2 fue el más consistente en el ensayo con oligonucleótidos degenerados, también se observaron productos de amplificación en su control negativo (Fig. 49). No obstante, la banda superior se purificó del gel para enviarse a secuenciar posteriormente.

Por tratarse de un producto con oligonucleótidos degenerados, no se tiene la secuencia específica de las secuencias que lo flanquean, por lo que previo a la secuenciación se realizó la clonación en el vector pGEM®-T Easy (JM109, Promega) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, pero dado que no se obtuvieron clonas recombinantes, no fue posible secuenciar algún producto.

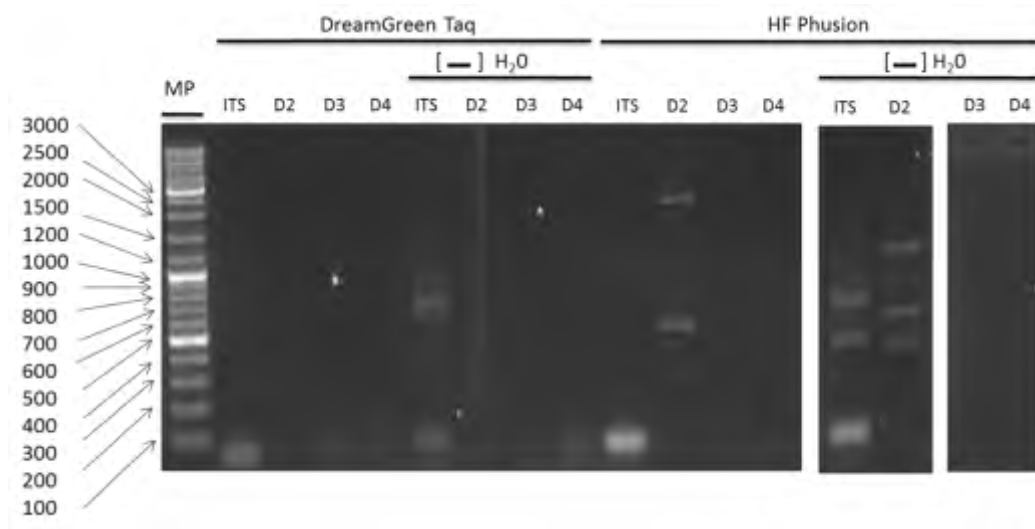


Figura 49. Gel de agarosa (1%) de los productos de PCR D2, D3 y D4 con oligonucleótidos degenerados a 53°C. Se empleó DNAg de la muestra de Rancho Grande. MP: GeneRuler DNA Ladder Mix.

6.2.4 Secuenciación de los productos F1 y F2

En consecuencia de los resultados obtenidos de la clonación, se mandó a secuenciar 20 μ L de cada los amplicones F1 y F2 conseguidos con los primers específicos.

En cuanto a los dos fragmentos analizados de las secuencias directa y reversa del amplicón F1, no se obtuvo la calidad de secuenciación adecuada para realizar los análisis bioinformáticos de homología. Por su parte, para el amplicón F2, la secuencia directa presentó la calidad adecuada para analizarse en la herramienta blast del NCBI.

6.2.5 Análisis de la secuencia del producto F2

La secuencia F2 obtenida fue analizada empleando tblastx, usando como fuente de almacenamiento la colección nucleotídica. Los valores más altos de homología corresponden a proteínas Dicer de organismos ortólogos, con un 46% de cobertura (Fig. 51). Cabe resaltar que en esta herramienta no se pueden incluir los contigs de *H. vastatrix* por estar su secuencia depositada en la base de whole genome shotgun (wgs).

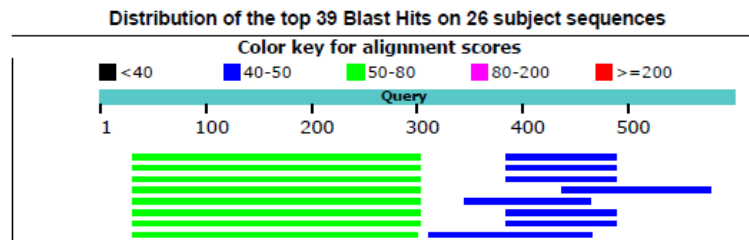
Usando la misma secuencia F2 de DNAg, con el análisis tblastx en la fuente de almacenamiento wgs (en donde se encuentra depositada el genoma de *H. vastatrix*) los puntajes obtenidos son de 58% de cobertura y $4e-52$ para el valor E respecto al contig 148667, que es la fuente de elaboración de los oligonucleótidos específicos, lo que proporciona evidencia de la presencia de *H. vastatrix* en la muestra y de la predicción bioinformática de la enzima Dicer (Fig. 52). Con este resultado se pudo proponer el diseño en base al contig 148667 de los sRNAs para *H. vastatrix*.

A partir de estos resultados se puede determinar que, derivado del primer análisis en la colección nucleotídica, el fragmento amplificado corresponde a un producto con altas (respecto al valor E de $4e-52$) posibilidades de codificar un DCL en la muestra aislada. Por otra parte, del segundo análisis se obtiene evidencia que apunta a la presencia de *H. vastatrix* en la muestra colectada en Rancho Grande, Valle Nacional, ya que fue capaz de amplificar el producto esperado a partir de oligonucleótidos específicos, y que además se reveló a *H. vastatrix* como el primer hit (58% cobertura y un valor de E de $4e-52$). El nivel de cobertura menor a 100%, puede ser reflejo de la imprecisión en la secuenciación observada durante este trabajo, probablemente debida a que se trata de una muestra ambiental donde se pueden encontrar DCLs de otros organismos.

Query ID |cl|Query_39431
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 586

Database Name nr
Description Nucleotide collection (nt)
Program TBLASTX 2.8.1+

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

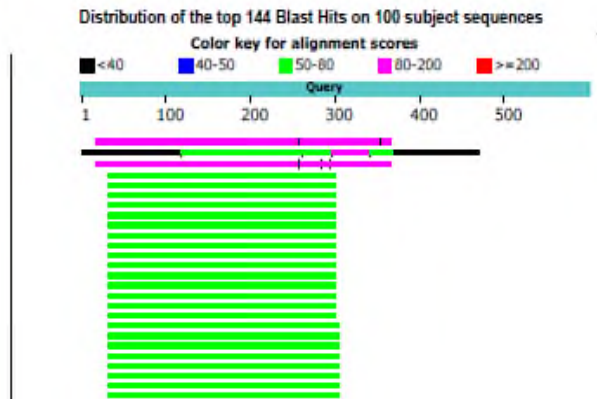
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	N	Accession
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. tritici CRL 75-36-700-3 hypothetical protein (PGTG_12289), mRNA	70.3	70.3	46%	1e-08	Sumn1	XM_003330704.2
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. tritici CRL 75-36-700-3 hypothetical protein (PGTG_19538), mRNA	68.0	68.0	46%	6e-08	Sumn1	XM_003337913.2
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. tritici CRL 75-36-700-3 hypothetical protein (PGTG_13088), mRNA	68.0	68.0	46%	6e-08	Sumn1	XM_003331077.2
<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. tritici RNase III dicer-like protein gene, complete cds	67.0	67.0	46%	1e-07	Sumn1	JN033211.1
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. tritici CRL 75-36-700-3 hypothetical protein (PGTG_19535), mRNA	63.8	63.8	46%	1e-06	Sumn1	XM_003337910.2
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. tritici CRL 75-36-700-3 hypothetical protein (PGTG_13081), mRNA	63.8	63.8	46%	1e-06	Sumn1	XM_003331070.2
<i>Puccinia triticina</i> dicer dimer protein mRNA, partial cds	63.4	63.4	46%	1e-06	Sumn1	MH107880.1
<i>Melampsora larici-populina</i> 98AG31 hypothetical protein (MELLADRAFT_79806), partial mRNA	58.3	58.3	45%	4e-05	Sumn1	XM_007417871.1

Figura 51. Análisis tblastx en el NCBI de la secuencia directa F2. Los mejores puntajes en los parámetros de cobertura y expectativa se adjudican a proteínas Dicer ortólogos.

Query ID lcl|Query_31159
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 586

Database Name wgs (4178 databases)
Description Program|BLASTX 2.8.1+

Graphic Summary.



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	N	Accession
Hemileia vastatrix HvCat contig_148667, whole genome shotgun sequence	210	2388	58%	4e-52	Sumn1	PZQ001052332.1
Hemileia vastatrix HvCat contig_250826, whole genome shotgun sequence	138	1537	80%	1e-30	Sumn1	PZQ001067775.1
Hemileia vastatrix HvCat contig_138322, whole genome shotgun sequence	136	617	58%	4e-30	Sumn1	PZQ001049897.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-A1 contig22086, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LADH01019472.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-A contig22805, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LADG01020009.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-11 contig23900, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LADF01020323.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-10 contig23387, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LADF01020087.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-9 contig23706, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LADD01020157.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-8 contig22936, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LADC01019906.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-7 contig22081, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LADR01019446.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-6 contig22264, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LADA01019581.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-5 contig22131, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LACZ01019516.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-4 contig22195, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LACY01019533.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-3 contig21981, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LACK01019411.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-2 contig22192, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LACW01019543.1
Puccinia triticoa Race 77 isolate 77-1 contig22125, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	LACV01019478.1
Puccinia triticoa Race 106 contig03775, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	AZRP01003775.1
Puccinia triticoa Race 77 contig10763, whole genome shotgun sequence	68.9	68.9	45%	1e-09	Sumn1	AZRQ01010763.1
Puccinia coronata var. avenae f. sp. avenae isolate 12NC29 000041F, whole genome shotgun sequence	69.8	69.8	48%	2e-09	Sumn1	PGCJ01000042.1
Puccinia coronata var. avenae f. sp. avenae isolate 12SD80 000207F_002, whole genome shotgun sequence	69.8	69.8	46%	2e-09	Sumn1	PGC01000703.1

Figura 52. Análisis tblastx en la fuente wgs, de la secuencia F2. El puntaje más alto corresponde al contig 148667.

6.3 Análisis de homología entre DCLs de *Coffea arabica* y *Hemileia vastatrix*

Siguiendo los criterios que se establecieron al inicio de este trabajo, para el diseño de sRNAs. Se consideraron dos Dicer de *C. arabica* obtenidos en la base de datos biológica terciaria Phytozome, tres de *C. canephora* recuperadas de UniProt, el Dicer de *H. vastatrix* HvaDCL1 predicho por homología (Anexo E, sección 10.3) y 5 Dicer de especies ortólogas a *H. vastatrix* encontradas en UniProt, para efectuar los análisis de búsqueda de regiones no conservadas. De la alineación múltiple aminoacídica en T-coffee (Notredame *et al.*, 2000) se seleccionaron regiones no conservadas largas que se ubicaron entre los dominios conservados de dimerización y RNasa III N-terminal (Fig. 53).

Una vez obtenida la sección aminoacídica no conservada de interés para el diseño de sRNAs (Fig. 53), se procedió a realizar el alineamiento múltiple nucleotídico en T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) entre los Dicer del fitopatógeno *H. vastatrix* y el huésped *C. arabica* en sus transcritos (Fig. 54), delimitada en la región de menor identidad.



Figura 53. Alineamiento múltiple proteico en T-Coffee de la región secuenciada de DCL. Se muestra la región no conservada entre los dominios de dimerización y RNasa III N-terminal entre proteínas Dicer de organismos ortólogos a *H. vastatrix* y especies del género *Coffea*.

(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Tabla 20) con los siguientes parámetros de diseño: 40-60% de contenido GC, 18-27 pb, T_m de 57-63°C, evitando la formación de horquillas y dimerización

Tabla 20. Oligonucleótidos específicos para la amplificación de la región no conservada

Primer	Secuencia	Longitud (pb)	T _m	% GC
Directo (sRNA_F)	CGTCGGACATCCCTCAGTAT	20	59.95	55
Reverso (sRNA_R)	TCGACGACAAAAATGAACGA	20	60.23	40

Estos oligonucleótidos amplificarán una zona de 511 pb, que están localizados dentro de la región no conservada. Una vez que se ajusten las condiciones óptimas de amplificación en la PCR, se obtendrá el fragmento largo de interés, el cual se purificará y se someterá a una nueva ronda de amplificación con oligonucleótidos diseñados para incorporar el promotor T7 (Tabla 21).

Tabla 21. Oligonucleótidos específicos propuestos para incorporar el promotor T7 al producto amplificado.

Primer	Secuencia	Longitud (pb)	T _m °C	% GC
T7Directo (TsRNA_F)	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGTCGGACATCCCTCAGTAT	43	68.3	46.5
T7Reverso (TsRNA_R)	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCGACGACAAAAATGAACGA	43	65.5	39.5

Una vez realizada la amplificación, el producto purificado podrá sintetizarse como RNA y procesarse para las pruebas de actividad biológica de *H. vastatrix*, entre las cuales se incluyen los efectos secundarios para especies sinérgicas o antagonistas y otros genes de *C. arabica*.

7. Conclusiones

A nivel morfológico se comprobó la presencia de esporas presuntivas de *H. vastatrix* en las muestras de roya, dados los signos característicos que la definen. La identificación molecular del ITS de *H. vastatrix* por la secuenciación capilar, no fue posible dado que el método Sanger secuencia una sola base por posición y *H. vastatrix* forma parte de un complejo fúngico que ocasiona la roya del café, coexistiendo de manera sinérgica o antagónica con otros hongos endófitos y patógenos. No obstante, se identificó como especie posiblemente predominante a *Rousoella mexicana*, la cual se ha reportado como fitopatógeno del café.

Dada la naturaleza biotrófica de *H. vastatrix*, los primers específicos para royas para la identificación por ITS son óptimos, más no los primers universales, en concordancia con lo observado en trabajos anteriores a éste.

El estudio metagenómico permitió la identificación de especies que incluyen a hongos endófitos, patógenos o viajeros accidentales del café, además de posibles nuevas especies que interactúan en ecosistemas naturales con el café.

La PCR dirigida en forma específica a amplificar un DCL potencial de *H. vastatrix* produjo un amplicón que corresponde a la secuencia reportada para *H. vastatrix*. Por lo tanto, la evidencia afirma que *H. vastatrix* tiene altas probabilidades de encontrarse en la muestra secuenciada de roya.

La secuencia de DCL obtenida en este trabajo cuenta con una región entre los dominios de dimerización y RNasa III de HvdDCL1 que no presenta homología con los genes DCL del café. Además, cubre una longitud adecuada para el diseño de sRNAs, por lo tanto, se aprueba la hipótesis del trabajo.

8. Perspectivas

Evaluar directamente la estrategia SIGS contra *H. vastatrix* con los sRNAs diseñados en el presente trabajo.

Realizar un estudio metagenómico extenso en los cafetales de la región para identificar la diversidad de organismos que constituyen las lesiones de roya.

Mediante una aproximación transcriptómica, caracterizar en las lesiones de roya la diversidad de DCLs que se encuentran presentes, dilucidando la influencia de los DCLs en el establecimiento y propagación de la enfermedad en las diversas especies que estén involucradas.

Realizar pruebas de bioseguridad para garantizar la inocuidad y la eficacia de esta tecnología diseñada para el combate del fitopatógeno *H. vastatrix*. A la par, analizar si es factible extender el espectro de acción hacia las especies *C. gloeosporioides*, *C. coffeicola* y *M. citricolor*.

Evaluar las relaciones sinérgicas entre patógenos, en caso de ser factores clave en el establecimiento de la fitoenfermedad y ser considerados como organismos diana en la estrategia SIGS.

9. Referencias

1. Aime, M. C. (2006). Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience*, 47(3), 112-122. doi: 10.1007/s10267-006-0281-0
2. Aime, M. C., Bell, C. D., & Wilson, A. W. (2018). Deconstructing the evolutionary complexity between rust fungi (Pucciniales) and their plant hosts. *Studies in Mycology*, 89, 143-152. doi:10.1016/j.simyco.2018.02.002
3. Anikster, Y., Szabo, L. J., Eilam, T., Manisterski, J., Koike, S. T. & Bushnell, W. R. (2004). Morphology, life cycle biology, and DNA sequence analysis of rust fungi on garlic and chives from California. *Phytopathology*, 94(6), 569-577. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.6.569
4. Arneson, P. A. (2000). Roya del café. *Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-I-2000-0718-02.
5. Asociación Nacional del Café. (2013). Análisis de cinco fungicidas de contacto para el control de la roya del café. Recuperado de: <https://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=16TEC:Análisis-fungicidas>
6. Bandelt, H., Forster P., & Röhl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026
7. Berlanga, H. R. (19 de mayo del 2018). La producción de café en el México del siglo XXI. La jornada del campo. Recuperado de: <http://www.jornada.unam.mx/2018/05/19/cam-produccion.html>
8. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363-366. doi: 10.1038/35053110
9. Borges, F., & Martienssen R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(12), 727-741. doi: 10.1038/nrm4085
10. Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F., Bihan, T. L., Kumar, S., Abreu-Goodger, C., Lear, M., Harcus, Y., Ceroni, A., Babayan, S. A., Blaxter, M., Ivens, A., & Maizels, R. M. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to

- mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications*, 5(1), 1-11. doi: 10.1038/ncomms6488
11. Burd, C. G., & Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, 265(5172), 615-621. Recuperado de: <https://www.jstor.org/stable/2884263>. doi: 10.1126/science.8036511
 12. Burger, K., & Gullerova, M. (2015). Swiss army knives: non-canonical functions of nuclear Drosha and Dicer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(7), 417-430. doi: 10.1038/nrm3994
 13. Cabral, P. G. C., Maciel-Zambolin, E., Oliveira, S. A. S., Caixeta, E. T., & Zambolim, L. (2016). Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp. *Plant Pathology*, 65(2), 196-204. doi: 10.1111/ppa.12411
 14. Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F-M., Palmquist, J., Huang, H-D., & 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
 15. Camara, M. P. S., Palm, M. E., van Berkum, P. B. & Stewart, E. L. (2001). Systematics of Paraphaeosphaeria: a molecular and morphological approach. *Mycological Research*, 105(1), 41-56. doi: 10.1017/S0953756200003233
 16. Carrion, G., & Rico-Gray, V. (2002). Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. *Fungal Diversity*, 11(5), 49-60. Recuperado de: http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD_11_49-60.pdf
 17. Carvahlo, C. R., Fernandes, R. C., Carvalho, G. M. A., Barreto, R. W., & Evans H. C. (2011). Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. *Plos One*, 6(11), 1-7. doi: 10.1371/journal.pone.0026387
 18. Castro, F. R., Charles, E. H., & Barreto, R.W. (2009). Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. *Tropical Plant Pathology*, 34(2), 108-113. doi: 10.1590/S1982-56762009000200005
 19. Catalanotto, C., Pallotta, M., ReFalo, P., Sachs, M. S., Vayssie, L., Macino, G., & Cogoni, C. (2003). Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, 24(6), 2536-2545. doi: 10.1128/MCB.24.6.2536-2545.2004
 20. Centro Nacional de Investigaciones de Café. (2011). Ojo de gallo o gotera del cafeto

Omphalia flavida. Recuperado de: <https://www.cenicafe.org/es/publications/bot037.pdf>

21. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. (2018). Protocolo de diagnóstico: *Hemileia vastatrix* (Roya del café). Recuperado de:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/391127/3._Protocolo_Hemileia_vastatrix.V01.pdf

22. Charrier, A., & Berthaud, J. (1985). Botanical classification of coffee. En: Clifford, M.N., & Willson, K.C. (Eds.), *Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage* (13- 47). Londres, Inglaterra: Springer Science & Business Media.

23. Cristancho, M. A., Escobar, C. O., & Ocampo, D. J. (2007). Evolución de razas de *Hemileia vastatrix* en Colombia. *Cenicafé*, 58(4), 340-359.

24. Cristancho, M. A., Botero, R. D. O., Giraldo, W., Tabima, J., Riaño, P. D. M., Escobar, C., Roza, Y., Rivera, L. F., Durán, A., Restrepo, S., Eilam, T., Anikster, Y., & Gaitán, A. L. (2014). Annotation of a hybrid partial genome of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) contributes to the gene repertoire catalog of the Pucciniales. *Frontiers in Plant Science*, 5(594), 1-12. doi: 10.3389/fpls.2014.00594

25. Crous, W. P., Groenewald, Z. J., Yañez-Morales, M. J., & Solano-Vidal, R. (2015). *Rousoella mexicana*. *Persoonia*, 35, 272-273.

26. Coffee Genome Hub. (2018). *Coffea canephora*. Recuperado de: <http://coffee-genome.org/coffeacanephora>

27. Comisión Interamericana de Agricultura Órgánica. (2013). Argentina impulsa desarrollo de industria de bioinsumos para la agricultura. Recuperado de: http://infoagro.net/archivos_Infoagro/Infotec/biblioteca/INFORGANICA30.pdf

28. Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M., & Stoffelen, P. (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152(4), 465-512. doi: 10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x

29. Department of Agriculture, Forestry and Fisheries. (2012). *Coffe, Coffee spp.*, production guideline. Recuperado de: <http://www.daff.gov.za/docs/Brochures%5Ccoffeeprodguide.pdf>

30. Dos Santos, S. B., & Tavares, S. (2017). Endophytic fungi in economically important plants: ecological aspects, diversity and potential biotechnological applications. *Journal of Bioenergy and Food Science*, 4(2), 113-126. doi: 10.18067/jbfs.v4i2.121
31. European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2014). Recuperado de: <https://gd.eppo.int/taxon/HEMIVA/distribution>
32. Farah, A., & Dos Santos, T.F. (2014). The Coffee Plant and Beans: An Introduction. En V. R Preedy (Ed.), *Coffee in Health and Disease Prevention* (5-7). Rio de Janeiro, Brasil: Academic Press.
33. Flores, D. (2015). Tight Coffee Situation in Mexico. USDA Foreign Agricultural Service Global Agricultural Information Network. (MX5021), 2.
34. Florez, J. C., Mofatto, L. S., Freitas-Lopes, R. D. L., Ferreira, S. S., Zambolim, E. M., Carazzolle, M. F., Zambolin, L., & Caixeta, E. T. (2017). High throughput transcriptome analysis of coffee reveals prehaustorial resistance in response to *Hemileia vastatrix* infection. *Plant Molecular Biology*, 95(6), 607-623. doi: 10.1007/s11103-017-0676-7
35. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2005). Arabica coffee manual for Lao-PDR. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/008/ae939e/ae939e03.htm#bm03.1.1>
36. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2015). Coffe. Statical Pocketbook. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-i4985e.pdf>
37. Geromel, C., Ferreira, P. L., Guerreiro, C. M. S., Cavalari, A. A., Pot, D., Pereira, P. F. L., Leroy, T., Vieira, E. G. L., Mazzafera, P., & Marraccini, P. (2006). Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), 3246-3250. doi: 10.1093/jxb/erl084
38. Google. (s.f.). [Mapa de México en Google maps]. Recuperado el 19 de Marzo, 2019, de: <https://www.google.com/maps/@23.6277191,-108.5547532,5.39z>
39. Golosova, O., Henderson, R., Vaskin, Y., Gabrielian, A., Grekhov, G., Nagarajan, V., Oler, A. J., Quiñones, M., Hurt, D., Fursov, M., & Huyen, Y. (2014). Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses. *PeerJ*, 2(e644), 1-15. doi: 10.7717/peerj.644

40. Grasso, V., Sierotzki, H., Garibaldi, A., & Gisi, U. (2006). Relatedness among agronomically important rusts based on mitochondrial cytochrome b gene and ribosomal ITS sequences. *Journal of Phytopathology*, 154(2), 110-118. doi: 10.1111/j.1439-0434.2006.01070.x
41. Grens, K. (Febrero de 2017). RNA interference between kingdoms. The Scientist. Recuperado de: <https://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/48073/title/RNA-Interference-Between-Kingdoms/>
42. Haddad, F., Saraiva, R. M., Mizubuti, E. S. G., Romeiro, R. S., & Maffia, L. A. (2014). Isolation and selection of *Hemileia vastatrix* antagonists. *European Journal of Plant Pathology*, 139(4), 763-772. doi: 10.1007/s10658-014-0430-9
43. Hahn, M., & Mendgen K. (2001). Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4), 322-325. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00180-1
44. Hernández, G., & Vazquez-Pianzola P. (2005). Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mechanisms of Development*, 122(7-8), 865- 876. doi: 10.1016/j.mod.2005.04.002
45. Hernández, J. R. (2005). Coffee leaf rust-*Hemileia vastatrix*. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Recuperado de: <https://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/factsheets/index.cfm?thisapp=Hemileiavastatrix&printtype=>
46. Hu, Y., Stenlid, J., Elfstrand, M., & Olson, Å. (2013). Evolution of RNA interference proteins dicer and argonaute in Basidiomycota. *Mycologia*, 105(6), 1489-1498. doi: 10.3852/12-171
47. International Coffee Organization. (2018). Aspectos botánicos. Recuperado de: http://www.ico.org/es/botanical_c.asp?section=Acerca_del_caf%E9
48. Iserte, J. A., Stephan, B. I., Goñi, S. E., Borio, C. S., Ghiringhelli, P. D., & Lozano, M. E. (2013). Family-Specific Degenerate Primer Design: A tool to design consensus degenerated oligonucleotides. *Biotechnology Research International*, 2013(383646), 1-9. doi: 10.1155/2013/383646
49. Ivashuta, S., Zhang, Y., Wiggins, B. E., Ramaseshadri, P., Segers, G. C., Johnson, S., Meyer, S. E., Kerstetter, R. A., McNulty, B. C., Bolognesi, R., & Heck, G. R. (2015). Environmental RNAi in herbivorous insects. *RNA*, 21(5), 840-850. doi: 10.1261/rna.048116.114

50. Jackson, Doug., Skillman, Jane., & Vandermeer John. (2012). Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control*, 6(1), 89-67. doi: 0.1016/j.biocontrol.2012.01.004
51. James, T. Y., Marino, J. A., Perfecto, I., & Vandermeer, J. (2016). Identification of putative coffee rust mycoparasites via single-molecular DNA sequencing of infected pustules. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 631-639. doi: 10.1128/AEM.02639-15
52. Jin, J. (2016). E.U.A. Patente N°. 14/809,063. California: E.U.A. US Patente and trademark office.
53. Joint Genome Institute. (s.f.). Pucciniomycotina. Estados Unidos de América. Recuperado de: <https://genome.jgi.doe.gov/mycocosm/species-tree/tree;ay6Ofv?organism=pucciniomycotina>
54. Kidwell, M. A., Chan, J. M., & Doudna, J. A. (2014). Evolutionarily conserved roles of the dicer helicase domain in regulating RNA interference processing. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(41), 28352-28362. doi: 10.1074/jbc.m114.589051
55. Kilambo, D. L., Reuben, S. O. W. M., & Mamiro, D. (2013). Races of *Hemileia vastatrix* and variation in pathogenicity of *Colletotrichum kahawae* isolates to compact Coffee genotypes in Tanzania. *Journal of Plant Studies*, 2(2), 95-104. doi: 10.5539/jps.v2n2p95
56. Koch, A., Biedenkopf D., Furch, A., Weber, L., Rossbach, O., Abdellatef, E., Linicus, Lukas., Johannsmeier, J., Jelonek, L., Goesmann, A., Cardoza, V., McMillan, J., Mentzel, T., & 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*, 12(10), 1-22. doi: 10.1371/journal.ppat.1005901
58. Lashermes, P., Combes, M. C., Robert, J., Trouslot, P., D'Hont, A., Anthony, F., & Charrier, A. (1999). Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. Genome. *Molecular and General Genetics*, 261(2), 259-266. doi: 10.1007/s004380050965
59. Lasko, P. F., Linder, P., Leroy, P., Nielsen, P. J., Nishi, K., Schnier, J., & Slonimski, P. P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature*, 337(12), 121-122. doi: 10.1038/337121a0
60. Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v. 5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187

61. Linneo, C. (1753). *Species plantarum*. 1, 172.
62. Linhart, C., & Shamir, Ron. (2005). The degenerate primer design problema: Theory and applications. *Journal of Computational Biology*, 12(4), 431-436. doi: 10.1089/cmb.2005.12.431
63. López, T., Silva, D., López, S., & Arias, C. (2007). RNA de interferencia: el silenciamiento de los genes. En *Biotecnología* (109-118). Recuperado de: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_10.pdf
64. McTaggart, R. A., Shivas, G. R., van der Nest, A. M., Roux, J., Wingfield, D. B., & Wingfield, J. M. (2016). Host jumps shaped the diversity of extant rust fungi (Pucciniales). *New Phytologist*, 209(3), 1149-1158. doi: 10.1111/nph.13686
65. Mukherjee, K., Campos, H., & Kolaczowski. (2012). Evolution of animal and plant dicers: Early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 30(3), 627-641. doi: 10.1093/molbev/mss263
66. Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition-a review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 46-48. doi: 10.1016/j.resconrec.2012.06.005
67. Mycobank. (s.f). *Sterigmatomyces halophilus*. Estados Unidos de América. Recuperado de: <http://mycobank.org/BioMICS.aspx?TableKey=14682616000000067&Rec=107976&Fields=All>
68. MycoCosm. (s.f.). *Wallemia mellicola*. Estados Unidos de América. Recuperado de: <https://genome.jgi.doe.gov/Walse1/Walse1.home.html>
69. National Center for Biotechnology Information. (2018). Estados Unidos de América. NCBI taxonomy browser. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=13442>.
70. Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269
71. Notredame, C., Higgins, D. G. & Heringa, J. (2000). T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205-217. doi: 10.1006/jmbi.2000.4042

72. Obando, N. V., Iberico, C. M., & Oliva M. (2013). Cultural management and Bordeaux broth effect over coffee rust (*Hemileia vastatrix*) in the province of Rodríguez de Mendoza, Amazonas. *Revista Indes*, 1(2), 51-58. doi: 10.25127/indes.201302.006
73. Observatory of Economic Complexity. (2016). Coffee. Estados Unidos de América. Recuperado de: <https://atlas.media.mit.edu/en/profile/hs92/0901/>
74. Pelayo-Sanchez, G. & Yanez-Morales, M. J. (2017). Direct Submission. *Fitopatología*. Recuperado de : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/1215353665?report=genbank>
75. Prado, E. E., & Cárdenas, S. D. (30 de mayo de 2018). Las variedades de alta calidad: una alternativa para la cafecultura mexicana. La jornada del campo. Recuperado de: <http://www.jornada.unam.mx/2018/05/19/cam-variedades.html>
76. Quispe-Apaza, C. S., Mansilla, R. C., López, F. C., Espejo, R., Villanueva, J., & Monzón, C. (2017). Genetic diversity of *Hemileia vastatrix* of two coffee producing areas in Peru. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 418-436. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1612-7
77. Raja, A. H., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2007). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756-770. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085
78. Rayner, R. W. (1961). Germination and penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* B. & Br.). *Annals of Applied Biology*, 49(3), 497-505. doi: 10.1111/j.1744-7348.1961.tb03641.x
79. Rivillas, O. C., Sena, G. C., Cristancho, A. M., & Gaitán, B.A. (2011). La roya del Cafeto en Colombia. Centro Nacional de Investigación del Café, 53. Recuperado de: <https://www.cenicafe.org/es/publications/bot036.pdf>
80. ScanProsite. (S.f.). ScanProsite Results Viewer. Estados Unidos de América. Recuperado de: <https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/ScanView.cgi?scanfile=9886624104199.scan.gz>
81. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2004). Pliego de condiciones para el uso de la marca oficial México calidad selecta en café verde. Recuperado de: http://www.mexicocalidadsuprema.org/assets/galeria/PC_010_2004_Cafe_verde.pdf

82. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2016). Anuario estadístico de la Producción Agrícola en México. Recuperado de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
83. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2016). Roya del caféto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome). Recuperado de: <http://www.cesaveson.com/files/docs/campanas/vigilancia/fichas2016/ROYAcaféto.pdf>
84. Talhinhos, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, Ana., Silva, N. D., Loureiro, A., Tavares, S., Pereira, A. P., Azinheira, H. G., Guerra-Guimaraes L., Várzea, V., & Silva, M. D. C. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18(8), 1039-1051. doi: 10.1111/mpp.12512
85. Taylor, D. W., Ma, E., Shigematsu, H., Cianfrocco, M. A., Noland, C. L., Nagayama, K., Nogales, E., Doudna, J. A., & Wang, H. W. (2013). Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(6), 662-670. doi: 10.1038/nsmb.2564
86. Tomari, Y., & Zamore, P. D. (2005). MicroRNA Biogenesis: Drosha can't cut it without a partner. *Current Biology*, 15(2), 61-64. doi: 10.1016/j.cub.2004.12.057
87. Vega, F. E., Posada, F., Peterson, S. W., Gianfagna, T. J., & Chaves, F. (2006). *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. *Mycologia*, 98(1), 31-42. doi: 10.3852/mycologia.98.1.31
88. Wang, M., Liu, F., Crous, P. W., & Cai, L. (2017). Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 39(1), 118-142. doi: 10.3767/persoonia.2017.39.06
89. Wang, M., Thomas, N., & Jin, H. (2017). Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 133-141. doi: 10.1016/j.pbi.2017.05.003
90. Wang, M., Weiberg, A., Lin, F-M., Thomma, B. P. H. J., Huang, H. Da., & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, 2(16151), 1-10. doi: 10.1038/NPLANTS.2016.151
91. Weiberg, A., Wang, M., Lin, F-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H-D. & Ji, H. (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, 342(118), 1-8. doi: 10.1126/science.1239705

92. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., & White T. J. (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (315-322). San Diego, EUA: Academic Press
93. Winston, W. M., Sutherlin, M., Wright, A. J., Feinberg, E. H., & Hunter, C. P. (2007). *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10565-10570. doi: 10.1073/pnas.0611282104
94. Zambolim, L. (2016). Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41(1), 1-8. doi: 10.1007/s40858-016-0065-9

10 Anexos

10.1 Anexo A. Preparación de soluciones

ACETATO DE SODIO 3 M pH 5.2 (200 mL)

NaOAc (grado biología molecular)	49.22 g
Agua destilada estéril	100 mL

Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial y aforar a un volumen de 200 mL con agua destilada estéril. Mezclar bien, esterilizar 15 lb/pulg² por 15 minutos y almacenar a 4°C.

AGUA DEPC

COMPONENTES	VOLUMEN
Agua desionizada	1000 mL
Dietilpirocarbonato (DEPC)	1 mL

Agregar 1 mL de DEPC (Sigma, D5758) al agua desionizada y mantener en agitación toda la noche. Esterilizar a 15 lb/pulg² a 121°C por 15 min para inactivar el DEPC. Mantener a temperatura ambiente.

EDTA 0.5M (100 mL)

COMPONENTES	VOLUMEN
EDTA	14.612 g
Agua DEPC	50 mL

Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 1 M, aforar a 100 mL con agua DEPC y esterilizar a 15 lb/pulg² por 15 minutos.

Gel de agarosa 1%

COMPONENTES	VOLUMEN
TAE 1X	100 mL
Agarosa	1 g

La mezcla se realiza en un matraz de 250 mL, calentándola en el microondas el tiempo suficiente hasta que se torne incolora (se usan guantes para evitar quemaduras con el matraz).

Gel de agarosa 2%

COMPONENTES	VOLUMEN
TAE 1X	100 mL
Agarosa	2 g

La mezcla se realiza en un matraz de 250 mL, calentándola en el microondas el tiempo suficiente hasta que se torne incolora (se usan guantes para evitar quemaduras con el matraz).

SDS 10%

COMPONENTE	VOLUMEN
SDS	10 g
Agua desionizada	60 mL

Se mantiene en agitación y aforar a 100 mL

SOLUCIÓN DE BROMURO DE ETIDIO PARA TINCIÓN

COMPONENTES	VOLUMEN
Agua desionizada	200 mL
Solución de bromuro de etidio (10 mg/mL)	10 μ L

Agregar el bromuro de etidio al agua y mezclar manualmente 5 s.

TAE 50X

COMPONENTES	VOLUMEN
TRIZMA base	242 g
EDTA (0.5 M)	100 mL
Ácido acético	57.1 mL
Agua desionizada	Aforar a 1 L

Se verifica el pH a 8.0.

TAE 1X

COMPONENTES	VOLUMEN
TAE 50X	980 mL
Agua desionizada	20 mL

Disolver el TAE en agua y mezclar.

Tris 1M HCl (150 mL)

COMPONENTES	VOLUMEN
TRIZMA base	18.171 g

Agua desionizada

100 mL

Ajustar el pH a 7.5 con HCl 5M pureza 37%, aforar a 150 mL con agua DEPC.

10.2 Anexo B. Ladders

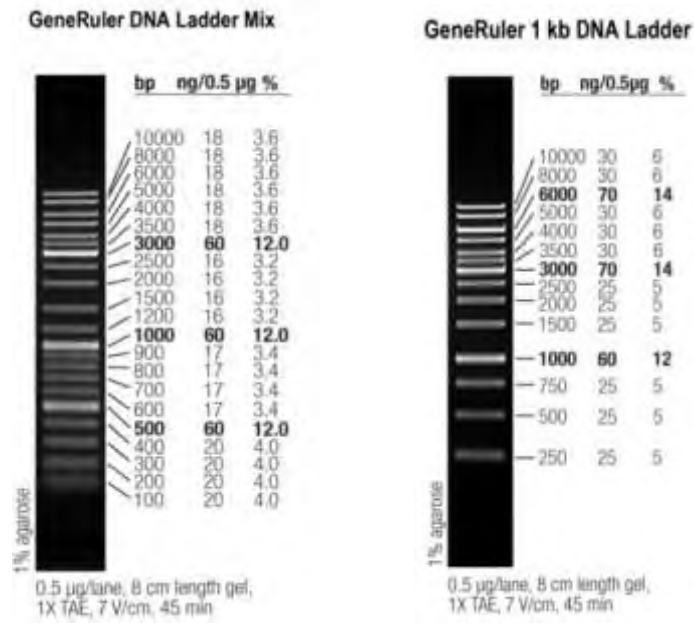


Figura c1. Marcadores de peso molecular usados en este trabajo.

10.3 Anexo E. Secuencia reconstruida a partir del contig 148667, de la enzima Dicer-1 de *H. vastatrix*

FGENESH+ 2.6 Prediction of potential genes in Puccinia genomic DNA
 Seq name: Conting 148667_RC_3-5
 Length of sequence: 9012
 Homology: tr|G3JX10|G3JX10_9BASI RNase III dicer-like protein Puccinia
 Length of homolog: 1386
 Number of predicted genes 1: in +chain 1, in -chain 0.
 Number of predicted exons 11: in +chain 11, in -chain 0.
 Positions of predicted genes and exons: Variant 1 from 1, Score:2844.287695

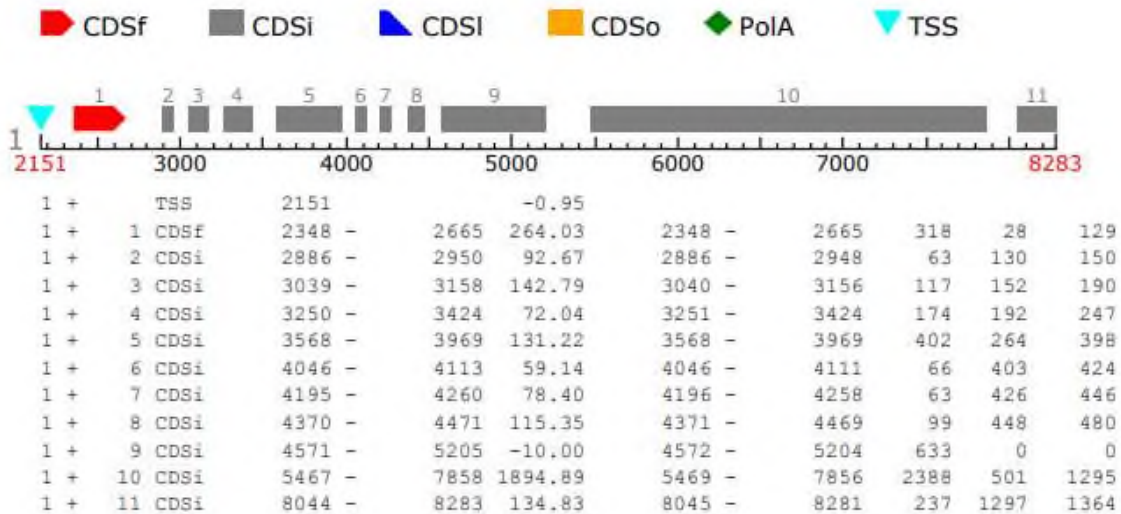


Figura c2. mRNA predicho en la herramienta bioinformática FGENESH1, se calculan 11 exones, longitud abarcada: 2348-8283 bp, longitud del mRNA: 4581 bp, cadena: +

ATGATCGATCAGGCTAAGACTCGTAATATCATTGTCCGATCTGACACCGGAACTGGAAAACTTTGGTGG
 CTATTCAGCTGATGCAATGGGTTGCTTCTCAGTCTCCTCAAGTGGACGAAGCCCAAAGCCTATCAAGAA
 AATTCAAGTCTTTCTTACTACTACCAGGCCTTTGGCGATTGAGCAAATGAAAGCTATCAACGATTCAACCT
 CTTTAGCAGTTCGTGCTTATACTGGTGATTTGAGACCAAGATTTTCCAGTGTTGAAAATGGAGTGTAGA
 ATTGAAAGGCATTGATATCATAGTGTGCACCGCTCAGGTTTCACTTCTTGTCTTTGATGAAGCTCACCATT
 GCCGAAAAAATCATGTTTATCGCATGATTATGCAAGTTCATTATCATCGGCTGGCTGAAAATCCAGAAAT
 CAGTCTTCTAAAATTTTAGGCTTGACGGCTTCTCCTATTTGGAAGTTGGGTGATCCTCACAAGGTTAAGC
 AGGAAATCAGGAATCTACAGAACAATCTTGCTCTCAAGTATATGAAGTTCGAGAAAACCGAGAAAACCT

TGAAACTTATACCCAAGAACCCAAAGAAAGGACCATTTATTACGATCTTTGTGTTCCACGGCCGCTATCT
TCACTTGACATGATTCCCTTCGGACGAGATACAGCAATTTTTAAGTGAAATCGGTATATACGGGTTGCAGA
AGAAGGACTTGATCTTCGCGAGTGCAATGTTGTTATTGATTTAATGACATAATAAACTGGAATCCTAC
ATCAATCTCGTGGACGGGCTCGCGCTAAAAATGCAGAATTTATTGTCTTTGCAAGTAAGGATGGAGTCA
GTAAATATGAACTCTTTGCTAACAAAAACAGAATTGATGTCACGAGCTCTCTTTATCTTGATCCACCTCAA
ATTGTTCCAAAAGGCGAAGTTGAGGTCACCCCTCAATTGATATGTACCTTTTCAGACGGCAATTTCGTCCAT
GTTGACCTACAGCGTCGCCTTGTCATCATCAATGAGTTTTGTCAGTCATTACCAAAAACAAGAAGATTCCC
AATCCGCTCAACCTATTTACAATGTTACAAGCACTCACTTAGGATTTGTTGCTGAACTCACCTCCCAGCCT
TTCAAAAATTGCCTACTAACAGCGAATATTTTTAGGAGGGGCGAAACCGAATAAGAAAGAGGCCATGA
AGGAGGCTGCATTCAAGGCTTGCATTGCTCTCTATGAAGCGAGTGCCCTAAGTGAACATTTTTCCAGT
GAAACCAGTTAAAGCAGATGAAACGATCGATTCTAATAGCGAAAAATTGGGCAACGTTCCGCATCAGAT
TGATCAAAGGCGAAGTTGAGGTTAACCTCCATTGATATGTATCCTTGCAAACGGTCATTCAACTAACT
TGACTCTGAGCACCGCTGTCTCAATCATTAAACGAGTTTTGCCAGCTATTACTGAGACCAGAAGATTCTCAA
CCGCTGAGGCTACGTATCATGTTACAAGCGAAGTTGAGGTTAACCTCAATTGATATGCACACTTGCAA
ATGGTAATTCATTCAATTTGACGTACTGCACCGCCTTGTCATTATCAATGAGTTTTGCCAGTCAGTAGCA
AAACAAGAAAATTCTCATGCCTCTCAACCTATATACAATGTTACAAGTACTCACATGGGATTTATTGCCGA
ACTTACCCTCCCAGCTTTTCGTCAATTTCTGCTAGCAAACAAATATTTTTGGGAGAGGGCGAAACCGAATA
AGAAGGAGGCTATGAGGGACACTGCATTCAAGGCTTGCCTTACTCTTTATGAAGCGGGTGTTTTAAATG
GACATTTTCTCCATTGAAACCAACTAAACCGTATGAAGCAATTGATGCTAATGGCAGGGAATTGGACAA
CCTTGATCTCCCTGAAAAAGTGGTAGTATGTTGTCCGAATCCATTTGGGAACTCCAAGATTCACCAGTG
CTGCATCTACACAAGCTTTCTTTCAATATTGGCGATCCCGAACCATGTTCAATTGGTTTCATATGCCAAAA
GAAGTTGAGTTTGCCTGATGGACTCTACCTTTGGGATCATATTCAGGAAGGGAAAACCTTTGCCAATTCGT
ATAGATGATGCTATCGAGCTTCAATGGAGACCTGAGGAGTTAGAACATAAATTTTTGATATTGACTGAGT
TTACTTTGTTTGGCATTCAAGCAGCCGTCCTCGAACGACTTACGATGGAAAGCTGCTGTTTTTACTTGCT
CCTTTAGTTGCAAATTCATGAAGATTGATTGGAATTTAGTGAAAACCAAGACGCCAATCGCGAGTG
TTGAGGAAGCTCTTCAAGCGCCTTATATTATTGTTCCCTTGAGGCCTCTACATTATCGAGTTCTCAAGGCA
ACCTCTTCTTAGATCTCACTCATGAATCAGAGCCACACCAAGTACCAAAAAGACTCTTGTAGCGCTAAATT
TATTACTAGAATATCAAAGTTCAAACTTTGAGCCATTTTCATGTTTGTAGTTTTCGATATTGACTATGAAA
AGTGTGATTCCCTCTGGTGTATGTGCAGTCCGCTTTACCCATCCACAATAACTTATCAAAAGTGCCTACA
GTTGAGAAAGAGCGATCATTTGCGTTCTTAGTGCCGATATCAGTTTGTTCGCCAGTTCAGCTCCATTTTC

GATATGGCGAATTTTTTCTTTATACCTGCCTTCACAAGACAAATGTATGACTCCCTACAGGCTGCCTCAG
TTTTAAAGCAATTAGAAGCACAGGAAGTTCCAATCTCATTAGCTGTTGAGGCCCTTACTCAACCTGGTATT
GGTGTGGTTGGGATTATCAAACGTTAGAAACCGTTGGTGATGCTTTTCTTAAGCTGGCTACTTCAGTTC
ATTTGTATTTATCTCAACCTTATAAAGGCGAAGGTGACTTAAGTGCTTTAAGATCTCGATCAGTGGATAAT
TTATACCTGAGAACGAAATCGTATACTGCTGGCTTAGGAGGTTACGTGTTAAGTCAACGATTTCCGGACTG
ATCGATTTAGGGCCCCACATGAAGAAGATGCAGAACTTTTAACTCTGGGGAGTTCACACAACGCAAGA
TACCTAGGAGAGTGTTGTCAGACATAGTTGAAGCTCTGCTCGGGGCAGGCTATTTATCTGGCGGTGTATC
AACTGCTTTAAAAATAGGCACTTCACTTGACCTTTCTTTGGTGGCACAACCTCATTGGGCTGAGCGACTTC
ATGATTTCCCGAATATTTTTGATGATACGTCTCAACCAGACCTTACCTCAGCATTGATTGAGCTGCAAGAT
AAGATCGGGTATCAATTTCAAACCCAGCCCTGCTACTTCAAGCGTTGACTCATAGAAGCGTCAGCTCTT
GTTTGACCAAATGTTGCGAAAGACAGGAATGGCTGGGCGATGCCGTTCTTGACTTGTGGATCACAGACA
AAATTTATCATAGATACGAGGGATCAACCGCAATCAGCTAACACTAACAGAGCTAGTTTAGTCACCAA
CGGCAGCATTGGCTTTCTTGCTATCCGCAAATTGCATTTGCACTTGAGGTTGCTTCACAATTCGCCAGAGT
TGCCGAACTATTCAAAAAAGCTATCACGGAAATTGAGCACTATCCGGACATACCCACTTTTTTTCATGAT
CTTACCAATGTCTTTACTGCTTTTCGATCCGCCAAGATACTGGGTGATGTGTTAGAAGCAATTGTGGGTG
CCGATTTGTAGATTCCGGTCTTAAATTAGAGACAGCATTTCAGCGCTTGATTTCAATTTATGAAGACGTT
TTGCCCTGCATCACTCGCTGTGAACCTATGGATCCTCTCTCCAACCTTTTGCATCTAAAAGACAGGTACCA
ATGTACTGGCTTGGAaaaaaAGTGTGAAATCGTCACAGAGAAAACGTCGGATGAAATCAACCGATTGAG
TAAGATTACTTTGAGGCGTTGCATATTTTTCTCCATGACCAAGTTATTGGTCAAGGTCAGCACCCGACAT
CAGTTTCATTGGCAGAGCAAAAGGCTGCCCAAGAGGCCCTAACTTTCTAAAGGCGATTGAGGCTACCC
AGTCCGAGGATGCCAGCAACCGTCTAGGAAAC ATATGCGATTGTATCAAATA

Enzima Dicer de *H. vastatrix* predicha en FGENESH+ mediante homología entre especies ortológicas, 1527 aa.

MIDQAKTRNIIVRSDTGTGKTLVAIQLMQWVASQSPQVDEAQKPIKIQVFLTTTRPLAIQQMKAINDESTSLA
VRAYTGDLRPRFSSVEKWSVELKGIDIIVCTAQVSLLVFDEAHHCRKNHVYRMIMQVHYHRLAENPEISLPKIL
GLTASPIWNLGDPHKVKQEIRNLQNNLASQVYEVRENRENLETYTQEPKERTIYYDLCVPRPLSSLDMIPSDEI
QQFLSEIGIYGKQLQYLSDWITLLLDSSLDQDYPRIDQEEFRGSLLSLLTKLEVILTQSSITSMTPKVMALIGYLLEH
ASIKSPSFHAILFIEQKRNAQILKKILDQIEELKPFIKSAVLTGHSSKSKANGGCGMKLRMQNEIIEKFKSGDINMI

ISTSVAEEGLDLRECNVVIRFNDIINWKSIIQSRGRARAKNAEFIVFASKDGVSKYELFANKNRIDVTSSLYLDPP
QIVPKGEVEVTPQLICTLSDGNSSMLTYSVALSIINEFCQSLPKQEDSQSAQPIYNVTSTHLGFVAELTLPAFQKL
PTNKRIFLGGAKPNKKEAMKEAAFKACIALYEASALSEHFFPVKPKADETIDSNSEKLGNVPHQIDSKGEVEV
NPPLICILANGHSTNLTSTAVSIIINEFCQLLLRPEDSQPPEATYHVTSEVEVNPQLICTLANGNSFNLTCTALSII
NEFCQSVAKQENSHASQPIYNVTSTHMGFIAELTLPAFRHFPASKQIFLGEAKPNKKEAMRDTAFKACVTLYE
AGVLNGHFLPLKPTKPYEAIDANGRELDNLDLPEKVVVCCPNPFGKLDSPVLHLHLKLSFNIGDPEPCSIGFICQ
KKLSLPDGLYLWDHIQEGKTLPIRIDDAIELQWRPEELEHNILILTEFTLFGIQAAVTRTTYDGKLLFLLAPLVANS
MKIDWNLVENHKTPIASVEEALQAPYIIVPLRPLHYRVLKATSSLDLTHESEPHQVPKDSCSAKFITRISKFKTLS
HFMFVVFDIDYEKCRFPLVYVQSALPIHNNLSKVPTVQKERSFRFLVPISVCFASSAPFSIWRIFSIFAPAFTRQMY
DSLQAASVLKQLEAQEVPISLAVEALTQPGIGVGWDYQTLETVGDAFLKLATS VHLYLSQPYKGEGLSALRSR
SVDNLYLRTKSYTAGLGGYVLSQRFRTDRFRAPHEEDAELLNSGEFTQRKIPRRVLSDIVEALLGAGYLSGGVST
ALKIGTSLDLSFGGTTHWAERLHDFPNIFDDTSQPDLTSAELQDKIGYQFQNPALLQALHRSVSSCLTKCC
ERQEWLGDVLDLWITDKIYHRYEGSTANQLTLTRASLVTNNGSIGFLAIRKLHLHLRLLHNSPELSELFKAITEI
EHYPDIPTFFHDLTNVFTAFDPPKILGDVLEAIVGAVFVDSGLKLETAFAQALDFIYEDVLPICITRCEPMDPLSNLL
HLKDRYQCTGLEKKCEIVTEKTSDEINRLSKITLRRCIFLHDQVIGQGQHPTSVSLAEQKAAQEALTFLKAI EAT
QSEDASNRLGNICDCIQI