



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

“Evaluación de un biofungicida basado en RNAs de doble cadena (dsRNAs) dirigidos contra genes de patogénesis de *Penicillium digitatum* para la protección de frutos de naranja (*Citrus sinensis*) en la etapa poscosecha”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:
JOSE IGNACIO BASILIO OLVERA

Directora: Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA, 2022



UNIVERSIDAD DEL PAPAALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS


En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 17 de noviembre de 2022 a las 16:15 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Evaluación de un biofungicida basado en RNAs de doble cadena (dsRNAs) dirigidos contra genes de patogénesis de *Penicillium digitatum* para la protección de frutos de naranja (*Citrus sinensis*) en la etapa poscosecha" presentado por el alumno Jose Ignacio Basilio Olvera, con número de matrícula 17090013, aspirante al título de Licenciatura.

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

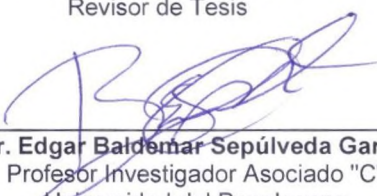
Tuxtepec, Oaxaca, a 17 de noviembre de 2022.

ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA

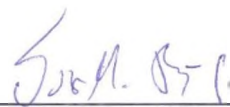

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis


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


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


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


Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Profesor Investigador Titular "B"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


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



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 18 de noviembre de 2022
Oficio No. JCIB/004/11/2022

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

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Jose Ignacio Basilio Olvera** titulado "**Evaluación de un biofungicida basado en RNAs de doble cadena (dsRNAs) dirigidos contra genes de patogénesis de *Penicillium digitatum* para la protección de frutos de naranja (*Citrus sinensis*) en la etapa poscosecha**", para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

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

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

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



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



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

**VICE-RECTORIA
ACADEMICA**

c.c.p. Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa. Director de tesis. Para su conocimiento
c.c.p. José Ignacio Basilio Olvera. Alumno. Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

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

www.unpa.edu.mx

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

Hoja de originalidad

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

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

Agradecimientos

A Dios por permitirme alcanzar este logro y ponerme al lado de personas que me han impulsado.

A mis padres, Ignacio Basilio Flores y Emilia Olvera Gasperin por creer en mí y darme la oportunidad de tener una carrera universitaria, por los sacrificios y esfuerzos que hicieron por mí, este logro y los que están por venir son de ustedes también, sin ustedes respaldándome no hubiera podido llegar tan lejos.

A mis abuelos maternos por el apoyo incondicional y siempre inculcarme el amor a la ciencia, por sus consejos y amor sin medida. A mis tíos por sus motivaciones y por brindarme de su ayuda. Mis hermanos, hermanas y familiares que han estado en el trayecto del camino.

Al M.M.M. Uribe Espejo Galicia por el apoyo académico y personal brindado, a Ricardo Silva por brindarme la oportunidad de realizar el servicio social bajo su supervisión y el apoyo personal brindado.

A mis compañeros de laboratorio, MBt. Saribel Zilli, Sofia Cavero, Max Lopez, Jorge García, Dr. Paul Sánchez por su amistad y la ayuda brindada durante mi estadía y trabajo experimental, por sus consejos, motivación y de esta manera haciendo que el ambiente de trabajo fuera ameno.

A Fernando Solano García por haberme instruido en el trabajo del laboratorio y enseñarme lo necesario para iniciar mis experimentos, por los consejos y la amistad brindada, de igual forma a Karla Esquivel por el apoyo y amistad.

Al Dr. Julián Mario Peña Castro, por todo el apoyo brindado, tanto académico, moral y personal. Por los consejos y estar siempre dispuesto a resolver dudas que surgieran.

Finalmente agradecer a la Dra. Blanca Estela Figueroa por haber aceptado ser mi directora de tesis, por la dirección, consejos, apoyo académico y personal, por los recursos. Por la confianza que depositó en mí y por el cariño brindado. Es una persona a la cual admiro mucho y tengo en gran estima, fue de las mejores decisiones haber trabajado con usted y me inspira a ser un investigador, es un ejemplo a seguir.

Resumen

La citricultura es una de las principales actividades agrícolas en México. Desafortunadamente, es vulnerable al ataque de hongos fitopatógenos que provocan grandes pérdidas, principalmente en la etapa poscosecha. Uno de los principales patógenos de cítricos es *Penicillium digitatum* que junto a *Penicillium italicum* puede llegar a causar hasta el 90% de las pérdidas totales en la producción. El desarrollo de una nueva generación de biofungicidas efectivos, amigables con el medio ambiente, y que no representen un peligro para la biodiversidad ni para la salud humana es uno de los retos más grandes de la biotecnología vegetal. Una tecnología novedosa llamada SIGS (silenciamiento génico inducido por aspersión), se basa en la aplicación de RNAs exógenos de doble cadena (dsRNAs). Los dsRNAs pueden ser tomados y procesados por la planta, o bien, tomados directamente por el patógeno, y una vez dentro de sus células, efectúan un proceso de silenciamiento génico sobre genes blanco. En el presente trabajo se tuvo por objetivo diseñar un fungicida de dsRNAs y evaluar su efecto en el control de *P. digitatum* sobre frutos de naranja. Para esto se realizó una búsqueda en la literatura de genes que se inducen durante el proceso infeccioso de *P. digitatum*, con la finalidad de identificar genes clave para la virulencia. A partir de dicho análisis se seleccionaron como blancos los genes, FET5 (transportador de hierro), Mic-33 (Proteína precursora de etileno), y NIP (Proteína inductora de necrosis), y se amplificaron mediante PCR regiones de estos genes que cumplieran con la condición de no tener similitud con el genoma de *C. sinensis*. Se amplificó un fragmento de 500 pb de FET5, y dos fragmentos de 250 pb de Mic-33 y NIP que posteriormente se fusionaron. Los fragmentos amplificados se adicionaron con la secuencia del promotor T7 en los extremos, se clonaron, se secuenciaron para su confirmación, y se emplearon como templados para la síntesis de dsRNA (RNAi) largos (ldsRNAs) y cortos (sdsRNAs). Los ldsRNAs de Mic-33/NIP y FET5 se mezclaron en cantidades equimolares y se aplicaron por aspersión sobre frutos de naranja en tres tiempos, y posteriormente con una suspensión de esporas de *P. digitatum*. Mediante el análisis del diámetro de las lesiones desarrolladas, se observó una inhibición estadísticamente significativa del desarrollo de la infección en las naranjas que fueron tratadas con ldsRNAs, pero sin diferencias estadísticas en términos de la incidencia de la infección ni en el desarrollo del hongo. Estos resultados abren nuevas direcciones para investigar a mayor detalle la escala temporal del efecto fungicida de los dsRNAs, así como estrategias alternativas para cuantificar el desarrollo de la infección, y con esto continuar explorando el potencial de uso de las formulaciones de dsRNAs para la protección de frutos de naranja en la etapa poscosecha.

Abstract

Citriculture is one of the main agricultural activities in Mexico. Unfortunately, it is vulnerable to fungal plant pathogens that cause huge losses, mainly in the postharvest stage. One of these pathogens is *Penicillium digitatum*, that together with *Penicillium italicum* can cause up to 90% of total production losses. The development of a new generation of effective biofungicides, safe for the environment and health, is one of the biggest challenges for plant biotechnology. A novel technology called SIGS (Spray-Induced Gene Silencing) is based on the application of exogenous double-stranded RNAs (dsRNAs). dsRNAs can be taken and processed by the plant, or can be taken directly by the pathogen, and once inside the cells initiate a process to silence target genes. This work aimed to design a dsRNA-based fungicide and to evaluate its effect in the control of *P. digitatum* on orange fruits. To achieve this, a search in the literature was performed to identify genes that are induced during the pathogenic process of *P. digitatum*, and to identify genes that are key to virulence. From this analysis, FET5 (iron transporter), Mic-33 (ethylene precursor protein), and NIP (necrosis inducer protein) were selected. Regions of these genes without similarity to the *Citrus sinensis* genome were selected and PCR amplified. A 500 bp fragment of FET5, and a fusion of two 250 bp fragments of Mic-33 and NIP, were added with the T7 promoter sequence in both ends. These constructs were cloned, sequenced and used as templates for the synthesis of long dsRNAs (ldsRNAs) and short dsRNAs (sdsRNAs). ldsRNAs of mic-33-NIP and FET5 were mixed in equimolar concentration and were applied in the form of spray over orange fruits three times. Then, a suspension of spores of *P. digitatum* was applied over the fruits. The analysis of the lesions developed 5 days after the infection revealed that there are statistically significant differences in the inhibition in the oranges that were treated with ldsRNAs but, without statistical differences in terms of incidence of the disease and fungal development. These results open new directions to investigate in a detailed way the temporal landscape of effectivity of ldsRNAs, and also to find alternative strategies to quantify the development of the infection, and thus continue exploring the potential of using dsRNA formulations as biofungicides for the protection of orange fruits in the postharvest stage.

INDICE GENERAL

1	Introducción	1
1.1	Importancia económica del cultivo de cítricos	1
1.2	Importancia de la producción de naranja	2
1.3	Problemas del cultivo de la naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	3
1.4	<i>Penicillium digitatum</i> y el proceso de infección del fruto de naranja	4
1.5	Métodos tradicionales y alternativos para el control de <i>P. digitatum</i>	6
1.6	Estrategias moleculares para el control de fitopatógenos en cítricos.....	8
1.7	Antecedentes directos de SIGS sobre <i>P. digitatum</i> en naranja.....	12
2	Justificación	14
3	Hipótesis	15
4	Objetivos.....	15
4.1	Objetivo general	15
4.1.1	Objetivos específicos.....	15
5	Secuencia experimental	16
6	Materiales y Métodos	17
6.1	Material biológico	17
6.2	Extracción de DNA genómico	17
6.3	Selección de genes candidatos para SIGS implicados en la patogénesis de <i>P. digitatum</i>	18
6.4	Búsqueda de secuencias y alineamientos	18
6.5	Diseño y construcción de templados para la síntesis de RNAi.....	19
6.5.1	Amplificación de fragmentos de los genes de interés.....	19
6.5.2	Purificación de productos de PCR.....	20
6.5.3	Fusión de productos de PCR y adición de la secuencia del promotor T7.....	20
6.5.4	Clonación	21
6.6	Síntesis de dsRNAs	23
6.6.1	Bioensayos de actividad del biofungicida de dsRNAi.....	23
6.6.2	Análisis estadístico	25
7	Resultados y discusión.....	26
7.1	Recuperación de <i>Penicillium digitatum</i> y extracción de DNA genómico.	26
7.2	Identificación de genes clave en la patogénesis de <i>P. digitatum</i>	27
7.3	Selección de la región de diseño de dsRNAs	33
7.4	Diseño del RNA de interferencia y construcción del templado para la síntesis de dsRNAs	35

7.5	Confirmación de las construcciones mediante secuenciación.....	39
7.6	Síntesis de dsRNAi	42
7.7	Actividad fungicida de la formulación de dsRNAs sobre <i>P. digitatum</i>	43
8	Conclusiones	53
9	Perspectivas	54
10	Referencias	55
Anexo 1	61
Anexo 2	62
Anexo 3	64
Anexo 4	65
Anexo 5	66
Anexo 6	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Exportaciones globales de cítricos mandarina, naranja, limón y toronja con tendencia a la alza, expresados en millones de toneladas (USDA, 2021).	1
Figura 2.	A) Síntomas del moho verde causado por <i>P. digitatum</i> ; B) Colonias de <i>P. digitatum</i> ; C) Conidiosporas de <i>P. digitatum</i> (Bautista-Banos y Bautista-Banos, 2014).	4
Figura 3.	Progresión temporal de los síntomas en naranja infectada con <i>P. digitatum</i> a 25°C. CK: Control inoculado con agua (Qian <i>et al.</i> , 2019).	5
Figura 4.	Diagrama simplificado de los factores moleculares involucrados en la infección de <i>P. digitatum</i> sobre el fruto de naranja. EFE:Enzima formadora de etileno; CWDEs: Enzimas degradadoras de pared celular; LysM: Efector que contiene dominio de Lisina; PTI: I. Modificado de Yang <i>et al.</i> , 2019.	6
Figura 5.	Efecto fungicida de dsRNAs empleados en SIGS. Pato sistema/gen(es) diana: A) Uva- <i>Plasmopara viticola</i> , DCL1 y DCL2 (Haile <i>et al.</i> , 2021), B) Arroz- <i>Rhizoctonia solani</i> , DCTN y SAC, y C) <i>A. thaliana</i> - <i>Verticillium dahliae</i> , DCL1 y DCL2 (Qiao <i>et al.</i> , 2021); D) Cebada- <i>Fusarium graminearum</i> , DCL1 y DCL2 (Werner <i>et al.</i> , 2020); E) Cebada- <i>F. graminearum</i> , CYP51 (Koch <i>et al.</i> , 2019); F) <i>Brasica napus</i> - <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , Tioredoxina reductasa (McLoughlin <i>et al.</i> , 2018); G) <i>Capsicum annum</i> - <i>Phytophthora capsici</i> , efectores RLXR1 y RLXR4 (Cheng <i>et al.</i> , 2022), H) <i>Cucurbita pepo</i> - <i>Podosphaera xanthii</i> , glycosil transferasa putativa (Ruíz-Jiménez <i>et al.</i> 2021), I) Jitomate- <i>Aspergillus niger</i> , DCTN y SAC, J) Jitomate- <i>Botrytis cinerea</i> , DCL1 y DCL2, K) Manzana- <i>A. niger</i> , DCTN y SAC (Qiao <i>et al.</i> , 2021); L) Uva- <i>B. cinerea</i> , DCL1 y DCL2, y M) Fresa- <i>B. cinerea</i> , DCL1 y DCL2 (Wang <i>et al.</i> , 2016). DCTN: Dinactina. SAC: Supresor de actina. DCL: Dicer-like. CYP51: Esterol 14 α demetilasa.	11
Figura 6.	Secuencia experimental.	16
Figura 7.	Diagrama general de fusión de fragmentos de Mic-33 y NIP	22
Figura 8.	Recuperación de <i>P. digitatum</i> . A) Desarrollo en medio PDA tras 7 días de incubación, B) Esporas observadas al microscopio (40X), y C) capacidad infectiva de <i>P. digitatum</i> sobre naranja, donde se observan las lesiones características.	26
Figura 9.	DNA genómico de <i>P. digitatum</i> . Gel de agarosa al 1% en TAE. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA.	27
Figura 10.	Resultados del análisis BLAST de los genes seleccionados contra la base de RNA	

mensajeros de <i>C. sinensis</i> . A) BLASTn del gen FET5, B) BLASTn del gen NIP, C) BLASTn de Mic-33.....	33
Figura 11. A) Región seleccionada de 501pb del gen FET5 para su amplificación, B) Región seleccionada de 250pb del gen Mic-33 para su amplificación, C) Región seleccionada de 250pb del gen NIP para su amplificación.....	34
Figura 12. A) Resultados de BLASTn para evaluar homologías entre la región de 501pb seleccionada de FET5 y el genoma de Citrus sinensis, B) Resultados de BLASTn para evaluar homologías entre la construcción Mic33-NIP y el genoma de Citrus Sinensis.	35
Figura 13. Amplificación de NIP y Mic-33. Gel de agarosa al 1% en TAE. Se visualiza la amplificación exitosa de NIP y Mic-33, con un tamaño de 250pb. P.d: <i>Penicillium digitatum</i> ; (-): Control negativo.....	36
Figura 14. Producto de amplificación de FET5 (lado izquierdo). Gel de agarosa al 1% en TAE. P. d: <i>Penicillium digitatum</i> ; (-): Control negativo.....	36
Figura 15. Amplicones con adaptación de oligonucleótidos complementarios en preparación para la fusión. Gel de agarosa al 1% en TAE. Se observan bandas de 273pb (tamaño esperado), y algunas unas bandas inespecíficas de 500pb. P.d: <i>Penicillium digitatum</i> ; (-): Control negativo.....	37
Figura 16. A) Producto de amplificación de la construcción Mic33-NIP, revelando una fusión exitosa y el tamaño esperado de 500pb. B) construcción flanqueada por el promotor T7, con un tamaño de 546pb. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.....	38
Figura 17. Producto de amplificación de FET5 flanqueado por el promotor T7 (centro, FET5+T7). Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.....	39
Figura 18. Productos de amplificación de PCR de colonia de la clonación de la construcción Mic33-NIP en células de <i>E. coli</i> químicamente competentes (One Shot Top 10), amplificada con primers M13 obteniendo una banda de 780pb en las colonias que se clonaron exitosamente (Clonas 1,2,3,4,5,7,8,10,12). Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.	40
Figura 19. Productos de amplificación de PCR de de colonia de la clonación de FET5 en células de <i>E. coli</i> químicamente competentes (One Shot Top 10). Amplificadas con primers M13, obteniendo una banda de 781pb en las colonias clonadas exitosamente (clonas 4,5,8,9,10). Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.....	41
Figura 20. Análisis de la secuencia Mic33-NIP. Alineamiento (BioEdit) entre las secuencias recuperadas de la secuenciación y la secuencia de la construcción obtenida de bases de datos.....	39
Figura 21. Análisis de la secuencia FET5. Alineamiento (BioEdit) entre las secuencias recuperadas de la secuenciación y la secuencia de la región del gen obtenida de bases de datos.....	40
Figura 22. Productos de la síntesis de ldsRNAi y sdsRNAi de FET5 y la construcción Mic33-NIP. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.....	41
Figura 23. Incidencia de la infección expresada como número de naranjas infectadas de un total de 15 individuos.....	42
Figura 24. Bioensayo de inhibición de desarrollo de la infección de <i>P. digitatum</i> sobre frutos de naranja con 3 dosis de biofungicida.....	43
Figura 25. Réplica 1 y 2. Desarrollo de la infección en naranjas tratadas con dsRNAs y en condiciones control.....	44
Figura 26. Tercera réplica del bioensayo de inhibición del desarrollo de <i>P. digitatum</i> sobre frutos de naranja.....	46
Figura 27. Promedio de diámetros de infección de <i>P. digitatum</i> sobre frutos de naranja.....	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estimaciones acerca de la producción, exportación y valor económico del cultivo de los cítricos, así como su crecimiento en el periodo 2016-2030. Tomado de SAGARPA (2016).....	2
Tabla 2. Principales productores de naranja en el mundo.	2
Tabla 3. Principales estados productores de naranja en el periodo 2018/2019 (USDA, 2020). ..	3
Tabla 4. Parámetros de BLASTn utilizados para evaluar los efectos off-target.....	19
Tabla 5. Preparación de reacciones de PCR para la amplificación de fragmentos seleccionados.	19
Tabla 6. Condiciones de la reacción de PCR	19
Tabla 7. Programa de fusión de fragmentos Mic-33 y NIP.....	21
Tabla 8. Componentes del mix para la PCR de colonia usando de molde parte de la colonia..	23
Tabla 9. Preparación de reacciones de síntesis de ldsRNAi e sdsRNAi	24
Tabla 10. Concentración y masa total de DNA genómico de <i>P. digitatum</i>	26
Tabla 11. Resumen de resultados de la búsqueda avanzada	28
Tabla 12. Genes seleccionados preliminarmente según su nivel de inducción (Yang et al., 2019). Los genes delimitados por recuadros son los seleccionados para el diseño de SIGS. ...	31
Tabla 13. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las regiones seleccionadas.....	35
Tabla 14. Oligonucleótidos con extremos complementarios para la fusión de Mic-33 y NIP	37
Tabla 15. Primers diseñados para añadir la secuencia del promotor T7 a los extremos de la construcción y fragmento FET5.....	38
Tabla 16. Datos y análisis estadístico (prueba de Tukey) del diámetro de crecimiento de la infección de <i>P. digitatum</i> sobre frutos de naranja en la réplica 1 y 2 (3 dosis de ldsRNAs).....	47
Tabla 17. Datos y análisis estadístico (análisis de varianza) del diámetro de crecimiento de la infección de <i>P. digitatum</i> sobre frutos de naranja en la réplica 1 y 2. $P < 0.05$: Diferencias estadísticamente significativas.	47
Tabla 18. Diámetro de crecimiento de la infección de <i>P. digitatum</i> sobre frutos de naranja. Datos correspondientes a la comparación entre la aplicación de 3 y 2 dosis de ldsRNAs.	50
Tabla 19. Análisis de varianza correspondiente al experimento de inhibición del desarrollo de infección de <i>P. digitatum</i> (3 dosis vs 2dosis). $p < 0.05$ por lo que hay diferencias significativas. 50	

1 Introducción

1.1 Importancia económica del cultivo de cítricos

La citricultura es una de las actividades agrícolas que mayores ingresos económicos generan a nivel mundial. En 2016 la producción de cítricos representó la quinta parte de la producción mundial de frutas (Yin *et al.*, 2020). Los cítricos se desarrollan mejor en climas tropicales y subtropicales, de esta manera los países del hemisferio norte aportan la mayor producción de estas frutas, entre los que destacan: México, Estados Unidos, España, China e Italia (USDA, 2021).

De acuerdo con las estadísticas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, se estima un crecimiento mundial del 4% en la producción de cítricos, llegando hasta los 98 millones de toneladas en el lapso de 2020-2021, y las exportaciones mundiales, estimadas en 11 millones de toneladas, están mayormente constituidas de naranjas, con más del 40%, seguido por mandarinas con casi 30% (Fig. 1) (USDA, 2021).

El cultivo de cítricos en México es una de las principales actividades agrícolas. México es uno de los principales exportadores internacionales; para el 2024 se estima la exportación de 3.26 millones de toneladas representando un valor de 2,000.86 millones de dólares (Tabla 1). La producción de éstos representa el 2.78% del PIB agrícola nacional y constituyen el 36.89% de la fruta producida en el país (SAGARPA, 2016).

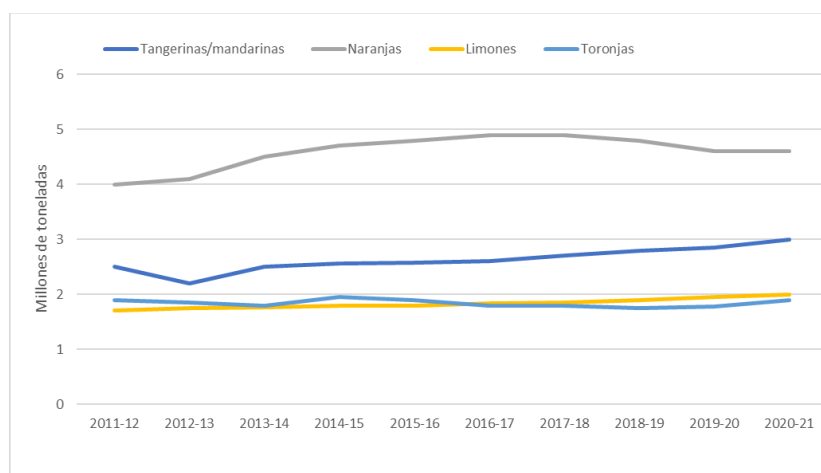


Figura 1. Exportaciones globales de cítricos mandarina, naranja, limón y toronja con tendencia a la alza, expresados en millones de toneladas (USDA, 2021).

Tabla 1. Estimaciones acerca de la producción, exportación y valor económico del cultivo de los cítricos, así como su crecimiento en el periodo 2016-2030. Tomado de SAGARPA (2016).

AÑO / PERIODO	ESTIMACIONES**				CRECIMIENTO ACUMULADO**				CRECIMIENTO PROMEDIO ANUAL**	
	2016	2018	2024	2030	2003-2016	2016-2018	2016-2024	2016-2030	2003-2016	2016-2030
Producción potencial*** (millones de toneladas)	7.46	8.13	10.17	12.20	25.20%	9.08%	24.98%	63.58%	1.74%	3.34%
Exportaciones (millones de toneladas)	0.75	1.37	3.26	5.16	115.28%	84.33%	137.48%	591.41%	6.08%	13.76%
Valor de exportaciones (millones de dólares a precios de 2016)	457.09	842.54	2,000.86	3,160.39						

1.2 Importancia de la producción de naranja

La naranja es el cítrico de mayor producción a nivel mundial. En 2019 se registró una producción de 47.5 millones de toneladas de naranja a nivel mundial (Statista, 2020). La lista de países productores mayoritarios está encabezada por Brasil, con 17,251,291 toneladas producidas, seguido por China, India y Estados Unidos. El quinto lugar está ocupado por México, con una cuarta parte de la producción de Brasil (Tabla 2).

Tabla 2. Principales productores de naranja en el mundo.

País	Producción (toneladas)	Superficie (hectárea)
Brasil	17,251,291	658,945
República Popular China	8,550,865	505,700
India	7,503,000	578,000
Estados Unidos de América	5,160,000	223,144
México	4,603,253	314,588
Egipto	3,438,030	136,015
España	3,137,546	151,487

Entre todos los cítricos, la naranja dulce (*Citrus sinensis*) posee la mayor superficie cultivada en México. El estado de Veracruz ha sido por mucho el mayor productor de naranjas, con el 50% de la superficie plantada y el 55% de la producción total durante 2018/19, por ejemplo. Otros estados productores importantes son Tamaulipas, San Luis Potosí y Puebla, además de otros estados que en conjunto contribuyen con las 342,716 Ha totales dedicadas al cultivo de 4,389,364 toneladas de naranja en el país (Tabla 3) (USDA, 2020).

Tabla 3. Principales estados productores de naranja en el periodo 2018/2019 (USDA, 2020).

Estado	Área cultivada (Ha)	Porcentaje	Producción (ton)	Porcentaje
Veracruz	169,966	50%	2,399,705	55%
Tamaulipas	33,201	10%	509,760	12%
San Luis Potosí	32,779	10%	286,288	7%
Puebla	29,019	8%	229,481	5%
Nuevo León	25,576	7%	318,353	7%
Estados restantes	52,175	15%	645,777	15%
Total	342,716	100%	4,389,364	100%

La producción nacional de naranja satisface el 100% del consumo interno. La naranja es el principal cítrico dulce consumido en México, con un consumo anual per cápita de 37.4 kilos (USDA, 2020). Los excedentes se exportan principalmente hacia Estados Unidos, Reino Unido y Países Bajos (SAGARPA, 2017). La mayoría de las naranjas exportadas a Estados Unidos son naranjas Navel cultivadas en Sonora.

1.3 Problemas del cultivo de la naranja (*Citrus sinensis*)

El cultivo de la naranja enfrenta una serie de problemáticas. Entre éstas se encuentran las enfermedades causadas por una diversidad de organismos fitopatógenos que infectan a las plantas causando bajos rendimientos y/o estropeando el fruto cosechado (Li *et al.*, 2021). Un ejemplo de esto es la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB), también llamada dragón amarillo, que es causada por la bacteria *Candidatus liberibacter spp.* y que produce pérdida de vigor y muerte de la planta con producción de frutos amargos. Esta enfermedad es la más grave de los cítricos e impacta su producción alrededor del mundo, causando pérdidas económicas graves en los países productores (Wang y Trivedi, 2013).

Al nivel poscosecha, el cultivo de la naranja también está expuesto al ataque de fitopatógenos. El principal ejemplo de esto es la pudrición poscosecha conocida comúnmente como moho verde o moho azul, causadas por *Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum*. Estas formas de pudrición poscosecha causan hasta el 90% de las pérdidas totales de cítricos (Cheng *et al.*, 2020). Además de esto, para el desarrollo del cultivo en México existen otros obstáculos para el cuidado del fruto una vez cosechado, por esto se busca implementar el mejoramiento de infraestructura, equipos

básicos y especializados, añadiendo campañas de protección fitosanitaria y de cuidado integral del cultivo (SAGARPA, 2016).

1.4 *Penicillium digitatum* y el proceso de infección del fruto de naranja

Penicillium digitatum es un hongo necrotrófico y el causante del moho verde en cítricos. Pertenece a la división Ascomycota, subdivisión Pezizomycotina, clase Eurotiomycetes, subclase Eurotiomycetidae, orden Eurotiales, familia Trichocomaceae y género *Penicillium*. Este hongo fitopatógeno forma conidiosporas que asemejan manos con dedos largos, de ahí su nombre “digitatum” (Fig. 2C). *P. digitatum* solo puede infectar a los cítricos mediante heridas hechas en la poscosecha, y la infección puede ocurrir mientras se cortan los frutos del árbol, en el transporte, en las casas de empaquetado o en la comercialización, por lo que para reducir las pérdidas por pudrición del fruto en la cosecha, es crucial establecer medidas para el correcto manejo, transporte y almacenamiento de los frutos (Yang *et al.*, 2019).

El proceso patogénico de *P. digitatum* se inicia cuando las esporas entran en contacto con heridas en el fruto. La zona de infección inicial se observa como una pequeña mancha acuosa sobre la cáscara, que luego se cubre con micelio blanco. Al cabo de 48-72 horas, el hongo habrá completado su ciclo produciendo esporas de color verde que son características de la infección (Fig. 2A-B, Fig. 3).

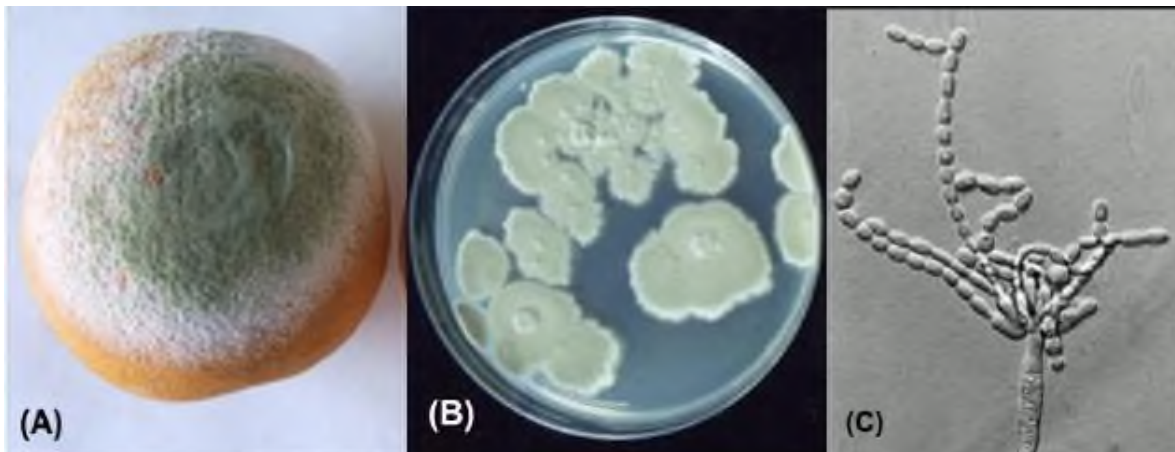


Figura 2. A) Síntomas del moho verde causado por *P. digitatum*; B) Colonias de *P. digitatum*; C) Conidiosporas de *P. digitatum* (Bautista-Banos y Bautista-Banos, 2014).

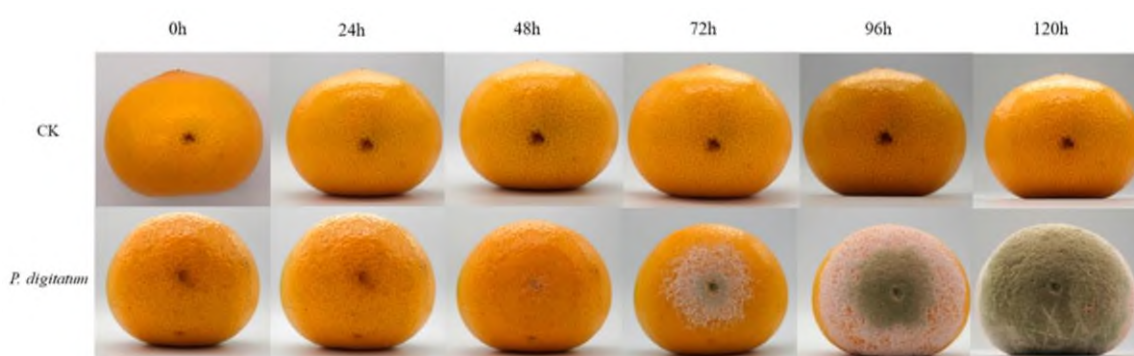


Figura 3. Progresión temporal de los síntomas en naranja infectada con *P. digitatum* a 25°C. CK: Control inoculado con agua (Qian *et al.*, 2019).

A partir del análisis transcriptómico de *P. digitatum* se ha descrito una serie de genes que se activan en el proceso de patogénesis (Fig. 4). Estos genes no solo se relacionan con el desarrollo del patógeno, sino también con su respuesta ante la defensa oxidativa del huésped, la necesidad de romper las barreras celulares del fruto, la acidificación del sustrato, y la producción de efectores patogénicos (Yang *et al.*, 2019).

La respuesta de defensa por parte de la planta involucra la producción de especies reactivas de oxígeno, como el H_2O_2 , que actúan para inhibir directamente el crecimiento del hongo y/o para señalar la respuesta hipersensible de muerte celular, a lo que *P. digitatum* responde suprimiendo la producción de H_2O_2 (Macarisin *et al.*, 2007). Para esto, *P. digitatum* induce la expresión de enzimas antioxidantes en el proceso de infección como la catalasa y la glutatión-S-transferasa, logrando bloquear la respuesta de defensa del huésped (Fig. 4). Además de esto, varios genes de virulencia que codifican enzimas degradadoras de pared celular, (CWDEs) por sus siglas en inglés, como pectinasas y celulasas (Qian *et al.*, 2019) se expresan fuertemente para ayudar a los patógenos a romper las barreras del tejido del fruto y de esta manera acceder a los nutrientes que requiere para crecer (Fig. 4).

El proceso patogénico de *P. digitatum* involucra además la acidificación del tejido a través de la síntesis y la secreción de ácidos orgánicos (Prusky *et al.*, 2004). La disminución del pH es necesaria para el crecimiento del hongo y la actividad de enzimas CWDEs. También, se requiere la producción de etileno (Marcos *et al.*, 2005) y de una variedad de efectores con diversidad funcional, como las proteínas inductoras de necrosis, con el objetivo de bloquear la respuesta de inmunidad en la planta (Fig. 4).

(Papoutsis *et al.*, 2019). Por ejemplo, el uso de imagen multiespectral con la finalidad de detectar lesiones en los frutos en las etapas iniciales de la enfermedad para su remoción de los empaques (Golzarian *et al.*, 2018). Otros métodos físicos para el control de *P. digitatum* emplean radiaciones. Los tratamientos con luz azul por LED se proponen como tecnologías ecológicas, energéticamente baratas, seguras y efectivas en el control de crecimiento de patógenos. Por ejemplo, Liao *et al.* (2013) emplearon luz azul para irradiar frutos inoculados con *P. digitatum*, observando que 24h de tratamiento de luz son suficientes para reducir significativamente el desarrollo de la infección. Lafuente *et al.* (2018) reportaron que el tratamiento de las esporas con LED de luz azul durante 3 días logra reducir la viabilidad y la capacidad de *P. digitatum* para infectar los frutos de naranja. No obstante, el tiempo necesario para que el tratamiento sea eficaz es un obstáculo para su aplicación práctica (Strano, s.f.).

Por otra parte, se han empleado tratamientos térmicos aplicando temperaturas de hasta 50°C en baños o por microondas, obteniendo buenos resultados para el control de *P. digitatum* en cítricos (Queb-González *et al.*, 2020). Los tratamientos térmicos con agua caliente se pueden dividir en dos, inmersión en agua caliente (HWD, por sus siglas en inglés) y enjuague y cepillado con agua caliente (HWRD, por sus siglas en inglés); HWD consiste en inmersiones cortas (1 a 5 min) en agua con una temperatura entre 40-55°C, mientras que HWRD involucra el uso de cepillos giratorios y agua con un rango de temperatura de 55-65°C. A pesar de mostrar reducciones significativas en la incidencia de infección, ambos métodos son costosos para su aplicación comercial y en el caso de HWD se limita al uso en cítricos cultivados orgánicamente (Strano, s.f.). También se reporta el empleo de coberturas de aceites esenciales y ceras para el control del patógeno (Du Plooy *et al.*, 2009; Kouassi *et al.*, 2012), y el uso de bicarbonato de sodio y sorbato de potasio, en combinación con otros tratamientos como baños térmicos y fungicidas (Smilanick *et al.*, 2008). Adicionalmente, se ha propuesto el empleo de productos naturales tales como aceites esenciales de tomillo y clavo (Yayahzadeh *et al.*, 2009), de naranja agria (Trabelsi *et al.*, 2016), y extractos de *Solanum nigrum* (Musto *et al.*, 2014), entre otros.

Aunque existe una diversidad de posibilidades para el control de *P. digitatum*, aún se enfrentan problemas derivados del uso continuo y excesivo de fungicidas químicos, que además de constituir un riesgo al ambiente y a la salud humana, tienden a crear resistencia en *P. digitatum* tras su uso repetitivo (Kinay *et al.*, 2007). Los métodos físicos de control también requieren la disponibilidad de infraestructura para realizar los tratamientos, lo que incrementa los costos de los productos.

Una tendencia en las propuestas recientes para el control de *P. digitatum* es el empleo de moléculas con actividad estimulante de la defensa del huésped y se han evaluado sustancias derivadas de plantas con propiedades antimicrobianas, con aplicaciones tanto antes y después de la cosecha. Esta estrategia es muy prometedora debido a la actividad antifúngica bien documentada, baja fitotoxicidad, amigable con el medio ambiente (Strano, s.f.). Por ejemplo, Pangallo *et al.* (2017) reportaron que el extracto de granada ejerce un efecto estimulante de la defensa en cítricos que brinda protección contra el ataque posterior de *P. digitatum* y *P. italicum*. En otro estudio, Moreno-Kirinus *et al.* (2021) reportaron la actividad de una serie de compuestos químicos que tras la aplicación precosecha estimulan la defensa en la planta y proporcionan defensa sistémica adquirida contra *P. digitatum* en los frutos, lo que protege a los frutos de infecciones en la etapa poscosecha. Los altos costos de purificación, inestabilidad y toxicidad no específica, hace que estos métodos sigan estando en etapa experimental sin poder escalarse comercialmente.

En la última década se han explorado estrategias para el control biológico de *P. digitatum*. Por ejemplo, la levadura *Saccharomycopsis craetaeensis* en combinación con bicarbonato de sodio (Pimenta *et al.*, 2010), *Bacillus amyloquefaciens* en combinación con saponinas de la semilla de te (Hao *et al.*, 2011), *Pseudomonas fluorescens* (Wang *et al.*, 2018) y combinaciones de cepas de *Pseudomonas spp.* y *Trichoderma spp.* (Panebianco *et al.*, 2015), entre otros. Todos estos estudios han demostrado el potencial del uso de agentes de biocontrol como una alternativa al uso de fungicidas químicos. Se debe añadir que a pesar de los resultados prometedores de los antagonistas microbianos a escala laboratorio, a nivel comercial es aun limitada su aplicación por su elevado costo (Strano, s.f.).

1.6 Estrategias moleculares para el control de fitopatógenos en cítricos

Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva de moléculas biológicas han ampliado las posibilidades de comprender las bases de los procesos de patogénesis y las respuestas de defensa en las plantas. La secuenciación de genomas completos y de transcriptomas durante la interacción planta-patógeno ha revelado la complejidad de las relaciones que se establecen entre los organismos, la evolución de los mecanismos de infección y respuesta, y las bases de la resistencia a los patógenos (Yang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2013). Estos avances han revelado genes y proteínas clave a partir de las cuales se pueden proponer soluciones específicas para

el control de las enfermedades y la protección de cultivos económicamente importantes, que aprovechan el conocimiento de los mecanismos naturales de tolerancia a las enfermedades y permiten desarrollar biotecnologías limpias y amigables al ambiente.

Una de estas estrategias es el uso de péptidos con actividad biológica sobre patógenos. Por ejemplo, Huang *et al.*, (2021) realizaron secuenciación masiva de RNAs pequeños y RNAs mensajeros en cítricos sensibles y tolerantes al Huanglongbing (HLB). Como resultado identificaron, entre otros, un genes que codifican péptidos antimicrobianos estables (por sus siglas en ingles SAMPs) en la respuesta inmune de la planta y que le confiere tolerancia al HLB. Cuando a dicho péptido se le aplicó por aspersión en árboles enfermos, no sólo disminuyó los síntomas de la enfermedad, sino que además estimuló la defensa inmune de la planta a nivel sistémico para evitar nuevas infecciones. Con esto se propuso la primera estrategia para proteger y tratar de manera efectiva árboles de cítricos infectados con HLB, misma que actualmente se desarrolla para su escalamiento a nivel comercial por la compañía INVAIO (2021).

Otra estrategia novedosa es el silenciamiento génico inducido por aspersión, o SIGS por sus siglas en inglés (spray-induced gene silencing). En la exploración sobre los mecanismos de infección de hongos y de respuesta de las plantas se ha descubierto el papel que tiene los RNAs pequeños durante la interacción planta-patógeno. Los RNAs pueden moverse entre huésped y patógeno o parásito, y de esta manera pueden inducir el silenciamiento de genes para inhibir las respuestas inmunitarias del huésped o de ataque del patógeno. Este fenómeno se llama cross-kingdom RNAi (Wang *et al.*, 2016).

SIGS consiste en la aplicación de RNAs de doble cadena (RNAi, dsRNAs) exógenos, diseñados para silenciar genes clave para el desarrollo, el crecimiento y/o la infectividad del patógeno, de tal manera que afecten su capacidad de interactuar con la planta y de establecer la infección y sus efectos. La efectividad de SIGS depende primariamente de la capacidad del patógeno para recibir dsRNAs ambientales (Qiao *et al.*, 2021), y posteriormente del potencial de éstos para silenciar a los genes diana. Otro aspecto importante es la selección adecuada de genes a silenciar y la estabilidad de los dsRNAs en el ambiente.

La estrategia SIGS ha mostrado su efectividad contra una variedad de hongos patógenos como *Plasmopara viticola*, *Fusarium graminearum*, *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*, *Hyaloperonospora arabidopsidis*, *F. asiaticum*, *F. oxysporum*, *Mycosphaerella fijiensis*,

Sclerotinia sclerotiorum, *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani*, y *Verticillium dahliae*, entre otros (Refs. en Fig. 5). En estos trabajos se han diseñado RNAs para el silenciamiento de diferentes genes en los patógenos, por ejemplo, genes blanco de fungicidas como la esterol 14 α demetilasa (CYP51A, B y C) (Koch *et al.*, 2016), MAP cinasas, genes del ciclo celular y la respuesta antioxidante (McLoughlin *et al.*, 2018), y genes de la rutas de producción de RNAs pequeños como Argonauta (AGO) (Werner *et al.*, 2020) y Dicer-like (DCL) (Wang *et al.*, 2016; Haile *et al.*, 2021).

A la fecha solo existe un reporte de la exploración de la estrategia SIGS para el control de hongos en cítricos, de acuerdo al string de búsqueda que se especifica en Anexo 1. En dicho trabajo, Yin *et al.*, (2020) generaron células transformadas de *P. italicum* con incapacidad de producir las proteínas Dicer-like 1 o 2 (*DCL1*, *DCL2*) y observaron que las líneas transformadas, especialmente *DCL2*, tenían virulencia reducida sobre frutos de mandarina. Después emplearon dsRNAs diseñados para silenciar los genes *DCL1* y *DCL2* del patógeno, los aplicaron por aspersión sobre frutos de mandarina y posteriormente las inocularon con *P. digitatum* silvestre, observando el silenciamiento de ambos genes y la disminución en la virulencia del patógeno.

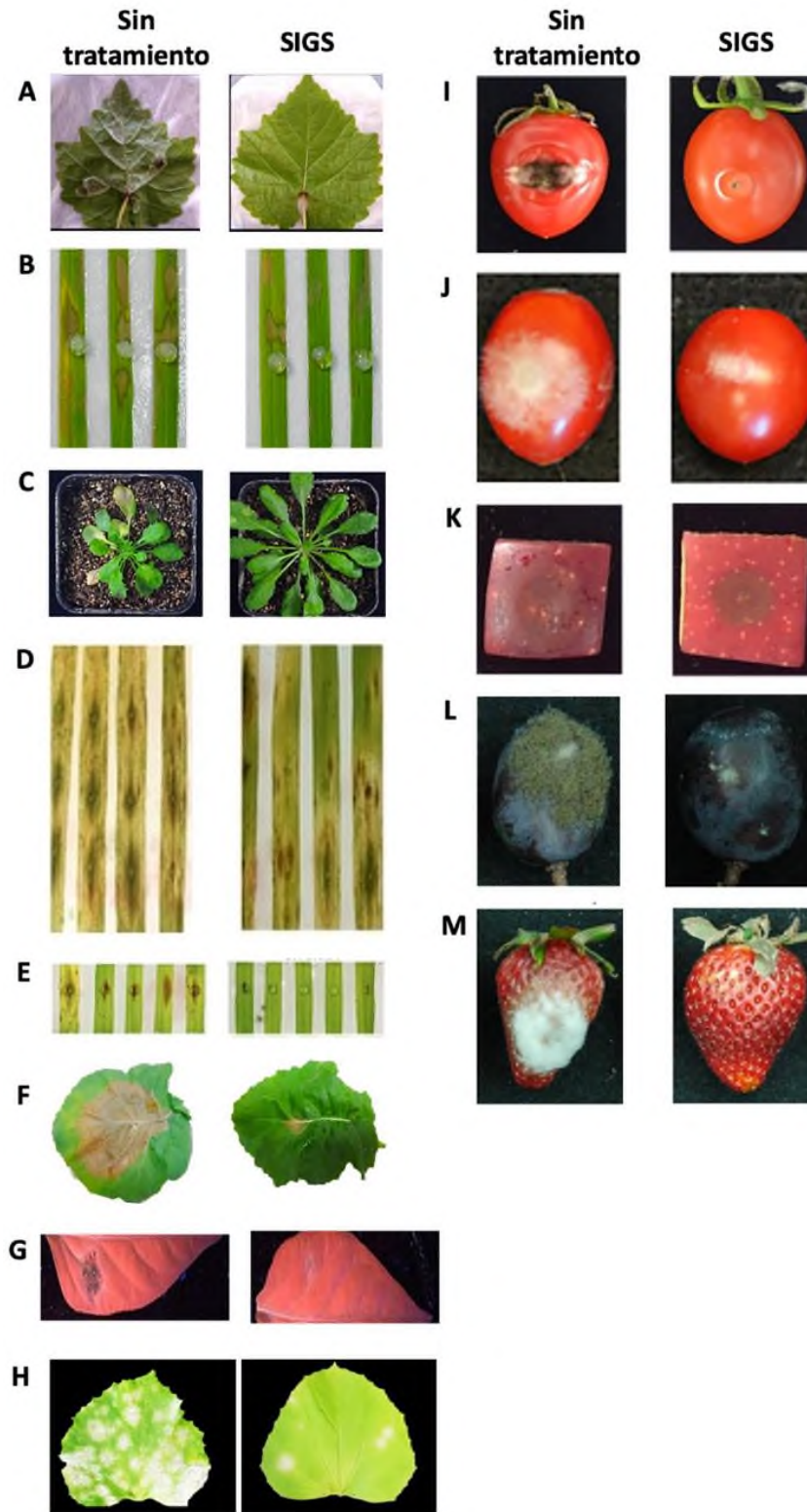


Figura 5. Efecto fungicida de dsRNAs empleados en SIGS. Patosistema/gen(es) diana: A) Uva-*Plasmopara viticola*, DCL1 y DCL2 (Haile *et al.*, 2021), B) Arroz-*Rhizoctonia solani*, DCTN y SAC, y C) *A. thaliana*-*Verticillium dahliae*, DCL1 y DCL2 (Qiao *et al.*, 2021); D) Cebada-

Fusarium graminearum, DCL1 y DCL2 (Werner *et al.*, 2020); E) *Cebada-F. graminearum*, CYP51 (Koch *et al.*, 2019); F) *Brasica napus-Sclerotinia sclerotiorum*, Tioredoxina reductasa (McLoughlin *et al.*, 2018); G) *Capsicum annum-Phytophthora capsici*, efectores RLXR1 y RLXR4 (Cheng *et al.*, 2022), H) *Cucurbita pepo-Podosphaera xanthii*, glycosil transferasa putativa (Ruíz-Jiménez *et al.* 2021), I) Jitomate-*Aspergillus niger*, DCTN y SAC, J) Jitomate-*Botrytis cinerea*, DCL1 y DCL2, K) Manzana-*A. niger*, DCTN y SAC (Qiao *et al.*, 2021); L) Uva-*B. cinerea*, DCL1 y DCL2, y M) Fresa-*B. cinerea*, DCL1 y DCL2 (Wang *et al.*, 2016). DCTN: Dinactina. SAC: Supresor de actina. DCL: Dicer-like. CYP51: Esterol 14 α demetilasa.

El estudio de Yin *et al.*, (2020) demuestra la capacidad de *P. italicum* para tomar dsRNAs ambientales. Dado que *P. italicum* está relacionado genéticamente con *P. digitatum*, y tienen preferencias similares de huéspedes, es posible que *P. digitatum* posea capacidades similares para la toma de dsRNAs ambientales para el silenciamiento de genes DCL. Por lo tanto, existen altas posibilidades de que la estrategia SIGS sea efectiva para el control de *P. digitatum* sobre el fruto de naranja.

1.7 Antecedentes directos de SIGS sobre *P. digitatum* en naranja

Previamente en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan se logró aislar una serie de patógenos en frutos poscosecha colectados en los mercados locales. Entre éstos se encontró *P. digitatum*, el cual se aisló de manera predominante a partir de frutos de naranja, y se identificó a nivel morfológico, macroscópico y molecular a través de la secuenciación y análisis de la región intergénica ITS (Santiago, 2019). Además, se diseñó una construcción que consiste de una fusión de DCL1 y DCL2 de *P. digitatum* flanqueada por la secuencia del promotor T7 en ambos extremos (Santiago, 2019).

Dicha construcción se empleó como molde para la síntesis dsRNAs largos y cortos, los cuales fueron aplicados a diferentes dosis sobre esporas de *P. digitatum* mediante un bioensayo *in vitro* (Ramírez-Hernández, 2022). Se observó que los dsRNAs cortos lograron reducir la germinación de las esporas hasta en un 80%, lo que sugiere que *P. digitatum* logra tomar dsRNAs ambientales. No obstante, a pesar de la alta efectividad de los dsRNAs cortos para inhibir la germinación de las esporas, cuando los tratamientos se aplicaron directamente en frutos no se observaron diferencias contundentes en la inhibición del desarrollo del hongo.

Estos resultados sugieren varias causas probables. Una de éstas es que los dsRNAs podrían perder su estabilidad al entrar en contacto con la cáscara de los frutos, lo que limitaría o

bloquearía su actividad, por lo que se podría requerir el uso de coadyuvantes, protectores, vesículas artificiales o nanopartículas que permitan la preservación y transferencia eficiente de los dsRNAs hacia el hongo.

Otra posibilidad es que DCL1 y DCL2 no sean suficientes para inhibir el desarrollo posterior de las esporas que escapan a su efecto inhibitorio durante la germinación, especialmente considerando que *P. digitatum* es un hongo de desarrollo rápido, que una vez que se establece en la superficie de la naranja genera nuevas esporas que podrían evadir el efecto inhibitorio de los dsRNAs de la primera aplicación. En este caso, una posible alternativa para incrementar la efectividad del biofungicida de dsRNAs podría incluir a otros genes blanco importantes para el desarrollo de la infección en *P. digitatum*.

El conocimiento de los mecanismos de infección de *P. digitatum* se ha ampliado con los estudios más recientes, siendo así que se han dilucidado las interacciones entre *P. digitatum* y *C. sinensis*. La producción de peróxido de hidrógeno por *Citrus sinensis* como respuesta inmune contra el patógeno es un importante mecanismo de defensa que es contrarrestado por *P. digitatum* con la producción de catalasa fúngica; la producción de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido fumárico, ácido oxálico) para la regulación de pH externo del hospedero permite para que sea óptimo para la actividad de las enzimas que degradan la pared celular del fruto, tales como poligalacturonasas (Yang *et al.*, 2019); la producción de flavonoides como barreras de defensa por parte del fruto permite que actúen en el tejido externo del cítrico y pueden producirse fitoalexinas contra *P. digitatum*; la producción de compuestos naturales por parte del hongo es útil para disminuir las defensas vegetales, causando necrosis en las células infectadas (Henrique-Costa *et al.*, 2019). Por otra parte, estudios de transcriptómica han mostrado que los genes asociados con factores patogénicos como la producción de CWDEs, etileno, ácidos orgánicos y efectores fueron significativamente regulados al alza, de manera similar los genes relacionados con la antioxidación y el transporte de hierro fueron regulados al alza en diversos niveles (Yang *et al.*, 2020), a partir de los cuales se pueden seleccionar genes blanco involucrados en los distintos aspectos de la infección para la aplicación de SIGS.

2 Justificación

El cultivo de naranja (*Citrus sinensis*) es una actividad agrícola importante y de alta derrama económica que enfrenta pérdidas por el ataque de patógenos en distintas etapas de la cadena productiva. Entre estos patógenos, *Penicillium digitatum* es uno de los más importantes ya que causa, junto a *P. italicum*, hasta el 90% de las pérdidas en la etapa poscosecha.

El combate de *P. digitatum* se lleva a cabo principalmente mediante el uso de fungicidas químicos que contaminan el ambiente, constituyen un riesgo a la salud y tienden a crear resistencia en el patógeno. Debido a lo anterior, se han propuesto alternativas de control, entre las cuales se destaca el uso de compuestos naturales con actividad fungicida o elicitoras de las respuestas de defensa en la planta, y el empleo de agentes de biocontrol. Adicionalmente se requiere la exploración de estrategias de nueva generación amigables al ambiente que han demostrado efectividad en el control de otros hongos patógenos. Una de estas estrategias es el silenciamiento génico inducido por aspersión o SIGS, que emplea RNAs pequeños de doble cadena (dsRNAs) para silenciar genes clave en el patógeno.

Aunque a la fecha no existen reportes publicados de la actividad de SIGS sobre *P. digitatum*, experimentos previos en el laboratorio de Biotecnología Vegetal demostraron que al aplicar dsRNAs dirigidos al silenciamiento de DCL1 y DCL2, dos genes clave para la síntesis de RNAs pequeños, se inhibe parcialmente la germinación de esporas de *P. digitatum*, demostrando así el potencial de la herramienta SIGS. Además de DCL1 y DCL2, a partir de estudios transcriptómicos se han identificado otros genes en *P. digitatum* que son importantes para el establecimiento de la enfermedad después de la germinación de las esporas, tales como los codificantes de proteínas transportadoras de hierro, precursoras de etileno y proteínas inductoras de necrosis. Por lo tanto, para incrementar la efectividad biofungicida de SIGS se requiere explorar dsRNAs dirigidos contra genes clave para la patogénesis en *P. digitatum*.

3 Hipótesis

Un biofungicida basado en RNAi dirigido contra genes clave para la patogénesis de *Penicillium digitatum* será efectivo para la protección de frutos de naranja (*Citrus sinensis*) en la etapa postcosecha.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la efectividad de un biofungicida basado en RNAi para la protección de frutos de naranja mediante el silenciamiento de genes de patogénesis de *Penicillium digitatum*.

4.1.1 Objetivos específicos

1. Mediante una revisión de la literatura, seleccionar tres genes importantes en el proceso patogénico de *Penicillium digitatum*.
2. Obtener la secuencia de los genes seleccionados y realizar alineamientos para identificar regiones de baja similitud con el genoma de *Citrus sinensis*.
3. Diseñar y obtener la construcción para la producción del biofungicida de RNAi.
4. Realizar bioensayos de la actividad biofungicida del RNAi sobre el desarrollo de *P. digitatum* en frutos de naranja.

5 Secuencia experimental

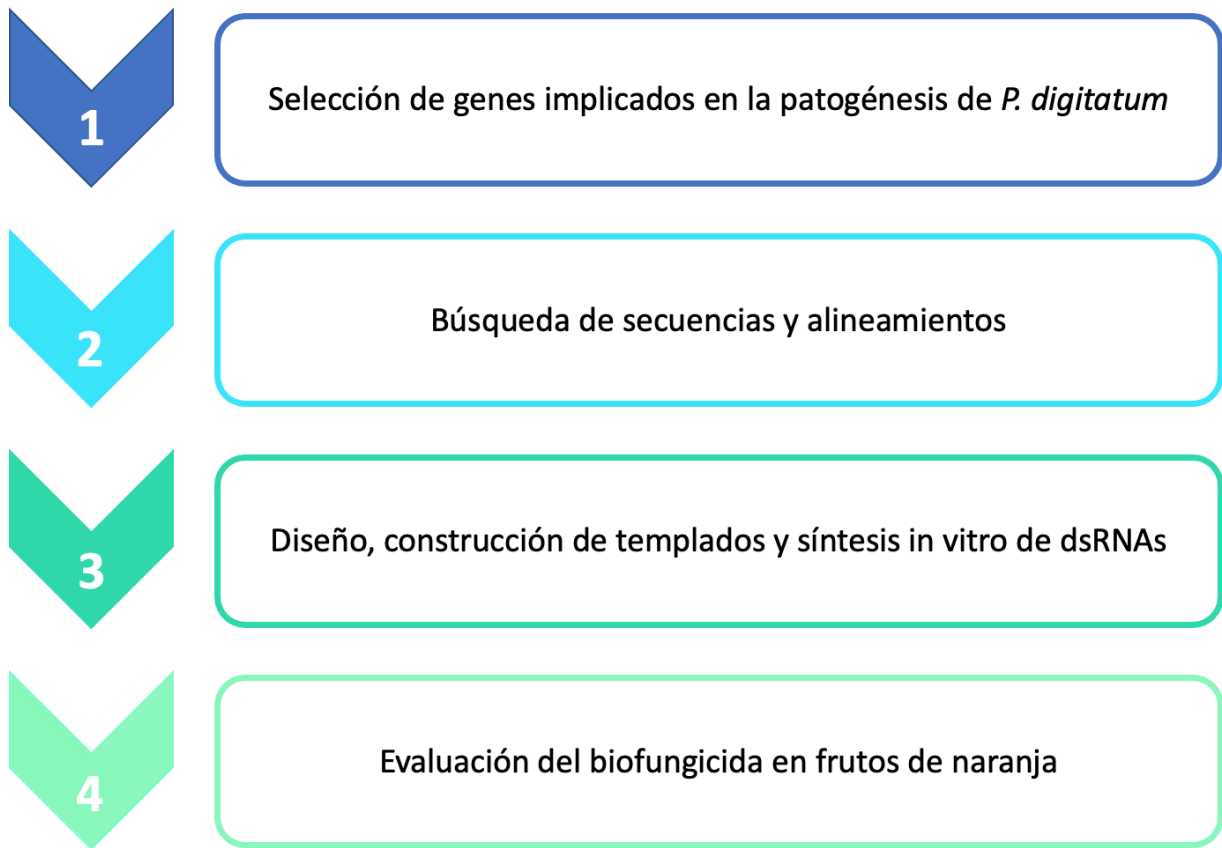


Figura 6. Secuencia experimental.

6 Materiales y Métodos

6.1 Material biológico

Se empleó una cepa de *Penicillium digitatum* aislada previamente por Santiago (2019) de frutos de naranja. La cepa se recuperó a partir de su almacenamiento a -80°C por medio de siembra con asa bacteriológica en medio agar papa-dextrosa (PDA) e incubación a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 4 días con el propósito de tener cultivos frescos.

6.2 Extracción de DNA genómico

A partir del cultivo desarrollado en medio PDA (Anexo 2) se realizó la extracción de DNA genómico por el método del fenol-cloroformo descrito por Santiago (2019). El micelio fúngico se colectó de la superficie de la placa de agar, se trituró en un mortero con nitrógeno líquido y se colocó en un microtubo de 1.5mL. A éste se le agregaron 600 μL de solución de lisis (50mM Tris-HCl, 50mM EDTA, 3% SDS, 1% beta-mercaptoetanol) y se homogenizó en un vortex por 15s. Enseguida se incubó a 80°C por 10 minutos en un termobloque y al término se dejó enfriar. Posteriormente, se añadieron a la mezcla 700 μL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se mezcló en vórtex por 15s y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos. Se recolectó el sobrenadante (~500 μL) en un tubo nuevo y se agregó el 10% de su volumen de solución de acetato de sodio 3M y dos volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló en un vórtex por 15s y se dejó incubando a -20°C por 2h. Concluido el tiempo, se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante, y se le agregó 1mL de etanol al 80% como solución de lavado. La preparación se mezcló en vórtex por 15s y se centrifugó una vez más a 10,000 rpm por 10min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar por 10min a temperatura ambiente. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 40 μL de agua desionizada, estéril. La muestra se trató con 1 μL de RNAsa (500U/mL RNAsa A 20,000U/mL RNAsa T1, Invitrogen), seguido por incubación a 37°C por 30min. Como último paso, se inactivó la RNAsa a 65°C por 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C para su conservación hasta su uso posterior.

6.3 Selección de genes candidatos para SIGS implicados en la patogénesis de *P. digitatum*

Para la selección de genes candidatos se realizó primeramente una búsqueda avanzada de información en PUBMED empleando los términos: *((Penicillium digitatum) AND (Citrus)) AND (gene expression OR protein)*. La búsqueda de los términos se limitó al título y al resumen de los documentos. Los artículos con información de transcritos o proteínas implicadas en la interacción del patógeno con la planta se seleccionaron para analizar la identidad de los genes e identificar las categorías funcionales a las que pertenecen para considerar su rol en el proceso de infección, para seleccionar los genes de expresión elevada o inducida en *P. digitatum*.

6.4 Búsqueda de secuencias y alineamientos

Se empleó el NCBI (Sayers *et al.*,2021) para extraer las secuencias de los RNAs mensajeros de los genes de *P. digitatum* identificados. Adicionalmente, se realizó una búsqueda para identificar genes similares en *C. sinensis*. Con estas secuencias se realizaron alineamientos entre *P. digitatum* y *C. sinensis*, empleando BLASTn (Altschul *et al.*,1990), para determinar el nivel de similitud y el potencial de silenciamiento de blancos no deseados (off-targets). Solo aquellos genes en los cuales fue posible reconocer regiones con baja o nula similitud entre *Penicillium* y *Citrus* fueron seleccionados para los pasos subsecuentes. Se redujo la selección a tres genes (los cuales mostraron menor similitud con el genoma de *Citrus sinensis* y tienen un rol importante en la patogénesis), que es un número manejable de secuencias para obtener construcciones para la síntesis de RNAs de doble cadena. Para realizar la selección de la región con menor homología para el diseño de dsRNAs se usó EMBOSS Needle.

Posteriormente, con el objetivo de conocer las posibilidades de que ocurra un efecto off-target (blanco de silenciamiento no deseado), se introdujeron las regiones de los genes seleccionados en la herramienta BLASTn del NCBI utilizando los parámetros por defecto (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros de BLASTn utilizados para evaluar los efectos off-target.

Organismos	<i>Citrus sinensis</i>
	<i>Penicillium digitatum</i>
Optimizado para	Highly similar sequences (megablast)
Umbral esperado	0.05
Tamaño de palabra	20
Puntaje para match	1, -2
Gap cost	Linear

6.5 Diseño y construcción de templados para la síntesis de RNAi

6.5.1 Amplificación de fragmentos de los genes de interés

Las regiones de menor similitud con el genoma de *C. sinensis* en los tres genes seleccionados se amplificaron mediante PCR a partir de DNA genómico para obtener los fragmentos necesarios para la construcción de templados para la síntesis de RNAi. Las reacciones se prepararon en un volumen de 20 μ L, con los componentes especificados en la Tabla 5 y el programa de la Tabla 6. Al término, los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1% para corroborar el tamaño del amplicón. Posteriormente, se realizó la purificación por beads (Agentcourt AMPure XP, A63881, Beckman Coulter) y se cuantificaron.

Tabla 5. Preparación de reacciones de PCR para la amplificación de fragmentos seleccionados.

Componente	Volumen (μ L)
Agua	8
Dream Taq Green Master Mix	10
Oligo específico directo (10 μ M)	0.5
Oligo específico reverso (10 μ M)	0.5
DNA genómico	1 (hasta 100 ng)

Tabla 6. Condiciones de la reacción de PCR

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Alineamiento	95	30 s	30
	62		
Extensión	65	20 s	1
	72		
Extensión final	72	5 min	1

6.5.2 Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron con el uso de perlas o *beads* (Agentcourt AMPure XP, A63881, Beckman Coulter) siguiendo las instrucciones del fabricante. En los casos donde se obtuvieron bandas únicas, se purificaron directamente las reacciones de PCR. Cuando se obtuvieron bandas de distintos tamaños, se seleccionó la banda de interés, se cortó a partir del gel y se eluyó en 2 volúmenes equivalentes de agua desionizada. Posteriormente, se procedió a la purificación siguiendo el procedimiento para reacciones de PCR.

6.5.3 Fusión de productos de PCR y adición de la secuencia del promotor T7

Para la fusión de los fragmentos (*Mic-33* y *NIP*) primero se agregaron extremos complementarios de cada secuencia mediante PCR por medio de primers diseñados con las secuencias complementarias en el sentido inverso (Fig. 7). Para esto, los productos amplificados y purificados en las secciones anteriores se emplearon como moldes en reacciones de PCR con oligonucleótidos complementarios, siguiendo las mismas condiciones de preparación y síntesis (Tabla 5 y 6). Una vez amplificados los fragmentos con extremos complementarios se purificaron y cuantificaron. Después, se mezclaron ambos productos en un mismo tubo en concentraciones equimolares, de forma que hubiera por lo menos 200ng de DNA de los fragmentos, y se aplicó el programa de fusión para posteriormente realizar la reacción de PCR de fusión, de acuerdo con Santiago (2019) (Tabla 7).

Tabla 7. Programa de fusión de fragmentos Mic-33 y NIP

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	5 min	1
2	94°C (-2°C cada ciclo)	1 min	35
3	24°C	25 min	1
PAUSA			
Tomar 10 µL de la reacción y agregar a 10 µL de mezcla de polimerasa con buffer y dNTPs (para un volumen final de 20µL).			
4	68°C	5 min	1
PAUSA			
Tomar 9 µL de la reacción y agregar a 11 µL de mezcla de reacción de PCR con los primers 1F y 2R.			
5	95°C	10 min	1
6	95°C	10 min	
7	62°C/ 65°C	30 S	30
8	72°C	30 S	
9	72°C	5 min	1
10	4°C	∞	-

Una vez terminada la fusión, se verificó su tamaño en un gel de agarosa al 1%, el producto de 500 pb se purificó usando beads magnéticas (AMPure XP). Por medio de PCR se le adicionó al producto de fusión obtenido la secuencia del promotor T7 en sus extremos usando un nuevo diseño de primers con la secuencia del promotor mencionado. Los amplicones con las secuencias adicionadas se purificaron usando beads magnéticas (AMPure XP, Beckman) siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.5.4 Clonación

Los fragmentos purificados se ligaron al vector de clonación pGEM-T easy (Anexo 3) y se transformaron células de *E. coli* químicamente competentes (One Shot Top 10, Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante.

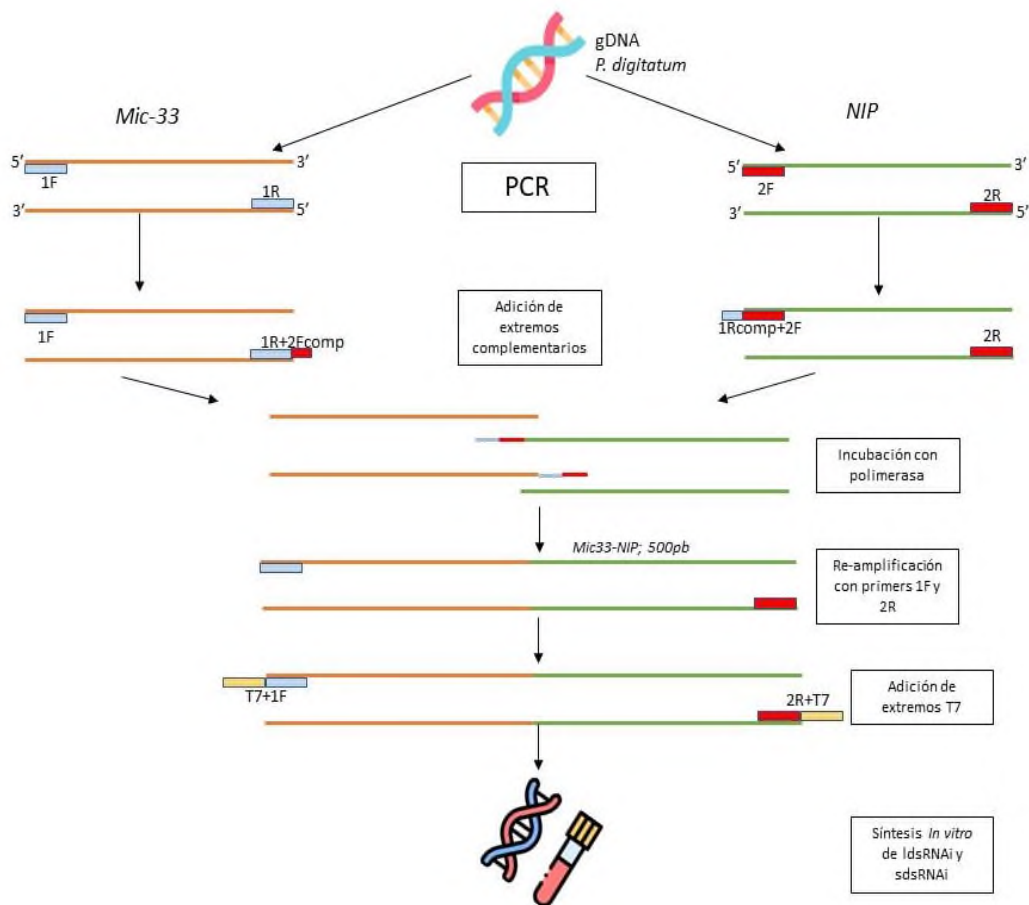


Figura 7. Diagrama general de fusión de fragmentos de Mic-33 y NIP

Las colonias blancas fueron seleccionadas y posteriormente se cultivaron en medio líquido LB con Ampicilina (100µg/mL) durante 14 h a 37°C. más adelante se realizó la extracción de plásmido mediante el método de lisis alcalina, para la confirmación del inserto se realizó PCR de colonia (tomando parte de una colonia con una punta estéril y mezclando en un microtubo con mezcla de reacción para PCR) usando los primers M13 (forward y reverse), como se especifica en la Tabla 8. Finalmente, los plásmidos aislados con el inserto (método en Anexo 4) se enviaron a secuenciar para confirmar que contenían íntegramente la construcción correcta del templado para la síntesis de los dsRNAi. Además, se analizó la secuencia completa del producto largo obtenido para la predicción de off-targets en *Citrus sinensis*, así como en *P. digitatum*. El análisis de las secuencias recuperadas se realizó mediante alineamientos con las secuencias encontradas *in silico*.

Tabla 8. Componentes del mix para la PCR de colonia usando de molde parte de la colonia.

PCR de colonia	
H ₂ O	8μL
Taq polimerasa	10μL
M13 F	0.5μL
M13 R	0.5μL

Los plásmidos se enviaron a secuenciar mediante la técnica de secuenciación capilar de Sanger al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV-Irapuato (LANGEBIO). Debido a que la secuenciación de Sanger presenta generalmente buena calidad en las primeras 350 bases, cuando se trata de fragmentos de mayor longitud, como es el caso de las construcciones obtenidas en este trabajo, se requiere realizar la secuenciación desde ambos extremos y verificar su solapamiento.

6.6 Síntesis de dsRNAs

El producto de fusión flanqueado por el promotor T7 se empleó como molde para la síntesis de dsRNAs. La síntesis del RNAi largo o ldsRNAs (RNAs largos de doble cadena) se realizó con el uso del kit MEGAScript RNAi (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNAi resultante se trató posteriormente con la mezcla enzimática de DNasa (2 U/μL) y Rnasa proporcionada en el kit para remover DNA residual y RNA de cadena sencilla. Una fracción de los ldsRNAs que resultaron de esta reacción fue empleada en una reacción catalizada por la enzima ShortCut RNaseIII (New England Biolabs®), para la generación de fragmentos cortos (21-14pb) de sdsRNAs (RNAs cortos de doble cadena). Las reacciones de síntesis de ldsRNAi y sdsRNAi se prepararon como se muestra en la Tabla 9. La concentración de los dsRNAs se cuantificó mediante un equipo Nanodrop (NANODROP 2000, ThermoFisher Scientific) y su integridad fue visualizada en un gel de agarosa al 1%.

6.6.1 Bioensayos de actividad del biofungicida de dsRNAi

Para evaluar la actividad de los dsRNA sobre el desarrollo de la patogénesis de *Penicillium digitatum* sobre los frutos de naranja se realizó la aspersión de los dsRNAi dirigidos a silenciar los 3 genes (*FET5*, *Mic33* y *NIP*).

Tabla 9. Preparación de reacciones de síntesis de dsRNAi e sdsRNAi

Síntesis de dsRNAi	
H ₂ O	3μL
ATP	2μL
CTP	2μL
GTP	2μL
UTP	2μL
10X reaction buffer	2μL
Molde (DNA)	5μL
T7 enzyme mix	2μL
Incubar 4 h	
Digestión con RNase y DNase I	
dsRNAs	20μL
H ₂ O	21μL
10X digestion buffer	5μL
DNase I	2μL
RNase	2μL
síntesis de sdsRNA	
H ₂ O	60μL
10x shortcut buffer	10μL
dsRNAi	10μL
ShortcurRNase III	10μL
10X MgCl ₂	10μL
Detener la reacción con 10μL de EDTA 10X	

Para esto se preparó la formulación del biofungicida con ambos dsRNAi (cada uno a la misma concentración) para aplicar una dosis de 1 μg de cada dsRNAi (construcción *Mic33-NIP* y *FET5*). La concentración se decidió a partir del trabajo de Ramírez-Hernández (2022), donde concentraciones menores e iguales a 1μg no mostraron inhibición o retraso en el desarrollo de la infección. Se tomaron 30 naranjas por replica (en total 3 réplicas), de las cuales se escogieron 15 naranjas al azar para aplicar el tratamiento y 15 naranjas al azar para el control (aspersión de H₂O) para cada réplica se emplearon naranjas de diversos lotes, adquiridas en distintos sitios de venta a lo largo de los meses de marzo a septiembre, cada lote era heterogéneo. Antes de la inoculación se lavaron con agua y jabón con ayuda de una esponja suave.

Las naranjas fueron punzadas creando una herida de 3 mm de profundidad en el ecuador, posteriormente se les asperjaron 3 mL de dsRNA con una concentración de 2 µg (1 µg dsRNAi *FET5* y 1µg dsRNAi *Mic33-NIP*) por cada disparo del atomizador (un disparo en la zona de la herida (~120µL) y el restante (~1800µL) se roció sobre las 15 naranjas del tratamiento). Para las naranjas control se rociaron de igual manera, pero en su caso se usó agua destilada estéril.

A las 24 horas (esto para propiciar que los dsRNAs sean internalizados por el fruto) se roció una suspensión de esporas con una concentración de 1×10^5 esporas/mL a las naranjas del tratamiento como a las naranjas del control. A las 48 horas de la primera dosis del biofungicida se aplicó una segunda dosis, posteriormente a las 72 horas de la primera dosis se aplicó una tercera dosis, esto para tratar de reducir el efecto de la degradación de los dsRNAs por condiciones ambientales y así mantener la misma concentración sobre el fruto. Una vez aplicadas las 3 dosis, se observó el crecimiento del hongo a partir de las 72 horas de la inoculación. El proceso de infección se observó durante los 7 días posteriores al inicio del bioensayo ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, intensidad lumínica: $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, recipiente cerrado). Las dosis múltiples se aplicaron para que de manera adicional se observara si existe algún efecto en el número de dosis y la efectividad de SIGS manteniendo a los dsRNAs por más tiempo sobre el fruto.

6.6.2 Análisis estadístico

Para el experimento, se realizó un ANOVA de una sola vía para determinar las diferencias entre las medias de los tratamientos y saber si existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$). Se aplicó la prueba HSD de Tukey como método de comparación de diferencia de medias. El análisis estadístico se realizó en el software Minitab19 (Minitab, LLC).

7 Resultados y discusión

7.1 Recuperación de *Penicillium digitatum* y extracción de DNA genómico.

El hongo fitopatógeno *Penicillium digitatum* que se usó en esta tesis fue aislado por Santiago (2019), *P. digitatum* se recuperó exitosamente por resiembra en medio PDA. El fitopatógeno conservó sus características morfológicas (colonia color verde oliva con reverso amarillo crema, micelio blanquecino y una textura aterciopelada) y la capacidad para infectar frutos de naranja, la cual se verificó inoculando a naranjas con esporas recuperadas del cultivo en medio PDA (Fig. 8).

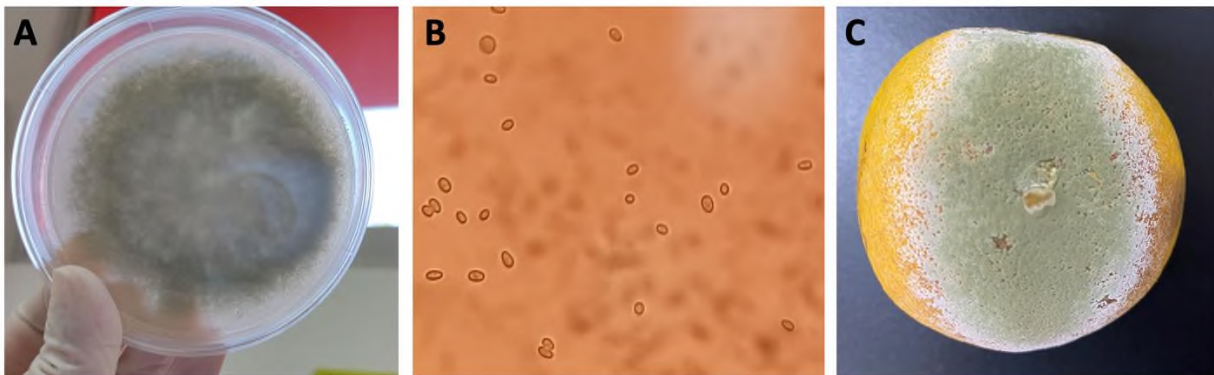


Figura 8. Recuperación de *P. digitatum*. A) Desarrollo en medio PDA tras 7 días de incubación, B) Esporas observadas al microscopio (40X), y C) capacidad infectiva de *P. digitatum* sobre naranja, donde se observan las lesiones características.

El micelio y esporas de *P. digitatum* desarrollados por 7 días en una caja de Petri con medio PDA se colectaron mediante raspado superficial para inmediatamente realizar la extracción de DNA genómico (gDNA). Tras la extracción se obtuvo la cantidad de DNA genómico indicada en la Tabla 10, así como un peso molecular esperado (mayor a 15kpb) y un nivel de integridad óptimo (sin degradación significativa evidente; Fig. 9). Este DNA se usó como molde para amplificar los fragmentos de genes seleccionados.

Tabla 10. Concentración y masa total de DNA genómico de *P. digitatum*

Muestra	Concentración	Masa total
<i>Penicillium digitatum</i>	2854 ng/ μ L	85620 ng

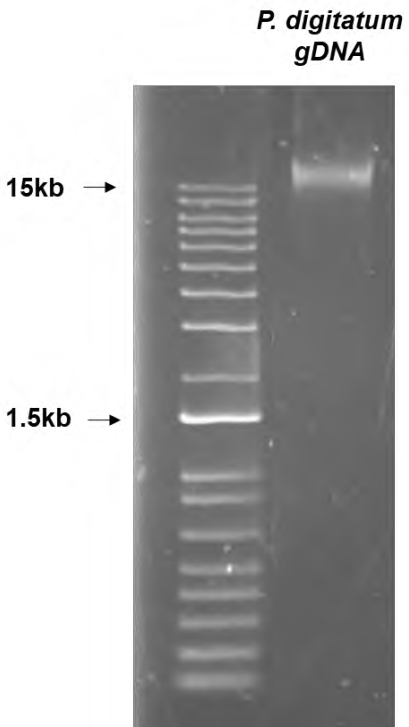


Figura 9. DNA genómico de *P. digitatum*. Gel de agarosa al 1% en TAE. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA.

7.2 Identificación de genes clave en la patogénesis de *P. digitatum*

Con el objetivo de identificar genes con un papel clave en la patogénesis de *P. digitatum* con potencial de ser blancos para el control de la infección a través del silenciamiento con RNAi, se realizó una búsqueda avanzada en la base de información científica PUBMED del NCBI. Para la búsqueda se emplearon los siguientes términos limitados al título o al resumen: *((Penicillium digitatum) AND (Citrus)) AND (gene expression OR protein)*.

La búsqueda arrojó 53 resultados. Tras realizar la lectura del resumen de los 53 documentos se encontraron diversos enfoques (Anexo 5). Por ejemplo, algunos documentos presentaban el estudio de los factores moleculares implicados en la resistencia de *P. digitatum* a agentes de control químico o biológicos. Se encontraron también estudios dirigidos a analizar la actividad antifúngica de péptidos y proteínas contra *P. digitatum*. En otros casos, se trataba de estudios que abordaban el estudio de la respuesta molecular de especies de cítricos durante la infección con *P. digitatum*, con el objetivo de identificar factores de resistencia contra el patógeno. Todos estos artículos se eliminaron ya que se requería seleccionar aquellos estudios que presentaran genes de expresión elevada o inducida en *P. digitatum* durante la infección (Anexo 5). Esta

condicionante responde a la necesidad de identificar genes que sean necesarios durante la interacción planta-patógeno para el establecimiento de la infección, y que por lo tanto sean potencialmente importantes para la virulencia de *P. digitatum*. Del total de 53, 17 artículos cumplieron la condición y se seleccionaron para su análisis (Tabla 11 y Anexo 6).

Tabla 11. Resumen de resultados de la búsqueda avanzada

Genes	Estrategia	Conclusión	Referencia
Major Facilitator Superfamily (MFS 2,3,4 y 5)	Análisis de mutantes de delección (nulas, KO) y mutantes de sobreexpresión	PdMFS2 y PdMFS3 confieren resistencia a los fungicidas. Todos los MSFs (2-4) están implicados en la virulencia, excepto MSF5.	de Ramón-Carbonell y Sánchez-Torres, 2021a
Proteína transportadora de hierro (FEPT), enzima formadora de etileno (EFE), enzimas degradadoras de pared celular (CWDEs), catalasa (CAT), efectores con dominio LysM y proteínas inductoras de necrosis (NIP), entre otros.	Secuenciación del transcriptoma de tejidos de fruto de naranja infectados con <i>P. digitatum</i>	Durante la infección de frutos de naranja, <i>P. digitatum</i> induce la expresión de genes para la síntesis de ácidos orgánicos, la degradación de la pared celular, la síntesis de etileno, el transporte de hierro, la síntesis de efectores de virulencia, y el bloqueo de la respuesta oxidativa del fruto.	Yang et al., 2019
Quitina sintasas (ChsII y ChsV)	Análisis de mutantes de delección (nulas, KO) de ChsII y ChsV.	En la mutante chsII se alteró el crecimiento y la morfología de los conidios, mientras que en chsV se observaron alteraciones severas en lo anterior y en el contenido de quitina, además de que disminuyó la virulencia.	Gandía et al., 2019a
Major Facilitator Superfamily (MSF1)	Análisis de mutantes de delección (nulas, KO) y mutantes de sobreexpresión de MSF1	Las mutantes nulas perdieron virulencia por baja incidencia de la infección, mientras las sobreexpresantes aumentaron su virulencia.	de Ramón-Carbonell et al., 2019
Protein-cinasas activadas por mitógeno (Kss1/Fus3, Hog1 y Slt2/Mpk1)	Análisis de mutantes de delección (nulas, KO) y de complementación de MAPKs.	Slt2/Mpk1 y Kss1/Fus3 están implicadas en la virulencia, mientras que Hog1 media la actividad de los fungicidas.	Gandía et al., 2019b
Factor de transcripción tipo Zn2Cys6 (PdMut3)	Análisis de dos mutantes de delección (nulas, KO) de Mut3	La delección de Mut3 incrementó la virulencia de <i>P. digitatum</i> y no tuvo efecto en la resistencia a fungicidas.	de Ramón-Carbonell y Sánchez-Torres, 2021b
Transportador de sacarosa (PdSUT1)	Análisis de mutantes de delección (nulas, KO) y de sobreexpresión de PdSUT1.	Las líneas mutantes disminuyeron su virulencia, pero mostraron mayor resistencia a tres de cuatro fungicidas. Las sobreexpresantes no aumentaron la severidad de la infección ni alteraron su sensibilidad a los fungicidas. Por lo tanto, la actividad de PdSUT1 sobre la virulencia es indirecta, y se relaciona más con la activación de transportadores MFS para la toma de carbohidratos.	de Ramón-Carbonell y Sánchez-Torres, 2017a
Protein-cinasa activada por mitógeno B (PdMpkB)	Análisis de mutantes de delección (nulas, KO) y de complementación de PdMpkB.	PdMpkB es necesaria para el crecimiento y las rutas de señalización que contribuyen a la virulencia de <i>P. digitatum</i> .	Ma et al., 2016

Adenilil ciclasa (Pdac1)	Análisis de mutantes de delección (nulas, KO) de Pdac1.	Pdac1 es necesaria para el crecimiento del micelio, la germinación de conidios, la utilización efectiva de carbohidratos y la virulencia	Wang et al., 2016
--------------------------	---	--	-------------------

Continuación. Tabla 11.

Genes	Estrategia	Conclusión	Referencia
Factor de transcripción (PdSte12)	Análisis de mutantes de delección (nulas, KO) de PdSte12	PdSte12 es necesario para el desarrollo de esporas y la virulencia de <i>P. digitatum</i> . Las mutantes redujeron su virulencia en términos de severidad, más que de la incidencia.	Vilanova et al., 2016
Major Facilitator Superfamily (PdMFS2)	Análisis de mutantes de delección (nulas, KO) de PdMFS2.	La delección de MFS2 incrementó la sensibilidad al fungicida procloraz y produjo disminución del crecimiento, la conidiación y la virulencia.	Wu et al., 2016
O-manosil transferasa (Pmt2)	Análisis de mutantes de delección (nulas, KO) y de sobreexpresión de Pmt2.	La delección de Pmt2 produjo alteraciones morfológicas coloniales, con estructuras microscópicas anormales, aumento de la resistencia a péptidos fungicidas y reducción de la virulencia.	Harries et al., 2015
Proteasas (Endopeptidasa aspártica, tripeptidil peptinasa, aspergilopepsina, serinpeptidasa, carboxipeptidasa), Proteínas degradadoras de pared celular o CWDEs (endoglucanasa, poligalacturonasa 1 y 2, glucanasa, pectin liasa 1), proteínas de homeostasis redox (tioredoxina, superóxido dismutasa, naftaleno 1,2 dioxigenasa), proteínas de detoxificación (transportador ABC PMR4, transportador MFS, demetilasa Cyp51B)	Hibridación sustractiva y macroarreglos para identificar genes inducidos durante la infección en <i>P. digitatum</i> , y análisis de mutantes knockout de una pectina liasa (Pnl1) y naftaleno dioxigenasa (Ndo1).	<i>P. digitatum</i> induce una variedad de genes durante la infección, que están involucrados en la proteólisis, la degradación de pared celular, la homeostasis redox y la detoxificación. La delección de Ndo1 no tiene efectos sobre la virulencia, a diferencia de Pnl1, que presenta la disminución de su virulencia.	López-Pérez et al., 2015
Proteína de unión al elemento regulador de esterol (sreA)	Análisis de mutantes de interrupción (nulas, KO) del gen sreA y de complementación.	La delección de sreA disminuyó la resistencia de <i>P. digitatum</i> al fungicida procloraz y la virulencia. Ambas características se restauraron en la mutante de complementación.	Liu et al., 2015
Protein-cinasa activada por mitógeno Hog1 (PdOs2)	Análisis de mutantes de delección (nulas, KO) y de complementación para PdOs2.	Se determinó que PdOs2 (Hog1) está involucrado en la tolerancia a estrés osmótico y la resistencia a fungicidas. Además, PdOs2 contribuye a la integridad de la pared celular y se requiere para la virulencia de <i>P. digitatum</i> .	Wang et al., 2014a
Proteín cinasa no fermentadora de sacarosa (SNF1)	Análisis de mutantes de delección (nulas, KO) de SNF1.	La delección de SNF1 produjo alteraciones en la conidiación y en la estructura de los conidióforos. Se sugiere que SNF1 actúa para la adaptación de <i>P. digitatum</i> a diferentes fuentes de carbono, y que su papel en la virulencia es promoviendo la inducción de genes de degradación de pared celular.	Zhang et al., 2013

Quitina sintasas (PdigCHSI, II, III, V y VII)	Análisis de expresión de 5 genes quitina sintasa.	La expresión de CHSI, II, V y VII se indujo durante la infección de frutos.	Gandía et al., 2012
---	---	---	---------------------

Los resultados muestran que, de los 17 artículos analizados, 14 se enfocan en la caracterización funcional de genes específicos usando como estrategia el estudio de mutantes (delección y/o complementación y/o sobreexpresión, Tabla 11), uno analiza directamente la expresión de un grupo de genes específicos (Gandía *et al.*, 2012) y dos realizan un escrutinio del transcriptoma diferencial o del transcriptoma total (López-Pérez *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2019) (Tabla 11). Una versión ampliada de la Tabla 11 se encuentra en el Anexo 6.

En el análisis de los estudios de caracterización funcional de genes específicos resaltan tres grupos principales de proteínas importantes para la virulencia: las proteínas transportadoras (MFSs, SUT1), las cinasas (Kss1/Fus3, Hog1 y Slit2/Mpk1, PdMpkB, PdOs2, SNF1), y las quitina sintasas (CHSs; Tabla 11). Estos resultados son importantes porque demuestran el requerimiento de la expresión de dichos genes en el proceso patogénico de *P. digitatum*, ya que los mutantes fúngicos analizados en estos estudios presentan defectos que afectan su capacidad de infectar a los frutos de naranja. Estos efectos se deben a la pérdida total de la expresión, o efecto *knockout*. La pérdida constitutiva de la función en estos mutantes podría no ser comparable con los efectos del silenciamiento temporal que se induciría mediante la estrategia SIGS, ya que con esta última no se espera la anulación total de la expresión de los genes de forma constitutiva.

Por otra parte, se encontraron 2 artículos que abordan de forma más amplia el estudio de los genes que inducen su expresión en *P. digitatum* durante la interacción con el fruto. Estos estudios son de gran importancia para identificar los genes que se activan en el hongo en la presencia del fruto de naranja, y que podrían estar involucrados en la virulencia. En el primero de dichos trabajos, López-Pérez *et al.*, (2015) emplearon la estrategia de hibridación sustractiva supresiva para separar la fracción de transcritos de expresión diferencial inducida durante el proceso de infección, y dejar fuera aquellos que no alteran su expresión o la disminuyen. De esta forma, al secuenciar dicha fracción, se logró la identificación de diversos genes, entre los que destacan los que codifican proteasas y enzimas de degradación de pared celular.

En el segundo trabajo, Yang *et al.*, (2019) emplearon técnicas de secuenciación de alto alcance (RNA-Seq) para investigar el conjunto completo de genes que alteran su expresión en *P.*

digitatum durante la infección. Este estudio reveló una imagen completa de los componentes y procesos moleculares que se llevan a cabo en *P. digitatum* para el establecimiento de la infección, proporcionando una fuente de genes blanco potenciales para la aplicación de SIGS. Por lo tanto, se seleccionó el trabajo de Yang *et al.*, (2019) como referencia central para hacer una selección preliminar de los genes candidatos para este trabajo. En la Tabla 12 se muestra su anotación funcional y los niveles de expresión diferencial en la infección de frutos de naranja.

Tabla 12. Genes seleccionados preliminarmente según su nivel de inducción (Yang *et al.*, 2019). Los genes delimitados por recuadros son los seleccionados para el diseño de SIGS.

ID	Nombre del gen	Clasificación funcional	Descripción	Nivel de inducción
PDIP_76510	<i>CCC1</i>	Almacenamiento de hierro	Proteína transportadora	7.81
PDIP_65530	<i>FET5</i>	Toma de hierro	Oxidasa multicobre transportadora de hierro	7.45
PDIP_36570	<i>Mic-33</i>	Precusores de etileno	Proteína acarreadora de 2-oxoglutarato	5.62
PDIP_07850	<i>tef3</i>	Glutathione S-transferase	Factor de elongación 1-gamma	8.2
PDIP_77830	desconocido	Proteína inductora de necrosis	Proteína inductora de necrosis	7.23
PDIP_86430	<i>patE</i>	Precusores de ácidos orgánicos	Oxidoreductasa de glucosa-metanol-colina	5.72
PDIP_64830	<i>HPM2</i>	Glutathione S-transferase	Actividad transferasa	5.11
MSTRG.1774	desconocido	Proteína inductora de necrosis	Proteína inductora de necrosis	6.25
PDIP_36560	<i>chiA1</i>	Quitinasa	Actividad quitinasa	6

Todos los genes de la Tabla 12 se analizaron extrayendo su secuencia de las bases de datos disponibles y realizando alineamientos con el genoma de *Citrus sinensis* para investigar la presencia de secuencias similares en la naranja. Como resultado se observó que los genes FET5, Mic-33, y uno desconocido, potencialmente una proteína inductora de necrosis (NIP), presentaban baja o nula similitud con el genoma de *Citrus sinensis* y altos niveles de inducción, por lo que dichos genes se seleccionaron para el diseño de la estrategia SIGS (Tabla 12).

Al realizar los alineamientos de la secuencia completa de los genes seleccionados se observó que FET5 presentaba similitud con un RNA mensajero de *Citrus sinensis* codificante de L-ascorbato oxidasa (Fig. 10A). El porcentaje de identidad es de 82.96%, sin embargo, la cobertura del alineamiento es de solo el 3% de la secuencia de FET5, lo que indica que la similitud es muy baja. Por su parte, la secuencia de NIP presentó similitud del 87.5% contra un RNA mensajero probable de codificar una enzima arabinosiltransferasa. De igual manera, la baja cobertura, de tan solo el 3% de la secuencia de NIP indica que el alineamiento no hay similitudes significativas (Fig. 10B). Finalmente, la secuencia de Mic-33 no obtuvo similitud significativa en *C. sinensis* (Fig. 10C).

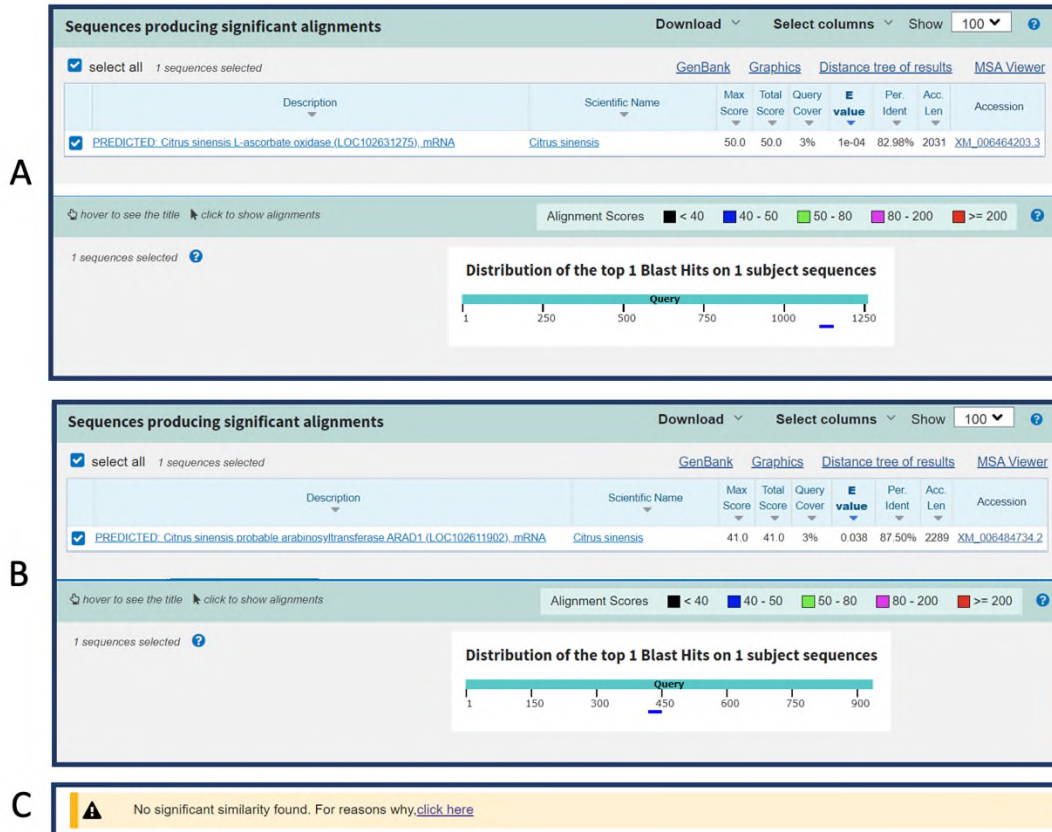


Figura 10. Resultados del análisis BLAST de los genes seleccionados contra la base de RNA mensajeros de *C. sinensis*. A) BLASTn del gen FET5, B) BLASTn del gen NIP, C) BLASTn de Mic-33.

7.3 Selección de la región de diseño de dsRNAs

Con la herramienta bioinformática EMBOSS Needle se realizaron alineamientos de cada uno de los genes para seleccionar las áreas con menor similitud y evitar las regiones con dominios en común. El tamaño de la selección fue de 250pb para (*Mic-33* y *NIP*) y para *FET5* de un tamaño de 500pb, la diferencia en el tamaño de las regiones seleccionadas recae en que el tamaño planeado es de 500pb, al ir *Mic33* y *NIP* fusionados se seleccionó la mitad de pb para cada gen (Fig. 11). Adicionalmente, con las secuencias limitadas a los fragmentos seleccionados, se realizó un análisis BLASTn para evaluar que no habría algún silenciamiento en genes de *Citrus sinensis*. Los resultados confirmaron que las construcciones seleccionadas tienen un potencial bajo o nulo de tener por blanco a cualquier RNA mensajero en naranjas, ya que no existe similitud entre el genoma de *Citrus sinensis* y los fragmentos diseñados para la síntesis de dsRNAi (Fig.

12). Por lo anterior, no hay riesgos de efectos de silenciamiento off-target en frutos de naranja.

A)

```

ATGGATGGTGCAGTGGGGATTTCACAGTGCCTGACCTTCTGGGGAGAGTTTGTTTACACTTGACAA
TTCCCTCCGATCAGAGTGGTACTTTTGGTACCATGCCATTGCGGGGTTTCGACGGCGATGGCCCTTA
TGGGGGCTAGTCTCAACAGCCAGCATCCAGATCGACCTTCCGGGTTATTACCCAGAGGTATGAT
GACCTTACCCTTACACTTATGACCCGGAACTTTGCTACTCATTTGGAGACTGGTACCATTCCCTCGAG
GTGATGTTCTGAATGGTATATGGACCCAGGAATTTGGGAACGAAGTGAATTCAGAAGTGGGGCCACA
GAGATGGGAGGTGCCATCTGATCTGGTATTAGCCTGTCTCTGATTCCTTGTCTATTATGGGGCAGGT
CATTGTACTGTACGATGGCGGTGTCTGTAGACCACTGGACTGCATTGATCAGCAGCTGAATAGTTTCA
TTATCGACCTCGATCCCTACACGACATGTCCGATGCGGTAGTCACACAGGGTATCCACAGGATTATC
AAAGCCAAATTAAGTACTAGCTGACCACTTGACAGAGCTTAGCTGGGTGGTCTCGTTTCGACCAACC
ATCTCTAGATTGCTTCAGGTTGACAGGCTGATGACGACGCTCCACACAGCAAAATATAAATCCAT
CGGATCCCTTCCCTGACACACGATGACTTTGTTCTTGGCCACTTTTACCGATCTCCGAAATCG
TCACACATGGAGGTTCACTTAGATCAGAGTATGAACGATCCAGCTCATGGTATCGGGTGGTGG
CTAATATCACACAGTTCCTTCAATACCTAACCCGGCATTGACCCAGATCAAACTTCCCATCAAC
TATCGTCCAAATCGGCTGAGGGACGTCGCTCAAGGCCACCATCTCAACATCGGAGAGCACCATCTG
CATCTCTATTCTCGGTGCCATTCCTCCCACTGCGCAACAAACCAAGTGGTGTATACGAGATTCAAAA
GATGGCCCGGTTTCCAAACAGCCATTCCGTTACTTCAACCAACTACCTGGAGCCGCCAGAGATCCA
CCATTTCCATTAGCATCACTACCAACCAAAATGGGACGCAAACTTGAATACCTACAGGGCCGG
AGCTGCATGGATAGTACTAGTAAACAACATCTAGACGAAGGATCCCACTTCCATATGGTAGAGGC
CCTTACTGGTGGGACTATCCACTAATTAATCCACTTCAGCACGGACACCACTTCTACTGCTCGCA
GTGACCAAGCCGAAATTTGGTTGGGCTCTTACAATCTTTCATTGACAAATCCCAACCCCTTAAAT
CTGACCGAGATCGTGGAGATGGCAGATGAGCCAGACTCAATCGTGGTATAGTTCCGGTTT
TTACGACATCTCCCGGCTGCTTCCGTGACACAGTCCAGATCCCAAGTCCGGGCTATGCGCTTCCGT
TTCGGGGGATAACCCCGGGTTGGCTTTTTCATTGCCATATGCTTGGCATTGGCGACGGGATGG
TCATGTTGATGATGTCAGGGGACCCGGCGGATTAGTTGGCATGCTGGCAATGGAGAAATATGCC
TGCTCTTGA

```

B)

```

ATGGCATCCACTATCAAGGACAGTGGCCAGCCCTGCTGCTCTCTGACAAAAACGCAACCAAGACCGCTA
TTGAGACTCCTACCGACTTCTGCAACCCATACATCGCGCCGCCCTGCCCTTCTCAATGGCGGACT
GGCCGGTATGACCCGCCACAGCCGTTGATCAACCTGTGACATGGTTAAAGTGGCTTGCAGCTCGCCGGC
GAAGGACCCGCCACCCGTTCCCTGCTCCACTCGGGATCACTCGCGACATCATCGCTCCGGCAAGG
TCCCTCGATCTCTACACTGGTTTGTCCGCGAGGAATCCTCCGCCAAGCCGCTACACTACTGCCCGCTGG
ATTTCTTTGAGACTTTCATCAAGAAGCTGAATACCCCGCTGAAGCCGAGGTGCAAGTAACTTCCGC
GAGCGTCTGCGGCGAGGACTGACTGCGGGTGAATCGCCCGCATGATTGGAAATCCGGCCGACTTGGTCC
TCGTGCGCATGCACTGGATGGCTGAAGGCCCGGAGGCTGCGGCCAATACCGTTCCGCTTTTATGATC
TCTGGGTGATACCCCGCACTGAGGACTCGCCGCCCTGTGGGCTGGTCTTCCGCCACGGTTTGTCCGT
GCCATGGCCCTCAACATGGGTCAATTGACCTTCTTCGCTGAGGCTAAGCAGCAGCTCAAGCAGCATACTT
CTCTCCGCTCAGAAATCAGACTTTCGCTGCTTCTGGCATTGCTGGCTTCTTTGCTAGTTTCTTGTCTCT
GCCTTTGATTTTCATCAAGACCCGCTTTCAGAAACAACAGAAGGACCCCAAGACTGGTTGGTTCCCTTAC
AAGGGCTGTTGGATTGTGCGCCAGAGTCCCAAGGAAGAGGGCTGCTGCGCTTCTACCGTGGCTTCG
GAACTTACTAGTCCGGATCGCTCCTCATGCGTTAGTTTCCCTACCGATTTTTTTTTTACCGGCCCTTTT
TTCCCACTGACTCTATATAGAATGGTCACTCTCATCGTGGCTGATTACCTCAACCTCTCACCAGTAA

```

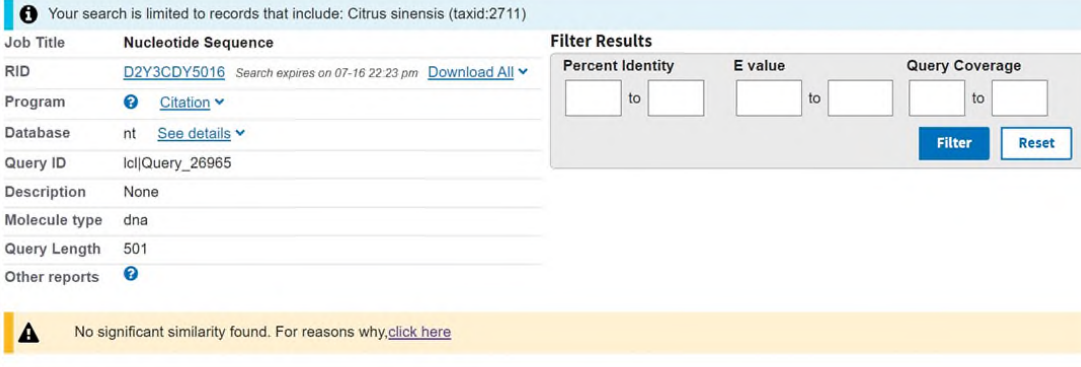
C)

```

ATGATTCTCAAATCTTACTGCGTACTGCTCTCGCTGTGCTGCCTGTCACAGCCAGCCCGGTAGAGC
TGTGCTCTCGCGGAGTGATTGGATCCGACGCGGTTGTGCGACTTCCCTCAAGAGGTTCCCTGCGGTGCCGT
TGGCAACCGCTACTTGGCTTACCAGCCAAAGCTCAAGGTGTCAATGGCTGCGTGCCTTCCCGGCTGTG
GAGCTACAGGGGAACCAAGTGAAGTGAAGACATTTGCCCGATAGGGGCTTTGACAGACTTTCATATCT
AATGCTGTGATATAGTGCCTGCTTAAAGCATCAGGAAGTCCCAAGCTGGATGCAGCAGTAGACCCGG
CCAAGTATACGGTGAAGTTTCTGTTCAAGAAACATCCACTGAACCCGTCCGGGACATGGGGACTAATGACTT
GTGGTTGCAATCCATAGTGAAGAGGCACTTCCGGAGGCAAGATGCCTGATGTACTCTCGGTATTT
CCCCAAGSATGAGCTTCTCCTGGAATCGGCCACCTCACGATTTGGAGGGTGTGATCATCTGGCTTTCG
GACGCCACAGCACTGCTGCCTCCAGCTGCTGGCGGTTTCCCGCTGGCACAGGTTGGTGGGACTGCA
CTACAGCAAGTTTACACTTGAATGGATCCTCGCTCTGATCAGGTATCAGTGGAAATGGCCCTCGACCA
CTCGTGGCCCTGACACCGAGGTGGCGGCACACAGCCGTTGGTTCCTGGGAGTCAATGAATGGTAAAG
TGACCCAGATCTACCCCAAGGCTTGAAGCTAGCAATCTAACCCTGGAACGTGAGCTGCCAGCAAAA
TGCTTTGACACACCCGACTTTGGAGCTGAAATGTTCTTTCAACAGAACAACTTTGGCCACCAACCTG
GCCAAGGCCACGTTCTGA

```

Figura 11. A) Región seleccionada de 501pb del gen FET5 para su amplificación, B) Región seleccionada de 250pb del gen Mic-33 para su amplificación, C) Región seleccionada de 250pb del gen NIP para su amplificación.

A) 

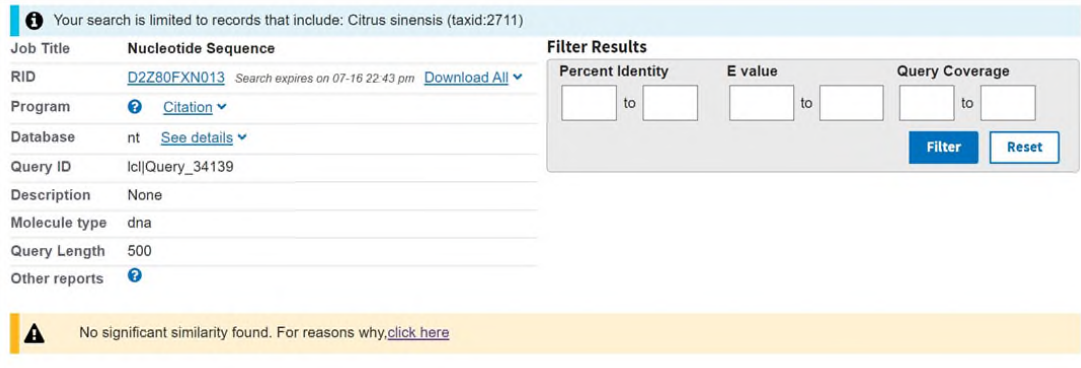
B) 

Figura 12. A) Resultados de BLASTn para evaluar homologías entre la región de 501pb seleccionada de FET5 y el genoma de *Citrus sinensis*, B) Resultados de BLASTn para evaluar homologías entre la construcción Mic33-NIP y el genoma de *Citrus Sinensis*.

7.4 Diseño del RNA de interferencia y construcción del templado para la síntesis de dsRNAs

Para la amplificación de cada región se diseñaron primers de un tamaño de 23pb, como se muestra en la Tabla 13. Las reacciones de PCR dieron por resultado los fragmentos de peso molecular esperado. Los fragmentos amplificados se purificaron.

Tabla 13. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las regiones seleccionadas

GEN	OLIGONUCLEÓTIDOS	
	Forward	Reverse
FET5	5' TTCAGGTTGACAGCGTCGATGCA 3'	5' CGTGGTAGTGATGCTAATGGAATAGG 3'
NIP	5' CCATAGTGAGAAGCGGCACTTCC 3'	5' GACTGATACCTGATCAGAGGCCGA 3'
Mic-33	5' TCGTCCATCCGCACTGGGGATCA 3'	5' GCCGGATTTCCAATCATGGCGGCG 3'

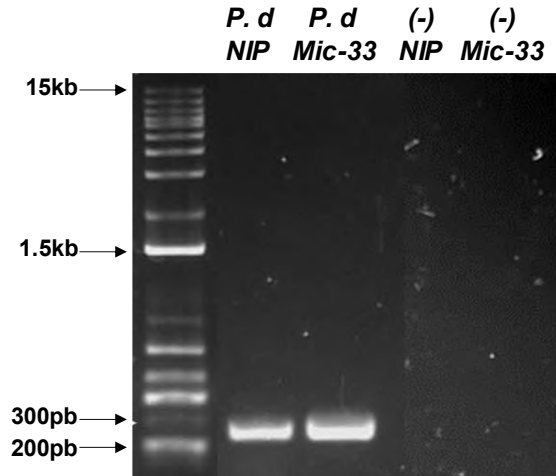


Figura 13. Amplificación de NIP y Mic-33. Gel de agarosa al 1% en TAE. Se visualiza la amplificación exitosa de NIP y Mic-33, con un tamaño de 250pb. P.d:*Penicillium digitatum*; (-): Control negativo.

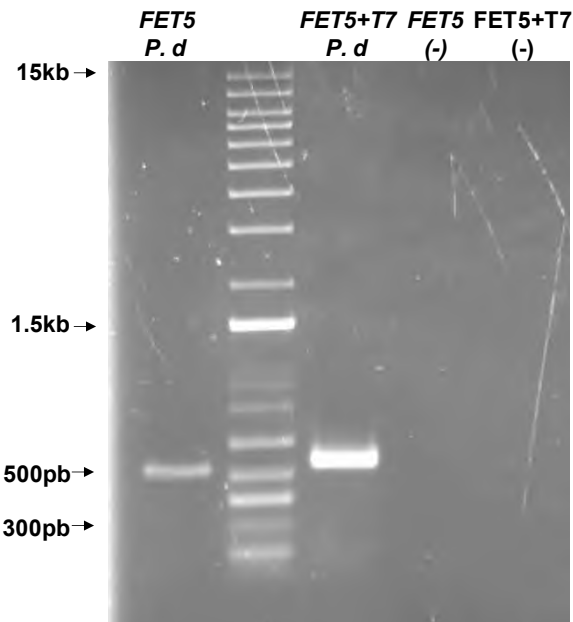


Figura 14. Producto de amplificación de FET5 (lado izquierdo). Gel de agarosa al 1% en TAE. P. d: *Penicillium digitatum*; (-): Control negativo.

Para llevar a cabo la fusión de los dos fragmentos génicos de NIP y Mic-33, se diseñaron primers complementarios con el fin de reunir en una sola molécula de DNA ambos fragmentos y posteriormente flanquearlos con el promotor T7. Se amplificaron los fragmentos de los genes *NIP* y *Mic-33* con primers con secuencias complementarias en sus extremos, los cuales se muestran en la Tabla 15. Se logró exitosamente añadir los extremos complementarios, lo que se confirma con la obtención de bandas más pesadas (23 pb más pesadas) en el gel (Fig. 15). Los

productos fueron purificados y cuantificados, el rendimiento se muestra en la Tabla 16.

Tabla 14. Oligonucleótidos con extremos complementarios para la fusión de Mic-33 y NIP

GEN	OLIGONUCLEÓTIDOS	
	Forward + compl	Reverse
NIP	CCGCCATGATTGGAATCCGGCCCATAGTGAG AAGCGGCACTTCCGG	GACTGATACCTGATCAGAGGCGA
Mic-33	TCGTCCATCCGCACTGGGGATCA	GGAAGTGCCGCTTCTCACTATGGGGCCGATTCCAATCATG GCGGCG

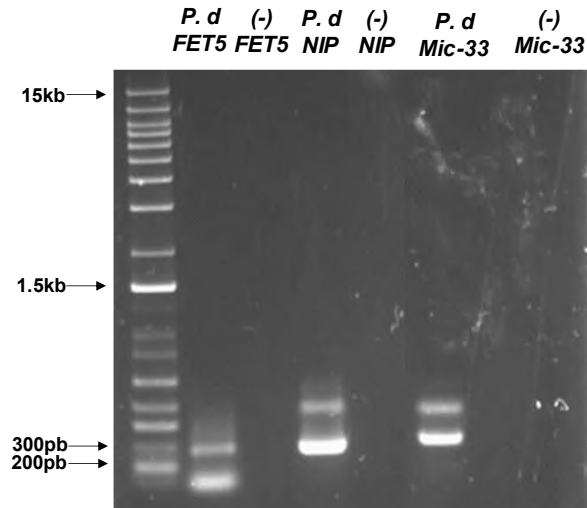


Figura 15. Amplicones con adaptación de oligonucleótidos complementarios en preparación para la fusión. Gel de agarosa al 1% en TAE. Se observan bandas de 273pb (tamaño esperado), y algunas unas bandas inespecíficas de 500pb. P.d: *Penicillium digitatum*; (-): Control negativo.

Después de la purificación y cuantificación, se realizó la fusión y la PCR de amplificación. Una vez obtenida la construcción NIP-Mic-33 y confirmada por visualización en el gel de la Fig. 16A, se realizó una nueva PCR para añadir los extremos del promotor T7, así que se diseñaron nuevos primers con la secuencia del promotor antes mencionado (Tabla 18). El resultado se muestra en la Fig. 16B. Al igual que con la construcción fusionada, para el fragmento de *FET5* se diseñaron primers con la secuencia del promotor T7 (Tabla 18) para obtener por PCR el producto con las secuencias T7 flanqueantes (Fig. 17).

Tabla 15. Primers diseñados para añadir la secuencia del promotor T7 a los extremos de la construcción y fragmento FET5

GEN	OLIGONUCLEÓTIDOS	
	Forward	Reverse
FET5	5'TAATACGACTCACTATAGGGAGATTC AGGTTGACAGCGTCGATGCA 3'	5'TAATACGACTCACTATAGGGAGACGTGGTAGTG ATGCTAATGGAATAGG 3'
NIP	5'TAATACGACTCACTATAGGGAGACCA TAGTGAGAAGCGGCACTTCC 3'	5'TAATACGACTCACTATAGGGAGAGACTGATACCT GATCAGAGGCCGA 3'
Mic-33	5'TAATACGACTCACTATAGGGAGATCG TCCATCCGCACTGGGGATCA 3'	5'TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCGGATTCC AATCATGGCGGCG 3'

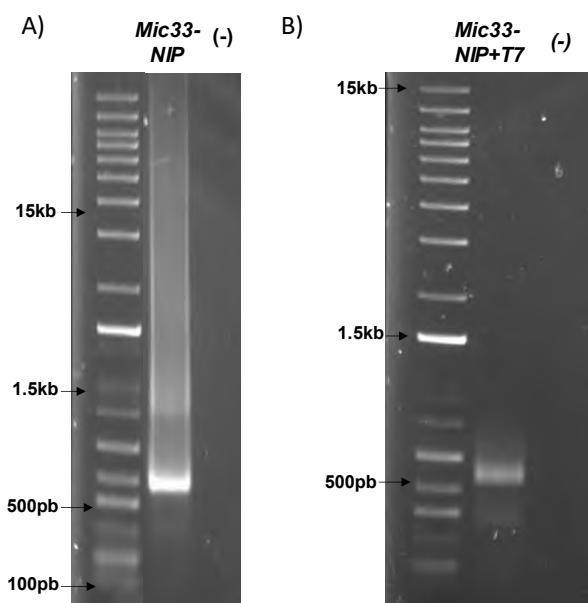


Figura 16. A) Producto de amplificación de la construcción Mic33-NIP, revelando una fusión exitosa y el tamaño esperado de 500pb. B) construcción flanqueada por el promotor T7, con un tamaño de 546pb. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

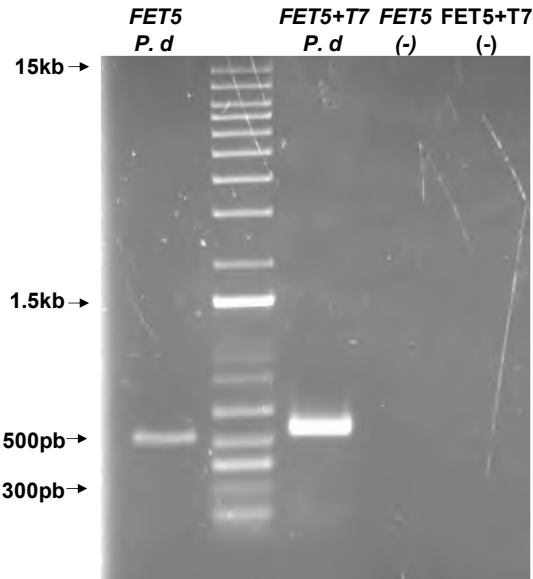


Figura 17. Producto de amplificación de FET5 flanqueado por el promotor T7 (centro, FET5+T7). Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

Después de purificar a partir del gel, la concentración de la construcción *Mic33-NIP* fue de 110 ng/μL. Para la construcción flanqueada por T7 fue de 127 ng/μL, mientras que para el fragmento *FET5* flanqueado por T7 se obtuvo una concentración de 320 ng/μL.

7.5 Confirmación de las construcciones mediante secuenciación

Uno de los aspectos más importantes para continuar hacia la síntesis de los RNAi fue la confirmación de que la construcción de fusión NIP-Mic33 fue exitosa y no se trataba de algún artefacto, o de la misma secuencia en múltiples copias o en sentido invertido. Para el caso del fragmento amplificado de FET5, también era importante confirmar que se trataba del gen objetivo. Adicionalmente, para que la síntesis de dsRNAs proceda, es una condición necesaria la presencia de la secuencia del promotor T7. Por estas razones, los fragmentos amplificados de NIP-Mic33 y FET5 se ligaron en el vector pGEM-T easy y se realizó la transformación de *E. coli* para obtener el plásmido con los insertos.

Las transformaciones fueron exitosas y se seleccionaron 12 colonias blancas individuales de la construcción *Mic33-NIP* y 11 para el fragmento *FET5*. Realizando una PCR de colonia y usando los primers M13 se confirmó que 10 colonias contenían presuntamente el inserto *Mic33-NIP* (Fig. 18) y 5 colonias contenían el inserto *FET5* (Fig. 19); para ambos el tamaño de la banda fue de aproximadamente de 780pb, que corresponde al tamaño de la construcción con una secuencia parcial del plásmido.

Las colonias blancas transformantes positivas se sembraron individualmente en medio LB líquido con ampicilina. Posterior a esto se extrajo plásmido por el método de lisis alcalina (Anexo 4). El rendimiento para *FET5* fue de 12,357 ng/μL y para *Mic33-NIP* de 16,177 ng/μL.

La información recibida de la secuenciación (construcciones en sentido directo y reverso) se empleó para alinear con las secuencias de los genes almacenadas en las bases de datos mediante un análisis BLAST. El alineamiento mostró que la secuencia de la construcción clonada correspondía (100%) con la región seleccionada de los genes.

De la secuenciación se obtuvieron dos secuencias para los fragmentos de interés, una en sentido directo (U) y otra en sentido reverso (R). Éstas fueron alineadas entre sí (BioEdit) y confirmadas en la región de solapamiento. Adicionalmente, ambas secuencias (U) y (R) se alinearon con la secuencia de diseño para corroborar su identidad e integridad, así como la presencia de la secuencia del promotor T7 en ambos extremos (Figs. 20 y 21).

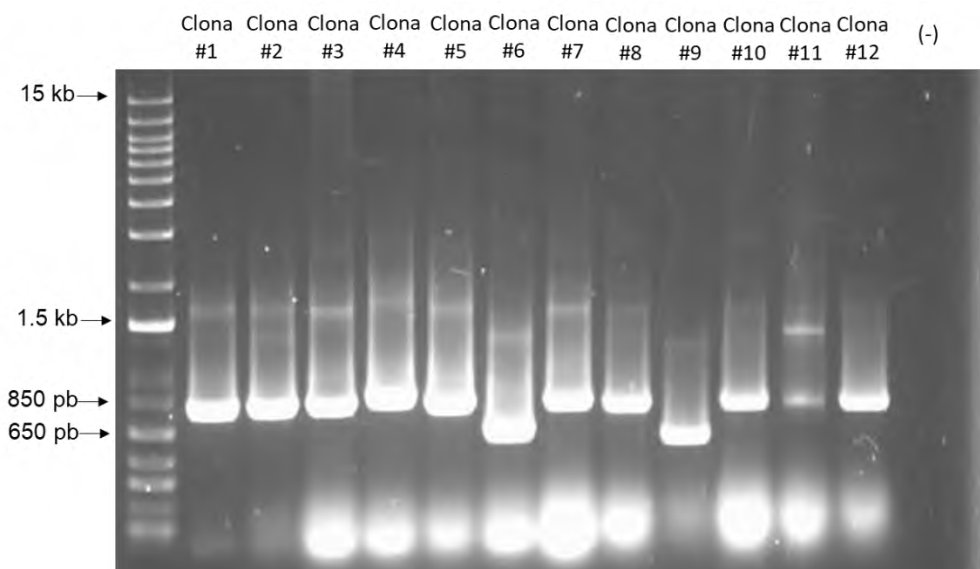


Figura 18. Productos de amplificación de PCR de colonia de la clonación de la construcción *Mic33-NIP* en células de *E. coli* químicamente competentes (One Shot Top 10), amplificada con primers M13 obteniendo una banda de 780pb en las colonias que se clonaron exitosamente (Clonas 1,2,3,4,5,7,8,10,12). Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

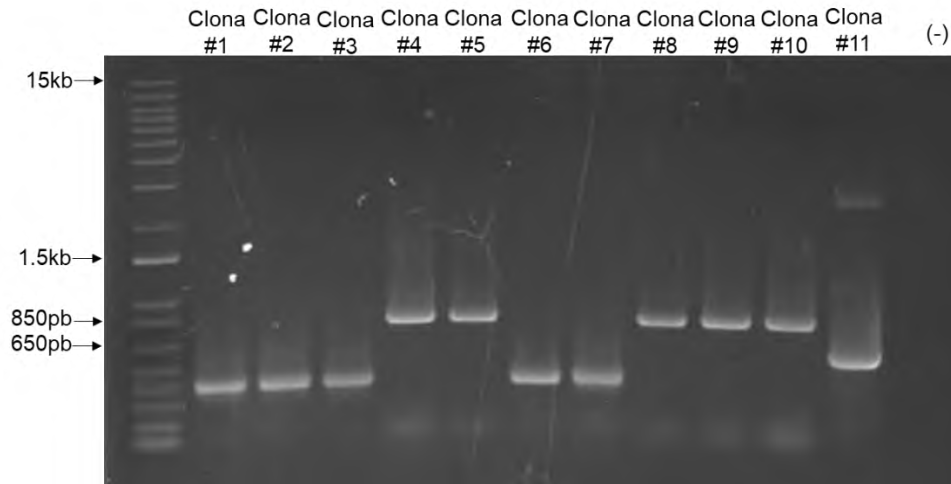


Figura 19. Productos de amplificación de PCR de colonia de la clonación de FET5 en células de *E. coli* químicamente competentes (One Shot Top 10). Amplificadas con primers M13, obteniendo una banda de 781pb en las colonias clonadas exitosamente (clonas 4,5,8,9,10). Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

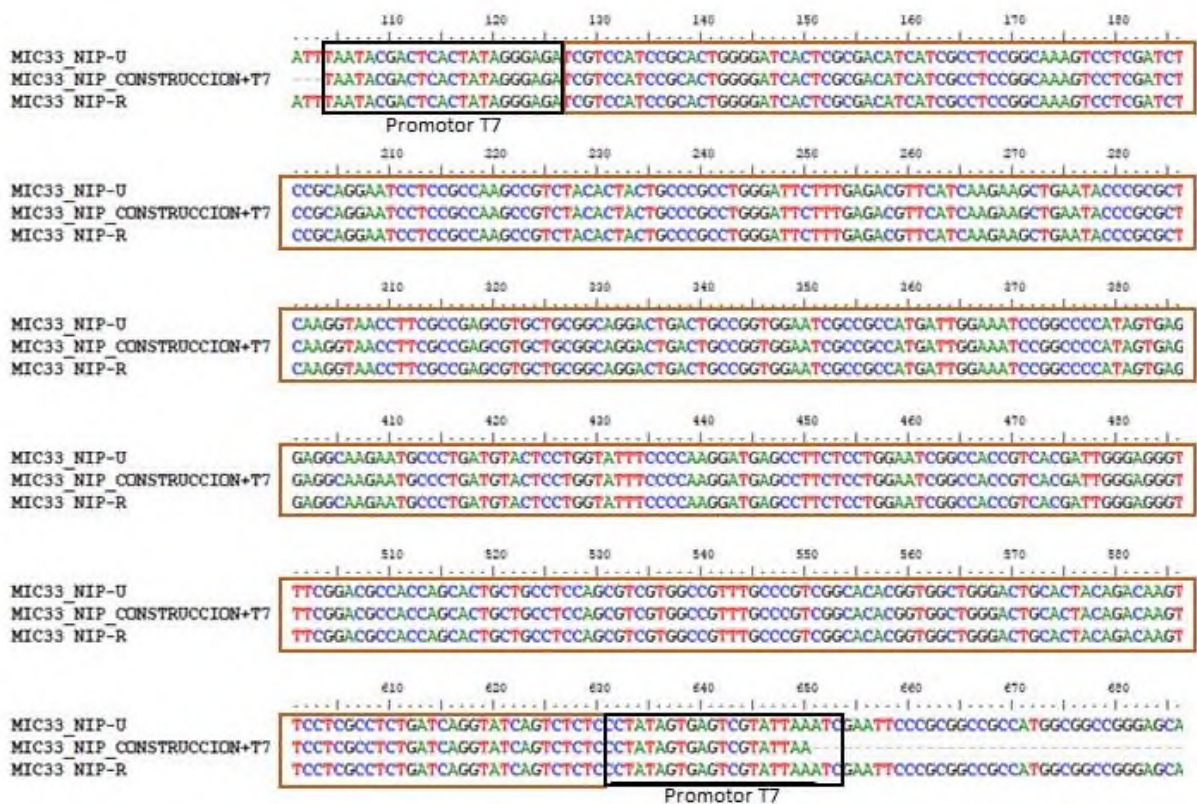


Figura 20. Análisis de la secuencia Mic33-NIP. Alineamiento (BioEdit) entre las secuencias recuperadas de la secuenciación y la secuencia de la construcción obtenida de bases de datos, mostrando que el inserto en el plásmido es el esperado y esta íntegro. La secuencia de interés se encuentra en el recuadro naranja, flanqueada por los promotores T7

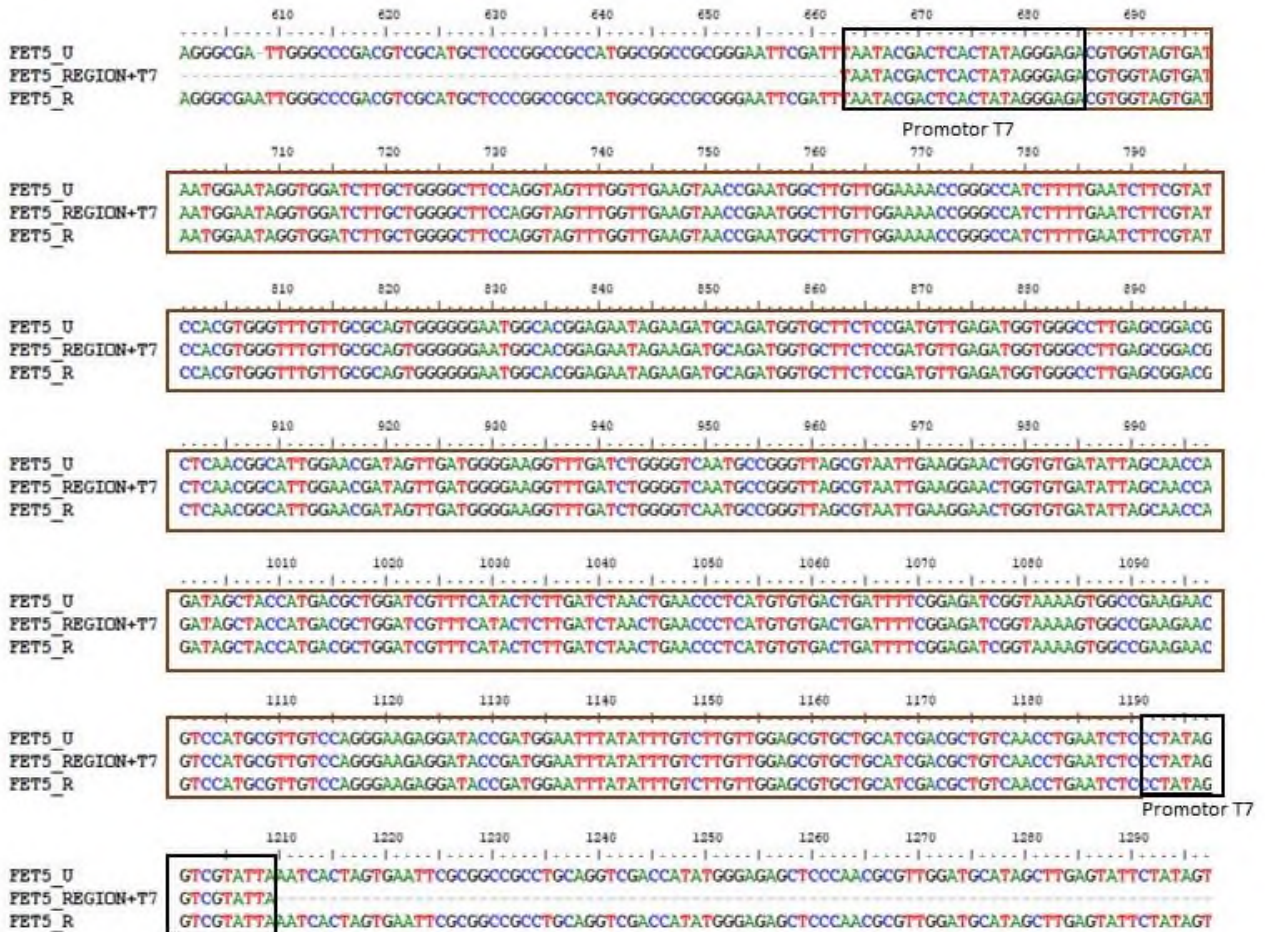


Figura 21. Análisis de la secuencia FET5. Alineamiento (BioEdit) entre las secuencias recuperadas de la secuenciación y la secuencia de la región del gen obtenida de bases de datos, mostrando que el inserto en el plásmido es el esperado y esta íntegro. La secuencia de interés se encuentra en el recuadro naranja, flanqueada por los promotores T7

7.6 Síntesis de dsRNAi

Una vez que se confirmó que las construcciones correspondían a las secuencias diseñadas y presentaban todos los elementos para ser empleadas como plantillas, se procedió a la síntesis de dsRNAi. Mediante un gel de agarosa (1%) se verificó la obtención de los productos de la síntesis (Fig. 22). Las bandas (observadas en el gel) de 500 pb corresponden al dsRNAi largo y las manchas debajo de 100 pb corresponden a dsRNAi cortos obtenidos por el tratamiento de ldsRNAs con RNAsa III.

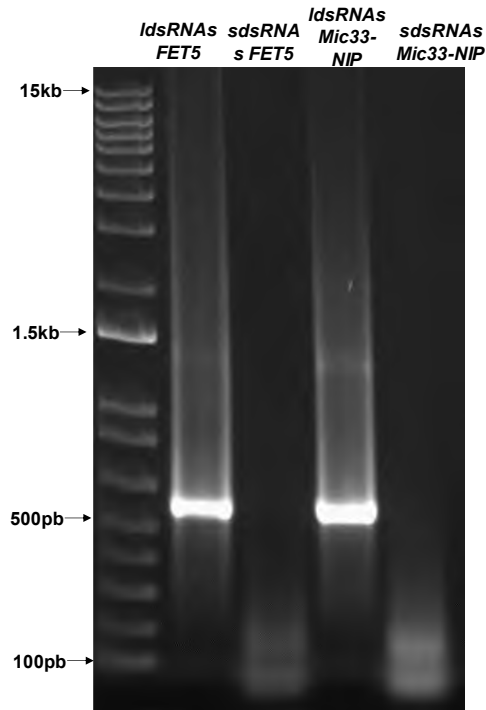


Figura 22. Productos de la síntesis de IdsRNAi y sdsRNAi de FET5 y la construcción Mic33-NIP. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X.

7.7 Actividad fungicida de la formulación de dsRNAs sobre *P. digitatum*

La formulación de dsRNAs que contenía concentraciones equimolares de la fusión Mic33-NIP y FET5, se empleó para realizar bioensayos dirigidos a evaluar el efecto inhibitorio sobre el hongo *P. digitatum*. Después de realizar varios ensayos preliminares empleando naranjas de diversos lotes, adquiridas en distintos sitios de venta a lo largo de los meses de marzo a septiembre, se observó que cada lote era heterogéneo (en cuanto tamaño y madurez). A pesar de que en cada uno de los bioensayos se controló la uniformidad de las condiciones ambientales y de tratamiento (intensidad de luz, temperatura, inóculo), se observaron diferencias en el desarrollo de la patogénesis que se evidenciaron al tener naranjas que rápidamente desarrollaban lesiones, y en el mismo experimento encontrar naranjas que no las desarrollaban, incluso en el grupo control sin tratamiento. Estas observaciones permitieron distinguir dos parámetros de respuesta: 1) la incidencia de la infección (que tantas naranjas se infectaban de las inoculadas), y 2) el desarrollo de la infección en las naranjas afectadas.

En cuanto a la incidencia de la infección, al día 5, que equivale a 120h días post inoculación (dpi),

se observó que en las tres réplicas experimentales se infectaron del 26 al 66% del total de naranjas que fueron inoculadas con *P. digitatum*. En ninguna de las réplicas se logró el 100% de infección. Como se observa en la Figura 23, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de la infección atribuibles al tratamiento de ldsRNAs.

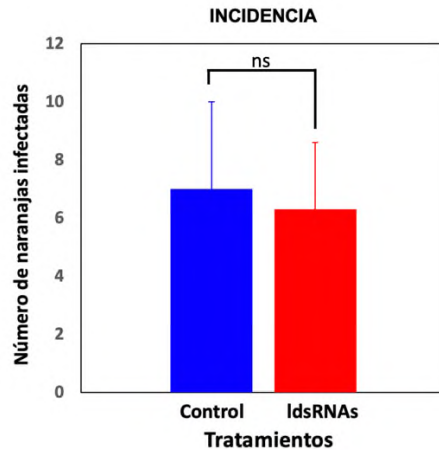


Figura 23. Incidencia de la infección expresada como número de naranjas infectadas de un total de 15 individuos. ANOVA-1W ($\alpha=0.05$, $n=15$) las barras de error muestran la desviación estándar (SD) de 3 réplicas independientes.

En lo que respecta al desarrollo de la infección en el subgrupo de naranjas que se infectaron y que recibieron tres aplicaciones de la formulación de ldsRNAs (2 μg), (réplicas 1 y 2, debido a falta de insumos para una tercera réplica), se observó una tendencia de efecto inhibitorio cuando se le comparó con el grupo de naranjas control, como se aprecia en la Fig. 23.

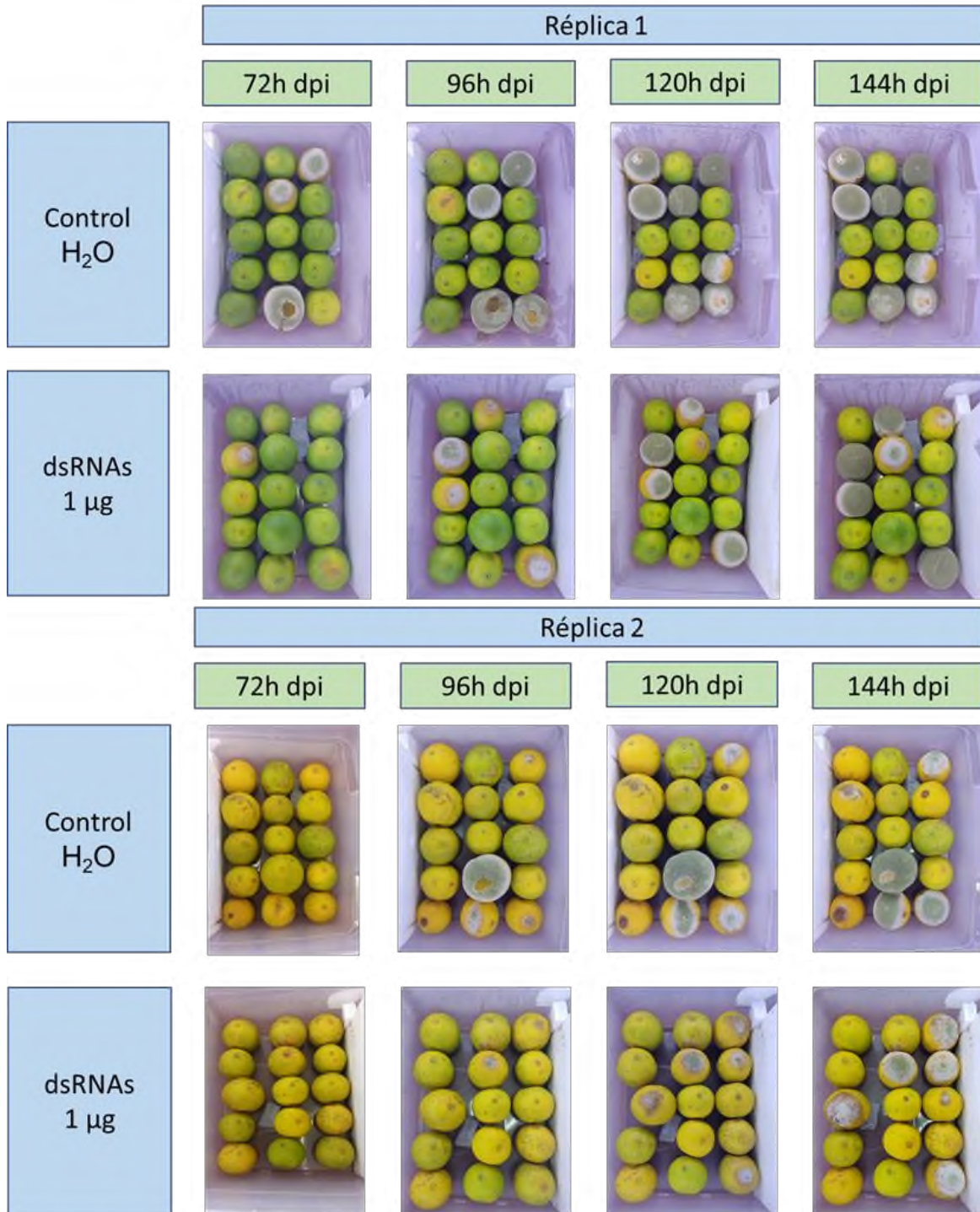


Figura 24. Bioensayo de inhibición de desarrollo de la infección de *P. digitatum* sobre frutos de naranja con 3 dosis de biofungicida.

Las lesiones observadas en las réplicas 1 y 2 se cuantificaron midiendo el diámetro de infección. En la Fig. 25 y Tablas 16 y 17 se muestran resultados del análisis de la réplicas 1 y 2, con

diámetros de lesión totales de 69.26 y 41.11 cm para el tratamiento control y el tratamiento con ldsRNAs, respectivamente. Tras realizar en análisis de la varianza se observó que existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al diámetro de la infección ($p < 0.05$) entre el control ($0 \mu\text{g}$) y el tratamiento con ldsRNAs ($2 \mu\text{g}$).

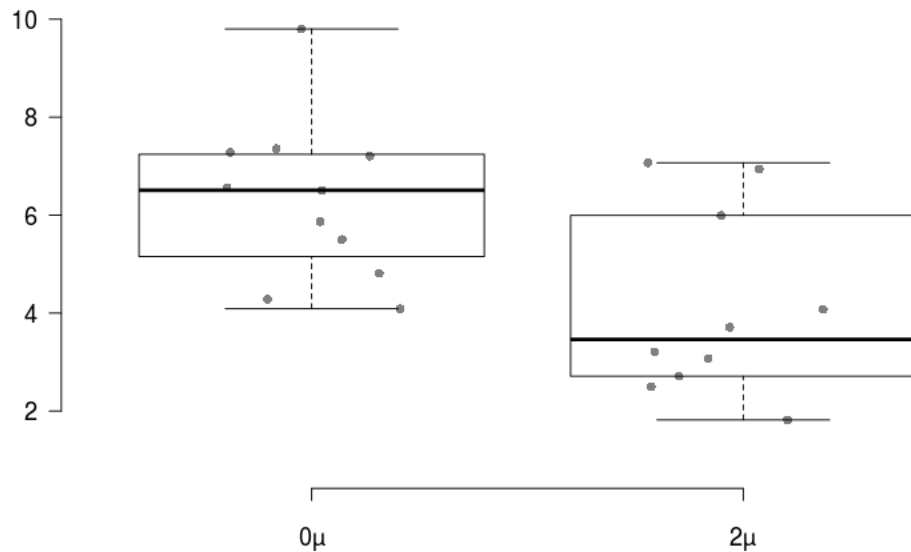


Figura 25. Réplica 1 y 2. Desarrollo de la infección en naranjas tratadas con dsRNAs y en condiciones control. Las líneas centrales muestran las medianas; los límites de las casillas indican los percentiles 25 y 75 determinados por el software R; los bigotes se extienden 1,5 veces el rango intercuartílico desde los percentiles 25 y 75. $n = 11$, 10 puntos de muestra, $\alpha = 0.05$.

Tabla 16. Datos y análisis estadístico (prueba de Tukey) del diámetro de crecimiento de la infección de *P. digitatum* sobre frutos de naranja en la réplica 1 y 2 (3 dosis de ldsRNAs).

	Cantidad de ldsRNAs	
	0 μ	2 μ
Diámetro de crecimiento	5.501	4.077
	7.279	6.944
	7.206	5.994
	6.507	7.069
	7.357	1.819
	6.564	3.075
	4.81	2.711
	4.089	3.711
	9.8	2.501
	5.866	3.211
	4.281	
SD	1.651	1.891
Tukey	A	B

Tabla 17. Datos y análisis estadístico (análisis de varianza) del diámetro de crecimiento de la infección de *P. digitatum* sobre frutos de naranja en la réplica 1 y 2. P<0.05: Diferencias estadísticamente significativas.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración de dsRNAs	1	25.01	25.012	7.99	0.011
Error	19	59.44	3.129		
Total	20	84.45			

Inicialmente se consideró tener tres réplicas independientes para los bioensayos. Desafortunadamente, para la tercera réplica solo fue posible adicionar 2 dosis de ldsRNAs (no se aplicó una tercera dosis por falta de insumos), por lo que ésta no se consideró para el análisis estadístico junto a las 2 réplicas anteriores (Figura 25) y se hizo de forma independiente. En la Fig. 26 se muestran los resultados del bioensayo de inhibición de la tercera réplica con dos dosis de ldsRNAs, donde se visualizaron diámetros de infección muy similares entre el control y el tratamiento.

Una de las preguntas importantes a responder en el transcurso de esta investigación fue si realmente el número de dosis tendría un efecto en la efectividad del biofungicida. De acuerdo con la literatura, se ha demostrado que la maquinaria de silenciamiento celular tiene límites y puede llegar a saturarse, y en esos casos, aumentar la dosis no implicaría necesariamente que el hongo tomará más ldsRNAs y que el silenciamiento sería más fuerte (McLoughlin *et al.*, 2018). Sin embargo, hacer repeticiones periódicas sí podría dar tiempo a la desaturación para la toma de nuevos ldsRNAs y de esta forma podría reforzar la respuesta (Nerva *et al.*, 2020).

Para confirmar si existían diferencias al aplicar dos dosis o tres, se compararon los resultados obtenidos en las primeras dos réplicas (de 3 dosis) con la tercera réplica (2 dosis). Los resultados se muestran en la Fig. 27, que demuestra diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos.

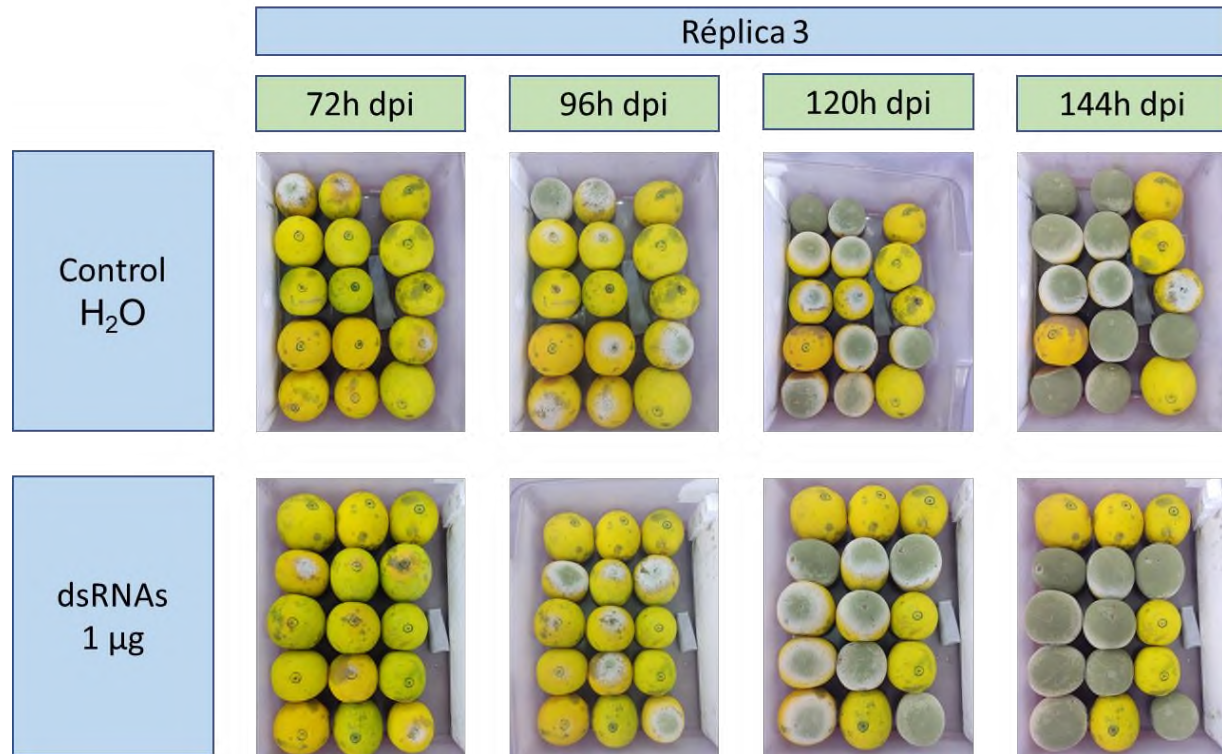


Figura 26. Tercera réplica del bioensayo de inhibición del desarrollo de *P. digitatum* sobre frutos de naranja.

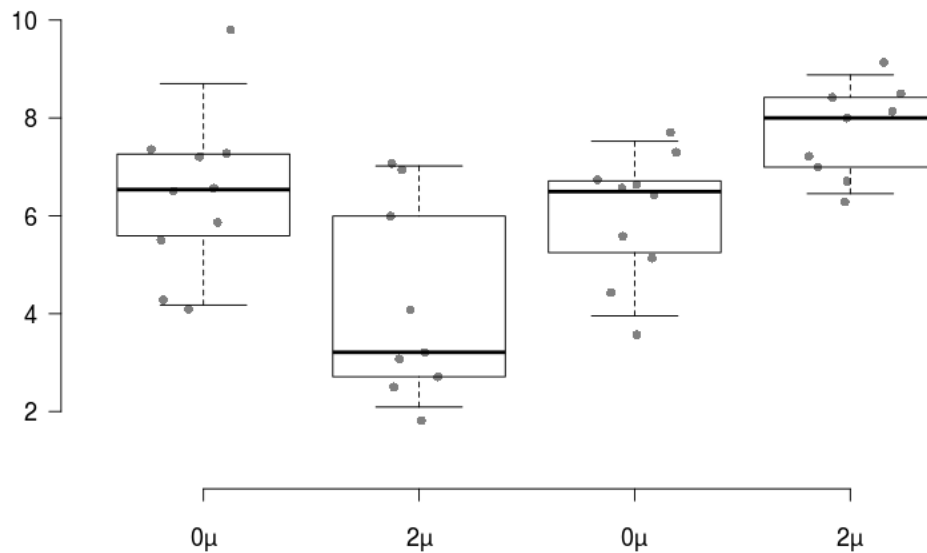


Figura 27. Promedio de diámetros de infección de *P. digitatum* sobre frutos de naranja. Del lado izquierdo (0μg y 2μg) representan la aplicación de 3 dosis de ldsRNAs, del lado derecho (0μg y 2μg) representan la aplicación de 2 dosis. Las líneas centrales muestran las medianas; los límites de las casillas indican los percentiles 25 y 75 determinados por el software R; los bigotes se extienden hasta los percentiles 5 y 95. n = 10, 9, 10, 9 puntos de muestra, $\alpha=0.05$.

Se puede observar en la Figura 27 que existen diferencias significativas entre aplicar 3 dosis y solamente 2. A pesar de que las réplicas no son las suficientes para realizar una afirmación, es posible inferir que el número de dosis aplicadas podrían tener un efecto sobre la inhibición del desarrollo del hongo. Los datos cuantitativos y el análisis de varianza se muestran en las Tablas 18 y 19.

Tabla 18. Diámetro de crecimiento de la infección de *P. digitatum* sobre frutos de naranja. Datos correspondientes a la comparación entre la aplicación de 3 y 2 dosis de ldsRNAs.

Diámetro de crecimiento	Cantidad de ldsRNAs			
	3 dosis		2 dosis	
	1μ	2μ	0μ	2μ
	5.501	4.077	6.567	6.994
	7.279	6.944	6.422	6.282
	7.206	5.994	5.582	8.498
	6.507	7.069	5.137	7.999
	7.357	1.819	4.429	7.219
	6.564	3.075	3.568	6.708
	4.089	2.711	6.737	8.42
	9.8	2.501	7.3	8.134
	5.866	3.211	6.637	9.134
	4.281		7.706	
SD	1.661	1.306	2	0.95
Tukey	A	A	AB	B

Tabla 19. Análisis de varianza correspondiente al experimento de inhibición del desarrollo de infección de *P. digitatum* (3 dosis vs 2 dosis). $p < 0.05$ por lo que hay diferencias significativas.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Número de dosis	3	58.61	19.538	8.37	0.00
Error	34	79.4	2.335		
Total	37	138.01			

A lo largo de los experimentos se observaron aspectos que es necesario puntualizar, además de encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control empleando el diámetro de la lesión como parámetro de respuesta, se observó de forma consistente una resistencia al avance de la enfermedad en las naranjas tratadas con dsRNAs. Esta resistencia fue visible al aparecer los signos primarios de la infección, alrededor de las 72h dpi. Las naranjas tratadas permanecieron por más tiempo conteniendo la lesión en la forma de ablandamiento antes de desarrollar micelio visible, en comparación con las naranjas tratadas solo con agua, que desarrollaron rápidamente micelio y esporas. Es probable que los efectos de la protección se manifiesten en un espacio de tiempo reducido, y que a partir de las 72h la efectividad se reduzca gradualmente. A partir de esta observación se pueden emplear otras estrategias para cuantificar el efecto protector de los dsRNAs que involucren la medición del avance de la infección en un intervalo de tiempo específico y que considere las distintas etapas de desarrollo del hongo sobre la superficie de la naranja. Para esto se puede emplear la microscopía para observar la morfología y cuantificar el desarrollo de esporas, o bien métodos

moleculares, como la qPCR aplicada a la cuantificación absoluta de DNA en las lesiones para determinar la biomasa que corresponde a la planta y al patógeno (Li *et al.* 2012, 2022).

Además de la observación anterior, en el grupo control se encontraron naranjas que iniciaron el desarrollo de la infección en la parte de debajo de la naranja, y no en la superficie expuesta. Una vez que se detectaron dichas naranjas, se invirtieron para que la lesión fuera visible en las imágenes (Fig. 26). Este fenómeno no ocurrió en las naranjas tratadas con dsRNAs en ninguna de las réplicas, por lo que puede ser un elemento de evidencia importante para observar en futuros bioensayos.

Por otra parte, los bioensayos evidenciaron la heterogeneidad en los frutos de naranja, expresados como susceptibilidad diferencial a la infección y a su desarrollo. A pesar de que las 30 naranjas para cada réplica se seleccionaron a partir de lotes de 100 naranjas con la finalidad de elegir muestras representativas con nivel de madurez similar, existieron desigualdades entre las naranjas de cada grupo que podrían explicar que algunas naranjas no se hayan infectado, tanto el grupo control como en el grupo tratado con dsRNAs.

De acuerdo con resultados previos (Ramirez,2022), la aplicación de SIGS en *P. digitatum* es eficiente para alterar su germinación y silenciar RNAs mensajeros específicos en pruebas *in vitro* por lo que este fitopatógeno es capaz de tomar RNAs ambientales. En el presente trabajo, esta capacidad es llevada al ambiente de la superficie de frutos de naranja, con la complejidad que esto implica ya que se desconoce el tipo de interacciones a las cuales se exponen los dsRNAs en dicho ambiente, y que podrían comprometer su estabilidad. Por lo tanto, se requieren mas estudios para evaluar el efecto de la superficie de la naranja sobre la estabilidad del RNA y la posterior toma por parte de *P. digitatum*, así como explorar el empleo de nanopartículas que permitan extender la estabilidad de los dsRNAs y promover su toma por parte del hongo.

Además de lo anterior, es necesario tener en consideración que cualquier estrategia SIGS implica el silenciamiento parcial y transitorio de los genes blanco (knockdown) y que no es posible comparar sus efectos con estrategias de abolición total de la expresión, conocido como efecto knockout, por lo que la reaplicación de dsRNAs puede ser crucial para observar efectos sostenidos en el tiempo de observación, tal y como se demostró al comparar entre tres y dos aplicaciones del biofungicida en este trabajo. En algunos reportes incluso, parten de inóculos que han sido preincubados con dsRNAs en el medio de cultivo para realizar los bioensayos del efecto

fungicida. Por ejemplo, el trabajo de Sarkar y Roy-Barman (2021) en el que preincubaron por dos generaciones al patógeno *Magnaporthe oryzae* en presencia de dsRNAs dirigidos contra el gen DES, que es un supresor de la defensa del huésped.

8 Conclusiones

- A partir de la búsqueda sistemática de información se seleccionaron tres genes reportados en el proceso patogénico de *P. digitatum*, NIP, Mic-33 y FET5, adecuados para diseñar una estrategia de silenciamiento génico inducido por aspersión.
- Mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se logró diseñar fragmentos de dsRNAs de baja similitud con el genoma de *Citrus sinensis*.
- Con la aplicación de la PCR fue posible la obtención de construcciones individuales (FET5) y de fusión (NIP y Mic-33) a partir de las cuales se sintetizaron ldsRNAs para la formulación de biofungicida.
- Los bioensayos realizados para evaluar el efecto de la formulación de ldsRNAs sobre *P. digitatum* en frutos de naranja mostraron diferencias significativas atribuibles a un efecto inhibitorio del tratamiento con ldsRNAs bajo las condiciones y los parámetros de respuesta analizados en este trabajo.

9 Perspectivas

- A partir de los resultados de este trabajo, se recomienda determinar a detalle el intervalo de tiempo en que los ldsRNAs producen el efecto de silenciamiento génico a partir de su aplicación. Para esto se requiere investigar la temporalidad del efecto y determinar el desarrollo de la biomasa fúngica mediante métodos microscópicos y moleculares.
- Se debe considerar la posibilidad de realizar una cinética del silenciamiento de los genes blanco mediante PCR cuantitativa, a lo largo de la infección en naranjas tratadas y no tratadas para determinar la temporalidad del efecto, así como incluir ensayos dosis-respuesta y de variación en el número de dosis para una mejor evaluación de la efectividad del biofungicida.
- Se recomienda explorar el uso de mezclas de dsRNAs dirigidos a varios genes de virulencia para producir una formulación para múltiples blancos e incrementar su efectividad.
- Los resultados obtenidos destacan la necesidad de optimizar la manera en la que son entregados los dsRNAi a fin de alargar su durabilidad en el ambiente y explorar formulaciones que los protejan de las nucleasas ambientales y la degradación derivada de la exposición a los rayos UV.
- Los resultados sugieren que existen diferencias en el efecto fungicida que dependen del número de dosis. La aplicación de tres dosis de dsRNAs produce efectos significativamente distintos que cuando se aplican solo dos dosis. No obstante, para poder inferir con certeza se deben realizar más réplicas con diferente número de dosis para investigar el número de dosis necesarias para un mínimo o nulo desarrollo de la enfermedad en la escala de tiempo.

10 Referencias

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
- Bautista-Baños, S. (2014). *Postharvest decay: Control strategies*. <http://site.ebrary.com/id/10881519>
- Cheng, W., Lin, M., Chu, M., Xiang, G., Guo, J., Jiang, Y., Guan, D., & He, S. (2022). RNAi-Based Gene Silencing of RXLR Effectors Protects Plants Against the Oomycete Pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 35(6), 440–449. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-21-0295-R>
- Cheng, Y., Lin, Y., Cao, H., & Li, Z. (2020). Citrus Postharvest Green Mold: Recent Advances in Fungal Pathogenicity and Fruit Resistance. *Microorganisms*, 8(3), 449. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030449>
- Costa, J. H., Bazioli, J. M., de Moraes Pontes, J. G., & Fill, T. P. (2019). Penicillium digitatum infection mechanisms in citrus: What do we know so far? *Fungal Biology*, 123(8), 584-593. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.004>
- Costa, J. H.; Bazioli, J. M.; de Moraes Pontes, J. G.; Fill, T. P. Penicillium Digitatum Infection Mechanisms in Citrus: What Do We Know so Far? *Fungal Biology* 2019, 123 (8), 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.004>.
- de Ramón-Carbonell, M.; López-Pérez, M.; González-Candelas, L.; Sánchez-Torres, P. PdMFS1 Transporter Contributes to Penicillium Digitatum Fungicide Resistance and Fungal Virulence during Citrus Fruit Infection. *JoF* 2019, 5 (4), 100. <https://doi.org/10.3390/jof5040100>.
- de Ramón-Carbonell, M.; Sánchez-Torres, P. PdSlit2 Penicillium Digitatum Mitogen-Activated-Protein Kinase Controls Sporulation and Virulence during Citrus Fruit Infection. *Fungal Biology* 2017, 121 (12), 1063–1074. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.09.004>.
- de Ramón-Carbonell, M.; Sánchez-Torres, P. Penicillium Digitatum MFS Transporters Can Display Different Roles during Pathogen-Fruit Interaction. *International Journal of Food Microbiology* 2021, 337, 108918. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108918>.
- de Ramón-Carbonell, M.; Sánchez-Torres, P. Unveiling the Role Displayed by Penicillium Digitatum PdMut3 Transcription Factor in Pathogen–Fruit Interaction. *JoF* 2021, 7 (10), 828. <https://doi.org/10.3390/jof7100828>.
- du Plooy, W., Regnier, T., & Combrinck, S. (2009). Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. *Postharvest Biology and Technology*, 53(3), 117-122. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.04.005>
- Gandía, M.; Garrigues, S.; Bolós, B.; Manzanares, P.; Marcos, J. F. The Myosin Motor Domain-Containing Chitin Synthases Are Involved in Cell Wall Integrity and Sensitivity to Antifungal Proteins in Penicillium Digitatum. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 2400. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02400>.
- Gandía, M.; Garrigues, S.; Hernanz-Koers, M.; Manzanares, P.; Marcos, J. F. Differential Roles, Crosstalk and Response to the Antifungal Protein AfpB in the Three Mitogen-Activated

- Protein Kinases (MAPK) Pathways of the Citrus Postharvest Pathogen *Penicillium Digitatum*. *Fungal Genetics and Biology* 2019, 124, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.12.006>.
- Gandía, M.; Harries, E.; Marcos, J. F. Identification and Characterization of Chitin Synthase Genes in the Postharvest Citrus Fruit Pathogen *Penicillium Digitatum*. *Fungal Biology* 2012, 116 (6), 654–664. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.03.005>.
 - Ghanei Ghooshkhaneh, N., Golzarian, M. R., & Mamarabadi, M. (2018). Detection and classification of citrus green mold caused by *Penicillium digitatum* using multispectral imaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(9), 3542-3550. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8865>
 - Haile, Z. M., Gebremichael, D. E., Capriotti, L., Molesini, B., Negrini, F., Collina, M., Sabbadini, S., Mezzetti, B., & Baraldi, E. (2021). Double-Stranded RNA Targeting Dicer-Like Genes Compromises the Pathogenicity of *Plasmopara viticola* on Grapevine. *Frontiers in Plant Science*, 12, 667539. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.667539>
 - Hao, W., Li, H., Hu, M., Yang, L., & Rizwan-ul-Haq, M. (2011). Integrated control of citrus green and blue mold and sour rot by *Bacillus amyloliquefaciens* in combination with tea saponin. *Postharvest Biology and Technology*, 59(3), 316-323. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.10.002>
 - Harries, E.; Gandía, M.; Carmona, L.; Marcos, J. F. The *Penicillium Digitatum* Protein O - Mannosyltransferase Pmt2 Is Required for Cell Wall Integrity, Conidiogenesis, Virulence and Sensitivity to the Antifungal Peptide PAF26: *P. Digitatum* Protein Glycosylation and Virulence. *Molecular Plant Pathology* 2015, 16 (7), 748–761. <https://doi.org/10.1111/mpp.12232>.
 - Huang, C.-Y., Araujo, K., Sánchez, J. N., Kund, G., Trumble, J., Roper, C., Godfrey, K. E., & Jin, H. (2021). A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(6), e2019628118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019628118>
 - INVAIO (2021). https://www.invaio.com/portfolio_page/addressing-big-problems-
 - Kinay, P., Mansour, M. F., Mlikota Gabler, F., Margosan, D. A., & Smilanick, J. L. (2007). Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection*, 26(4), 647-656. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.06.002>
 - Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Rossbach, O., Abdellatef, E., Linicus, L., 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), e1005901. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005901>
 - Koch, A., Höfle, L., Werner, B. T., Imani, J., Schmidt, A., Jelonek, L., & Kogel, K. (2019). SIGS vs HIGS: A study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium FgCYP51* genes in infected host and non-host plants. *Molecular Plant Pathology*, 20(12), 1636-1644. <https://doi.org/10.1111/mpp.12866>
 - Kouassi, K. H. S., Bajji, M., & Jijakli, H. (2012). The control of postharvest blue and green molds of citrus in relation with essential oil–wax formulations, adherence and viscosity. *Postharvest Biology and Technology*, 73, 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.06.008>
 - Lafuente, M. T., Alférez, F., & González-Candelas, L. (2018). Light-emitting Diode Blue Light Alters the Ability of *Penicillium digitatum* to Infect Citrus Fruits. *Photochemistry and Photobiology*, 94(5), 1003-1009. <https://doi.org/10.1111/php.12929>

- Li, L., Chengping, Z., Hong, L., Wufeng, L., Lihuan, Z., DongMei, X., Jinsheng, W., & Huifeng, L. (2011). Establishment of the plasmid standard curve generation method for absolute quantification PCR. *Journal of Agriculture Biotechnology*, 19, 1157-1162.
- Li, X.; Mu, K.; Yang, S.; Wei, J.; Wang, C.; Yan, W.; Yuan, F.; Wang, H.; Han, D.; Kang, Z.; Zeng, Q. Reduction of *Rhizoctonia Cerealis* Infection on Wheat Through Host- and Spray-Induced Gene Silencing of an Orphan Secreted Gene. *MPMI* 2022, 35 (9), 803–813. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-22-0075-R>.
- Liao, H.-L., Alferez, F., & Burns, J. K. (2013). Assessment of blue light treatments on citrus postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 81, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.02.019>
- Liu, J.; Yuan, Y.; Wu, Z.; Li, N.; Chen, Y.; Qin, T.; Geng, H.; Xiong, L.; Liu, D. A Novel Sterol Regulatory Element-Binding Protein Gene (SreA) Identified in *Penicillium Digitatum* Is Required for Prochloraz Resistance, Full Virulence and Erg11 (Cyp51) Regulation. *PLoS ONE* 2015, 10 (2), e0117115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117115>.
- López-Pérez, M.; Ballester, A.-R.; González-Candelas, L. Identification and Functional Analysis of *Penicillium Digitatum* Genes Putatively Involved in Virulence towards Citrus Fruit: Identification of *P. Digitatum* Virulence Factors. *Molecular Plant Pathology* 2015, 16 (3), 262–275. <https://doi.org/10.1111/mpp.12179>.
- Ma, H.; Sun, X.; Wang, M.; Gai, Y.; Chung, K.-R.; Li, H. The Citrus Postharvest Pathogen *Penicillium Digitatum* Depends on the PdMpkB Kinase for Developmental and Virulence Functions. *International Journal of Food Microbiology* 2016, 236, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.001>.
- Macarasin, D., Cohen, L., Eick, A., Rafael, G., Belausov, E., Wisniewski, M., & Droby, S. (2007). *Penicillium digitatum* Suppresses Production of Hydrogen Peroxide in Host Tissue During Infection of Citrus Fruit. *Phytopathology*, 97(11), 1491-1500. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-11-1491>
- Marcos, J. F., González-Candelas, L., & Zacarías, L. (2005). Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. *Journal of Experimental Botany*, 56(418), 2183-2193. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri218>
- McLoughlin, A. G., Wytinck, N., Walker, P. L., Girard, I. J., Rashid, K. Y., de Kievit, T., Fernando, W. G. D., Whyard, S., & Belmonte, M. F. (2018). Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports*, 8(1), 7320. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25434-4>
- Musto M., Potenza G., & Francesco C. (2014). Inhibition of *Penicillium digitatum* by a crude extract from *Solanum nigrum* leaves. *BASE*, 18(2), 174-180. <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=10980>.
- Nerva, L., Guaschino, M., Pagliarani, C., De Rosso, M., Lovisolò, C., & Chitarra, W. (2022). Spray-induced gene silencing targeting a glutathione S-transferase gene improves resilience to drought in grapevine. *Plant, cell & environment*, 45(2), 347–361. <https://doi.org/10.1111/pce.14228>
- Panebianco, S., Vitale, A., Polizzi, G., Scala, F., & Cirvilleri, G. (2015). Enhanced control of postharvest citrus fruit decay by means of the combined use of compatible biocontrol agents. *Biological Control*, 84, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.02.001>

- Pangallo, S., Li Destri Nicosia, M. G., Raphael, G., Levin, E., Ballistreri, G., Cacciola, S. O., Rapisarda, P., Droby, S., & Schena, L. (2017). Elicitation of resistance responses in grapefruit and lemon fruits treated with a pomegranate peel extract. *Plant Pathology*, 66(4), 633-640. <https://doi.org/10.1111/ppa.12594>
- Papoutsis, K., Mathioudakis, M. M., Hasperué, J. H., & Ziogas, V. (2019). Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold). *Trends in Food Science & Technology*, 86, 479-491. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.053>
- Pimenta, R. S., Silva, J. F., Coelho, C. M., Morais, P. B., Rosa, C. A., & Corrêa, A., Jr (2010). Integrated control of *Penicillium digitatum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis crataegensis* and sodium bicarbonate on oranges. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 41(2), 404-410. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220100002000022>
- Prusky, D., McEvoy, J. L., Saftner, R., Conway, W. S., & Jones, R. (2004). Relationship Between Host Acidification and Virulence of *Penicillium* spp. On Apple and Citrus Fruit. *Phytopathology*®, 94(1), 44-51. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.1.44>
- Qian, X., Yang, Q., Zhang, Q., Abdelhai, M. H., Dhanasekaran, S., Serwah, B. N. A., Gu, N., & Zhang, H. (2019). Elucidation of the Initial Growth Process and the Infection Mechanism of *Penicillium digitatum* on Postharvest Citrus (*Citrus reticulata* Blanco). *Microorganisms*, 7(11), 485. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110485>
- Qiao, L., Lan, C., Capriotti, L., Ah-Fong, A., Nino Sanchez, J., Hamby, R., Heller, J., Zhao, H., Glass, N. L., Judelson, H. S., Mezzetti, B., Niu, D., & Jin, H. (2021). Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal*, 19(9), 1756-1768. <https://doi.org/10.1111/pbi.13589>
- Queb-González, D. B., Lopez-Malo, A., Sosa-Morales, M. E., & Villa-Rojas, R. (2020). Postharvest heat treatments to inhibit *Penicillium digitatum* growth and maintain quality of Mandarin (*Citrus reticulata* blanco). *Heliyon*, 6(1), e03166. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03166>
- Ramírez-Hernández, J. E. (2022). Evaluación de un biofungicida a base de RNAi para el control de hongos fitopatógenos, mediante silenciamiento génico inducido por aspersion. Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan.
- Ramón-Carbonell, M. de; Sánchez-Torres, P. Involvement of *Penicillium Digitatum* PdSUT1 in Fungicide Sensitivity and Virulence during Citrus Fruit Infection. *Microbiological Research* 2017, 203, 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.06.008>.
- Ruiz-Jiménez, L., Polonio, Á., Vielba-Fernández, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2021). Gene Mining for Conserved, Non-Annotated Proteins of *Podosphaera xanthii* Identifies Novel Target Candidates for Controlling Powdery Mildews by Spray-Induced Gene Silencing. *Journal of Fungi*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/jof7090735>
- SAGARPA. (2017). Planeación Agrícola Nacional 2016-2030..
- Santiago T. L. B. (2019). Diseño de biofungicidas compuestos de RNAs pequeños sintéticos contra hongos patógenos de frutos tropicales. Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan.
- Sarkar, A.; Roy-Barman, S. Spray-Induced Silencing of Pathogenicity Gene MoDES1 via Exogenous Double-Stranded RNA Can Confer Partial Resistance Against Fungal Blast in Rice. *Front. Plant Sci.* 2021, 12, 733129. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.733129>.

- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., . . . Sherry, S. (2021). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D20-D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
- Si-Fi21. <http://www.snowformatics.com/si-fi.html>
- Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Gabler, F. M., & Sorenson, D. (2008). Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology*, 47(2), 226-238. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.020>
- Statista. (2020, 9 diciembre) Producción mundial de naranjas 2011-2019., <https://es.statista.com/estadisticas/508983/produccion-mundial-de-naranjas/>
- Tinoco, H. A., Barco, D. R., Ocampo, O., & Buitrago-Osorio, J. (2020). Geometric Modeling of the Valencia Orange (*Citrus sinensis* L.) by Applying Bézier Curves and an Image-Based CAD Approach. *Agriculture*, 10(8), 313. <https://doi.org/10.3390/agriculture10080313>
- Trabelsi, D., Hamdane, A. M., Said, M. B., & Abdrrabba, M. (2016). Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oils from Flowers, Leaves and Peels of Tunisian *Citrus aurantium* Against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(7), 1660-1674. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2016.1141069>
- Universidade Federal de Pelotas, Kirinus, M. B. M., Dorneles, K. da R., Universidade Federal de Pelotas, Silva, P. S., Universidade Federal de Pelotas, Barreto, C. F., Universidade Federal de Pelotas, Oliveira, R. P., Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Malgarim, M. B., & Universidade Federal de Pelotas. (2021). Application of chemical compounds during pre-harvesting to control post-harvesting green mold in citrus. *Semina: Ciências Agrárias*, 42(4), 2135-2150. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n4p2135>
- USDA. (2020, enero). *Mexico: Citrus Annual* (N.º MX2019-0067). Foreign Agricultural Service.
- USDA. (2021, julio). *Citrus: World Markets and Trade*. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service.
- Vilanova, L.; Teixidó, N.; Torres, R.; Usall, J.; Viñas, I.; Sánchez-Torres, P. Relevance of the Transcription Factor PdSte12 in *Penicillium Digitatum* Conidiation and Virulence during Citrus Fruit Infection. *International Journal of Food Microbiology* 2016, 235, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.027>.
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F.-M., Thomma, B. P. H. J., Huang, H.-D., & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, 2(10), 16151. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>
- Wang, M.; Chen, C.; Zhu, C.; Sun, X.; Ruan, R.; Li, H. Os2 MAP Kinase-Mediated Osmostress Tolerance in *Penicillium Digitatum* Is Associated with Its Positive Regulation on Glycerol Synthesis and Negative Regulation on Ergosterol Synthesis. *Microbiological Research* 2014, 169 (7–8), 511–521. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.12.004>.
- Wang, N., & Trivedi, P. (2013). Citrus Huanglongbing: A Newly Relevant Disease Presents Unprecedented Challenges. *Phytopathology*®, 103(7), 652-665. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-12-0331-RVW>

- Wang, W.; Wang, M.; Wang, J.; Zhu, C.; Chung, K.-R.; Li, H. Adenylyl Cyclase Is Required for CAMP Production, Growth, Conidial Germination, and Virulence in the Citrus Green Mold Pathogen *Penicillium Digitatum*. *Microbiological Research* 2016, 192, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.013>.
- Wang, Z., Jiang, M., Chen, K., Wang, K., Du, M., Zalán, Z., Hegyi, F., & Kan, J. (2018). Biocontrol of *Penicillium digitatum* on Postharvest Citrus Fruits by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Food Quality*, 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/2910481>
- Werner, B. T., Gaffar, F. Y., Schuemann, J., Biedenkopf, D., & Koch, A. M. (2020). RNA-Spray-Mediated Silencing of *Fusarium graminearum* AGO and DCL Genes Improve Barley Disease Resistance. *Frontiers in Plant Science*, 11, 476. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00476>
- Wu, Z.; Wang, S.; Yuan, Y.; Zhang, T.; Liu, J.; Liu, D. A Novel Major Facilitator Superfamily Transporter in *Penicillium Digitatum* (PdMFS2) Is Required for Prochloraz Resistance, Conidiation and Full Virulence. *Biotechnol Lett* 2016, 38 (8), 1349–1357. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2113-4>.
- Yahyazadeh, M., Zare, R., Omidbaigi, R., Faghih-Nasiri, M., & Abbasi, M. (2009). Control of *Penicillium* decay on citrus fruit using essential oil vapours of thyme or clove inside polyethylene and nano-clay polyethylene films. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(4), 403-409. <https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512540>
- Yang, Q., Qian, X., Dhanasekaran, S., Boateng, N. A. S., Yan, X., Zhu, H., He, F., & Zhang, H. (2019). Study on the Infection Mechanism of *Penicillium Digitatum* on Postharvest Citrus (*Citrus Reticulata* Blanco) Based on Transcriptomics. *Microorganisms*, 7(12), 672. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120672>
- Yang, Q.; Qian, X.; Dhanasekaran, S.; Boateng, N. A. S.; Yan, X.; Zhu, H.; He, F.; Zhang, H. Study on the Infection Mechanism of *Penicillium Digitatum* on Postharvest Citrus (*Citrus Reticulata* Blanco) Based on Transcriptomics. *Microorganisms* 2019, 7 (12), 672. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120672>.
- Yin, C., Zhu, H., Jiang, Y., Shan, Y., & Gong, L. (2020). Silencing Dicer-Like Genes Reduces Virulence and sRNA Generation in *Penicillium italicum*, the Cause of Citrus Blue Mold. *Cells*, 9(2), 363. <https://doi.org/10.3390/cells9020363>
- Zhang, T.; Sun, X.; Xu, Q.; Zhu, C.; Li, Q.; Li, H. PdSNF1, a Sucrose Non-Fermenting Protein Kinase Gene, Is Required for *Penicillium Digitatum* Conidiation and Virulence. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, 97 (12), 5433–5445. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4593-z>.

Anexo 1

String de búsqueda de artículos sobre la aplicación de SIGS para el control de hongos en cítricos:

PUBMED, búsqueda avanzada restringida a Title/Abstract

(string de búsqueda en PUBMED: Citrus AND (fungi OR mold) AND (Silencing OR sRNAs OR spray-induced OR sigs) NOT (mutant OR deletion OR transgenic fungi)

Anexo 2

Preparación de soluciones y medios de cultivo

1. ddH₂O + DEPC (1L)

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

2. Buffer TAE 50X (500mL)

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

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

3. Solución de Lisis

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

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

- Agarosa 1g
- Buffer TAE 1X 100mL

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

5. Solución I (10mL)

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

Mezclar los componentes y guardar a 4°C.

6. Solución II (200µL)

- NaOH 10N 4µL

- SDS 10% 20 μ L
- ddH₂O + DEPC cbp 200 μ L

7. Solución III (10mL)

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

Mezclar los componentes y almacenar a 4°C.

8. Medio de cultivo LB Sólido (100mL)

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

En un matraz vaciar el agua y en agitación agregar los componentes hasta disolver bien. Esterilizar 15min a 15lb/in² a 121°C. Enfriar a 40-50°C y agregar 100 μ L ampicilina 100mg/mL.

Anexo 3

Vector de clonación pGEM-T easy

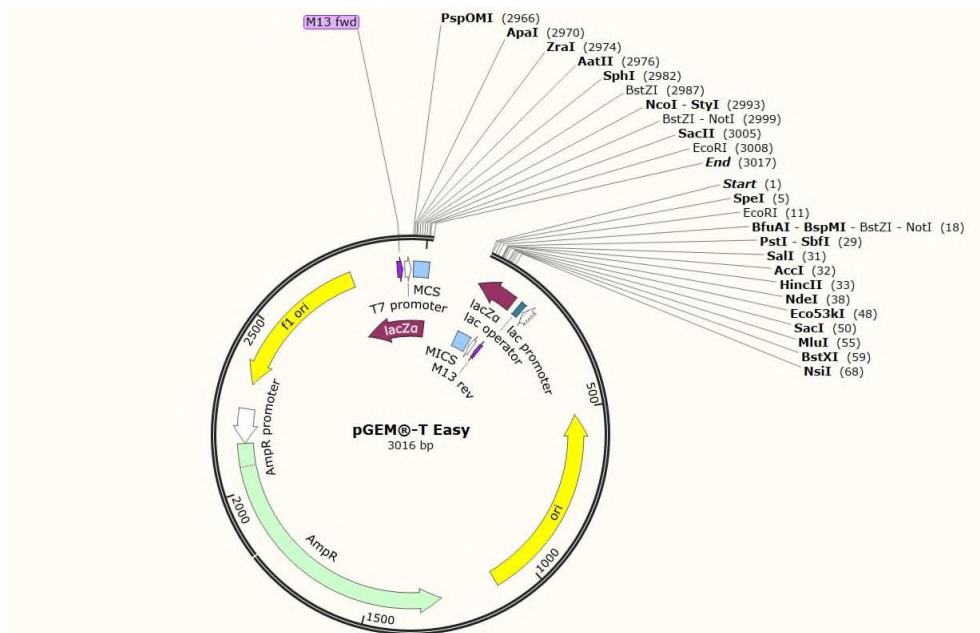


Ilustración A Estructura del vector pGEM-T easy. Se visualizan las enzimas de restricción del MCS (sitio de clonaje múltiple) y las cajas de DNA del vector

Anexo 4

Método de extracción por lisis alcalina

- Vaciar el cultivo bacteriano en tubos de 1.5mL y centrifugar a 12,000 rpm x 2min. Vaciar gentilmente el sobrenadante por decantación, dejando el pellet bacteriano sin líquido. Resuspender el pellet en 100µL de Solución I y agitar por vórtex vigorosamente. Meter la mezcla en hielo.
- Agregar 200µL de la Solución II recién preparada al pellet y mezclar por inversión 10 veces, poner seguidamente en hielo. Añadir 150µL de Solución III, cerrar y dispersar la solución mediante inversión varias veces; poner en hielo 5min.
- Centrifugar el lisado bacteriano a 12,000 rpm x 5min a 4°C. Transferir el sobrenadante a tubos nuevos. Agregar un volumen igual de fenol-cloroformo-álcool isoamílico, mezclar por vórtex y centrifugar a 12,000 rpm x 2min a 4°C. Transferir la capa superior acuosa a un tubo nuevo.
- Precipitar el plásmido añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente. Mezclar por vórtex y dejar reposar 2min a temperatura ambiente. Centrifugar el plásmido a 12,000 rpm x 5min a 4°C. Se obtiene un pellet blanquecino.
- Remover el sobrenadante por aspiración gentil. Se lava el pellet con 1mL de etanol al 70% y mezclar por inversión. Centrifugar a 12,000 rpm x 2min a 4°C. Remover el sobrenadante por aspiración gentil. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Resuspender el pellet en 30µL de ddH₂O + DEPC, incubar con RNAsa 30min a 37°C, inactivar a 65°C y almacenar a -20°C.

Anexo 5

Artículos totales que arrojó la búsqueda en la base PUBMED

Autor y año	Título	Incluido/Excluido	Tema
Xu <i>et al.</i> , 2022	Risk and molecular mechanisms for boscalid resistance in <i>Penicillium digitatum</i>	Excluido	Bases moleculares de la resistencia de <i>P. digitatum</i> a un agente de control químico
Citores <i>et al.</i> , 2022	Deciphering Molecular Determinants Underlying <i>Penicillium digitatum</i> 's Response to Biological and Chemical Antifungal Agents by Tandem Mass Tag (TMT)-Based High-Resolution LC-MS/MS.	Excluido	Bases moleculares de la respuesta de <i>P. digitatum</i> a agentes químicos/biológicos
Tian <i>et al.</i> , 2021	Chromosome Genome Sequencing and Comparative Transcriptome-Based Analyses of <i>Kloeckera apiculata</i> 34-9 Unveil the Potential Biocontrol Mechanisms Against Citrus Green Mold.	Excluido	Análisis genómico y transcriptómico de la respuesta de un agente de biocontrol durante la interacción con <i>P. digitatum</i>
de Ramón-Carbonell y Sánchez-Torres, 2021	Unveiling the Role Displayed by <i>Penicillium digitatum</i> PdMut3 Transcription Factor in Pathogen-Fruit Interaction	Excluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico. NOTA: El gen se reprime naturalmente durante la infección, por lo que no es un blanco para el silenciamiento.
Gandía <i>et al.</i> 2021	Potential of Antifungal Proteins (AFPs) to Control <i>Penicillium</i> Postharvest Fruit Decay	Excluido	Actividad antifúngica de péptidos y proteínas contra <i>P. digitatum</i>
Zou <i>et al.</i> 2020	Reconstruction of a Context-Specific Model Based on Genome-Scale Metabolic Simulation for Identification of Prochloraz Resistance Mechanisms in <i>Penicillium digitatum</i>	Excluido	Bases moleculares de la resistencia de <i>P. digitatum</i> a un agente de control químico
Wang <i>et al.</i> , 2021	Transcription Factor CsWRKY65 Participates in the Establishment of Disease Resistance of Citrus Fruits to <i>Penicillium digitatum</i>	Excluido	Identificación de factores de resistencia en cítricos contra <i>P. digitatum</i>
Sicilia <i>et al.</i> 2021	Fungal Infection Induces Anthocyanin Biosynthesis and Changes in DNA Methylation Configuration of Blood Orange [<i>Citrus sinensis</i> L. (Osbeck)].	Excluido	Respuesta molecular de especies de cítricos ante la infección con <i>P. digitatum</i>
de Ramón-Carbonell y Sánchez-Torres, 2021a	<i>Penicillium digitatum</i> MFS transporters can display different roles during pathogen-fruit interaction	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico

Autor y año	Título	Incluido/Excluido	Tema
Feng <i>et al.</i> , 2020	Effects of Peptide Thanatin on the Growth and Transcriptome of <i>Penicillium digitatum</i>	Excluido	Actividad antifúngica de péptidos y proteínas contra <i>P. digitatum</i>
Garrigues <i>et al.</i> , 2020	A Novel Secreted Cysteine-Rich Anionic (Sca) Protein from the Citrus Postharvest Pathogen <i>Penicillium digitatum</i> Enhances Virulence and Modulates the Activity of the Antifungal Protein B (AfpB)	Excluido	Actividad antifúngica de péptidos y proteínas/Identificación de proteínas antifúngicas en <i>P. digitatum</i>
Bugada <i>et al.</i> , 2020	The Antifungal Protein AfpB Induces Regulated Cell Death in Its Parental Fungus <i>Penicillium digitatum</i>	Excluido	Actividad antifúngica de péptidos y proteínas/Identificación de proteínas antifúngicas en <i>P. digitatum</i>
Yang <i>et al.</i> , 2019	Study on the Infection Mechanism of <i>Penicillium digitatum</i> on Postharvest Citrus (<i>Citrus Reticulata</i> Blanco) Based on Transcriptomics.	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
Delgado <i>et al.</i> , 2019	Evaluation of the activity of the antifungal PgAFP protein and its producer mould against <i>Penicillium</i> spp postharvest pathogens of citrus and pome fruits.	Excluido	Actividad antifúngica de péptidos y proteínas contra <i>P. digitatum</i>
Gandía <i>et al.</i> , 2019a	The Myosin Motor Domain-Containing Chitin Synthases Are Involved in Cell Wall Integrity and Sensitivity to Antifungal Proteins in <i>Penicillium digitatum</i>	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
de Ramón-Carbonell <i>et al.</i> , 2019	PdMFS1 Transporter Contributes to <i>Penicillium digitatum</i> Fungicide Resistance and Fungal Virulence during Citrus Fruit Infection.	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
Ballester <i>et al.</i> , 2019	Functional and Pharmacological Analyses of the Role of <i>Penicillium digitatum</i> Proteases on Virulence	Excluido	Análisis de proteínas de <i>P. digitatum</i> sin efecto en la virulencia
Louw y Korsten, 2019	Impact of Postharvest Storage on the Infection and Colonization of <i>Penicillium digitatum</i> and <i>Penicillium expansum</i> on Nectarine	Excluido	Análisis de expresión de <i>P. digitatum</i> en una planta distinta a Citrus
Gandía <i>et al.</i> , 2019b	Differential roles, crosstalk and response to the Antifungal Protein AfpB in the three Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) pathways of the citrus postharvest pathogen <i>Penicillium digitatum</i>	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico

Autor y año	Título	Incluido/Excluido	Tema
Yang <i>et al.</i> , 2018	Molecular characterization of a new gammapartitivirus isolated from the citrus-pathogenic fungus <i>Penicillium digitatum</i> .	Excluido	Identificación de virus de <i>P. digitatum</i>
Vu <i>et al.</i> 2017	A highly efficient <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation system for the postharvest pathogen <i>Penicillium digitatum</i> using DsRed and GFP to visualize citrus host colonization	Excluido	Transformación genética de <i>P. digitatum</i>
de Ramón-Carbonell y Sánchez-Torres, 2021b	Unveiling the Role Displayed by <i>Penicillium digitatum</i> PdMut3 Transcription Factor in Pathogen–Fruit Interaction	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
Ruan <i>et al.</i> , 2017	Functional characterization of the Dsc E3 ligase complex in the citrus postharvest pathogen <i>Penicillium digitatum</i>	Excluido	Análisis de proteínas de <i>P. digitatum</i> sin efecto demostrado en la virulencia
de Ramón-Carbonell y Sánchez-Torres, 2017a	Involvement of <i>Penicillium digitatum</i> PdSUT1 in fungicide sensitivity and virulence during citrus fruit infection	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
Ma <i>et al.</i> , 2016	The citrus postharvest pathogen <i>Penicillium digitatum</i> depends on the PdMpkB kinase for developmental and virulence functions	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
Wang <i>et al.</i> , 2016	Adenylyl cyclase is required for cAMP production, growth, conidial germination, and virulence in the citrus green mold pathogen <i>Penicillium digitatum</i>	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
Vilanova <i>et al.</i> , 2016	Relevance of the transcription factor PdSte12 in <i>Penicillium digitatum</i> conidiation and virulence during citrus fruit infection	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
Wu <i>et al.</i> , 2016	A novel major facilitator superfamily transporter in <i>Penicillium digitatum</i> (PdMFS2) is required for prochloraz resistance, conidiation and full virulence	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
Niu <i>et al.</i> , 2016	Isolation and characterization of a novel mycovirus from <i>Penicillium digitatum</i> .	Excluido	Identificación de virus de <i>P. digitatum</i>
Garigues <i>et al.</i> , 2015	Occurrence and function of fungal antifungal proteins: a case study of the citrus postharvest pathogen <i>Penicillium digitatum</i>	Excluido	Actividad antifúngica de péptidos y proteínas/Identificación de proteínas antifúngicas en <i>P. digitatum</i>

Autor y año	Título	Incluido/Excluido	Tema
Liu <i>et al.</i> , 2015	Whole transcriptome analysis of <i>Penicillium digitatum</i> strains treated with prochloraz reveals their drug-resistant mechanisms	Excluido	Bases moleculares de la resistencia de <i>P. digitatum</i> a un agente de control químico
Harries <i>et al.</i> , 2015	The <i>Penicillium digitatum</i> protein O-mannosyltransferase Pmt2 is required for cell wall integrity, conidiogenesis, virulence and sensitivity to the antifungal peptide PAF26	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
López-Pérez <i>et al.</i> , 2015	Identification and functional analysis of <i>Penicillium digitatum</i> genes putatively involved in virulence towards citrus fruit	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
Liu <i>et al.</i> , 2015	A novel sterol regulatory element-binding protein gene (<i>sreA</i>) identified in <i>Penicillium digitatum</i> is required for prochloraz resistance, full virulence and <i>erg11</i> (<i>cyp51</i>) regulation.	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
Rodríguez <i>et al.</i> , 2015	Resistance to pathogens in terpene down-regulated orange fruits inversely correlates with the accumulation of D-limonene in peel oil glands	Excluido	Bases de la resistencia a <i>P. digitatum</i> en Citrus
Wang <i>et al.</i> , 2015	Pdbr1A, PdabaA and PdwetA control distinct stages of conidiogenesis in <i>Penicillium digitatum</i>	Excluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el ciclo de vida, no directamente en la virulencia
Waewthongrak <i>et al.</i> , 2014	Cyclic LIPopeptides from <i>Bacillus subtilis</i> ABS-S14 elicit defense-related gene expression in citrus fruit	Excluido	Bases de la resistencia a <i>P. digitatum</i> en Citrus
Liu <i>et al.</i> , 2014	Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from <i>Kloeckera apiculata</i> in control of <i>Penicillium</i> molds of citrus fruits	Excluido	Agentes de biocontrol
Wang <i>et al.</i> , 2014b	Novel mutations in CYP51B from <i>Penicillium digitatum</i> involved in prochloraz resistance	Excluido	Bases moleculares de la resistencia de <i>P. digitatum</i> a un agente de control químico
Wang <i>et al.</i> , 2014a	Os2 MAP kinase-mediated osmostress tolerance in <i>Penicillium digitatum</i> is associated with its positive regulation on glycerol synthesis and negative regulation on ergosterol synthesis	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico

Autor y año	Título	Incluido/Excluido	Tema
Rodríguez <i>et al.</i> , 2014	Terpene down-regulation triggers defense responses in transgenic orange leading to resistance against fungal pathogens	Excluido	Bases de la resistencia a <i>P. digitatum</i> en Citrus
Zhang <i>et al.</i> , 2013	PdSNF1, a sucrose non-fermenting protein kinase gene, is required for <i>Penicillium digitatum</i> conidiation and virulence	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
Hershkovitz <i>et al.</i> , 2013	De-novo assembly and characterization of the transcriptome of <i>Metschnikowia fructicola</i> reveals differences in gene expression following interaction with <i>Penicillium digitatum</i> and grapefruit peel	Excluido	Agentes de biocontrol
Ballester <i>et al.</i> , 2013	Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part II: gene expression and metabolite accumulation in the response of fruits to <i>Penicillium digitatum</i> infection	Excluido	Bases de la respuesta a <i>P. digitatum</i> en Citrus
Marcet-Houben <i>et al.</i> , 2012	Genome sequence of the necrotrophic fungus <i>Penicillium digitatum</i> , the main postharvest pathogen of citrus	Excluido	Secuenciación del genoma de <i>P. digitatum</i>
Buron-Moles <i>et al.</i> , 2012	Use of GFP-tagged strains of <i>Penicillium digitatum</i> and <i>Penicillium expansum</i> to study host-pathogen interactions in oranges and apples	Excluido	Transformación genética de <i>P. digitatum</i> y estudio de su interacción con Citrus
Gandía <i>et al.</i> , 2012	Identification and characterization of chitin synthase genes in the postharvest citrus fruit pathogen <i>Penicillium digitatum</i>	Incluido	Análisis de genes de <i>P. digitatum</i> con importancia en el proceso patogénico
Ballester <i>et al.</i> , 2011	Transcriptomic profiling of citrus fruit peel tissues reveals fundamental effects of phenylpropanoids and ethylene on induced resistance	Excluido	Bases de la resistencia a <i>P. digitatum</i> en Citrus
Zhang <i>et al.</i> , 2010	Optimised expression and spectral analysis of the target enzyme CYP51 from <i>Penicillium digitatum</i> with possible new DMI fungicides	Excluido	Bases moleculares de la resistencia de <i>P. digitatum</i> a un agente de control químico
Liu <i>et al.</i> , 2010	Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of silicon against <i>Penicillium digitatum</i>	Excluido	Bases moleculares de la respuesta de <i>P. digitatum</i> a agentes químicos/biológicos

Autor y año	Título	Incluido/Excluido	Tema
González-Candelas <i>et al.</i> , 2010	A transcriptomic approach highlights induction of secondary metabolism in citrus fruit in response to <i>Penicillium digitatum</i> infection	Excluido	Respuesta molecular de especies de cítricos ante la infección con <i>P. digitatum</i>
Zhao <i>et al.</i> , 2007	Expression and homology modeling of sterol 14alpha-demethylase from <i>Penicillium digitatum</i>	Excluido	Análisis de un gen/proteína de <i>P. digitatum</i>
Droby <i>et al.</i> , 2002	Induction of Resistance to <i>Penicillium digitatum</i> in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent <i>Candida oleophila</i>	Excluido	Agentes de biocontrol

Anexo 6

Información de los artículos incluidos en la selección de los genes de interés

Autor y año	Título	Genes	Estrategia	Conclusión
de Ramón-Carbonell y Sánchez-Torres, 2021a	<i>Penicillium digitatum</i> MFS transporters can display different roles during pathogen-fruit interaction	Major Facilitator Superfamily (MFS 2,3,4 y 5)	Generaron mutantes de delección (nulas, KO) y mutantes de sobreexpresión de 4 MSF individuales, analizando su capacidad infectiva y su resistencia a fungicidas.	PdMFS2 y PdMFS3 confieren resistencia a los fungicidas. Todos los MSFs (2-4) están implicados en la virulencia, excepto MSF5.
Yang et al., 2019	Study on the Infection Mechanism of <i>Penicillium digitatum</i> on Postharvest Citrus (<i>Citrus Reticulata</i> Blanco) Based on Transcriptomics.	Proteína transportadora de hierro (FEPT), enzima formadora de etileno (EFE), enzimas degradadoras de pared celular (CWDEs), catalasa (CAT), efectores con dominio LysM y proteínas inductoras de necrosis (NIP), entre otros.	Realizaron secuenciación del transcriptoma de tejidos de fruto de naranja infectados con <i>P. digitatum</i> a las 44h de la infección, y lo compararon con el de <i>P. digitatum</i> desarrollado en ausencia del fruto, para explorar el mecanismo de infección y los genes implicados en la virulencia.	Durante la infección de frutos de naranja, <i>P. digitatum</i> induce la expresión de genes para la síntesis de ácidos orgánicos, la degradación de la pared celular, la síntesis de etileno, el transporte de hierro, la síntesis de efectores de virulencia, y el bloqueo de la respuesta oxidativa del fruto.
Gandía et al., 2019a	The Myosin Motor Domain-Containing Chitin Synthases Are Involved in Cell Wall Integrity and Sensitivity to Antifungal Proteins in <i>Penicillium digitatum</i>	Quitina sintasas (ChsII y ChsV)	Generaron mutantes de delección (nulas, KO) chsII y chsV, y analizaron su fenotipo (crecimiento, producción de conidios, morfología del micelio, sensibilidad a proteínas antifúngicas y contenido de quitina), así como su virulencia.	En la mutante chsII se alteró el crecimiento y la morfología de los conidios, mientras que en chsV se observaron alteraciones severas en lo anterior y en el contenido de quitina, además de que disminuyó la virulencia.
de Ramón-Carbonell et al., 2019	PdMFS1 Transporter Contributes to <i>Penicillium digitatum</i> Fungicide Resistance and Fungal Virulence during Citrus Fruit Infection.	Major Facilitator Superfamily (MSF1)	Generaron mutantes de delección (nulas, KO) y mutantes de sobreexpresión de MSF1, analizando su capacidad infectiva y su resistencia a fungicidas.	Las mutantes nulas perdieron virulencia por baja incidencia de la infección, mientras las sobreexpresantes aumentaron su virulencia.
Gandía et al., 2019b	Differential roles, crosstalk and response to the Antifungal Protein AfpB in the three Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) pathways of the citrus postharvest pathogen <i>Penicillium digitatum</i>	Protein-cinasas activadas por mitógeno (Kss1/Fus3, Hog1 y Slt2/Mpk1)	Generaron mutantes de delección (nulas, KO) y de complementación para tres MAPKs. Analizaron a las mutantes fenotípicamente en términos de su tolerancia a estrés y resistencia a fungicidas, así como su sensibilidad a una proteína antifúngica y su capacidad infectiva.	Slt2/Mpk1 y Kss1/Fus3 están implicadas en la virulencia, mientras que Hog1 media la actividad de los fungicidas.
de Ramón-Carbonell y Sánchez-Torres, 2021b	Unveiling the Role Displayed by <i>Penicillium digitatum</i> PdMut3 Transcription Factor in Pathogen-Fruit Interaction	Factor de transcripción tipo Zn2Cys6 (PdMut3)	Generaron dos mutantes de delección (nulas, KO) de Mut3	La delección de Mut3 incrementó la virulencia de <i>P. digitatum</i> y no tuvo efecto en la resistencia a fungicidas.

Autor y año	Título	Genes	Estrategia	Conclusión
de Ramón-Carbonell y Sánchez-Torres, 2017a	Involvement of <i>Penicillium digitatum</i> PdSUT1 in fungicide sensitivity and virulence during citrus fruit infection	Transportador de sacarosa (PdSUT1)	Generaron mutantes de delección (nulas, KO) y de sobreexpresión de PdSUT1 y analizaron su virulencia y sensibilidad a fungicidas químicos, así como sus efectos en la expresión de genes relacionados con la resistencia.	Las líneas mutantes disminuyeron su virulencia pero mostraron mayor resistencia a tres de cuatro fungicidas. Las sobreexpresantes no aumentaron la severidad de la infección ni alteraron su sensibilidad a los fungicidas. Por lo tanto, la actividad de PdSUT1 sobre la virulencia es indirecta, y se relaciona más con la activación de transportadores MFS para la toma de carbohidratos.
Ma et al., 2016	The citrus postharvest pathogen <i>Penicillium digitatum</i> depends on the PdMpkB kinase for developmental and virulence functions	Protein-cinasa activada por mitógeno B (PdMpkB)	Generaron mutantes de delección (nulas, KO) y de complementación. Analizaron el crecimiento, tolerancia a estrés osmótico, capacidad infectiva y efectos transcriptómicos de la inactivación de PdMpkB.	PdMpkB es necesaria para el crecimiento y las rutas de señalización que contribuyen a la virulencia de <i>P. digitatum</i> .
Wang et al., 2016	Adenylyl cyclase is required for cAMP production, growth, conidial germination, and virulence in the citrus green mold pathogen <i>Penicillium digitatum</i>	Adenilil ciclasa (Pdac1)	Generaron mutantes de delección (nulas, KO) y analizaron el contenido de cAMP, el crecimiento y la virulencia.	Pdac1 es necesaria para el crecimiento del micelio, la germinación de conidios, la utilización efectiva de carbohidratos y la virulencia
Vilanova et al., 2016	Relevance of the transcription factor PdSte12 in <i>Penicillium digitatum</i> conidiation and virulence during citrus fruit infection	Factor de transcripción (PdSte12)	Generaron mutantes de delección (nulas, KO) de PdSte12	PdSte12 es necesario para el desarrollo de esporas y la virulencia de <i>P. digitatum</i> . Las mutantes redujeron su virulencia en términos de severidad, más que de la incidencia.
Wu et al., 2016	A novel major facilitator superfamily transporter in <i>Penicillium digitatum</i> (PdMFS2) is required for prochloraz resistance, conidiation and full virulence	Major Facilitator Superfamily (PdMFS2)	Generaron mutantes de delección (nulas, KO) de PdMFS2, y analizaron su crecimiento, resistencia a fungicidas y virulencia.	La delección de MFS2 incrementó la sensibilidad al fungicida procloraz y produjo disminución del crecimiento, la conidiación y la virulencia.

Autor y año	Título	Genes	Estrategia	Conclusión
Harries et al., 2015	The <i>Penicillium digitatum</i> protein O-mannosyltransferase Pmt2 is required for cell wall integrity, conidiogenesis, virulence and sensitivity to the antifungal peptide PAF26	O-manosil transferasa (Pmt2)	Generaron mutantes de delección (nulas, KO) y de sobreexpresión de Pmt2. Analizaron el crecimiento, la sensibilidad a péptidos, compuestos químicos antifúngicos y factores de estrés, así como su virulencia.	La delección de Pmt2 produjo alteraciones morfológicas coloniales, con estructuras microscópicas anormales, aumento de la resistencia a péptidos fungicidas y reducción de la virulencia.
López-Pérez et al., 2015	Identification and functional analysis of <i>Penicillium digitatum</i> genes putatively involved in virulence towards citrus fruit	Proteasas fúngicas (Endopeptidasa aspártica, tripeptidil peptinasa, aspergilopepsina, serinpeptidasa, carboxipeptidasa), Proteínas degradadoras de pared celular o CWDEs (endoglucanasa, poligalacturonasa 1 y 2, glucanasa, pectin liasa 1), proteínas de homeostasis redox (tioredoxina, superóxido dismutasa, naftaleno 1,2 dioxigenasa), proteínas de detoxificación (transportador ABC PMR4, transportador MFS, demetilasa Cyp51B)	Realizaron hibridación sustractiva y macroarreglos para identificar genes inducidos durante la infección en <i>P. digitatum</i> . Además generaron mutantes knockout de una pectina liasa (Pnl1) y naftaleno dioxigenasa (Ndo1) para analizar su virulencia.	<i>P. digitatum</i> induce una variedad de genes durante la infección, que están involucrados en la proteólisis, la degradación de pared celular, la homeostasis redox y la detoxificación. La delección de Ndo1 no tiene efectos sobre la virulencia, a diferencia de Pnl1, que presenta la disminución de su virulencia.
Liu et al., 2015	A novel sterol regulatory element-binding protein gene (<i>sreA</i>) identified in <i>Penicillium digitatum</i> is required for prochloraz resistance, full virulence and <i>erg11</i> (<i>cyp51</i>) regulation.	Proteína de unión al elemento regulador de esterol (<i>sreA</i>)	Se generaron mutantes de disrupción (nulas, KO) del gen <i>sreA</i> y de complementación. Se analizó su crecimiento, resistencia a fungicidas y virulencia.	La delección de <i>sreA</i> disminuyó la resistencia de <i>P. digitatum</i> al fungicida prochloraz y la virulencia. Ambas características se restauraron en la mutante de complementación.

Autor y año	Título	Genes	Estrategia	Conclusión
Wang et al., 2014a	Os2 MAP kinase-mediated osmotic stress tolerance in <i>Penicillium digitatum</i> is associated with its positive regulation on glycerol synthesis and negative regulation on ergosterol synthesis	Protein-quinasa activada por mitógeno Hog1 (PdOs2)	Generaron mutantes de delección (nulas, KO) y de complementación para PdOs2. Se caracterizó el crecimiento de estas mutantes en medios con NaCl y otros agentes de estrés, así como en ensayos de infección de frutos de naranja, medición de ergosterol y glicerol y el análisis de expresión de los genes implicados en la síntesis de ergosterol.	Se determinó que PdOs2 (Hog1) está involucrado en la tolerancia a estrés osmótico y la resistencia a fungicidas. Además, PdOs2 contribuye a la integridad de la pared celular y se requiere para la virulencia de <i>P. digitatum</i> .
Zhang et al., 2013	PdSNF1, a sucrose non-fermenting protein kinase gene, is required for <i>Penicillium digitatum</i> conidiation and virulence	Proteín quinasa no fermentadora de sacarosa (SNF1)	Generaron mutantes de delección (nulas, KO) de SNF1 y caracterizaron su crecimiento en diferentes fuentes de carbono como sacarosa, etanol, glicerol, pectina, or poligalacturonicpectina y ácido polgalacturónico, así como su virulencia y los niveles de expresión de genes de degradación de pared celular.	La delección de SNF1 produjo alteraciones en la conidiación y en la estructura de los conidióforos. Se sugiere que SNF1 actúa para la adaptación de <i>P. digitatum</i> a diferentes fuentes de carbono, y que su papel en la virulencia es promoviendo la inducción de genes de degradación de pared celular.
Gandía et al., 2012	Identification and characterization of chitin synthase genes in the postharvest citrus fruit pathogen <i>Penicillium digitatum</i>	Quitina sintasas (PdCHSI, II, III, V y VII)	Aislaron y caracterizaron 5 genes quitina sintasa de <i>P. digitatum</i> . Analizaron su expresión durante el crecimiento axénico de micelio, bajo condiciones de estrés oxidativo y osmótico y durante la infección de frutos de naranja.	La expresión de CHSI, II, V y VII se indujo durante la infección de frutos.