



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Evaluación de un biofungicida a base de RNAi para el control de hongos fitopatógenos, mediante Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS)

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOSÉ EDUARDO RAMÍREZ HERNÁNDEZ

Director de Tesis

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, 2022.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP-MB/2022/136
ASUNTO	Jurado de examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 24 de octubre de 2022

C. JOSÉ EDUARDO RAMÍREZ HERNÁNDEZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de **Maestro en Biotecnología** estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Miguel Angel Peña Rico	Presidente	Universidad del Papaloapan
Dr. Edgar Garcia López	Secretario	Catedras CONACYT- Universidad del Papaloapan
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	Vocal	Universidad del Papaloapan
Dr. Edgar Baldemar Sepulveda Garcia	Suplente I	Universidad del Papaloapan
Dr. Enrique Villalobos Amador	Suplente II	Universidad del Papaloapan

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

*Dei terra uberrima, mens aperta
Cou Lo-tama, chí jí jú*

DIVISIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES CAMPUS TUXTEPEC

Dr. José Abad Zavaleta
 Jefe de la División de Estudios de Posgrado



M. en C. Héctor López Arjona
 Vice-Rector Académico
 Vo. Bo.



C.c.p. C. José Eduardo Ramirez Hernández – Estudiante
 C.c.p. Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa – Directora de tesis y Coordinadora de la Maestría en Biotecnología
 C.c.p. M.E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares
 C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
 C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
 C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
 Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
 Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
 C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
 Tel. 01(281)8729230

Recibido

24/10/22



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP-MBU/2022/135
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 24 de octubre de 2022

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del **C. José Eduardo Ramírez Hernández**, con número de **Matrícula 19140006**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **"Evaluación de un biofungicida a base de RNAi para el control de hongos fitopatógenos, mediante Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS)"**, para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Agradezco su atención y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.



Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama. chi ji jú

Dr. José Abad Zavaleta

Jefe de la División de Estudios de Posgrado



Recibí 24/10/22
Blanca Estela Barrera F.

- C.c.p. C. José Eduardo Ramírez Hernández – Estudiante
- C.c.p. Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa – Directora de tesis y Coordinadora de la Maestría en Biotecnología
- C.c.p. M.E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares
- C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

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.

El sustentante, José Eduardo Ramírez Hernández, contó con Beca CONACYT para estudios de maestría, asignada al programa de Maestría en Biotecnología (PNPC 003131).

Los resultados de este trabajo se presentaron en modalidad de charla corta en el XIX Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, y el XII Simposio Mexico-USA/2nd ASPB Mexico Section, celebrado de forma virtual del 8 al 11 de noviembre de 2021.

Ramírez-Hernández, J.E., Santiago-Tapia, L.B., López-Morales, M., Peña-Castro, J.M., Barrera-Figueroa, B.E. (2021). *In vitro* assessment of dsRNAs as biofungicides against pathogens of pineapple, orange and cacao.

Como actividad de retribución social, parte de los resultados de este trabajo se plasmaron en el documento titulado:

INFORME TÉCNICO

“Identificación morfológica y molecular de hongos de frutos de *Theobroma cacao*”, entregado en el mes de marzo de 2022 a la organización comunitaria de productores de cacao de Valle Nacional “Red Cacao del Norte S.P.R. de R.I.”

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores y comité asignado por apoyarme en este proyecto, en especial a mi directora, Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa por darme la oportunidad de trabajar en su proyecto de investigación y por el apoyo brindado a mi persona y a la elaboración de este importante trabajo.

A la Universidad del Papaloapan por permitirme ser parte de la educación que brinda.

Al CONACYT, su ayuda fue vital para poder hacer esta tesis.

Gracias a mis compañeros de maestría y de laboratorio por los momentos compartidos y también para aquellos que directa o indirectamente han contribuido en mi desarrollo profesional.

¡Gracias a todos!

DEDICATORIA

A Dios por permitirme el privilegio de estar vivo y de disfrutar los momentos que la vida nos regala.

Esta tesis la dedico con toda mi admiración y respeto a mi hermano Fernando Moisés por ser el pilar que me ha sostenido en todo momento, cuando pensaba retroceder siempre estuvo a mi lado apoyándome, hermano esta tesis es por ti, sin tu apoyo nada hubiese sido posible, eres mi mayor inspiración y orgullo, hemos pasado momentos difíciles en el cual forjamos las bases de responsabilidad y deseos de superación, tus virtudes y tu gran corazón son infinitas. Gracias por creer y confiar en mí.

A mis padres; por enseñarme los valores de la vida, que me ha ayudado a seguir adelante con mis proyectos, Madre; gracias por enseñarme a superar los obstáculos que hemos pasado, por los consejos y todo el amor que nos tienes.

A mi esposa; gracias Moris por estar conmigo, por el amor tan inmenso que me brindas, por compartir nuestros sueños, este es uno de tantos que haremos realidad, TE AMO PRECIOSA.

A mis hermanitos, y familia, por compartir parte de su vida conmigo, he aprendido y seguiré aprendiendo de ustedes, gracias por el apoyo que me han brindado, y por poner un granito de arena en cada paso que he dado, los quiero y aprecio mucho.

ÍNDICE

Indice de Figuras.....	iii
Indice de tablas	vi
Lista de abreviaturas y símbolos.....	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 La agricultura en el Mundo	10
1.2 La agricultura en México.....	11
1.3 Problemáticas en la agricultura mexicana	13
1.4 Impacto de las enfermedades en la agricultura.....	14
1.5 Principales enfermedades causadas por hongos fitopatógenos	15
1.6 Estrategias de control de hongos fitopatógenos	17
1.7 Problemática en las estrategias de control.....	19
1.8 Nuevas tecnologías en la estrategia de control de fitopatógenos	21
1.9 Uso de RNAi como biofungicida	22
1.9.1 Tecnología HIGS	25
1.9.2 Tecnología SIGS.....	27
1.10 Importancia y función de los genes DCL	31
2. JUSTIFICACIÓN	33
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo general.....	34
4.2 Objetivos Específicos	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1 Material Biológico.....	35
5.2 Aislamiento de hongos fitopatógenos	35
5.3 Identificación morfológica de hongos	36
5.4 Identificación molecular de hongos.....	36
5.4.1 Extracción de DNA.....	37
5.4.2 Amplificación y análisis del ITS	38
5.5 Identificación de DCLs en los patosistemas de interés	40
5.6 Diseño de RNAi	41
5.6.1 Alineamiento de DCLs planta-patógeno y diseño de oligonucleótidos.....	41
5.6.2 Amplificación de DCLs	41
5.6.3 Fusión de DCLs y adición de la secuencia del promotor T7	42
5.7 Clonación de las construcciones DCL.....	45
5.7.1 Ligación de las construcciones en el vector pGEM-T easy y transformación de células de <i>E. coli</i>	45

5.7.2 Extracción y purificación de plásmido	46
5.8 Síntesis de RNAi	47
5.9 Bioensayos de germinación de esporas <i>in vitro</i>	49
5.9.1 Ensayos preliminares para el conteo de esporas	49
5.9.2 Bioensayos de inhibición de la viabilidad de esporas.....	50
5.10 Análisis de expresión para validar el silenciamiento de DCLs	51
5.10.1 Bioensayos en medio líquido	51
5.10.2 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA.....	51
5.10.3 Análisis de expresión por PCR cuantitativa	52
5.11 Análisis estadístico	55
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
6.1 Búsqueda de sitios para la colecta de materiales.....	56
6.2 Resultados de la búsqueda de plantas con signos de enfermedad fúngica en los campos seleccionados.....	58
6.3 Aislamiento de hongos fitopatógenos	59
6.4 Identificación morfológica	60
6.5 Identificación molecular	62
6.5.1 Extracción de DNA genómico y amplificación de la región ITS	62
6.5.2 Resultados de secuenciación, identificación y análisis filogenético.....	66
6.6 Identificación de genes Dicer-like (DCL) en los hongos seleccionados	70
6.7 Localización de dominios y alineamiento de DCLs	72
6.8 Diseño de construcciones para la producción del RNAi	74
6.9 Generación de construcciones para la producción de RNAi	83
6.9.1 Escrutinio de plásmidos	86
6.9.2 Secuenciación y análisis de las construcciones	88
6.10 Producción del biofungicida de RNAi	91
6.11 Ensayos de actividad fungicida	92
6.11.1 Condiciones para el crecimiento de <i>P. digitatum</i>	92
6.11.2 Conteo de esporas de <i>P. digitatum</i>	93
6.11.3 Inhibición de la viabilidad de esporas.....	94
6.12 Ensayo de silenciamiento de la expresión de DCL	101
6.13 Ensayos <i>in vivo</i> preliminares	108
7. CONCLUSIONES	110
8. PERSPECTIVAS	111
9. BIBLIOGRAFÍA	112
10. ANEXOS	119
Anexo I	119
Anexo II.....	120
Anexo III	127

Anexo IV	150
Anexo V.....	171
Anexo VI	175
Anexo VII.....	176

Índice de Figuras

Figura 1. Porcentaje de productos exportados al extranjero en Febrero 2020.....	12
Figura 2. Síntomas externos e internos de la Moniliasis en el cacao.....	16
Figura 3. Uso de plaguicidas en México desde el año 1990 al 2017.....	20
Figura 4. Los 10 países con mayor consumo de fungicidas y bactericidas del año 1990 al 2017.....	20
Figura 5. Representación del complejo de silenciamiento génico inducido por RNAi (RISC).	23
Figura 6. Papel bidireccional del RNAi en la interacción planta-patógeno.....	24
Figura 7. Protección conferida a hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> a través de HIGS	26
Figura 8. Fundamento de la estrategia SIGS	28
Figura 9. Efectividad de la estrategia SIGS en la protección de frutos, flores y vegetales.	29
Figura 10. Conservación estructural y funcional de proteínas DCL en diversos organismos.	31
Figura 11. Región seleccionada para la amplificación de la región ITS.	38
Figura 12. Procedimiento para la obtención de las fusiones de DCLs en los hongos,	44
Figura 13. Localización e imágenes del campo productor de cacao en el que se realizó la detección y recolección de ejemplares de frutos con síntomas de infección fúngica.	56
Figura 14. Localización e imágenes del campo piñero en el que se realizó la detección y recolección de ejemplares con síntomas de infección fúngica.....	57
Figura 15. Lesiones seleccionadas para el aislamiento de los hongos fitopatógenos en cacao.	58
Figura 16. Lesiones en plantas de piña seleccionadas para siembra en medio sólido.....	59
Figura 17. Característica de crecimiento arrosetado y coraloide de la cepa HP3.....	61
Figura 18. Estructuras de la cepa HP3 aislada de cultivo de piña.	61
Figura 19. DNA genómico extraído de los cultivos puros de hongos aislados de frutos de cacao (A y B), y de plantas de piña (C).	63
Figura 20. Productos de amplificación de la región ITS mediante PCR a partir de DNA _g de aislamientos de frutos de cacao (A y B) y de plantas de piña (C).	64
Figura 21. Ejemplo de la calidad general de la secuenciación.	66
Figura 22. Árbol filogenético realizado con la región ITS del hongo identificado como <i>Phytophthora tropicalis</i>	68
Figura 23. Árbol filogenético realizado con la región ITS del hongo identificado como <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	68

Figura 24. Árbol filogenético realizado con la región ITS del hongo identificado como <i>Phytophthora nicotianae</i>	69
Figura 25. Árbol filogenético realizado con la región ITS del hongo identificado como <i>Fusarium oxysporum</i>	69
Figura 26. Estructura y localización de dominios de DCLs en los patosistemas de cacao.....	72
Figura 27. Estructura y localización de dominios de DCLs en los patosistemas de piña.....	73
Figura 28. Estructura y localización de dominios de DCLs en el patosistema <i>Citrus sinensis:Penicillium digitatum</i>	74
Figura 29. Región para el diseño de RNAi en <i>Phytophthora nicotianae</i>	76
Figura 30. Región para el diseño de RNAi en DCL1 de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	77
Figura 31. Región para el diseño de RNAi en DCL2 de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	78
Figura 32. Región para el diseño de RNAi en <i>Phytophthora nicotianae</i>	79
Figura 33. Región para el diseño de RNAi en DCL1 de <i>Fusarium oxysporum</i>	80
Figura 34. Región para el diseño de RNAi en DCL2 de <i>Fusarium oxysporum</i>	81
Figura 35. Regiones para el diseño de RNAi en DCL1 y DCL2 de <i>Penicillium digitatum</i>	82
Figura 36. Electroforesis de productos de PCR obtenidos de amplificar la región seleccionada en <i>Phytophthora nicotianae</i> para la síntesis de RNAi.....	83
Figura 37. Electroforesis de productos de PCR de amplificación de las regiones seleccionadas en <i>Lasiodiplodia theobromae</i> para la síntesis de RNAi	84
Figura 38. Electroforesis de productos de PCR de amplificación de las regiones seleccionadas en <i>Fusarium oxysporum</i> para la síntesis de RNAi	85
Figura 39. Crecimiento de colonias blancas (transformadas) y azules (no transformadas, círculo amarillo) en medio LB suplementado con ampicilina.	86
Figura 40. Amplificación de regiones esperadas de 414 pb a partir de los plásmidos extraídos de las colonias transformadas con el inserto de interés de <i>P. nicotianae</i>	87
Figura 41. Amplificación de regiones esperadas de 676 pb en los plásmidos extraídos de las colonias transformadas con el inserto de interés de <i>L. theobromae</i>	87
Figura 42. Amplificación de regiones esperadas de 659 pb en los plásmidos extraídos de las colonias transformadas con el inserto de interés de <i>F. oxysporum</i>	88
Figura 43. Análisis de secuencia de la construcción para la síntesis de RNAi de <i>Phytophthora nicotianae</i>	89
Figura 44. Análisis de secuencia de la construcción para la síntesis de RNAi de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	90
Figura 45. Análisis de secuencia de la construcción para la síntesis de RNAi de <i>Fusarium oxysporum</i>	90
Figura 46. Electroforesis de agarosa a 2 % de los productos de la síntesis de RNAs de doble cadena	92
Figura 47. Conteo de esporas a diferentes diluciones.....	93

Figura 48. Densidad de esporas germinadas de <i>Penicillium digitatum</i> a diferentes concentraciones de siembra.....	94
Figura 49. Diferencia de medias de germinación de esporas por tipo de RNA utilizado en los tratamientos ($p < 0.05$).....	96
Figura 50. Efecto de la concentración de RNAi en la germinación de esporas.....	98
Figura 51. Representación gráfica del efecto inhibitorio de ldsRNAs y sdsRNAs sobre la germinación de esporas <i>in vitro</i>	100
Figura 52. Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1%, de RNA total obtenido de las muestras para los análisis de expresión de DCLs.	102
Figura 53. Gel de agarosa al 1% que demuestra la ausencia de contaminación de DNA genómico en las extracciones de RNA.....	102
Figura 54. Curva de normalización de fluorescencia (ΔR_n) con respecto a número de ciclos durante la amplificación por PCR.....	103
Figura 55. Cuantificación relativa (RQ) de la amplificación de DCL2 en las diluciones seriales de cDNA.....	103
Figura 56. Curvas de disociación (melting) de la amplificación	104
Figura 57. Expresión relativa de los genes DCL1 y DCL2 en el crecimiento micelial de <i>P. digitatum in vitro</i> en caldo PDA (Papa-Dextrosa)	106
Figura 58. Resultados de ER de DCLs mediante qPCR.	108
Figura 59. Ensayos preliminares de actividad <i>in vivo</i> del biofungicida de sdsRNAs sobre <i>P. digitatum</i> inoculado en la superficie de frutos de naranja.....	109

Indice de tablas

Tabla 1. Pérdidas causadas por factores adversos en el sector agrícola y ganadero (FAO, 2019). ...	14
Tabla 2. Pérdidas económicas causadas por enfermedades en cultivos en los diferentes continentes (FAO, 2019).....	15
Tabla 3. Hongos fitopatógenos y algunos ejemplos de genes objetivo en los que se ha probado la efectividad de SIGS.	30
Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.	38
Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR.....	39
Tabla 6. Condiciones de ciclado para la amplificación de ITS.....	39
Tabla 7. Oligonucleótidos específicos para la amplificación de DCLs fúngicos.	42
Tabla 8. Oligonucleótidos para la fusión de DCLs fúngicos y la adición de T7.	43
Tabla 9. Condiciones de ciclado para la amplificación de DCL + T7.....	44
Tabla 10. Componentes de la mezcla de ligación en el vector pGEM-T Easy.....	45
Tabla 11. Preparación de las reacciones de síntesis de RNAi	47
Tabla 12. Preparación de reacciones de digestión de DNA y de RNA pequeño de cadena sencilla. 48	
Tabla 13. Preparación de reacciones de digestión con RNasa III.....	49
Tabla 15. Componentes de la mezcla de reacción para la qPCR.....	53
Tabla 14. Aislamientos presuntamente distintos, obtenidos a partir de tejidos de cacao y piña. ...	60
Tabla 15. Aislamientos de hongos seleccionados para identificación con el marcador ITS.	65
Tabla 16. Número de registros de secuencias de ADN o proteínas DICER en las bases de datos NCBI, Uniprot, Phytozome, EnsemblPlant/EnsembleFungi y FunRNA de los organismos en estudio.....	71
Tabla 17. Secuencias DICER únicas en los organismos bajo estudio y su anotación.	71
Tabla 18. Efecto de los RNAs largos (lcrRNAs) en la germinación de esporas de <i>P. digitatum</i>	95
Tabla 19. Efecto de los RNAs cortos (scRNAs) en la germinación de esporas de <i>P. digitatum</i>	95

Lista de abreviaturas y símbolos

μL: micro litro

ng: nano gramo

AGO: Proteína Argonauta

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

RNA o ARN: Ácido Ribonucleico

RNAi o ARNi: Ácido Ribonucleico de interferencia.

CINVESTAV: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

CPYPSI: Citocromo P450 lanosterol C-α desmetilasa

DCL: Proteína Dicer-like

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

HIGS: Silenciamiento Génico Inducido por el Huésped

ITS: Espaciadores Internos Transcritos (marcador molecular)

LANGEBIO: Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad

miRNAs: micro RNAs

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

OGM: Organismos Genéticamente Modificados

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDA: Agar Papa Dextrosa

PTGS: Silenciamiento Génico Postranscripcional

SAGARPA: Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación

SIGS: Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión

siRNAs: Pequeños RNAs de interferencia

sRNAs: Pequeños RNAs

TGS: Silenciamiento Génico Transcrip

RESUMEN

México es uno de los principales países exportadores de frutos tropicales a nivel mundial, sin embargo, en los últimos años la producción de estos cultivos se ha visto afectado por una diversidad de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos que impactan en diferentes etapas de la cadena productiva provocando pérdidas considerables. Por este motivo existe la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías para el control de hongos fitopatógenos que sean eficientes, amigables con el ambiente y libres de efectos adversos para la salud humana.

Partiendo del conocimiento de la comunicación mediada por RNA de doble cadena (dsRNA) entre plantas y hongos, se han desarrollado nuevas estrategias para el control de patógenos fúngicos que involucran el uso de dsRNA (RNAi) para inducir el silenciamiento de genes de patógenos y ejercer un efecto fungicida.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de biofungicidas basados en dsRNA para la protección de cultivos tropicales como piña, naranja y cacao. Para ello, se aislaron hongos patógenos directamente de plantaciones de piña y cacao en el área de Loma Bonita y Valle Nacional, Oaxaca, respectivamente, y naranjas en etapa de poscosecha en mercados locales. El análisis microscópico y molecular mediante secuenciación de la región ITS identificó a los patógenos como *Phytophthora nicotianae* y *Fusarium oxysporum* (piña), *Phytophthora tropicalis* y *Lasiodiplodia theobromae* (cacao) y *Penicillium digitatum* (naranja).

Las secuencias de genes similares a DICER (DCL) en estos patógenos se buscaron en las bases de datos y se seleccionaron regiones de 250-500 pb para elaborar construcciones flanqueadas por la secuencia del promotor T7, mismas que se emplearon como molde para la síntesis de dsRNA o RNAi. Los ensayos *in vitro* mostraron que una combinación de dsRNA cortos derivados de DCL1-DCL2 inhiben la germinación de esporas de *P. digitatum* hasta en un 80% en comparación con los controles sin dsRNAs. Así mismo, mediante qPCR se verificó el silenciamiento de los genes DCLs de *P. digitatum* en donde se encontró una disminución en la expresión relativa (ER) del gen DCL1 en 1.37 veces (27.2%) y de DCL2 en 1.44 veces (30%) con respecto al control, lo cual muestra que efectivamente el uso dsRNA tiene un efecto en la expresión de los genes DCLs. Por lo anterior, los resultados obtenidos representan un punto de partida para futuras exploraciones en el diseño de biofungicidas a base de dsRNAs para la protección de cultivos tropicales.

ABSTRACT

Mexico is one of the main exporter countries of tropical fruits worldwide, however, in the last years the production of these crops has been impacted by a variety of diseases caused by plant pathogens that affect at different levels of the productive chain, causing dramatic losses in this sector. For this reason, there is the need to develop new technologies for the control of plant pathogens, which should be efficient, environment friendly and without adverse effects for human health.

On the basis of knowledge about cross-kingdom interaction mediated by double-stranded RNA (dsRNA) between plants and fungal pathogens, new approaches have been developed for the control of fungal pathogens that involve the use of dsRNAs (RNAi) directed to induce gene silencing in pathogens, and thus acting as biofungicides.

The aim of this work was to evaluate the effect of biofungicides based on dsRNAs for the protection of tropical crops such as pineapple, orange and cacao. For this, plant pathogens were isolated directly from pineapple and cacao plantations in the area of Loma Bonita and Valle Nacional, Oaxaca, respectively, and from orange fruits in postharvest stage in the local markets. Microscopical and molecular analysis via ITS region sequencing identified the pathogens isolated from the samples as *Phytophthora nicotianae* and *Fusarium oxysporum* (pineapple), *Phytophthora tropicalis* and *Lasiodiplodia theobromae* (cacao), and *Penicillium digitatum* (orange).

The respective DCL (Dicer-like) gene sequences of these pathogens were searched in the databases and regions of 250-500 pb were selected, flanked with the T7 promoter sequence and cloned to be used as template for the synthesis of dsRNA (RNAi). *In vitro* assays showed that a combination of short dsRNAs (sdsRNAs) derived from DCL1 and DCL2 were able to inhibit spore germination of *P. digitatum* in up to 80% in comparison with non-dsRNAs controls. Moreover, quantitative PCR demonstrated the silencing of DCL genes in the pathogen, with a 1.37 (27.2%) and DCL2 with a 1.44 fold change (30%) in comparison to controls, which demonstrates that dsRNAs have an effect in the expression of DCL genes. Based on these results, this work represents a start point to further explore the design of dsRNA-RNA based biofungicidas for the protection of tropical crops.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La agricultura en el Mundo

La agricultura es una actividad económica necesaria para el desarrollo de la humanidad, ya que es básica para la producción de alimentos. Aunque a finales del siglo XX y en la primera década del siglo XXI a nivel mundial se produjeron alimentos para alimentar a cerca de siete mil millones de habitantes, aún existe desabasto alimenticio. Por ejemplo, en los países en desarrollo, seis de cada diez personas siguen padeciendo hambre crónica. A finales del 2010 a nivel mundial se estimó que cerca de 925 millones de personas vivían en condiciones de desnutrición, donde el 98 % pertenecían a países en desarrollo, por lo que la seguridad alimentaria es el primer desafío en la agricultura para la producción de alimentos (Sonnino y Ruane, 2013).

Por otra parte, la producción de alimentos, además de ser insuficiente para diversos sectores de la población mundial, enfrenta retos por el cambio climático. Las condiciones ambientales adversas impactan negativamente el crecimiento y la productividad de las plantas. Por esta razón, el segundo desafío en la agricultura son las problemáticas causadas por el cambio climático, que tienen consecuencias directas al alterar la frecuencia con la que ocurren los fenómenos meteorológicos extremos, alterando las modalidades de la producción agrícola, así como los patrones de distribución de plagas y enfermedades que amenazan los cultivos. Se estima que los efectos globales de estos fenómenos en la agricultura serán cada vez más negativos, especialmente en las regiones vulnerables como los países en desarrollo (Sonnino y Ruane, 2013; FAO, 2016).

Adicionalmente, el crecimiento de la población ha incrementado las demandas de urbanización, ocupando áreas de vegetación y tierras cultivables. Este hecho agudiza el problema del desabasto de alimentos para una población creciente que requiere áreas para la agricultura. El abandono del campo debido a pérdidas en los cultivos agudiza el problema. La FAO y la OECD prevén que la población mundial aumentará, de los 7,300 millones de habitantes actuales, a 9,800 para el 2050, y que la mayor parte de este incremento tendrá

lugar en regiones en desarrollo. Por lo tanto, se necesitará ampliar la producción de alimentos en un 50% más para abastecer la demanda (OECD, 2012; FAO, 2017). Esto plantea la necesidad de asegurar la producción de alimentos para los países en desarrollo, a través de la intensificación de la agricultura y de nuevas estrategias para contrarrestar el efecto de factores ambientales adversos.

1.2 La agricultura en México

En México, la historia de la alimentación está estrechamente relacionada con la agricultura. Los primeros alimentos mexicanos de que se tiene información son el maíz, la calabaza, el chile y el jitomate, siendo estos los primeros alimentos producidos ya que crecían de manera silvestre, y por ser tolerantes a las condiciones ambientales propias del país (Osorio, 2014). México cuenta con un territorio de 198 millones de hectáreas, de las cuales el 73.2 % (145 millones Ha) son destinadas a la actividad agropecuaria. Del total del sector, aproximadamente 20.7 % (27.8 millones de Ha) son tierras de cultivo. Del 100% de hectáreas destinadas al cultivo solo 20 y 25 millones de hectáreas por año se destinan para esta actividad (Osorio, 2014).

A diferencia de otros países, México cuenta con una gran variedad de condiciones climáticas que le permiten cultivar cerca de 264 especies vegetales. Gracias a esto, la alimentación de los mexicanos se basa en productos de origen vegetal, en donde el maíz, el frijol, el chile, el jitomate y la calabaza constituyen la base de la dieta. En nuestro país, 202 diferentes especies vegetales se destinan para fines alimentarios y se cultivan ocupando el 65% del área agrícola. Entre estas especies se encuentran el maíz y el frijol, que cubren el 44% del área cultivada. Las especies vegetales forrajeras ocupan 21% de las áreas de cultivo. Por otra parte, el área cultivada de leguminosas cubre una superficie relativamente pequeña de 0.67 millones de hectáreas (Sosa y Ruiz, 2017).

Además, México se ha posicionado como el primer exportador de frutos tropicales y el cuarto exportador mundial de frutas y hortalizas, con 5.8 millones de toneladas de productos agrícolas, cifra que es solo superada por Holanda, España y China (Sosa y Ruiz, 2017). En

2018, la OEC (Observatorio de Complejidad Económica, por sus siglas en inglés) estimó que para febrero de 2020, los productos vegetales producidos en el país y exportados al extranjero, principalmente a Estados Unidos, estuvieron encabezados por vegetales variados, con un 23.9%, seguidos por un 15.6 % de tomate y 14.8% para frutos tropicales, siendo así los frutos tropicales uno de los tres productos mayormente exportados al extranjero (Fig. 1).

Otros vegetales 23.9%	Otros frutos 12.6%		Pepinos 4.7%	
	Otras nueces 9.13%	Vegetales congelados 3.83%	Coles 3.64%	
	Cítricos 2.89%	Melones 1.71%	Fruta congelada 1.43%	Plátano 1.11%
Jitomate 15.6%	Cebollas 2.7%	Café 1.1%		
Frutos tropicales 14.8%	Lechugas 2.0%			

Figura 1. Porcentaje de productos exportados al extranjero en Febrero 2020, principalmente a Estados Unidos, China, Alemania y Japón (modificada de OEC, 2020).

La creciente demanda de alimentos en México se relaciona estrechamente con el aumento poblacional de las últimas décadas. Por ejemplo, de 1980 a 2015, la población pasó de 66.8 a los 119.5 millones de habitantes, es decir, se duplicó. Sin embargo, en el mismo periodo, la superficie agrícola creció tan solo 22%, pasando de 17.99 millones a solo 22.2 millones de Ha sembradas. Para agravar este panorama, se ha predicho que la población se extenderá a 140 millones de habitantes para el año 2050, y que la tierra agrícola disponible podría disminuir, lo que hace inminente la necesidad de implementar nuevas tecnologías para aumentar la producción de alimentos a niveles suficientes para abastecer a la población (CONAPO, 2012; Sosa y Ruiz, 2017).

1.3 Problemáticas en la agricultura mexicana

Según la SAGARPA (2017), en México las principales problemáticas a los que se enfrenta la agricultura son diversas, e incluyen la falta de apoyos para los productores, los altos costos de insumos y servicios, las pérdidas por cuestiones climáticas, plagas y enfermedades, la falta de capacitación y asistencia técnica, la pérdida de la fertilidad del suelo, la infraestructura insuficiente para la producción, la dificultad para la comercialización y la falta de organización para la producción, entre otras.

La FAO (2019) y el CIMMYT (2020) puntualizan las problemáticas ocasionadas por el cambio climático, y enfatizan que éste tendrá impactos directos sobre los componentes del ciclo hidrológico, los cuales son fundamentales en la agricultura. Se predice que la alteración de la evapotranspiración y la precipitación aumentará las demandas de riego y tendrá efectos sobre la distribución de las plagas y el establecimiento de enfermedades dentro de los cultivos. El cambio climático afectará el tamaño de las poblaciones, tasa de supervivencia y la distribución geográfica de plagas, así mismo, provocará la intensidad, desarrollo y distribución geográfica de enfermedades.

En específico, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Fitosanitaria (SINAVEF), enfatiza el hecho de que la sequía prolongada y el aumento constante de la temperatura favorecerá de manera general el desarrollo de especies invasoras de plagas y de organismos patógenos, lo que provocará la aparición de nuevas enfermedades en los cultivos (FAO, 2014; SAGARPA, 2017). A partir de 1960 se tienen registros de que las plagas, y en mayor medida las enfermedades de los cultivos de alto interés comercial, se han estado moviendo en promedio 3 Km al año del ecuador con dirección hacia los polos a medida que aumenta la temperatura (CIMMYT, 2020), cubriendo territorios que no estaban colonizados y provocando pérdidas en la producción agrícola, lo cual es preocupante para la agricultura mexicana.

1.4 Impacto de las enfermedades en la agricultura

En la agricultura a nivel mundial y en México, los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades tanto de pre- como de poscosecha en los cultivos de interés económico, como hortalizas, cereales y frutas, siendo responsables de pérdidas económicas en la producción asociadas directamente a su efecto negativo sobre el desarrollo de las plantas a las que parasitan (Juárez-Becerra *et al.*, 2010). Por tal razón, las enfermedades de plantas de cultivo se consideran como uno de los más grandes obstáculos a vencer para garantizar la seguridad alimentaria a nivel global (Velásquez *et al.*, 2018).

En 2019, la FAO estimó las pérdidas causadas en la producción agrícola y ganadera por diferentes tipos factores, donde las pérdidas ocasionadas por desastres biológicos, incluidas las enfermedades, oscilaron entre los 9,500 millones de dólares (Tabla 1).

Tabla 1. Pérdidas causadas por factores adversos en el sector agrícola y ganadero (FAO, 2019).

Evento adverso	Pérdidas entre 2005 y 2015
Sequía	29 000 millones de dólares
Inundaciones	19 000 millones de dólares
Terremotos / desprendimientos de tierra / movimientos del terreno	10 500 millones de dólares
Otros desastres meteorológicos, como temperaturas extremas y tormentas	26 500 millones de dólares
Desastres biológicos, como enfermedades e infestaciones	9 500 millones de dólares
Incendios forestales	1 000 millones de dólares

Los patógenos causantes de las enfermedades son principalmente virus, nemátodos, fitoplasmas, viroides, bacterias y hongos; sin embargo, son los hongos los que con mayor frecuencia causan deterioro patológico en frutas, hojas, tallos y productos subterráneos (raíces, tubérculos, cormos etc.). Se ha estimado que dichas pérdidas oscilan entre 5-25 % en países en desarrollo y el 20 al 50% en vías de desarrollo como lo es México (Rodríguez, 2001; Juárez-Becerra *et al.*, 2010). En la Tabla 2 se muestran los continentes más afectados por enfermedades de cultivos y el monto de sus pérdidas económicas.

Tabla 2. Pérdidas económicas causadas por enfermedades en cultivos en los diferentes continentes (FAO, 2019).

Continente	Pérdidas económicas entre 2005 y 2015
Asia	48 000 millones de dólares
África	26 000 millones de dólares
América Latina y el Caribe	22 000 millones de dólares

En 2017, en México se estimó una pérdida del 44% de las unidades de producción por causas biológicas; 40 % fue por plagas en interacción con enfermedades y 21 % correspondió estrictamente a enfermedades. Así mismo, en ese año se evidenció el incremento del monitoreo de presencia de plagas y enfermedades en las unidades de producción en el país, con el objetivo de detectar a tiempo los agentes patógenos y poder desarrollar acciones pertinentes para su control (INEGI, 2018).

1.5 Principales enfermedades causadas por hongos fitopatógenos

Existe una gran gama de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos que pueden tener efectos económicos, ecológicos y sociales devastadores. A nivel global se reconoce la importancia de hongos patógenos de mayor importancia científica y económica. En orden de importancia, estos patógenos son: *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Puccinia spp.*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Colletotrichum spp*, *Ustilago maydis* y *Melampsora lini* y especies de los géneros *Alternaria*, *Phytophthora*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Rhizopus* y *Mucor* (Rulfo *et al.*, 2007; Dean *et al.*, 2012).

Las principales enfermedades causadas por hongos fitopatógenos que tienen relevancia en México están relacionadas con los cultivos de importancia en el país. Entre estos cultivos se encuentra el agave tequilero, el cual es afectado por tizón foliar, mancha anular y pudrición de cogollo, hojas y planta; todos estos ocasionados por *Phytophthora sp.*, y *Alternaria sp.* En el caso del cultivo de aguacate, las enfermedades más comunes son la antracnosis ocasionada

por *Colletotrichum gloeosporoides* y la tristeza del aguacatero provocado por *Phytophthora cinnamoni* (Rulfo *et al.*, 2007). En cuanto a cultivos tropicales como el cacao, las principales enfermedades que merman la producción son la mancha negra y la Moniliasis; la primera es causada por hongos del género *Phytophthora*, de las cuales *P. megakarya* es la más agresiva, y la segunda es causada por hongos del género *Moniliophthora* (Fig. 2), una de las principales causas de pérdidas en la producción de cacao (Sánchez y Garcés, 2012; Cuervo-Parra, 2014).

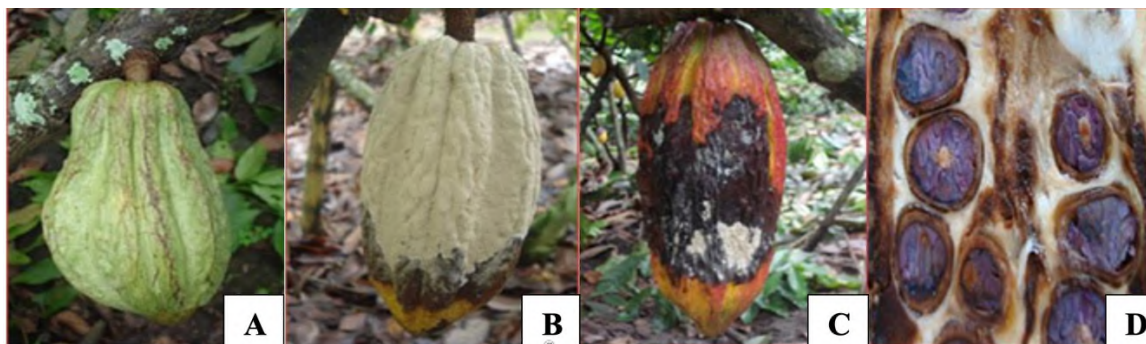


Figura 2. Síntomas externos e internos de la Moniliasis en el cacao. A) Fruto con pequeños abultamientos y protuberancias indicios de una infección interna causada por el hongo; B) Se observa el micelio del hongo cubriendo el tejido del fruto; C) Necrosis celular ocasionada por la enfermedad en un estadio avanzado; D) Tejidos internos, pulpa, almendras y cáscara en proceso de pudrición causadas por el patógeno (modificada de Sánchez & Garcés, 2012).

El cultivo del café también ha sido castigado por enfermedades; una de las más agresivas es la antracnosis ocasionada por hongos del género *Colletotrichum sp*, además del mal del talluelo ocasionado por el hongo *Rhizoctonia solani*. Éste último provoca grandes pérdidas de plántulas de café en viveros. Además, el cultivo del café sufre la roya anaranjada provocada por el hongo *Hemileia vastatrix*, que es hasta ahora la enfermedad más violenta de todas.

En el caso del cultivo del mango, otro producto tropical, la enfermedad más ofensiva es la de la malformación ocasionada por hongos del género *Fusarium* (Betancourt *et al.*, 2015). La producción de piña también ha sido afectada por enfermedades, de las cuales se tiene registrada la pudrición del cogollo, ocasionada por el hongo *Phytophthora nicotianae*, misma que provoca pérdidas significativas de este cultivo (Espinosa-Rodríguez *et al.*, 2015). Recientemente los cítricos han cobrado gran importancia en la producción nacional, siendo

México uno de los 5 principales países productores de naranja, limón y lima a nivel mundial. En nuestro país la producción de cítricos se ve mermada por la gomosis que es la principal enfermedad causada por al menos 12 especies de *Phytophthora*, produciendo la muerte de 3 a 5% de árboles de cítricos en pie (Acosta-Pérez, 2012). Además de esto, otros hongos fitopatógenos atacan los cítricos en la etapa poscosecha. Éste es el caso de hongos como *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* que juntos pueden llegar a ocasionar hasta el 90% de las pérdidas de producto cosechado (Cheng *et al.*, 2020)

1.6 Estrategias de control de hongos fitopatógenos

Las estrategias de control de enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos, además de tomar en cuenta el parásito o patógeno, incluyen el manejo del hospedante. De acuerdo con Achicanoy (2001), los métodos de control se clasifican de acuerdo a la causa y desarrollo de la enfermedad, teniendo métodos reglamentarios, culturales, físicos, químicos y biológicos. En México, desde la década de los 70's se han implementado labores de Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIP). El MIP tiene por objetivo proteger las cosechas al menor costo y con el mínimo riesgo al hombre, sus animales y agroecosistemas, en donde la integración de los diferentes métodos existentes (físicos, reglamentarios, culturales, genéticos, químicos y biológicos) es necesaria para lograr un buen manejo (Romero, 2004).

a) Control reglamentario y cultural

El control reglamentario está vinculado con las disposiciones legales emitidas por las autoridades competentes, enfocadas a limitar las actividades agrícolas tanto de campo como de comercio, con el fin de excluir los patógenos o impedir su desarrollo en los hospederos de un área geográfica determinada. Este tipo de control se enfoca principalmente en el establecimiento de cuarentenas, labores de inspección y certificación de productos que se exportan e importan en el territorio donde las leyes son vigentes y aplicables. En cuanto a los métodos culturales, éstos incluyen las actividades realizadas por el agricultor para evitar que el patógeno establezca relación con el hospedero, o disminuir la población de los patógenos en la plantación cuando éste logra establecerse. Dentro de esta metodología se promueve la

rotación de cultivos, la erradicación del hospedero (destrucción de las plantas infectadas), y el saneamiento que permiten eliminar o minimizar la dispersión del patógeno en una nueva planta en el cultivo (Achicanoy, 2001).

b) Control físico

El control físico tiene el objetivo de erradicar al patógeno o reducir sus poblaciones utilizando temperaturas altas o bajas, así como el uso de radiaciones o el tratamiento por calor para combatir nemátodos, bacterias y hongos fitopatógenos que se encuentran en los primeros 15 cm del suelo. El control físico también implica el tratamiento del suelo por esterilización y solarización, y el tratamiento del material de propagación como las semillas, tubérculos, bulbos, plántulas y cormos. En el método físico también se puede hacer uso de radiación electromagnética como la luz UV, rayos X, rayos γ , α y β , eficientes para eliminar patógenos de productos poscosecha particularmente frutos y hortalizas (Kumar & Pandey, 2016).

c) Control químico

El control químico es el más empleado y el más efectivo para el control de enfermedades causadas por fitopatógenos. Este método incluye el uso de fungicidas de contacto contra varios sitios objetivo en hongos, desarrollados a partir del conocimiento del metabolismo fúngico (Morton & Staub, 2008). Los agentes químicos se enfocan en la inhibición de la biosíntesis de esterol empleando aminas, espiroxamina, hidroxianilidas y compuestos de la familia de los triazoles. Otro grupo de agentes químicos con actividad antifúngica son las estrobilurinas, ubiquinol, benzimidazoles, tiofanatos y grupos inhibidores del complejo succinato deshidrogenasa, comomepronil, flutolanil, furametpir y tifluzamida. Cada uno de estos compuestos fue diseñado para intervenir en rutas celulares específicas, lo que ha convertido al método químico en el más eficiente en el control de enfermedades fúngicas.

d) Control biológico

El control biológico hace uso de organismos que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el objetivo de eliminar o reducir los efectos del patógeno en las plantas o sus productos. Los agentes biológicos utilizados para el control de enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos pertenecen principalmente a los géneros *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Streptomyces*, *Coniothyrium* y *Candida*, así como bacterias enemigas naturales

de los hongos, del género *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Agrobacterium* (Serrano y Galindo, 2007).

La aplicación de estos microorganismos ha sido importante en el sector agrícola para la obtención de productos alimenticios de calidad, además de que no generan impactos negativos al ambiente. El éxito de esta estrategia de control depende de la capacidad de detección del agente adecuado, y del estudio de su interacción con el agente patógeno, lo cual es necesario para aumentar el potencial de biocontrol, permitiendo reemplazar los productos más ampliamente utilizados como son los químicos, en caso de que el agente patógeno genere o desarrolle resistencia (McSpadden & Fravel, 2002). Sin embargo, la implementación del MIP apoyado en control biológico ha fracasado en México debido a que los agricultores optan por el uso de los métodos de control químico, frecuentemente de manera intensiva.

1.7 Problemática en las estrategias de control

De las estrategias del control, el método químico es el más empleado a nivel mundial. México no es la excepción por ser el método más eficiente a corto plazo. En general, el término agroquímico o plaguicida comprende una serie de productos que tienen como fin destruir o controlar plagas y enfermedades, y de acuerdo a su función, se pueden clasificar en herbicidas, insecticidas, fungicidas y nematocidas (Guzmán-Plazola *et al.*, 2016).

El uso excesivo de los agroquímicos los ha convertido en un problema ambiental a nivel mundial. La American Chemical Society identificó alrededor de 13 millones de productos químicos en 1993, y a partir de ahí se estimó que cada año se suman unos 500,000 nuevos compuestos, lo cual genera desechos y contaminación del suelo de manera alarmante. Se ha establecido que solo el 0.1 % del producto llega al patógeno, y el resto circula por el ambiente contaminando el suelo, el agua y la biota. Esto revela un grave daño en el área ambiental, sin mencionar que quizá el daño más grave es que estos niveles de contaminación han afectado e impactado a la salud de las personas expuestas al contacto con estos productos (Torre & Capote, 2004; García-Gutiérrez & Rodríguez-Meza, 2012).

La FAO estimó que en el año 2007, en México se comercializaron cerca de 100,000 ton de plaguicidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas y bactericidas) con un equivalente de 4 %

del consumo mundial, convirtiéndose en uno de los primeros 10 países consumidores de plaguicidas, sobre todo de fungicidas y bactericidas a nivel mundial (Figs. 3 y 4). Además, la Dirección General de Epidemiología (DGE) reportó cerca de 4,000 casos de intoxicaciones por plaguicidas en el año 2016, lo cual es preocupante para la agricultura mexicana (García *et al.*, 2018).

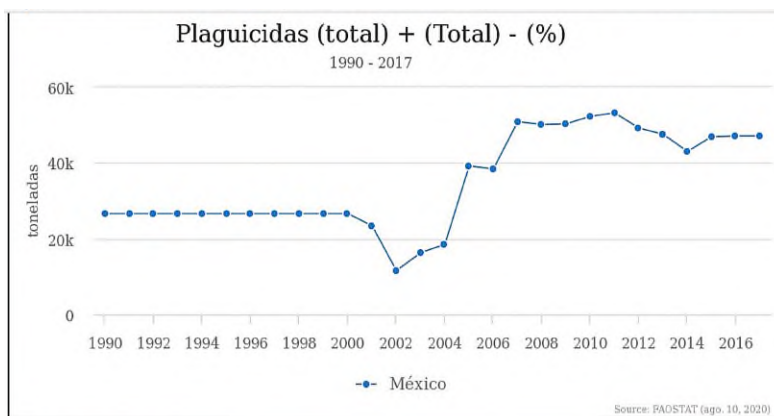


Figura 3. Uso de plaguicidas en México desde el año 1990 al 2017. Se puede observar el aumento drástico en el consumo de plaguicidas del año 2002 hasta el 2007, año en el que se alcanzó uno de sus puntos máximos (FAOSTAT, 2020).

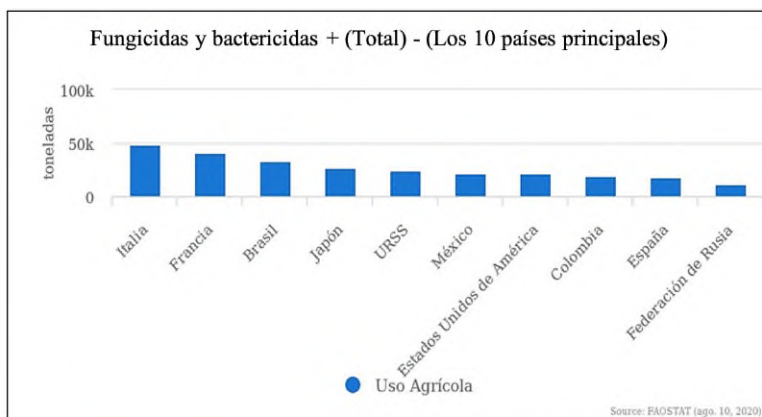


Figura 4. Los 10 países con mayor consumo de fungicidas y bactericidas del año 1990 al 2017. México ocupa el sexto lugar con 22,217 toneladas (FAOSTAT, 2020).

Hasta el momento no se encuentra documentado en México qué grupos o ingredientes activos son los más utilizados, ni el uso de estos agroquímicos por estados de la República y por

cultivo, sin embargo, hay evidencia de su uso y del efecto negativo que se genera al ambiente y a la salud humana (García *et al.*, 2018).

Otra problemática que se ha observado en el uso desmedido de agroquímicos es la resistencia del agente patógeno al principio activo, el cual se define como el cambio genético de un organismo como respuesta a la selección por sustancias tóxicas (FAO, 2012). Esta resistencia constituye una propiedad heredable del organismo, lo que le permite a las nuevas generaciones la adaptación a diferentes condiciones agronómicas adversas y les permite sobrevivir a ellas. De este modo, se originan organismos patógenos más agresivos que sus antecesores (Carmona & Sautua, 2017), y se genera la necesidad de nuevas formulaciones de agroquímicos más potentes, que a largo plazo tendrán impactos en el ambiente y en la salud humana. Estos efectos negativos al ambiente y a la salud humana han impulsado la búsqueda de nuevas tecnologías y estrategias para el control de enfermedades causada por hongos fitopatógenos.

1.8 Nuevas tecnologías en la estrategia de control de fitopatógenos

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos pueden controlarse eficientemente con el uso de agentes químicos, reduciendo considerablemente el impacto de las enfermedades; no obstante, el uso excesivo e inadecuado de estas sustancias tiene un impacto en la salud humana, de animales y al ambiente, por lo que el desarrollo de nuevas tecnologías verdes, como los biofungicidas, se ha iniciado para minimizar el impacto de los desechos y residuos químicos (Zaker, 2016).

El término biofungicida corresponde al producto obtenido con microorganismos y/o compuestos de origen natural que posee la capacidad de controlar las enfermedades de las plantas (Moraes *et al.*, 2019). Ejemplos de éstos son los microorganismos beneficiosos (hongos y bacterias) que atacan y controlan los patógenos, extractos de plantas, aceites esenciales, gomas y resinas. Los biofungicidas pueden ser una de las mejores alternativas viables que pueden usarse como parte de un programa de manejo integrado de plagas y enfermedades eficiente para reducir y controlar las poblaciones y patogenicidad de los

agentes patógenos, así como para reducir el riesgo de que los patógenos desarrollen resistencia con facilidad (Thomas, 2002).

Dentro de las ventajas de los biofungicidas se encuentra la reducción del uso de fungicidas químicos, su biodegradabilidad, su seguridad de uso y su intervalo de reingreso más bajo. Muchos de estos productos pueden ser utilizados por productores orgánicos, son menos fitotóxicos, y se puede alternar su uso con otras medidas de control como son los métodos físicos, e incluso, los químicos (Thomas, 2002). De esta manera, se requiere la búsqueda de alternativas biotecnológicas que permitan el desarrollo de nuevos biofungicidas eficientes en el control de plagas y enfermedades y que no generen impactos al ambiente ni a la salud humana.

1.9 Uso de RNAi como biofungicida

Con el avance científico en el manejo de plagas y enfermedades han surgido nuevas tecnologías para satisfacer las demandas en la producción de cultivos. Los organismos genéticamente modificados son una alternativa, sin embargo, enfrentan fuertes desafíos para establecerse como una opción viable y segura en varios países productores. Por otra parte, se abren nuevas posibilidades a partir del descubrimiento del mecanismo de silenciamiento génico a través de los RNAi en organismos eucariotas. Con la finalidad de homogenizar la nomenclatura con la que se reconoce en la literatura científica al RNAi, microRNAs (miRNAs) y siRNAs, en lo sucesivo la palabra RNA se referirá al ácido ribonucléico (ARN).

La búsqueda de alternativas para el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Cagliari *et al*, 2019) incluye el uso del RNAi para el control de plagas y enfermedades aplicado superficialmente o dentro de plantas modificadas genéticamente (Lundren & Duan, 2013; Younis *et al*, 2014).

Los RNAi son moléculas de RNA pequeñas (sRNAs, por small RNAs) que se sintetizan de forma natural en las células y que participan en la regulación negativa de los genes. Zhu *et al.*, (2019) define a los sRNA como secuencias pequeñas de 21-24 nucleótidos que se clasifican en dos grupos: microRNAs (miRNAs) y pequeños RNAs de interferencia (siRNAs). Éstos se procesan a partir de una horquilla monocatenaria o bicatenaria de RNA

como precursor, mediante una endoribonucleasa tipo RNAsa III llamada DICER o Dicer-like (DCL) (Wang *et al.*, 2017).

En general, la maquinaria de síntesis de RNAi en plantas consta de tres componentes centrales: RNA polimerasas dependientes de RNA, responsables de catalizar la biosíntesis de los RNA bicatenarios (dsRNAs) a partir de una plantilla de RNA de cadena sencilla (ssRNAs); las proteínas Dicer-Like (DCL), que escinden dsRNA; y proteínas Argonauta (AGO), que son guiadas por sRNAs y se unen a un RNA mensajero (mRNA, transcrito) objetivo por complementación de secuencia casi perfecta, lo que conduce a la degradación del mRNA o la inhibición de la traducción (Zhu *et al.*, 2019; Islam & Sherif, 2020). Este proceso se denomina silenciamiento génico postranscripcional (Fig. 5).

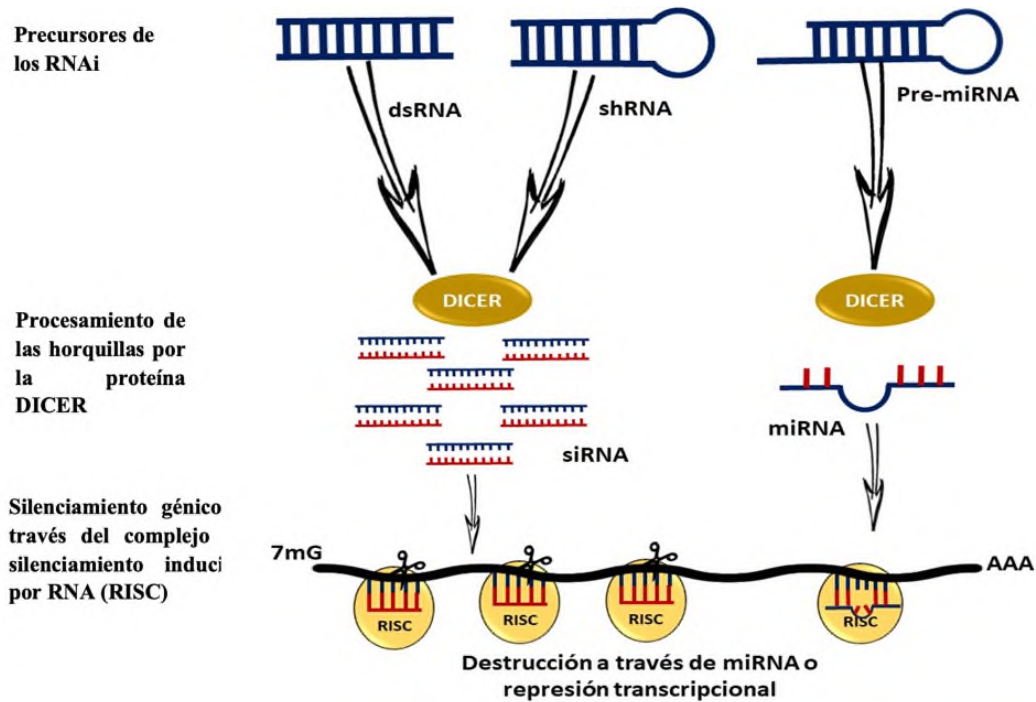


Figura 5. Representación del complejo de silenciamiento génico inducido por RNAi (RISC). El proceso inicia con la biosíntesis de las horquillas precursoras de los dsRNA y miRNA, los cuales con procesados por la enzima DICER (DCL) para generar pequeños RNA interferentes de ~ 22 nucleótidos. Estos RNAs pequeños son tomados por el complejo RISC para inducir el silenciamiento génico por degradación del RNAm objetivo o la inhibición de la traducción (modificado de Mello & Conte 2004).

A partir de la caracterización de los sRNAs como moléculas reguladoras de la expresión que participan en procesos del desarrollo de las plantas, la respuesta al estrés abiótico y la defensa ante agentes bióticos, los sRNAs se han ubicado como una estrategia promisoriosa para inhibir la expresión de genes de interés de cualquier organismo patógeno (Younis *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que los sRNAs se mueven de forma bidireccional entre los límites celulares entre el hospedero y los patógenos con los que interactúa, induciendo silenciamiento génico a través de RNAi en un fenómeno llamado RNAi entre reinos (Fig. 6). Para lograr su colonización los patógenos inyectan una serie de moléculas al huésped, como proteínas efectoras, ácidos nucleicos y toxinas, para suprimir la inmunidad y hacer débil al huésped y poder colonizarlo. En este mecanismo se incluye la supresión de la señalización del RNAi, en el cual los RNAs fúngicos utilizan la maquinaria de RNAi de la planta para silenciar los genes de respuesta del hospedador y de esta manera debilitarla para parasitarla (Hua *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019). Dicho intercambio de moléculas de RNA pequeños se lleva a cabo mediante el transporte en vesículas extracelulares (Liu *et al.*, 2021).

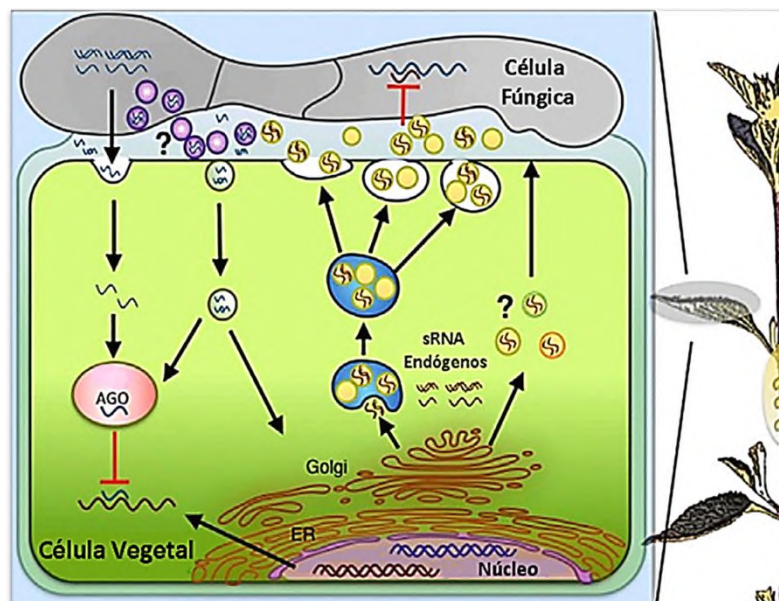


Figura 6. Papel bidireccional del RNAi en la interacción planta-patógeno. Los RNAi sintetizados por la planta son secretados hacia el patógeno en vesículas extracelulares y reprimen la expresión de genes de virulencia del patógeno. A su vez, los RNAi sintetizados por el patógeno actúan como efectores que se envían a la célula del huésped, donde utilizan la maquinaria de RNAi de la planta para silenciar sus genes de defensa, haciendo que pierda su capacidad de ataque y de esta manera logre invadirla exitosamente (modificada de Huang *et al.*, 2019).

A partir de estos hallazgos se han desarrollado dos estrategias usando RNAi: el silenciamiento génico inducido por el huésped (HIGS) y el Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión (SIGS) (Koch *et al.*, 2019).

1.9.1 Tecnología HIGS

La tecnología HIGS (Silenciamiento Génico Inducido por el Huésped) consiste en la modificación genética de la planta huésped para expresar los sRNAs o dsRNAs que serán dirigidos a algún gen clave del patógeno para silenciarlo, y de esta manera controlar o interrumpir su crecimiento (Huang *et al.*, 2019). En la última década se han realizado estudios tomando como ejemplo el tráfico de los RNAs desde los hospederos hasta los patógenos o plagas que interactúan con la planta, convirtiéndose así en un método de protección de cultivos. Las plantas y cultivos transgénicos que expresan los RNAi dirigidos contra genes esenciales de crecimiento y virulencia de patógenos y plagas han demostrado ser resistentes a las enfermedades respectivas (Nunes & Dean, 2012; Wang *et al.*, 2017).

Bajo esta premisa Tinoco *et al.*, (2010), demostraron mediante el uso de HIGS el control del hongo *Fusarium verticillioides* en plantas de tabaco modificadas genéticamente. En el mismo año, Nowara *et al.* (2010), lograron reducir el desarrollo de cepas del hongo *Blumeria graminis* en plantas de cebada y trigo. También bajo esta metodología, Koch *et al.* (2013) evaluaron el potencial de silenciamiento génico para controlar la enfermedad del tizón, cuyo agente causal es *Fusarium spp.* (Fig. 7). En dicho trabajo, se diseñó RNAi (CYP3RNA) dirigido a genes del citocromo P450 lanosterol C- α -desmetilasa (CYP51), una enzima importante en la síntesis de ergosterol en el hongo. Los resultados obtenidos empleando HIGS fueron similares a los obtenidos con el uso de tubucoazol, un producto químico diseñado para el control de la enfermedad.

Posteriormente se logró controlar poblaciones de *Fusarium graminearum* al inhibir el efecto de la quitina sintasa (Chs) 3b, un gen de virulencia identificado en el hongo, para conferirle protección a plantas de trigo frente al patógeno (Cheng *et al.*, 2015). De igual forma, Guo *et al.* (2019), probaron esta metodología para la protección del cultivo de arroz amenazada por

Magnaporthe oryzae. Como resultado, la planta transgénica resistió a por lo menos 11 cepas del hongo. Recientemente, Dou *et al.* (2020) emplearon HIGS en banana para silenciar los genes ERG6 y ERG11, involucrados en la germinación de conidios de *Fusarium oxysporum*. Las plantas HIGS de banana presentaron una resistencia superior a la enfermedad de marchitamiento causada por *Fusarium*. En otro caso, mediante la tecnología HIGS se logró reducir la producción de aflatoxinas en maíz transgénico gracias al silenciamiento de un gen clave en la ruta de biosíntesis de estas toxinas (Raruang *et al.*, 2020).

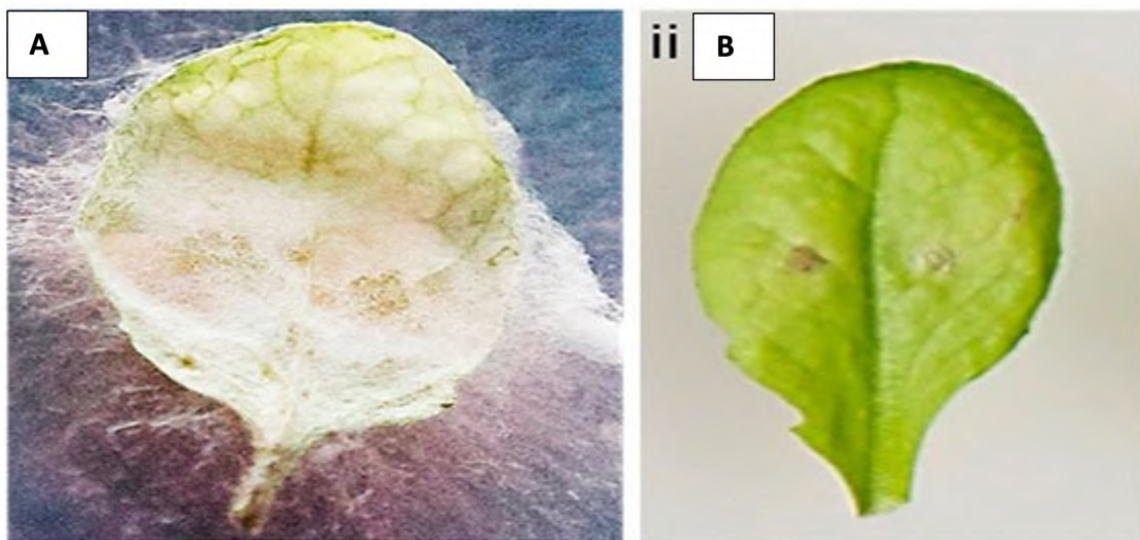


Figura 7. Protección conferida a hojas de *Arabidopsis thaliana* a través de HIGS. A) hoja de la planta que no expresa el RNAi (CYP3RNA), se observa infectada por *Fusarium graminearum*. B) hoja de la planta que expresa el RNA (CYP3RNA) se observa sin daños significativos por *F. graminearum* (modificada de Koch *et al.*, 2013).

Los ejemplos mencionados anteriormente demuestran que HIGS es una metodología muy eficiente para el control de enfermedades agrícolas, además de que ha sido la base para el entendimiento del uso natural de los RNAi entre reinos. No obstante, una de las limitaciones para su uso es que se requiere de la transformación genética de la planta, teniendo así organismos genéticamente modificados (OGM). En la mayoría de los países, la siembra de transgénicos no está permitida, por lo que prevalece la necesidad de desarrollar nuevos medios para el control de enfermedades sin generar OGM (Wang, 2017).

1.9.2 Tecnología SIGS

Alguna plagas y patógenos, además de recibir RNAs pequeños de la planta, son capaces de absorber sRNAs del medio ambiente, lo que se denomina RNA ambiental. El descubrimiento y entendimiento de este proceso se ha convertido en una herramienta prometedora para el desarrollo de nuevas tecnologías usadas contra los patógenos para la protección de la planta o los derivados, como los frutos, conocida como SIGS o Silenciamiento Génico Inducido por Aspersión.

La tecnología SIGS se desarrolló a raíz del descubrimiento de la interacción planta-patógeno y de la efectividad del uso de RNAi mostrado mediante la metodología HIGS (Silenciamiento Génico Inducido por el Huésped). En esta metodología se diseñan y sintetizan RNAi artificiales dirigidos a genes clave para la virulencia del patógeno. Los RNAi se aplican en aspersión para que sean tomados por los hongos y efectúen el silenciamiento, y de esta manera controlen su crecimiento (Ozlem, 2019).

Los RNAs de doble cadena (dsRNA) son rociados sobre las superficies de la planta infectada por hongos fitopatógenos. De acuerdo a Song *et al.*, (2018), los dsRNAs exógenos tienen dos posibles vías de entrada en las células fúngicas (Figura 8). Por una parte las células vegetales pueden tomar el RNA y posteriormente transferirlo a las células fúngicas. Por otro lado los hongos pueden tomar los RNAs directamente, y al ser captados por las células vegetales inducen la maquinaria de RNAi de la planta y posteriormente la maquinaria fúngica, o bien, si los RNAs fueron captados directamente por las células fúngicas, inducen la maquinaria de los hongos directamente. Recientemente se ha obtenido evidencia de que las plantas pueden tomar sRNAs exógenos, incluyendo microRNAs tales como miR156 y miR399 (Betti *et al.*, 2021). Esto fortalece la posibilidad de que la vía para la entrega de los RNAi exógenos hacia el hongo ocurra a través de la planta mediante la producción de RNAi secundarios por parte de ésta.

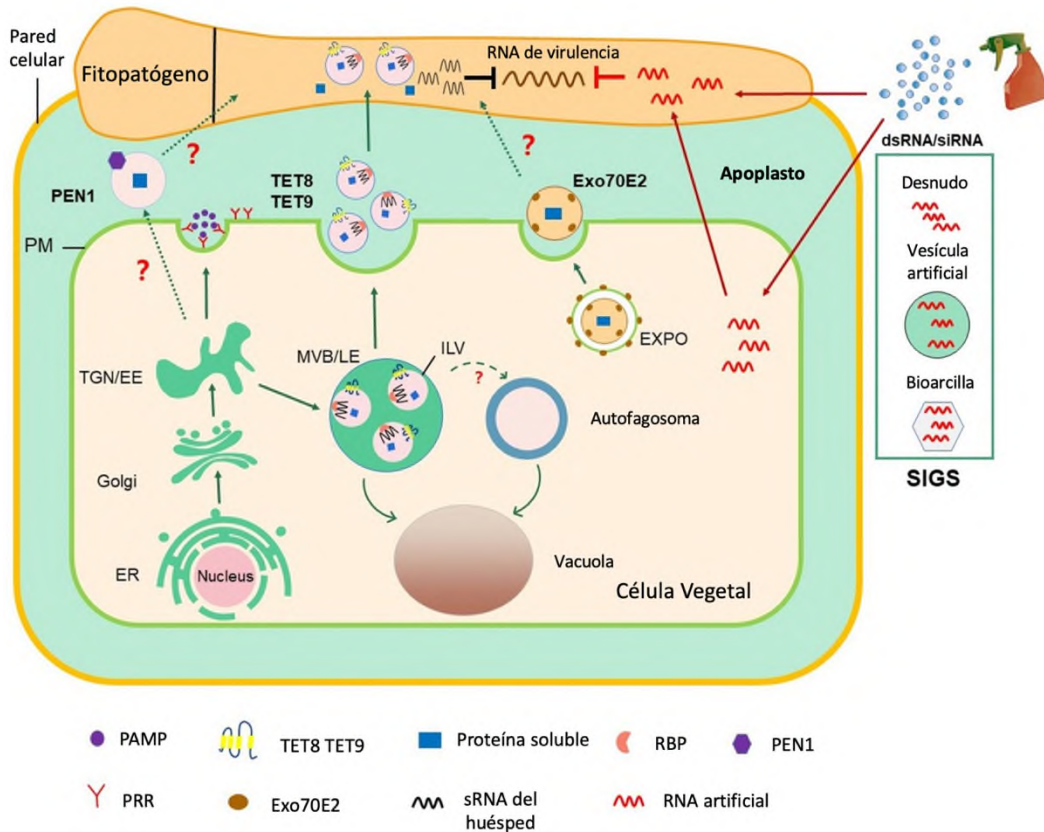


Figura 8. Fundamento de la estrategia SIGS. El intercambio de dsRNAs entre reinos establece las bases de la aplicación SIGS para conferir a las plantas protección contra patógenos. Modificado de Cai *et al.* (2021).

Empleando la tecnología SIGS, Koch *et al.*, (2016) demostró su efectividad para controlar poblaciones de *Fusarium graminearum* en plantas de cebada. En dicho trabajo se empleó dsRNA para silenciar el gen P450 lanosterol C-14 α -desmetilasa, el mismo gen que en años previos se había probado mediante HIGS (Koch *et al.*, 2013). Wang *et al.*, (2016), también mediante esta tecnología, demostró la eficiencia del método al controlar hongos patógenos como *Botrytis* y *Verticillium spp.*, al silenciar los genes DCL1 y DCL2 encargados de la síntesis de sRNA de los hongos, en plantas como *Arabidopsis* y tomate, así como de otros frutos, verduras y flores (Figura 9).

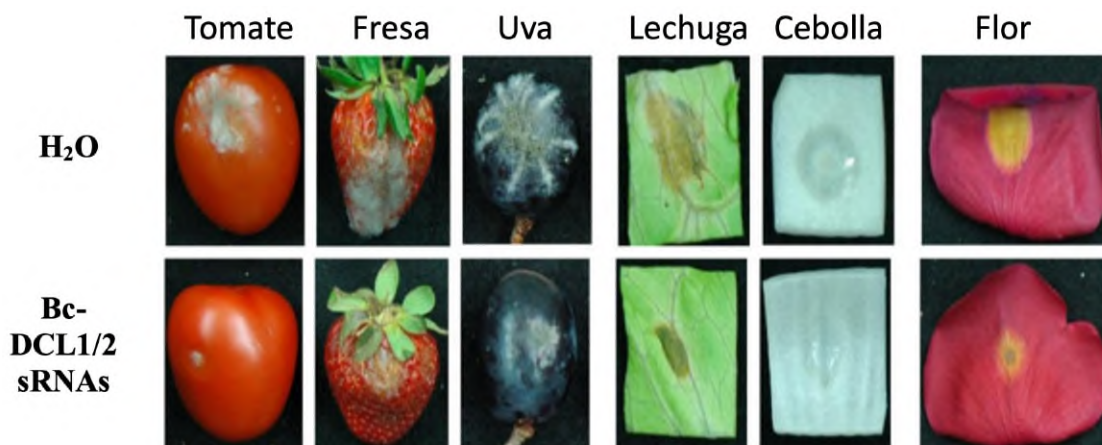


Figura 9. Efectividad de la estrategia SIGS en la protección de frutos, flores y vegetales. Se muestran los efectos de la inoculación de *Botrytis cinerea* sobre frutos, vegetales, y flores sin tratamiento previo (panel superior), y con tratamiento previo de sRNAs dirigidos al silenciamiento de DCL1/2 del hongo (Wang *et al.*, 2016).

SIGS ha mostrado ser una tecnología prometedora debido a que en el ambiente se encuentran de manera natural los RNA en interacción con los organismos. Además en comparación con los fungicidas químicos no genera residuos tóxicos en el ambiente, ya que el RNA se degrada en cuestión de semanas posteriores a la aplicación. No obstante, los patosistemas en los que se ha probado esta tecnología son limitados (Tabla 3).

Los avances en el estudio de la aplicación de los RNAi mediante la estrategia SIGS apuntan a una metodología rentable y muy prometedora, ya que en los últimos años se ha estimado un costo de producción de 0.5 a 1 dólar por cada gramo de RNAi, lo cual hace de esta tecnología una tecnología muy competitiva en el mercado (Zotti *et al*, 2018; Mezzetti *et al*, 2020). Además, los dsRNA son moléculas que se degradan fácilmente en la naturaleza y en los sistemas biológicos por lo que representa un tipo bastante novedoso de protección biológica contra enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Mezzetti *et al*, 2020).

Lo anterior plantea la posibilidad de crear biofungicidas de nueva generación ecológicos a partir de estos mecanismos altamente específicos para controlar múltiples enfermedades (Cai

et al., 2018), para lo cual es necesario realizar investigación para extender las posibilidades de aplicación de SIGS hacia una gama diversa de hongos fitopatógenos que cubra las necesidades de protección de cultivos de alta importancia agronómica para nuestro país.

Tabla 3. Hongos fitopatógenos y algunos ejemplos de genes objetivo en los que se ha probado la efectividad de SIGS.

Hongo fitopatógeno	Genes objetivo	Referencia
<i>Fusarium sp</i> y <i>Mycosphaerella sp</i>	AC y subunidad α - β DNAPol	Mumbanza <i>et al.</i> , 2013
<i>Fusarium graminearum</i>	CYP51	Koch <i>et al.</i> , 2016; Koch <i>et al.</i> , 2019.
<i>Botrytis cinerea</i> y <i>Verticillium sp</i>	DCL1 y DCL2	Wang <i>et al.</i> , 2016
<i>Fusarium culmorum</i>	FcCYP51A-1B y 1C	Koch <i>et al.</i> , 2018
<i>Fusarium asiaticum</i> y <i>Fusarium tricinctum</i>	Myosina 5	Song <i>et al.</i> , 2018
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Tioredoxina reductasa	McLoughlin <i>et al.</i> , 2018
<i>Plasmopara viticola</i>	DCL1 y DCL2	Haile <i>et al.</i> , 2021
<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Aspergillus niger</i>	VPS51, DCTN y SAC	Qiao <i>et al.</i> , 2021
<i>Verticillium dahliae</i>	DCL1 y DCL2	Qiao <i>et al.</i> , 2021
<i>Fusarium graminearum</i>	DCL1 y DCL2	Werner <i>et al.</i> , 2020
<i>Phytophthora infestans</i>	GPB1, Hmp1, Cut3, Endo3	Kalyandurg <i>et al.</i> , 2021
<i>Botrytis cinerea</i>	Sl2-Type MAP Kinase	Spada <i>et al.</i> , 2021

AC: Adenilasa ciclasa; DNAPol: DNA polimerasa; CYP51 (A, B, C): Cytochrome P450 lanosterol C-14a-demethylase; DCL1-2: Dicer-like 1 y 2; VPS51: Vacuolar protein sorting; DCTN: Dinactina; SAC: Supresor de Actina; GPB1: Subunidad Beta de la proteína G; Hmp1: Proteína de membrana específica de haustorio; Cut3: Cutinasa; Endo3: Endo-1,3(4)- β -glucanasa; Sl2: Map Kinasa tipo Sl2.

1.10 Importancia y función de los genes DCL

Los trabajos previos de investigación de la estrategia SIGS (Tabla 3) han explorado su aplicación en el silenciamiento de una variedad de genes relacionados con la síntesis de componentes y la integridad de la pared celular de los hongos (CYP51, Slt2-Type MAP Kinase), la formación de vesículas (*VPS51+DCTN1+SAC1*), y otros genes importantes para el desarrollo (GPB1, Hmp1, Cut3, Endo3). Además de estos genes, una gran parte de los trabajos se ha enfocado en el silenciamiento de genes que codifican proteínas Dicer-like o DCL.

Las proteínas DCL, junto a las proteínas ARGONAUTA, forman parte de la ruta de la interferencia mediada por RNA (RNAi) en la que participan procesando RNAs precursores para generar RNAs pequeños de doble cadena o dsRNAs (Figura 5). El RNAi es un proceso conservado en células eucariotas, por lo que también lo son los genes DCL. Las proteínas DCL codificadas poseen secuencias características que incluyen un dominio helicasa, un dominio de dimerización y dos dominios con actividad RNasa III, entre otros. La estructura de DCLs típicos de varios organismos se muestra en la Figura 10.

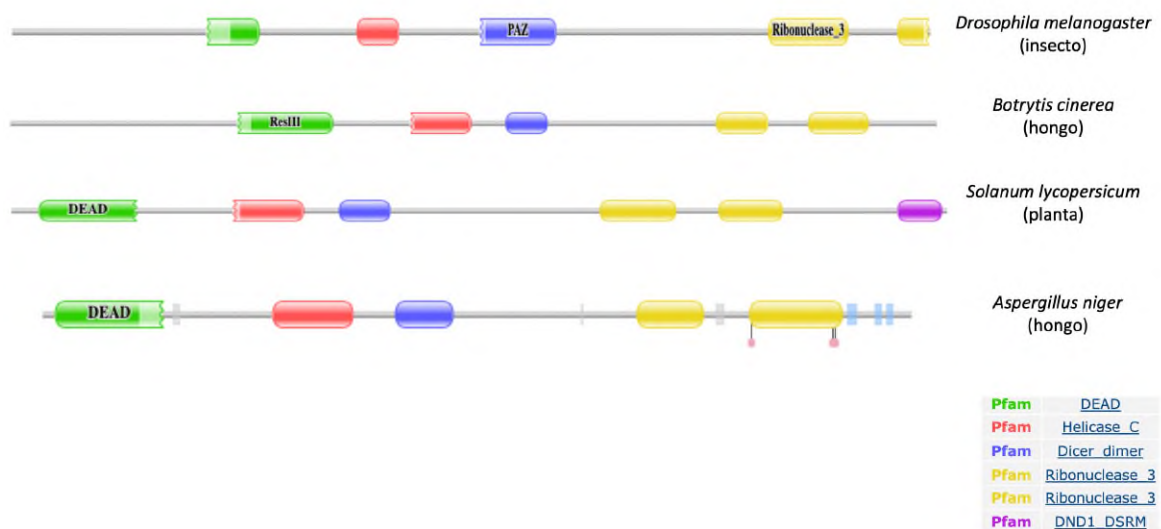


Figura 10. Conservación estructural y funcional de proteínas DCL en diversos organismos. En color rojo se destacan los dominios con actividad de helicasa, en azul los dominios de dimerización de DICER, y en amarillo los dos dominios de ribonucleasa tipo 3 característicos de las proteínas DCL.

Los DCLs tienen la función de generar RNAs pequeños de doble cadena, o dsRNAs, los cuales participan en la regulación de una variedad de procesos en los organismos, tales como el desarrollo, la esporulación, la respuesta al estrés y la virulencia en patógenos. En este último punto, se ha demostrado que la generación de dsRNAs y su transporte hacia la célula vegetal es parte de la estrategia de los hongos fitopatógenos para suprimir la expresión de genes de defensa en la planta dentro del esquema del flujo bidireccional de dsRNAs entre plantas y patógenos (Figura 6). De esta manera, la supresión de la actividad de los DCLs en los hongos bloquearía la producción de dsRNAs necesarios para regular el desarrollo y la virulencia, por lo que constituye un objetivo potencial para la protección vegetal mediante la estrategia SIGS.

2. JUSTIFICACIÓN

En los próximos años la población mexicana se incrementará de 120 millones a 140 millones de personas para el 2050, generando una demanda de alimentos que se estima será del 50% más a la producida en la actualidad, lo cual generara una presión sin precedentes para la agricultura en la producción de alimentos para abastecer la demanda. Aunado a esto, el cambio climático ha provocado que recientemente hayan surgido enfermedades causadas por hongos fitopatógenos muy agresivos, y resistentes a fungicidas químicos, lo cual pone en riesgo que se alcance la producción de alimentos necesaria.

Con el objetivo de generar alternativas que permitan controlar las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, se han desarrollado nuevas tecnologías para la producción de biofungicidas. Una de estas tecnologías es SIGS, la cual está basada en el proceso natural de transferencia de RNAs pequeños entre planta y patógeno. Esta nueva herramienta biotecnológica podría ser de utilidad para la protección de cultivos importantes a través del control de la virulencia de los hongos mediante el silenciamiento de genes vitales para el hongo.

En el estado de Oaxaca se dedican grandes extensiones de tierra al cultivo de plantas tropicales de importancia económica, como la piña, la naranja y el cacao, entre otros, que sufren pérdidas debidas al ataque de enfermedades causadas por hongos. Por lo tanto, se requiere realizar investigación que conduzca a la identificación de hongos patógenos en estos cultivos para llevar a cabo el diseño, formulación y evaluación de biofungicidas a base de RNAi dirigidos a los genes DCL de los patógenos. Los resultados serán útiles para evaluar las aplicaciones de la tecnología SIGS a futuro con el objetivo de controlar el desarrollo y la virulencia de hongos fitopatógenos, y con miras a garantizar la producción y/o alargar la vida de anaquel de los productos tropicales.

3. HIPÓTESIS

La estrategia de silenciamiento génico inducido por aspersión mediante el uso de RNAi dirigida contra genes DCL de hongos fitopatógenos, será efectiva para reducir el porcentaje de germinación de esporas de los hongos de manera *in vitro*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Formular, evaluar y explorar el potencial de un biofungicida a base de RNAi exógenos para la protección de cultivos tropicales contra hongos fitopatógenos, mediante la estrategia de silenciamiento génico inducido por aspersión.

4.2 Objetivos Específicos

- 1) Aislar e identificar hongos fitopatógenos a partir de órganos infectados de *Ananas comosus* y *Theobroma cacao*, y a partir de frutos de *Citrus sinensis* en etapa poscosecha.
- 2) Identificar la secuencia de genes DCL en los hongos identificados y sus plantas huésped respectivas.
- 3) Diseñar y producir construcciones útiles para la síntesis de RNAi para el silenciamiento de genes DCL en los hongos fitopatógenos.
- 4) Establecer bioensayos *In vitro* para determinar la actividad fungicida del RNAi, en función de la dosis, para al menos uno de los patógenos.
- 5) Validar el silenciamiento de los genes DCL mediante qPCR.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material Biológico

El material biológico utilizado consistió en una cepa pura de *Penicillium digitatum* previamente aislada e identificada morfológica y molecularmente en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec (Santiago-Tapia, 2019). Para el caso de patógenos de *Ananas comosus* (piña) y de *Theobroma cacao* (cacao), se realizaron aislamientos a partir de plantas y frutos con signos de infección, respectivamente.

Las muestras de cacao se colectaron en el municipio de Valle Nacional, Tuxtepec Oaxaca, específicamente en las coordenadas N 17° 47.129' y W 96° 16.57' a una altura de 50.5 msnm. Para el caso de los tejidos de piña, éstos fueron colectados en la localidad de Loma Bonita, Oaxaca, en el rancho “tres hermanos” ubicado en las coordenadas N 17° 59.648' y W 95° 51.178' a 77.11 msnm. El material vegetal fue transportado en bolsas y en un contenedor de plástico a los laboratorios de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal de la Universidad de Papaloapan.

5.2 Aislamiento de hongos fitopatógenos

Una vez en el laboratorio, con ayuda de una hoja de bisturí estéril se cortaron pequeños pedazos de tejido de cacao, de aproximadamente 5mm², los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% durante 3 a 4 minutos respectivamente con cuatro enjuagues con agua destilada estéril y posteriormente se sembraron en medio PDA (Anexo I) (Espinosa-Rodríguez *et al.*, 2015). Para algunos hongos con evidencia de micelio, se tomó una porción de éste con una asa bacteriológica mediante la técnica punta de hifa y se depositó en una caja de Petri con PDA mediante punción.

El tejido colectado de piña que contenía exceso de tierra se lavó con agua corriente y posteriormente, con ayuda de una hoja de bisturí estéril, se cortó en trozos de aproximadamente 5 mm², los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% durante 3 a 4 minutos. Enseguida se enjuagó con agua destilada estéril para retirar el exceso de cloro y posteriormente se sembraron en medio PDA 5 pedazos de tejido por caja. Al igual que el cacao, los hongos con micelio evidente en el tejido se tomaron con un asa bacteriológica mediante la técnica punta de hifa y se sembró directamente en las cajas con PDA. A cada tejido seleccionado se asignó una clave identificación.

De los hongos crecidos en los medios de cultivo se realizaron resiembras para aislar las cepas que presentaron características morfológicas y de crecimientos similares a los hongos de interés (*Phytophthora sp.*, y *Moniliophthora sp.*). Las cajas se incubaron a 25°C por 10 días o hasta observar el crecimiento miceliar. Se realizaron resiembras hasta aislar los hongos referidos en medio PDA y PDA-V8 (Anexo II).

5.3 Identificación morfológica de hongos

Los hongos aislados fueron inspeccionados para identificar la morfología colonial característica de *Phytophthora spp.*, y *Moniliophthora spp.*, así como el de los demás hongos aislados en placas de agar. Se describió el color de las colonias, su tamaño, hábito de crecimiento y bordes. Adicionalmente, se realizó la inspección microscópica de los hongos en un microscopio de contraste de fase (Leica Mycrosistems DM3000) para confirmar la morfología del micelio y estructuras reproductivas típicas (Anexo III). Posteriormente estas características fueron utilizadas y con ayuda de claves de identificación taxonómicas se determinó la familia y género de los hongos de interés.

5.4 Identificación molecular de hongos

El aislamiento de los hongos de interés fue confirmado mediante la amplificación, secuenciación y análisis de la región espaciadora transcrita (ITS). Para esto se extrajo DNA

genómico de cada uno de los patógenos aislados y se realizaron reacciones de PCR, como se describe a continuación.

5.4.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó a partir de hongos crecidos y aislados en medio sólido PDA. Para la extracción se tomó micelio y esporas de la superficie de la placa de agar con ayuda de una espátula y se depositó en un mortero y enseguida se le adicionó nitrógeno líquido y se trituró con un pistilo de polipropileno hasta pulverizar el tejido, el cual fue depositado en tubos de 1.5 mL y congelados a -80°C hasta su posterior uso.

Para la extracción de DNA genómico se empleó el método de fenol: cloroformo, como se describe a continuación: Las esporas y micelio colectados y triturados fueron tratados con 600 μL de buffer de lisis (50 mM de TRIS HCl pH 7.5; 50 mM de EDTA pH 8.0; 3% de SDS; 1% de Mercaptoetanol) (Anexo I). Los tubos se agitaron en un vortex, y se incubaron en un baño María a 80°C durante 10 min. Cuando los tubos se enfriaron hasta llegar a una temperatura de 50°C , se agregaron 700 μL de la mezcla Fenol-Cloroformo-Isoamilalcohol (25:24:1). Enseguida se mezclaron suavemente hasta obtener una emulsión y se llevaron a centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionaron dos volúmenes de etanol puro y 1/10 volumen de solución 3M de acetato de sodio para precipitar durante 2 horas a -20°C . Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se descartó dejando los pellets en el fondo del tubo, mismos que se lavaron con 500 μL de etanol al 80%. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 40 μL de agua desionizada estéril. Enseguida se adicionó 1 μL de RNasa A (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron a 37°C por 30 min para eliminar el RNA contaminante. Finalmente, para desactivar la RNasa A se incubaron las muestras a 65°C por 10 min, para después almacenar a -20°C para su análisis posterior.

5.4.2 Amplificación y análisis del ITS

Para la identificación de los hongos, el DNA genómico extraído se empleó en reacciones de PCR para amplificar la región ITS que abarca parte del 18S, la región ITS1-5.8S-ITS2 completa y parte del 28S (Figura 11), empleando los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4 (Tabla 4).

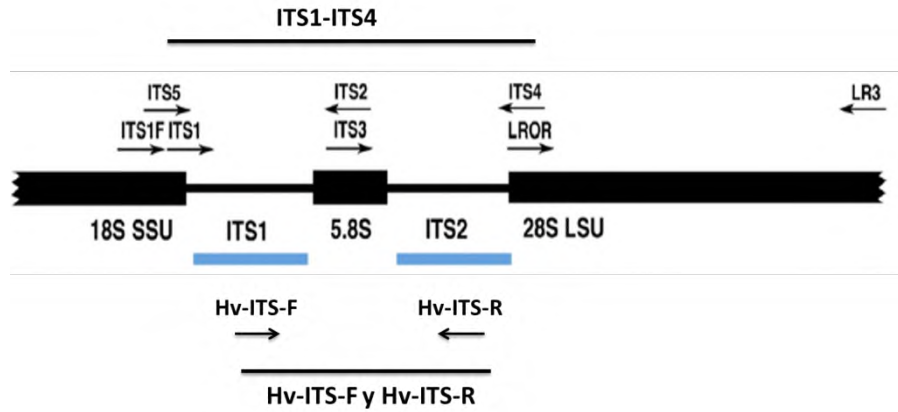


Figura 11. Región seleccionada para la amplificación de la región ITS. El amplicón comprende desde el sitio del primer ITS1 hasta el ITS4 (Modificada de Raja *et al.*, 2017).

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.

Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)
ITS1 directo	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	57
ITS4R reverso	TCCTCCGCTTATTGATATGC	53

Las reacciones de amplificación por PCR se prepararon en microtubos de 0.2 mL, empleando como molde los DNA genómicos extraídos, de acuerdo a la Tabla 5. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti™ 96 Well (Applied Biosystems), las condiciones de amplificación se indican en la Tabla 6.

Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR.

Componente	Volumen (μL)
H ₂ O	13.3
5X Phusion HF buffer	4
dNTPs 10 mM	0.5
Primer F: ITS 1 (10 μM)	0.5
Primer R: ITS 4 (10 μM)	0.5
Phusion HF	0.2
DNA	1
Total	20

Tabla 6. Condiciones de ciclado para la amplificación de ITS.

Paso	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	98	5 min	1
Desnaturalización	98	10 s	
Alineamiento	53	20 s	30
Extensión	72	30 s	
Elongación final	72	5 min	1

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Anexo I) a 110 V, revelado con bromuro de etidio en un fotodocumentador (Ingenius, LHR Syngene) con el programa GeneSnap. Posterior a la visualización, los productos de PCR obtenidos se purificaron con el kit MinElute PCR Purification (28004, QIAGEN) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

La concentración de los productos purificados se midió en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Los amplicones purificados se enviaron a secuenciar a la unidad de secuenciación de LANGEBIO en el CINVESTAV-Irapuato, mediante secuenciación capilar.

5.4.3 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se les verificó la calidad mediante el uso del programa BioEdit (BioEdit Sequence. Alignment Editor 7.0 (Hall, 1999) y para posteriormente realizar alineamientos por BLAST contra la base de datos de secuencias del National Center for Biological Information (NCBI). Después del análisis de la calidad de los productos de secuenciación y obtención de secuencias consenso se realizó la identificación filogenética en diversas bases de datos biológicas (Barcode of Life Database, BOLDSYSTEMS, CBS-KNAW, Fungal Barcoding, Fungal MLST database Q-Bank, UNITE, Naïve Bayesian Classifier, Mycobank), seleccionando los más altos puntajes respecto a identidad, número de expectativa y cobertura (Raja *et al.*, 2017). Posteriormente se realizó el alineamiento múltiple de secuencias de más alto puntaje en el programa MEGA 6, incluyendo las secuencias obtenidas en este trabajo para cada hongo, para finalmente obtener el árbol filogenético. Los árboles se construyeron con el método Neighbor-Joining usando el arreglo de Juke-Scantor con un valor bootstrap de 1000.

5.5 Identificación de DCLs en los patosistemas de interés

Para la identificación de los genes DCLs en los hongos y plantas objeto de este estudio, se realizó una búsqueda en bases de datos para obtener la secuencia de DCLs previamente reportados de los hongos y plantas de interés. Para esto se utilizaron las bases de datos del NCBI, Uniprot, Phytozome, FunRNA, Ensemblplant y EnsemblFungi.

En los casos en que no se encontraron las secuencias de DCLs reportadas y anotadas como tales, se buscaron directamente DCLs sobre los ensamblajes genómicos disponibles para cada hongo y/o planta de interés, empleando para esto DCLs de especies relacionadas filogenéticamente, con la finalidad de encontrar las secuencias con mayor homología. Las secuencias homologas se etiquetaron como DCLs presuntivos y se ingresaron en pFam, InterPro y SMART para el análisis de dominios de los DCLs.

5.6 Diseño de RNAi

5.6.1 Alineamiento de DCLs planta-patógeno y diseño de oligonucleótidos

Una vez obtenidas las secuencias de DCLs de hongos y plantas de interés, se realizaron alineamientos entre DCLs de cada hongo patógeno y DCLs de la planta para identificar regiones de baja homología usando las plataformas para alineamientos de la European Bioinformatics Institute como T-coffee y Muscle. A partir de estos análisis, se seleccionaron regiones de baja homología en ambos organismos aplicando el criterio de que no existiera coincidencia en 8 aminoácidos seguidos, para que las regiones seleccionadas no coincidieran en un máximo de 20 bases seguidas para el alineamiento a nivel de nucleótidos. Una vez ubicada la región con las características descritas se seleccionaron regiones de aproximadamente 250 pb para el caso de la existencia de dos DCLs, o de 500 pb para el caso de la existencia de un DCLs único.

5.6.2 Amplificación de DCLs

Para la amplificación de las regiones seleccionadas se diseñaron los oligonucleótidos específicos que se muestran en la Tabla 7. Las reacciones se prepararon de acuerdo a lo señalado en la Tabla 5, sustituyendo a los oligonucleótidos ITS por los oligonucleótidos directo y reverso correspondientes a cada DCL y aplicando la temperatura promedio indicada por la T_m de cada par de oligonucleótidos. Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo al programa de ciclado de la Tabla 6, y los productos se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo se diseñaron utilizando los softwares en línea Snapgene, Primer 3 así como Primer 3 plus. Los parámetros se corroboraron en la plataforma de OligoAnalyzer.

Los productos verificados por electroforesis se purificaron por columna utilizando el kit (DNA Clean & Concentrator of Zymo Research), y se midió su concentración en un espectrofotómetro (Nanodrop, ThermoScientific).

Tabla 7. Oligonucleótidos específicos para la amplificación de DCLs fúngicos.

Oligonucleótidos	Secuencias	Tm °C
Pni DCL1 F	TCAAAGCAACCACCAACGCT	61.0
Pni DCL1 R	TTCGTCATTGTTGCGCTGC	60.0
Fox DCL1 F	CGCCTCGAGAATACCAGATT	63.5
Fox DCL1 R	CATCCCAGTATTCTTTGGTCTT	61.2
Fox DCL2 F	TGGACGCTATCTGCGTACTC	64.5
Fox DCL2 R	AGTTCGGCAAGGATTTCTCT	62.2
Lth DCL1 F	CCCAGAATATTCGGAATGACA	63.9
Lth DCL1 R	CCTGGAGAGCATAAAAACCAGA	63.4
Lth DCL2 F	GGCCTGAGCTTGTGCAGT	64.9
Lth DCL2 R	CGGATGTAGAACTCTGTTGGAG	63.0

5.6.3 Fusión de DCLs y adición de la secuencia del promotor T7

A los hongos que se le encontraron dos DCLs, se realizaron reacciones de fusión con los productos individuales de DCL obtenidos, adicionando secuencias complementarias en uno de sus extremos mediante PCR sobrelapada (overlapping). Para esto, se emplearon los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 8 y que se identifican con la abreviatura “Compl”. Por ejemplo, para obtener el producto con secuencia complementaria de DCL1 de *Fusarium oxysporum*, se amplificó con el par Fox DCL1 F (Tabla 7) y Fox Rev 1 Compl (Tabla 8). En una reacción separada se amplificó con el par Fox DCL2 R y Fox Forw2 Compl.

Los productos obtenidos se purificaron por columna, se cuantificaron por espectrofotometría y se mezclaron en concentraciones equimolares en un volumen total de 10 µL en un tubo de 0.2 mL. La mezcla se incubó a 95°C por 10 minutos y después se dejó enfriar a temperatura ambiente por 1 h para promover la hibridación de los extremos complementarios entre DCL1 y DCL2. A esta reacción se adicionaron 10 µL de la mezcla de reacción que contiene DNA polimerasa DreamTaq Green (ThermoScientific) para dar un volumen total de 20 µL, y se

incubó a 68 °C por 10 minutos para que la polimerasa sintetizara la segunda cadena en los espacios generados por la unión de los DCLs.

Enseguida se llevó a cabo una PCR con el producto de la hibridación mediante una reacción de PCR empleando los oligonucleótidos Fox DCL1 F y Fox DCL2 R para amplificar el producto fusionado desde sus extremos.

Adicionalmente, para incorporar la secuencia del promotor T7 en los extremos de la fusión, se efectuó una PCR empleando los oligonucleótidos identificados con la abreviatura T7 (Tabla 8), empleando el programa de PCR indicado (Tabla 9). Para los hongos en los que solo se logró identificar un DCL, se realizó directamente la PCR para incorporar la secuencia del promotor T7.

De esta manera se logró obtener en una sola construcción los fragmentos DCL identificados en cada hongo y las secuencias del promotor T7 en los extremos, que es una condición necesaria para la síntesis de RNA *in vitro*. El procedimiento global de la PCR sobrelapante y la clonación de la construcción se esquematiza en la Figura. 12.

Tabla 8. Oligonucleótidos para la fusión de DCLs fúngicos y la adición de T7.

Oligonucleótidos	Secuencias	Tm °C
Fox Rev 1 Compl	GAGTAACGCAGATAGCGTCCACATCCCAGT ATTCTTTGGTCTT	80.1
Fox Forw 2 Compl	AAGACCAAAGAATACTGGGATGTGGACGCT ATCTGCGTTACTC	80.1
Lth Rev 1 Compl	ACTGCACAAGCTCAGGCCCTGGAGAGCAT AAAACCAGA	84.3
Lth Forw 2 Compl	TCTGGTTTTATGCTCTCCAGGGGCCTGAGCT TGTGCAGT	84.3
Lth DCL1 F-T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAGAA TATTCGGAATGACA	77.3
Lth DCL2 R-T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGGATGT AGAACTCTGTTGGAG	76.8
Pni DCL1 F-T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCAAAGC AACCACCAACGCT	79.1
Pni DCL1 R-T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGATTCGTCA TTGTTGCGCTGC	79.8
Fox DCL1 F-T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGCCTCG AGAATACCAGATT	77.1
Fox DCL2 R-T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTTCCGG CAAGGATTTCTCT	76.6

Tabla 9. Condiciones de ciclado para la amplificación de DCL + T7

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 s	
Alineamiento	60	30 s	30
Extensión	72	40 s	
Elongación final	72	5 min	1

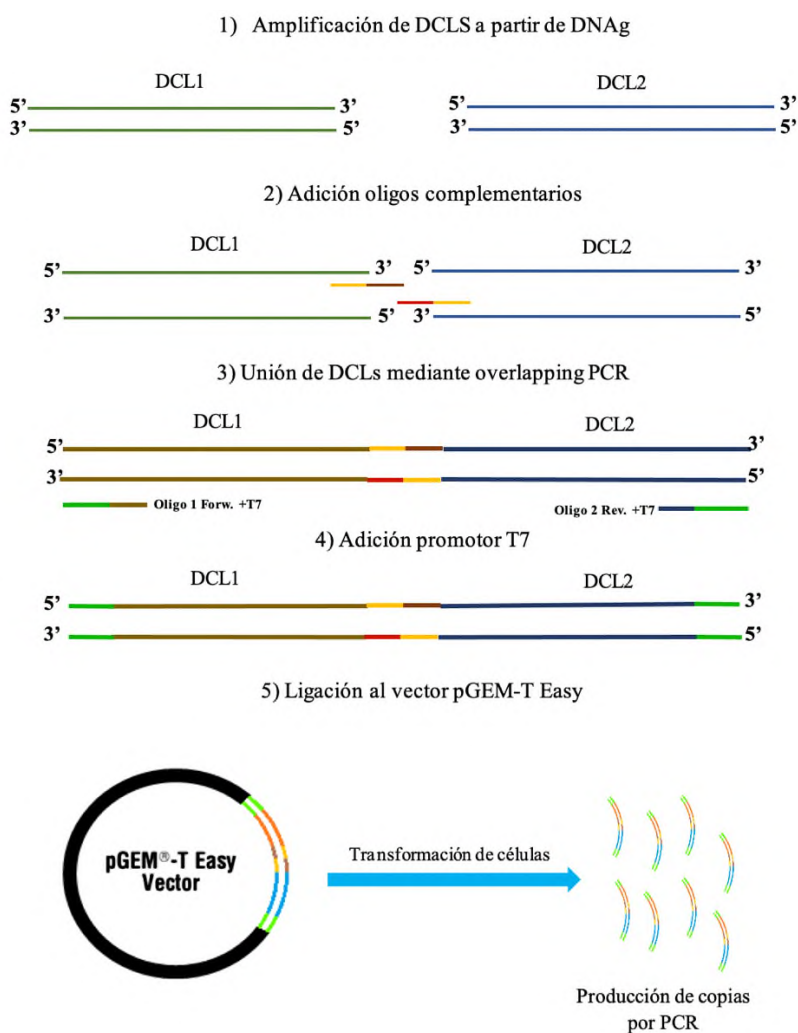


Figura 12. Procedimiento para la obtención de las fusiones de DCLs en los hongos, su preparación para la síntesis de RNA in vitro con la adición de la secuencia del promotor T7 y su clonación en el vector pGEM-T Easy.

5.7 Clonación de las construcciones DCL

5.7.1 Ligación de las construcciones en el vector pGEM-T easy y transformación de células de *E. coli*.

Para la producción de RNAi, las regiones de interés seleccionadas, amplificadas y unidas al promotor T7 de cada uno de los hongos de interés, fueron usadas en una reacción de ligación usando el vector pGEM-T Easy, que posteriormente fue clonada en células competentes de *E. coli* con el fin de reproducir el plásmido y el fragmento de interés. El proceso de ligación se llevó a cabo para cada uno de los genes DCLs seleccionados. Para esto, en un tubo de 0.2 mL se adicionaron los componentes de la Tabla 10:

Tabla 10. Componentes de la mezcla de ligación en el vector pGEM-T Easy

Componente	Volumen (μL)
H ₂ O	1
2x Rapid Ligation Buffer	2.5
Vector pGEM-T Easy (50ng)	0.5
Producto de PCR (DCL + T7)	(0.5-1.5)
T4 DNA Ligase 3 U/ μL	0.5
Total	5

El tubo con la mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente por una hora. Después de la incubación se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* siguiendo el manual One Shot Top 10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Para esto se tomó del ultra congelador (-80 °C) un vial con células competentes de *E. coli* y se colocó en hielo donde se permitió descongelar dentro de una campana de flujo laminar VECO.

Una vez descongeladas las células de *E. coli* se le adicionó 2.5 μL del producto de ligación en las paredes de vial cerca de la superficie de la solución de células y con golpes suaves se homogenizó la mezcla. El vial se dejó incubar en hielo durante 30 minutos. Pasados los primeros 15 minutos se volvió a mezclar la alícuota con golpes suaves en el tubo. Después de los 30 minutos se realizó un choque térmico en un termoblock a una temperatura de 42 °C

por 30 s. Transcurridos los 30 s el vial se regresó al hielo y se transportó nuevamente a la campana de flujo laminar donde se le adicionó 250 μ L de medio LB o medio SOC y se incubó a 37 °C por una hora con agitación a 250 rpm en una incubadora con agitador magnético (New Brunswick Scientific).

Al término de la incubación se plaquearon 50, 100 y 150 μ L del producto en cajas de Petri con medio sólido LB que contenían IPTG, X-Gal y ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL. Después del plaqueo las cajas se incubaron toda la noche a 37 °C, y al siguiente día se incubaron a 4 °C en un refrigerador por dos horas con el objetivo de diferenciar claramente las células transformadas de color blanco y células azules no transformadas.

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

5.7.2 Extracción y purificación de plásmido

Después de obtener las células transformadas en el paso anterior, éstas fueron colocadas en tubos de 1.5 mL y centrifugadas a 12 000 rpm por 2 minutos para retirar el medio LB. Posteriormente se procedió a la extracción de DNA plasmídico a partir de las pastillas conseguidas en la centrifugación anterior por lisis alcalina (Anexo VI). Una vez obtenido el DNA plasmídico, éste fue empleado como molde en una reacción de PCR usando los oligonucleótidos específicos para verificar que el inserto se había clonado con éxito en el vector. Después de corroborar el éxito de la clonación y presencia de la región de interés se procedió a purificar los plásmidos, los cuales se enviaron a secuenciar para confirmar la presencia e identidad del inserto de interés.

Una vez confirmada la clonación de la región de interés en el plásmido, se realizó una digestión con la enzima EcoRI para obtener el fragmento de interés clonado, que posteriormente fue usado en una reacción de PCR con los oligonucleótidos T7 para de ésta

manera incrementar su concentración. Los productos de PCR se purificaron y se usaron para la síntesis de RNAi *in vitro*.

5.8 Síntesis de RNAi

Para la síntesis de RNAi se realizaron reacciones de transcripción *in vitro* usando el kit MEGAScript RNAi (Invitrogen) y usando como molde los productos purificados con los promotores T7, o en su defecto directamente de plásmido. Brevemente, se prepararon reacciones en tubos de 0.2 mL adicionando los componentes que se indican en la Tabla 11.

Las reacciones se incubaron a 37°C por 4h para posteriormente realizar una digestión con DNasa y RNasa para eliminar DNA y RNAs de cadena sencilla, respectivamente. Las reacciones se prepararon como se indica en la Tabla 12 y se incubaron a 37°C durante 1 h. Al término, los productos se purificaron y se analizó su concentración mediante un equipo Nanodrop. Los productos de esta reacción se identificaron como RNAs largos de doble cadena.

Tabla 11. Preparación de las reacciones de síntesis de RNAi

Componente	Volumen (µL)
H ₂ O	c.b.p. 20 µL
DNA con T7 en los extremos	variable, hasta 2 µg
Buffer de reacción 10X T7	2
ATP	2
CTP	2
GTP	2
UTP	2
Mezcla enzimática T7	2
Total	20

Tabla 12. Preparación de reacciones de digestión de DNA y de RNA pequeño de cadena sencilla.

Componente	Volumen (µL)
Producto de la reacción previa	20
H ₂ O	21
10X Buffer de digestión	5
DNasa I	2
RNasa	2
Total	50

Parte de estos productos (10 µg) se emplearon para la generación de fragmentos cortos de RNA de doble cadena (de 21-24 pb de longitud), empleando la enzima ShortCut RNase III (New England Biolabs). Las reacciones de digestión de RNAs de doble cadena se prepararon de acuerdo a la Tabla 13 y se incubaron a 37°C por 20 minutos. Al término se adicionaron 10 µL de solución de EDTA al 10X para detener la reacción. El producto se purificó agregando a la reacción 110 µL de solución de acetato de sodio 3M, 2 µL de glicógeno y 330 µL de etanol absoluto.

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

El producto se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop, ThermoScientific) y se analizó en un gel de agarosa al 1% junto al producto sin digerir (RNAs de doble cadena largos) obtenido previamente. Ambos productos, largos y cortos, se ajustaron a concentraciones de 100, 500, 250 y 125 ng/µl en agua libre de nucleasas, para su uso posterior en ensayos de actividad fungicida.

Tabla 13. Preparación de reacciones de digestión con RNasa III.

Componente	Volumen (µL)
H ₂ O	c.b.p. 100
10X buffer de reacción	10
RNA de doble cadena largo	variable, 10 µg
ShortCut RNase III	10
10X MgCl ₂	10
Total	100

5.9 Bioensayos de germinación de esporas *in vitro*.

5.9.1 Ensayos preliminares para el conteo de esporas

A partir de cajas sembradas con *P. digitatum* de 10 a 12 días de incubación se recolectaron esporas con solución de Tween al 0.1 %. Para determinar la concentración de esporas por mililitro se prepararon diluciones 1:10 y 1:100, y con ayuda de un hematocímetro y un microscopio óptico se contabilizaron las esporas de la diluciones. Todas las diluciones con esporas se agitaron con un vortex de 30 a 60 segundos previos inmediatos al conteo para asegurar la homogenización de la suspensión.

La concentración de esporas se calculó de la siguiente forma:

$$e/mL = (\# \text{ de esporas por conteo}) \times (\text{Factor de dilución}) \times (\text{Factor de la cámara})$$

Donde:

$$\text{Factor de dilución} = 1 \times 10^{-2}$$

$$\text{Factor de la cámara (hematocímetro)} = 1 \times 10^4$$

Para los conteos se realizaron un mínimo de 8 por muestra, utilizando 5 cuadrículas de la cámara del hematocímetro.

Una vez obtenidas las concentraciones de esporas de la suspensión madre, éstas se ajustaron a 5×10^5 e/mL y a 5×10^3 e/mL, de las cuales se tomaron 100 y 10 μ L y se plaquearon en cajas de Petri contenidas con PDA para realizar el conteo de germinación y estandarizar la concentración adecuada que permitiera un fácil conteo de esporas germinadas, disminuyendo de esta manera el sesgo muestral.

5.9.2 Bioensayos de inhibición de la viabilidad de esporas

El efecto en la inhibición de la germinación de esporas de los hongos de interés se evaluó mediante el protocolo establecido por Mumbanza *et al.* (2013). Para esto, se cultivaron cepas de *Penicillium digitatum* en cajas de petri de 9 mm con medio PDA, las cuales se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 10 días en un incubadora (Thermo Scientific). Transcurridos los 10 días se tomó una caja con micelio y esporas y se le adicionó de 6 a 8 mL de Tween 80 al 0.01 % y se agitó suavemente. El líquido se decantó en un tubo falcon de 15 mL y se etiquetó como suspensión madre. A partir de ésta se realizaron diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000, y con ayuda de un hematocímetro se cuantificó la concentración de esporas en cada dilución.

Una vez obtenida la concentración de esporas, se prepararon suspensiones a una concentración de 5×10^3 esporas/mL. Un total de 10 μ L de estas suspensiones fueron colocadas en microtubos estériles de 1.5 mL, enseguida se agregaron 15 μ L de la solución de RNA de doble cadena, cortos o largos, a concentración de 1000, 500, 250 y 125 ng/ μ L, o 15 μ L de agua estéril para el control sin RNA de doble cadena, para dar un volumen total de 25 μ L. Los tubos se incubaron por 24h a temperatura ambiente y posteriormente se plaquearon en placas con medio PDA suplementado con ampicilina y rifampicina a 200 y 100 μ g/mL de medio, respectivamente. Las placas se incubaron a 25°C por 24h para inspeccionarlas, cuantificar el número de colonias en desarrollo y determinar el porcentaje de germinación e inhibición de acuerdo a las concentraciones iniciales, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{\text{Tratamiento (\# de esporas germinadas)}}{\text{Control (\# numero de esporas germinadas)}} \times 100$$

5.10 Análisis de expresión para validar el silenciamiento de DCLs

5.10.1 Bioensayos en medio líquido

Para el caso de las concentraciones de de RNAi donde se observó una respuesta de inhibición debida al tratamiento con el biofungicida, se realizó la validación del silenciamiento de DCLs mediante PCR cuantitativa. Para los bioensayos se llevó a cabo la metodología propuesta por Islam *et al*, (2020) de la siguiente manera: En tres cajas de Petri de 9 mm de diámetro se inocularon 3 gotas de 10 μ l de suspensión de esporas en una concentración de 5×10^5 esporas/mL. Las cajas se incubaron por 3 días a 25 °C. Pasado el tiempo de incubación, con una punta de micropipeta de 1 mL a modo de sacabocado, se tomaron discos de 4 mm de diámetro que contenían micelio del hongo. Cada disco se colocó individualmente en pozos de una caja de 24 pozos que contenían 1 mL de caldo Papa-dextrosa adicionado con 1 μ g de RNAs de doble cadena cortos (sdsRNAs), o sin éstos para el caso del tratamiento control.

Una vez inoculados con los discos, las placas se incubaron a 25 °C por 3 días. Transcurrido el tiempo, el micelio se cosechó de cada pozo, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C para la extracción posterior de RNA total.

Se establecieron 3 repeticiones para el control y 3 para el tratamiento, cada experimento se repitió 3 veces, dando un total de 9 pozos para el control y 9 para el tratamiento.

5.10.2 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

A partir de los materiales colectados, se realizó la extracción de RNA total empleando el kit Direct-zol RNA miniprep plus (Zymo Research), seguido por retrotranscripción para generar cDNA. Para la extracción de RNA, el micelio cosechado en el punto anterior se trituró con ayuda de nitrógeno líquido en un mortero. Posteriormente, el polvo se transfirió a un microtubo de 1.5 mL, se agregó 800 μ L de TRI Reagent y se mezcló en vortex. La mezcla se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo. Se agregó un volumen igual de etanol absoluto a la muestra y se transfirió a una columna Zymo-Spin IICR. La columna se centrifugó por 30s y se desechó el eluato. Se agregó 400 μ L de Buffer de lavado

de RNA a la columna y se centrifugó. Enseguida se agregó a la columna 80 μL de una mezcla que contenía 75 μL de Buffer de digestión de DNA y 5 μL de DNasa I (6U/ μL). La reacción en columna se incubó a temperatura ambiente por 15 min, agregando al término 400 μL de solución prelavado de RNA y centrifugando. Este paso se repitió. Finalmente, se hizo un lavado de la columna con 700 μL de Buffer de Lavado de RNA, y tras centrifugar, se agregaron 50 μl de agua libre de nucleasas a la columna. La columna se centrifugó para recuperar el RNA en el eluato. El RNA obtenido se cuantificó en nanodrop y se verificó la integridad por electroforesis en un gel desnaturizante.

Las reacciones de retrotranscripción para generar el cDNA molde para las reacciones de qPCR subsecuentes se prepararon con el kit Maxima FirstStrand Synthesis (Thermo Scientific) de acuerdo a los componentes de la Tabla 14.

Tabla 14. Preparación de reacciones de retrotranscripción

Componente	Volumen (μL)
H ₂ O	6
Buffer de reacción 5X	4
RNA (2 μg)	8
Mezcla enzimática	2
Total	20

Las reacciones se incubaron a 25°C por 10 min, después a 50°C por 30 min, y finalmente a 85°C por 5 min para inactivar la reacción.

5.10.3 Análisis de expresión por PCR cuantitativa

A partir de la secuencia específica de los DCLs fúngicos respectivos, se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 14) y se prepararon reacciones empleando SYBRGreen, mediante el kit Máxima SYBRGreen qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) usando los componentes de la Tabla 15 y condiciones de ciclado para la qPCR de la Tabla 16, empleando como molde el cDNA fúngico sintetizado anteriormente. Preliminarmente, las reacciones de PCR se llevaron a cabo empleando como molde diluciones seriales (1:10, 1:100, 1:1000 y

1:10000) del cDNA obtenido del hongo sin tratamiento. Estas reacciones se realizaron para corroborar la eficiencia de los oligonucleótidos diseñados en el rango de concentraciones empleado. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador StepOne Real Time PCR System (Thermofisher Scientific). Como control constitutivo de expresión, se empleó el gen de actina del hongo.

Tabla 14. Oligonucleótidos diseñados para la qPCR.

Oligonucleótidos	Secuencias	Tm °C
Pdi DCL1 F	TCGGAGGAGATCAAACGAATCC	68.6
Pdi DCL1 R	ATGCATTTGGTATCTGGCGAC	67.1
Pdi DCL2 F	GATTGACTCCGATGCCACAC	66
Pdi DCL2 R	CTGGGAGCCTGCAAATAGAG	64.2
Pdi ACTIN F	CGCTGCACGATCAATGCTCCAG	74.3
Pdi ACTIN R	CCTTCCAGCATCACCTCGGC	71.1

Tabla 15. Componentes de la mezcla de reacción para la qPCR

Componente	Volumen (µL)
SYBERGreen Master Mix (qPCR)	10
Oligo directo (10 µM)	0.5
Oligo reverso (10 µM)	0.5
cDNA (1:5)	2
H ₂ O	7
Total	20

Tabla 16. Condiciones de ciclado para la amplificación DCLs y Actina qPCR

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	
Alineamiento	65	30 s	40
Extensión	72	30 s	

Todos los datos de fluorescencia se obtuvieron durante la extensión a 72 °C, después de la finalización del programa de PCR se obtuvo la curva de disociación (Melt curve) en cada experimento, con la cual se determina la presencia de un producto único de amplificación. Los datos obtenidos, tanto de las pruebas preliminares con diluciones seriales como de los ensayos con cDNAs experimentales, fueron analizados mediante el software StepOne Software v. 2.3.

Con la qPCR se obtuvieron los valores del ciclado Ct que requirió cada muestra para alcanzar el umbral de fluorescencia, así mismo se obtuvieron valores de $\Delta\Delta Ct$ y se compraron con los valores de referencia del manual Comparative Ct Experiments Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR systems. Con los datos obtenidos se determinó el análisis de expresión relativa de cada gen (ER) de acuerdo al análisis comparativo de las Ct expresado en la ecuación de Livak y Schmittgen (2001).

$$ER = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

Donde:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen de referencia})_{\text{tratamiento}} - (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen de referencia})_{\text{control}}$$

control

5.11 Análisis estadístico

Para todos los bioensayos y la validación del silenciamiento de transcritos DCL se realizaron 3 réplicas por tratamiento. Los datos se ajustaron a una t-student ($p=0.05$) para evaluar el efecto del biofungicida a base de ARNi. Adicionalmente, los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de dos factores para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos y se estableció una comparación de medias mediante la prueba de Tukey con ayuda del software estadístico Minitab 18 (Minitab, LLC. 2020) y así establecer la concentración adecuada de ARNi en el control de los hongos evaluados en este trabajo (McLoughlin, 2018).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Búsqueda de sitios para la colecta de materiales

Para dar inicio al trabajo de investigación se estableció contacto con el grupo de productores de cacao de Valle Nacional “Red Cacao del Norte SPR de RI.”, quienes en una primera reunión compartieron las problemáticas que aquejan a su cultivo, entre éstas las enfermedades causadas por hongos. Al término de una reunión sostenida en noviembre de 2020, se accedió a una parcela propiedad del LB. Celedonio Santos Pérez, donde se colectaron frutos de cacao con síntomas visibles de enfermedad fúngica. Las imágenes del sitio de colecta y los frutos muestreados se presentan en la Figura. 13.



Figura 13. Localización e imágenes del campo productor de cacao en el que se realizó la detección y recolección de ejemplares de frutos con síntomas de infección fúngica. La parcela se localiza en el municipio de San Juan Bautista Valle Nacional, Oaxaca, con coordenadas N 17° 47.12' W 96° 16.57', a 50.5 m sobre el nivel del mar.

Por otra parte, para el caso de organizaciones productoras de piña, se estableció contacto con trabajadores de campos piñeros del Grupo Santa Mónica, en Loma Bonita Oaxaca, quienes a través de sus directivos permitieron el acceso al Rancho Tres Hermanos para la búsqueda y colecta de plantas de piña afectadas por enfermedades fúngicas. En la Figura 14 se muestran imágenes del piñero donde se realizó el muestreo y del aspecto de las plantas dañadas que se encontraron en el campo y se seleccionaron para este trabajo.



Figura 14. Localización e imágenes del campo piñero en el que se realizó la detección y recolección de ejemplares con síntomas de infección fúngica. El campo se encuentra en el Rancho 3 Hermanos, perteneciente a la empresa Grupo Santa Mónica en la localidad de Loma Bonita, Oaxaca, con coordenadas N 17° 59.64' W 95° 51.178', a 77.11 m sobre el nivel del mar.

6.2 Resultados de la búsqueda de plantas con signos de enfermedad fúngica en los campos seleccionados

En la parcela de cacao se localizaron plantas con frutos que presentaron diversos signos de enfermedades causadas por hongos. Entre los síntomas principales se encontraron numerosos frutos que manifestaron un color negro, como se muestra en las lesiones HC1 y HC3, e incluso en frutos inmaduros, como en HC4 (Figura. 15). Algunas lesiones en forma de manchas oscuras se observaron en frutos amarillos (HC2FM-L1 y L2, Figura. 15) y en frutos verdes (HC2FV1-L1 y L2, Figura. 15). En algunos casos, como en HC2FV1-L1 las lesiones incluían malformaciones del fruto en el sitio de la mancha. Los frutos con síntomas se consideraron presuntivos de enfermedad causada por hongos, ya que de manera preliminar se determinó que la sintomatología podría corresponder a infección con *Moniliophthora roreri* y/o *Phytophthora sp.*

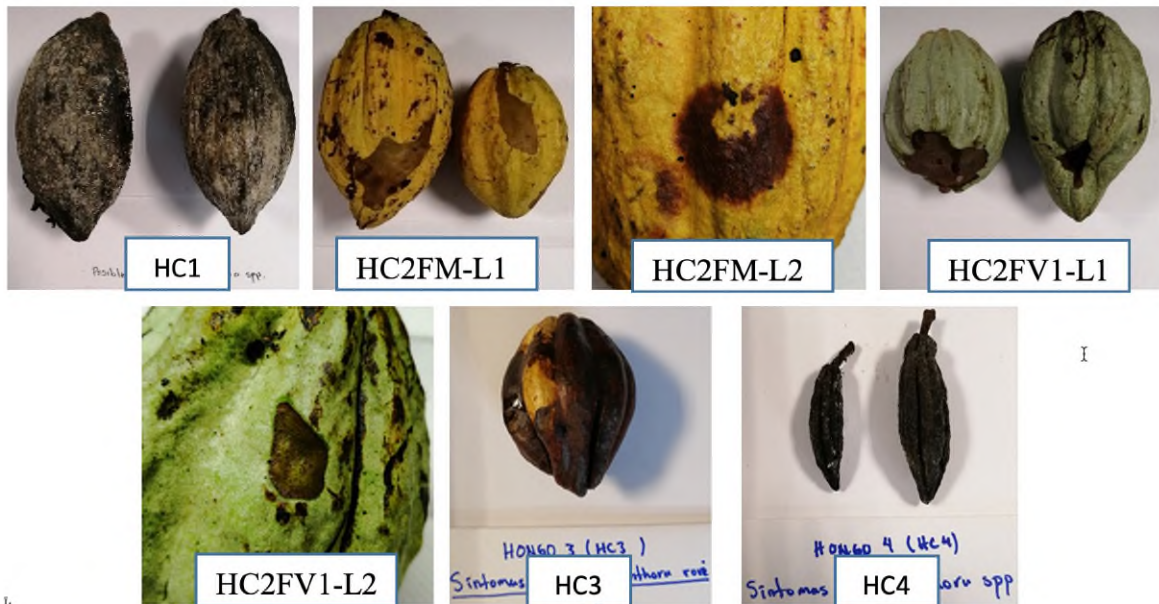


Figura 15. Lesiones seleccionadas para el aislamiento de los hongos fitopatógenos en cacao. HC1: Hongo Cacao 1; HC2FM-L1: Hongo Cacao 2 Fruto Maduro-Lesión 1; HC2FM-L2: Hongo Cacao 2 Fruto Maduro-Lesión 2; HC2FV-L1: Hongo Cacao 2 Fruto Verde-Lesión 1; HC2FV-L2: Hongo Cacao 2 Fruto Verde-Lesión; 2HC3: Hongo Cacao 3; HC4: Hongo Cacao 4.

Para el caso de la piña, las plantas con síntomas de enfermedad fúngica se distinguieron de las plantas sanas a simple vista ya que ocupaban zonas de la parcela donde se presentaba anegamiento. Las plantas dañadas mostraban hojas más delgadas y decoloradas que se desprendían fácilmente del tallo (Figura 14). Al realizar cortes de los tallos y las raíces, se hicieron visibles lesiones de coloración café, generalmente con ablandamiento severo de los tejidos. En algunos casos se alcanzaba a distinguir el desarrollo de micelio de color blanco (Figura 16).



Figura 16. Lesiones en plantas de piña seleccionadas para siembra en medio sólido. H: Hongo; P: piña. El número hace referencia al orden cronológico de siembra.

6.3 Aislamiento de hongos fitopatógenos

Del total de las siembras realizadas a partir de las muestras de cacao y piña colectados, se logró obtener varios aislamientos. Para el caso de cacao, se obtuvieron 17 aislamientos presuntivamente distintos tomando en cuenta hábitos de crecimiento, características del micelio y coloración, así como producción de estructuras reproductivas (Anexo II y III). De igual forma se seleccionaron 13 aislamientos presuntivamente distintos a partir para el caso de los tejidos de piña. En la Tabla 14 se enlistan los aislamientos seleccionados para cada cultivo.

Tabla 14. Aislamientos presuntamente distintos, obtenidos a partir de tejidos de cacao y piña.

CACAO		PIÑA	
1	HC1 Micelio Arocetado 4 S/D	1	HP1 Micelio Blanco
2	HC1 Micelio Rosa	2	HP1 Micelio Blanco 2
3	HC1 Micelio Blanco 1	3	HP1 Micelio Blanco 2 S/D (Verde)
4	HC2FM-L1 Tejido Externo MB C1	4	HP1 Micelio Morado P. Hifa S/D
5	HC2FM-L1 Tejido Interno	5	HP2 S/D Micelio Blanco Algodonoso
6	HC2FM-L1 Tejido Externo MB 1	6	HP3 2 Micelio Arocetado
7	HC2FM-L1 Tejido Externo MB 2	7	HP6 1 S/D P. Hifa
8	HC2FM-L1 Tejido Externo MB3	8	HP6 2 S/D P. Hifa Micelio Rosa
9	HC2FM-L1 Tejido Externo MB 1Crema	9	HP7 2 M. Blanco T/Sin lavar
10	HC2FM-L1 Tejido Externo M. Crema 2	10	HP7 1 Micelio Blanco T/Sin lavar
11	HC2FM-L1 Tejido Externo MB 5	11	HP8 1 Tejido Lavado
12	HC2FM-L2 Tejido Externo 2	12	HP8 2 Tejido Lavado
13	HC2FM-L2 Tejido Externo 2	13	LP9 Micelio Blanco
14	HC2FM-L2 Tejido Externo 4		
15	HC2FV1-L1		
16	HC2FV1-L2		
17	HC3 Tejido Externo 2		

6.4 Identificación morfológica

Al inicio del trabajo se planteó la posibilidad de aislar *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis en cacao, a partir de frutos con signos de enfermedad. Sin embargo, no se observó algún aislamiento con las características morfológicas reportadas para el patógeno, por lo que se sospechó que no se encontraba presente en las muestras. Para el caso de las muestras de piña, se esperaba la presencia de *Phytophthora nicotianae*. La cepa HP3 2 presentó características morfológicas típicas de este hongo, como es la presencia de un micelio coraloide arocetado (Figura 17) con formación de hifas hinchadas y globosas. Este tipo de crecimiento se obtuvo también en el aislado HP1. Sin embargo, de este último aislado no se logró la resiembra debido a contaminación con bacterias.

P. nicotianae posee una fase asexual con esporangios papilados, caducos y no caducos, simples o simpodiales con un pedicelo corto y presencia de clamidosporas (Martin *et al.*, 2012). Así mismo, muestra una fase sexual con micelio heterotálico y formación de oogonios como estructuras reproductivas y pedicelo corto. La cepa HP3 2 aislada en este estudio se encuentra en una fase asexual, ya que se observaron esporangios papilados y clamidosporas

(Figura. 18), pedicelos cortos, y micelio con hifas hinchadas y globosas. Estas características observadas coinciden con las claves taxonómicas propuestas por Erwin & Ribeiro (1996), Martin *et al.*, (2012) & Espinoza-Rodríguez (2015) para dicho patógeno.

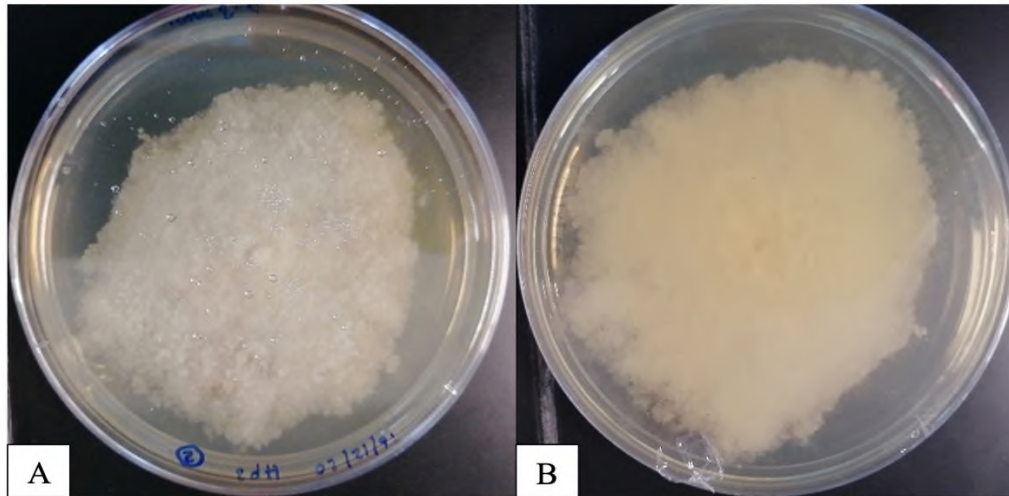


Figura 17. Característica de crecimiento arrocetado y coraloide de la cepa HP3. A) Anverso, B) reverso del cultivo.

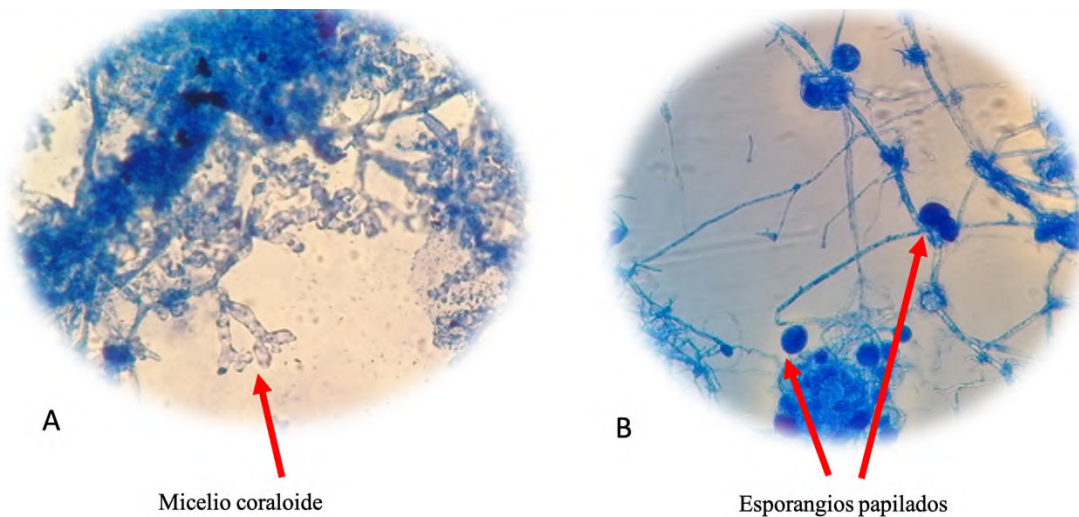


Figura 18. Estructuras de la cepa HP3 aislada de cultivo de piña. Se pueden observar las características típicas de especies de Phytophthora, como micelio coraloide (A) y esporangios papilados (B).

Cabe mencionar que las cepas presuntivas de *Phytophthora ssp.* crecen en menos tiempo en medio de cultivo PDA-V8 (Anexo I), además de que producen más estructuras reproductivas, por lo que se sugiere que para la producción de esporas se use medio PDA-V8, y para las pruebas de germinación, PDA, ya que con este medio se logra observar la germinación al poner las cajas a contra luz.

6.5 Identificación molecular

6.5.1 Extracción de DNA genómico y amplificación de la región ITS

La observación de los síntomas producidos por hongos en las plantas de piña y los frutos de cacao, así como el análisis de la morfología macro y microscópica de los cultivos aislados, permitió predecir la identidad de los hongos patógenos causales. Para avanzar en la identificación por métodos moleculares se seleccionó al marcador ITS que amplifica una parte de la región 18S y 28S del genoma de los hongos. Dicha región varía significativamente en secuencia entre especies, lo que permite utilizarlo para identificar la mayoría de especies de hongos (Tedersoo *et al.*, 2015; Rosenblad *et al.*, 2016; Raja *et al.*, 2019).

El DNA genómico (DNAg) de cada hongo aislado se extrajo y se analizó por electroforesis en geles de agarosa. En la Figura. 19 se presentan los geles de las muestras de DNAg de cacao y piña, donde se puede observar una banda definida y de alto peso molecular en todas las muestras, que es característica de DNAg íntegro.

El DNAg extraído de cada muestra se empleó como molde en reacciones de PCR para amplificar la región ITS. En la Figura 20 se muestran los productos conseguidos para cacao y piña, cuyo peso molecular varía entre 500 y 850 pb, aproximadamente. De las 17 muestras de cacao, en 2 no se obtuvieron productos de PCR, y en 2 más de una banda como producto. Las 2 muestras que no amplificaron un producto se descartaron, y de las 2 que mostraron más de una banda se eliminó solo una (HC2FM1 MB1) (Figura 20A-B), quedando 14 para los análisis subsecuentes. En el caso de los 13 aislamientos obtenidos a partir de plantas de piña, 2 muestras de DNAg no presentaron amplificación de productos, y 2 se trataban de repeticiones, quedando 9 hongos para la secuenciación.

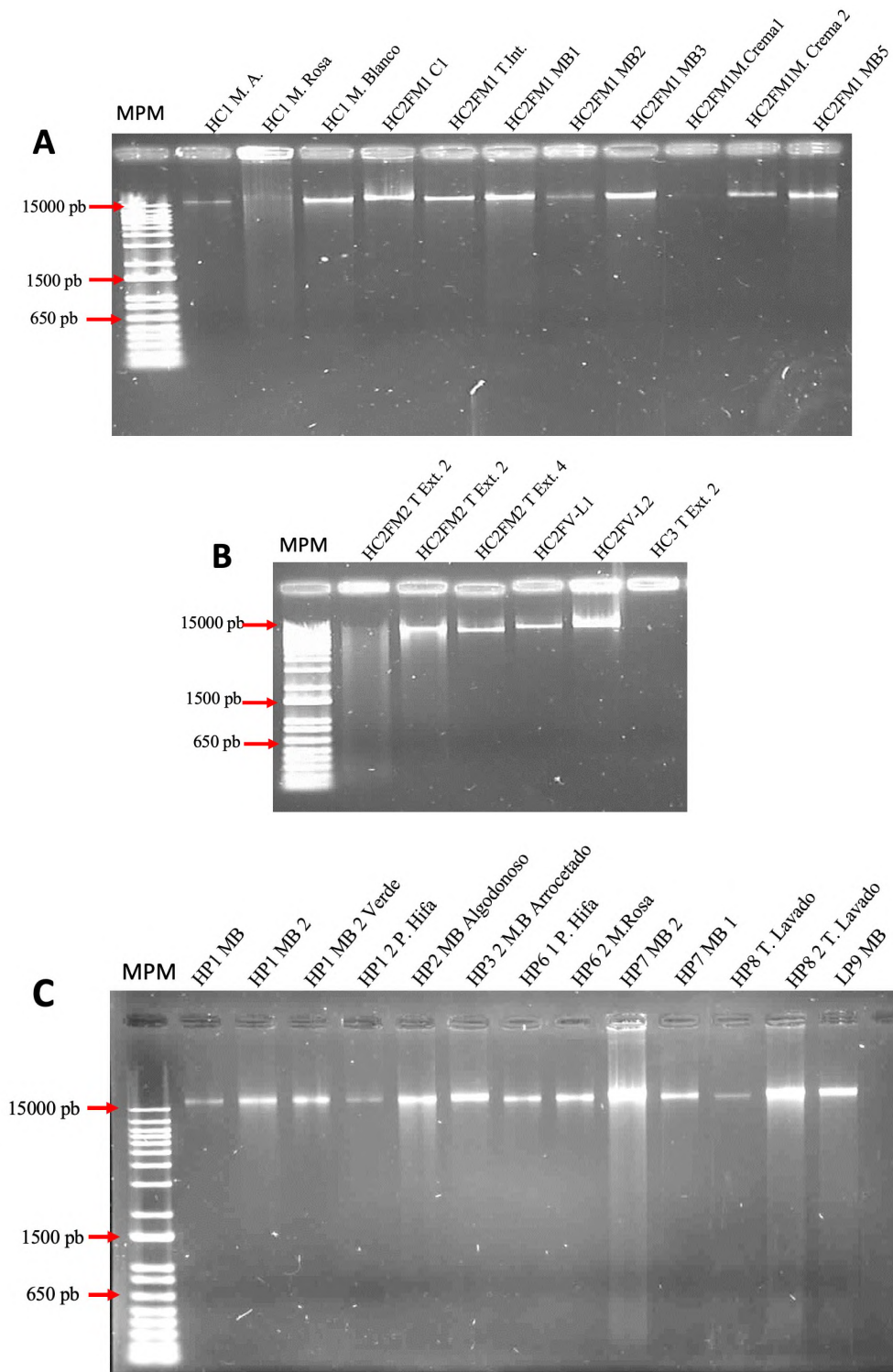


Figura 19. DNA genómico extraído de los cultivos puros de hongos aislados de frutos de cacao (A y B), y de plantas de piña (C). Gel de agarosa al 1% en TAE. MPM: Marcador de peso molecular.

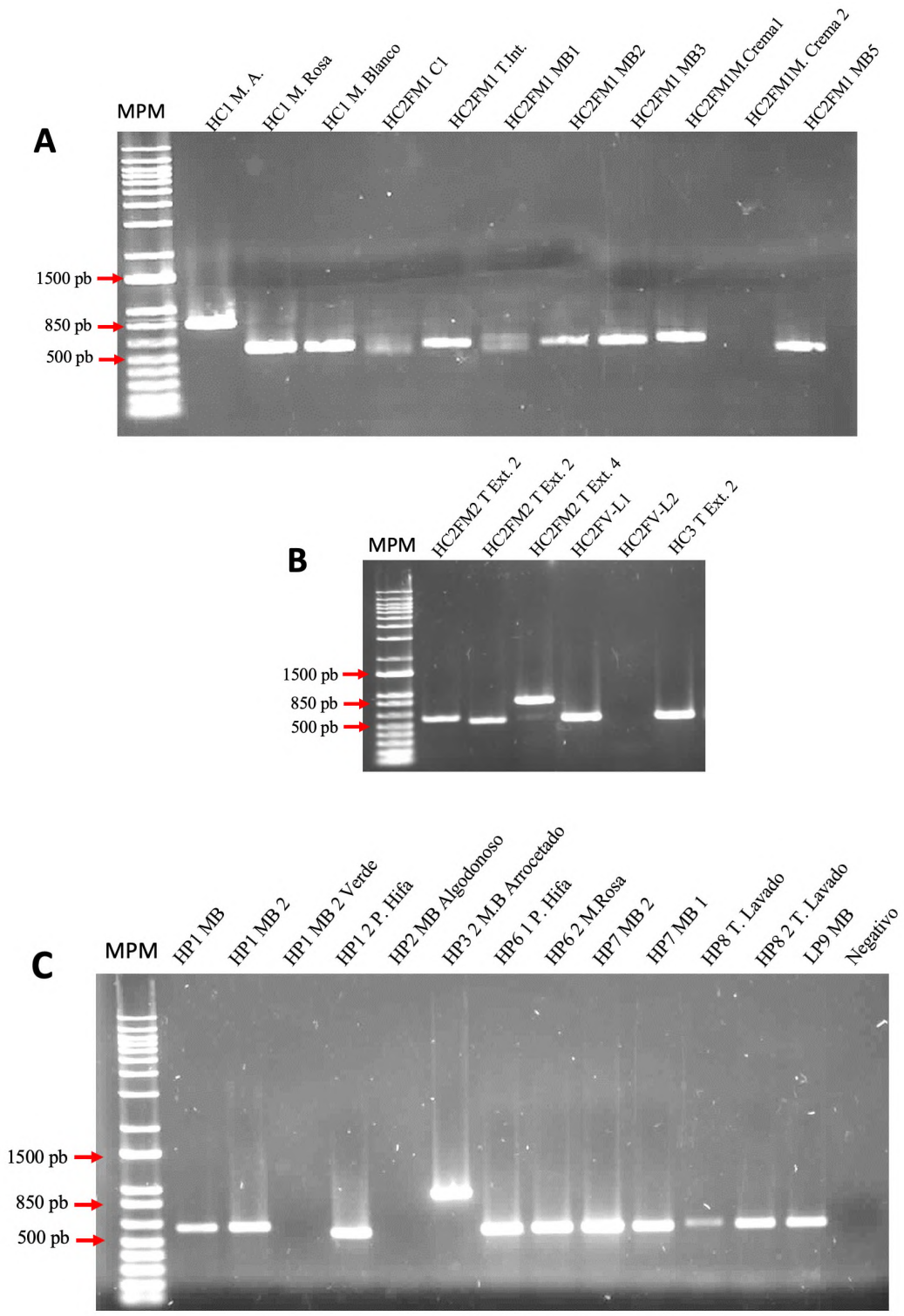


Figura 20. Productos de amplificación de la región ITS mediante PCR a partir de DNAg de aislamientos de frutos de cacao (A y B) y de plantas de piña (C). Gel de agarosa al 1% en TAE. MPM: Marcador de peso molecular.

Las causas de no haber obtenido productos de amplificación a partir de algunas muestras de DNAg pueden ser diversas. Por ejemplo, puede deberse a la presencia de inhibidores de la reacción de PCR en las extracciones de DNAg, o bien, al hecho de que los oligonucleótidos ITS, si bien son universales, existen hongos para los cuales no funcionan de forma óptima en la PCR. Tal es el caso del hongo *Hemileia vastatrix*, un patógeno de la planta de café, para el cual se requieren oligonucleótidos ITS específicos para la identificación (James *et al.*, 2016). Por otra parte, la obtención de dos bandas en la amplificación podría indicar que el cultivo no es puro y está compuesto por dos hongos, o bien, que se podría tratar de productos inespecíficos de la amplificación. Los cultivos aislados y el DNAg de los hongos que no amplificaron la región ITS se conservaron a -80°C en el banco patogenómico para una exploración a futuro y por tal motivo dichos productos no se enviaron a secuenciar.

En total, se enviaron a secuenciar 14 aislamientos de cacao y 9 de piña. Estos se enlistan en la Tabla 15.

Tabla 15. Aislamientos de hongos seleccionados para identificación con el marcador ITS.

CACAO		PIÑA	
1	HC1 Micelio Arrochetado 4 S/D	1	HP1 Micelio Blanco 2
2	HC1 Micelio Rosa	2	HP1 Micelio Morado P. Hifa S/D
3	HC1 Micelio Blanco 1	3	HP3 2 Micelio Arrochetado
4	HC2FM-L1 Tejido Interno	4	HP6 1 S/D P. Hifa
5	HC2FM-L1 Tejido Externo MB 1	5	HP6 2 S/D P. Hifa Micelio Rosa
6	HC2FM-L1 Tejido Externo MB 2	6	HP7 2 M. Blanco T/Sin lavar
7	HC2FM-L1 Tejido Externo MB3	7	HP7 1 Micelio Blanco T/Sin lavar
8	HC2FM-L1 Tejido Externo MB 1Crema	8	HP8 2 Tejido Lavado
9	HC2FM-L1 Tejido Externo MB 5	9	LP9 Micelio Blanco
10	HC2FM-L2 Tejido Externo 2		
11	HC2FM-L2 Tejido Externo 2		
12	HC2FM-L2 Tejido Externo 4		
13	HC2FV1-L1		
14	HC3 Tejido Externo 2		

6.5.2 Resultados de secuenciación, identificación y análisis filogenético

Una vez obtenidos los archivos de secuenciación, se verificó la calidad y la limpieza de secuencia del vector con el programa Bioedit 7.2 (Tom Hall, Ibis biosciences, Carlsbad). Se pudo observar que la mayoría de los electroferogramas presentaron una limpieza aceptable con muy poco o escaso ruido, con picos elevados y definidos para cada posición de la secuencia, lo que representa certeza en la identificación del nucleótido correspondiente (Márquez-Valdelamar, 2013) y nos indica que tanto la extracción del DNAg como el proceso de amplificación de la región ITS empleados fueron realizados exitosamente. Como ejemplo, en la Figura. 21 se muestra el electroferograma de una región de la secuencia ITS del aislamiento HC2FM-L2 Tejido Externo 2.

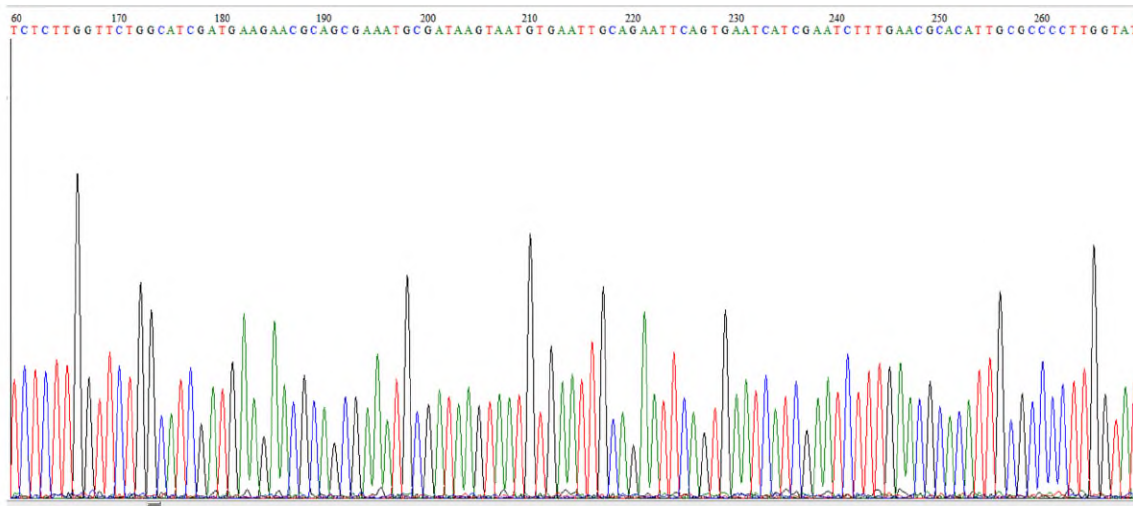


Figura 21. Ejemplo de la calidad general de la secuenciación. Se observa la presencia de picos únicos y bien definidos en cada posición de la secuencia.

Una vez determinada la calidad de los electroferogramas, y eliminados los extremos 5' y 3' correspondientes a secuencia residual del vector, se alinearon las dos secuencias (directa y reversa) de cada fragmento. Esto es con la finalidad de verificar que se obtuvo el mismo resultado al secuenciar el producto de PCR en las dos direcciones.

Después de verificar la correspondencia de la secuencia en las dos direcciones, se realizó un análisis BLASTn en el NCBI para la identificación preliminar de cada hongo. Para esto se atribuyó la identidad presuntiva del aislamiento a las secuencias depositadas en el NCBI que

presentaran como mínimo 98% de identidad y cobertura con las secuencias obtenidas en este estudio, con lo cual se garantiza una divergencia menor al 3% entre las especies analizadas (Raja *et al.*, 2017).

Una vez obtenida la identidad probable de los aislamientos, se descargaron del NCBI las secuencias ITS de hongos relacionados en términos de género y especie, y se analizaron junto a la secuencia de los aislamientos en MEGA 7 para construir árboles filogenéticos. Todas las secuencias obtenidas de los aislamientos en este trabajo se analizaron y se emplearon para construir árboles filogenéticos. Los resultados se muestran en el Anexo III.

Con base en la identificación morfológica y molecular, la prevalencia de las infecciones y su importancia económica para el cultivo respectivo, se eligieron 3 aislamientos de cacao para continuar el estudio. Estos aislamientos son HC1 Micelio Arocetado 4 S/D, HC2FM-L2 Tejido Externo 4, y HC2FM-L2 Tejido Externo 2 del cultivo de cacao. Los dos primeros fueron identificados como *Phytophthora tropicalis*, y el tercero como *Lasioidiplodia theobromae*, reportados como hongos patógenos del cacao (Picos-Muñoz *et al.* 2014; Chavez-Ramírez *et al.* (2021) (Figuras 22 y 23).

Para el caso del cultivo de piña se eligieron 2 aislamientos. Estos aislamientos son HP1 Micelio Morado P. Hifa S/D y HP3 2 Micelio Arocetado, la primera identificada como *Fusarium oxysporum* y la segunda como *Phytophthora nicotianae* (Figuras 24 y 25), con una separación entre especies con un valor de bootstrap de 95 y de 99 para ambos hongos, siendo estos dos de los más importantes patógenos para el cultivo de piña (Espinoza-Rodriguez *et al.*, 2015; Ibrahim *et al.*, 2015).

Para la construcción filogenética se usó el método de Neighbor-Joining, por ser un método tradicional muy rápido y sensible para las inferencias de secuencias con divergencias muy bajas. Este método suele tener sesgo, lo cual se corrige usando un modelo de arreglo como el modelo de Jukes-Cantor (Holder & Lewis, 2003; Schmitt & Barker, 2009). Sin embargo, no para todos los hongos identificados se obtuvieron árboles con una separación entre especies mayor al 98% (Anexo III) y esto es debido a que, a pesar de que el ITS es un marcador molecular universal para la identificación de hongos, es necesario complementar la identificación usando otros marcadores adicionales como: RPB1, RPB2, o tub2 / BenA, para un mejor sustento en la identificación de hongos a nivel de especie (Raja *et al.* 2017).

Después de la identificación molecular se descartó trabajar con el hongo *Moniliophthora roreri* debido a que no fue posible aislarlo en el material vegetal colectado. Por lo tanto, el estudio de cacao se llevó a cabo en los hongos *Lasiodiplodia theobromae* y *Phytophthora tropicalis*.

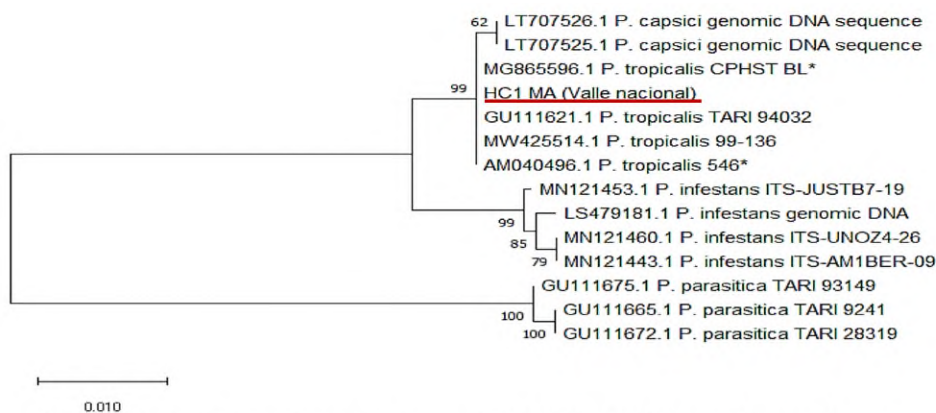


Figura 22. Árbol filogenético realizado con la región ITS del hongo identificado como *Phytophthora tropicalis*. El método de reconstrucción filogenética usado para la identificación fue la de Neighbor- Joining con una prueba de bootstrap de 1000. Los arboles filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 7. La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo.

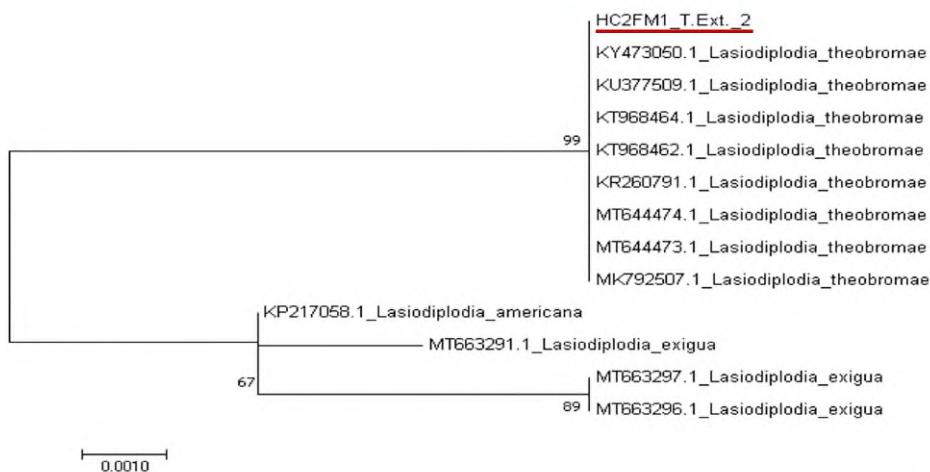


Figura 23. Árbol filogenético realizado con la región ITS del hongo identificado como *Lasiodiplodia theobromae*. El método de reconstrucción filogenética usado para la identificación fue la de Neighbor- Joining con una prueba de bootstrap de 1000. Los arboles filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 7. La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo.

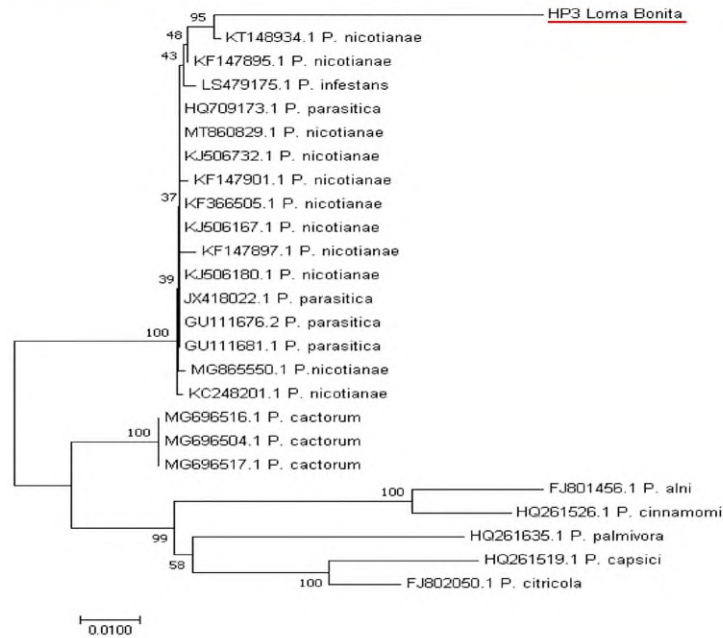


Figura 24. Árbol filogenético realizado con la región ITS del hongo identificado como *Phytophthora nicotianae*. El método de reconstrucción filogenética usado para la identificación fue la de Neighbor- Joining con una prueba de bootstrap de 1000. Los arboles filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 7. La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo.

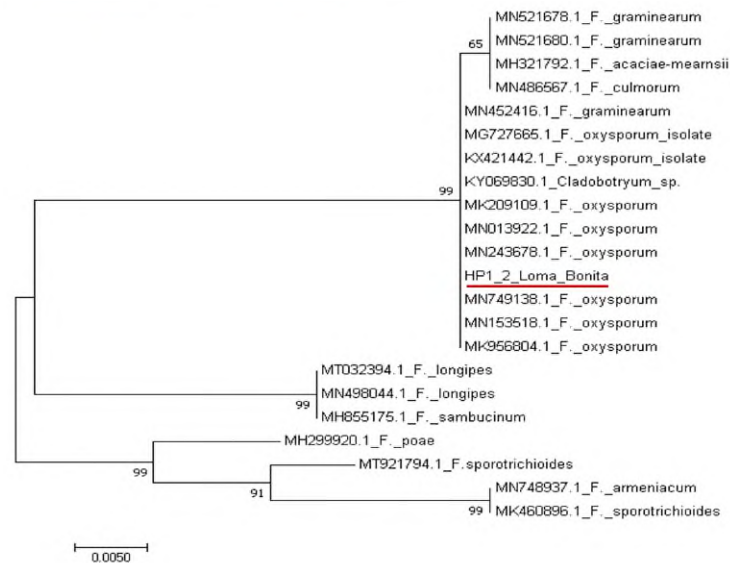


Figura 25. Árbol filogenético realizado con la región ITS del hongo identificado como *Fusarium oxysporum*. El método de reconstrucción filogenética usado para la identificación fue la de Neighbor- Joining con una prueba de bootstrap de 1000. Los arboles filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 7. La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo.

La identificación de hongos a través de marcadores moleculares, además de auxiliar en la tipificación de los hongos causales, es útil para la clasificación de la micoflora en las muestras y conocer a mayor detalle las diferentes especies presentes y las interacciones sinérgicas o antagónicas que se puedan establecer entre éstas.

Además de encontrar a los hongos *Phytophthora tropicalis* y *Lasiodiplodia theobromae* en mazorcas de cacao, dentro de la microbiota cultivable se encontraron otros hongos cuyo análisis morfológico y filogenético se presenta en el Anexo III. Si bien algunos patógenos requieren el análisis de otros marcadores distintos a ITS para su identificación detallada, la secuenciación de la región ITS permitió identificar en cacao otros patógenos como *Pestalotiopsis sydowiana*, *Pestalotiopsis spp.*, *Pestalotiopsis microspora* (Hernández, 2014), y *Diaporthe spp.* (Serrato-Díaz *et al.*, 2020), en cuanto a hongos potencialmente benéficos se identificó a *Clonostachys rosea* (Sun *et al.*, 2020). Para el caso de las muestras de piña, además de *Phytophthora nicotianae* y *Fusarium oxysporum*, se encontraron otros patógenos, tales como especies de *Fusarium*, *Neopestalotiopsis sp.*, y *Pestalotiopsis sp.*, así como hongos potencialmente benéficos como *Trichoderma spp.*

En este punto de la investigación, además de los patógenos identificados en mazorcas de cacao (*Phytophthora tropicalis* y *Lasiodiplodia theobromae*) y en plantas de piña (*Phytophthora nicotianae* y *Fusarium oxysporum*), se incluyó al patógeno de naranja *Penicillium digitatum*, el cual se había identificado previamente por el grupo de investigación (Santiago-Tapia, 2019). Por lo tanto, los 5 patosistemas de interés son:

- *Ananas comosus:Phytophthora nicotianae*
- *Ananas comosus:Fusarium oxysporum*
- *Theobroma cacao:Phytophthora tropicalis*
- *Theobroma cacao:Lasiodiplodia theobromae*
- *Citrus sinensis:Penicillium digitatum*

6.6 Identificación de genes Dicer-like (DCL) en los hongos seleccionados

Para continuar hacia el objetivo específico 2, se realizó la búsqueda e identificación de genes Dicer-Like (DCL) de los 5 patógenos seleccionados y de sus plantas huésped. Para esto se emplearon las bases de datos NCBI, Uniprot, Phytozome, EnsemblPlants o EnsemblFungi y FunRNA. En la Tabla 16 se muestran los resultados de la búsqueda.

Tabla 16. Número de registros de secuencias de ADN o proteínas DICER en las bases de datos NCBI, Uniprot, Phytozome, EnsemblPlant/EnsembleFungi y FunRNA de los organismos en estudio.

Organismo	NCBI	Uniprot	Phytozome	EnsemblPlant/ EnsembleFungi	FunRNA
<i>Phytophthora nicotianae</i>	5	5	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	78	52	0	50	2
<i>Phytophthora tropicalis</i>	0	0	0	0	0
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	3	3	0	3	0
<i>Penicillium digitatum</i>	3	10	0	8	0
<i>Ananas comosus</i>	8	35	6	8	0
<i>Theobroma cacao</i>	7	13	4	16	0
<i>Citrus sinensis</i>	5	5	5	0	0

Para todos los hongos y plantas se obtuvieron secuencias de DICER en al menos una de las bases de datos consultadas, excepto para *Phytophthora tropicalis* (Tabla 16). Después de analizar las secuencias se observó que varias de éstas no estaban completas, aunque presentaban algunos dominios característicos de DICER. Adicionalmente, se corrieron alineamientos de las secuencias, revelando que varias eran redundantes, por lo que se realizó una selección eliminando tanto secuencias incompletas como redundantes. Finalmente se obtuvieron las secuencias en las que se basaría el diseño de los sRNAs (Tabla 17).

Tabla 17. Secuencias DICER únicas en los organismos bajo estudio y su anotación.

Organismo	Anotación
<i>Phytophthora nicotianae</i>	A0A0W8DVU2
<i>Fusarium oxysporum</i>	A0A0J9VAE2, A0A0J9VWG9
<i>Phytophthora tropicalis</i>	-
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	A0A5N5DT14, A0A5N5D4R5
<i>Penicillium digitatum</i>	K9GQS7, A0A7T6XGN3
<i>Ananas comosus</i>	A0A199W5C6, A0A6P5FLM4, A0A6P5GGM9, A0A199UFR0
<i>Theobroma cacao</i>	A0A061DZU3, A0A061GR83, A0A061EY61, A0A061GJM5
<i>Citrus sinensis</i>	A0A067HF90, A0A067G252, A0A067DVW3

6.7 Localización de dominios y alineamiento de DCLs

Las secuencias de aminoácidos de DCLs de cada patosistema se analizaron para localizar sus dominios característicos y realizar alineamientos que permitieran visualizar las zonas de menor homología entre las proteínas, ya que a partir de éstas se seleccionan las secuencias nucleotídicas para el diseño de los biofungicidas. En la Figura 26 se muestran las estructuras de DCLs de los patosistemas de cacao (*Theobroma cacao*). Se observa en todos los casos la presencia de dos dominios de RNasa III característicos de DCLs, además de dominios helicasa y/o DICER-dimer hacia el extremo amino. Para el caso del patosistema *Theobroma cacao-Phytophthora tropicalis* no se encontraron reportes de secuencias DCLs en el patógeno. Tampoco se encontró registro de la secuenciación de su genoma, por lo tanto para este hongo se recurrió a la búsqueda de DCLs en especies relacionadas. Una de éstas especies, para la cual existe registro de DCL en las bases de datos es *P. nicotianae*, por lo que se consideró su secuencia para el diseño de dsRNAs.

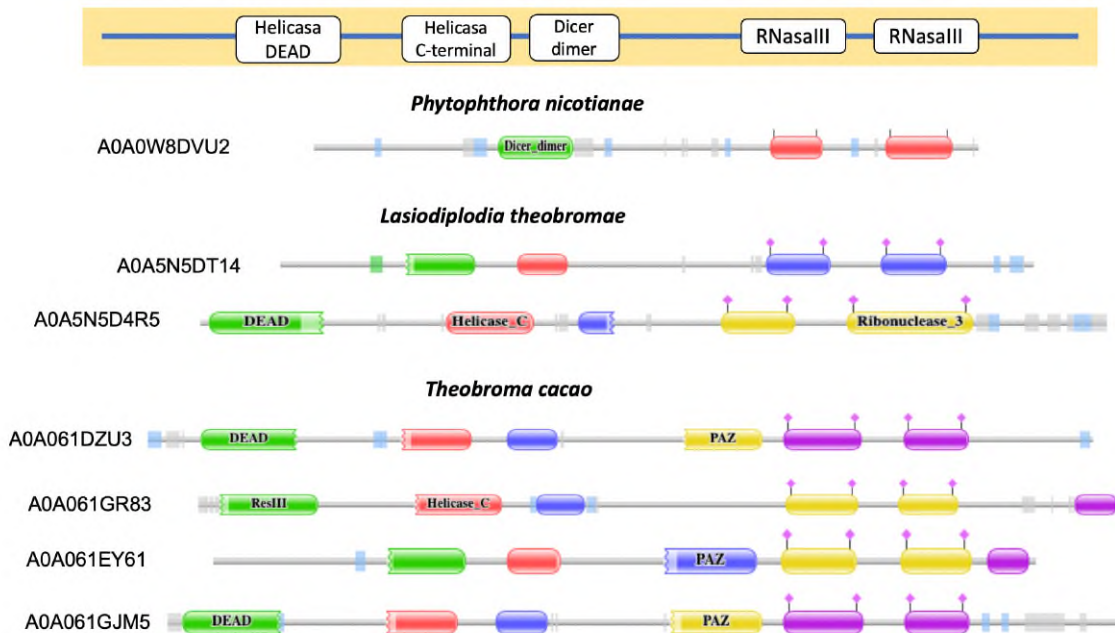


Figura 26. Estructura y localización de dominios de DCLs en los patosistemas de cacao.

Por otra parte, en las bases de datos consultadas se obtuvieron secuencias de DCL no redundantes para *Phytophthora nicotianae* y *Fusarium oxysporum*, ambos patógenos de piña

(*Ananas comosus*). En la Figura 27 se presentan las estructuras y presencia de dominios de DCL de los patógenos y de piña.

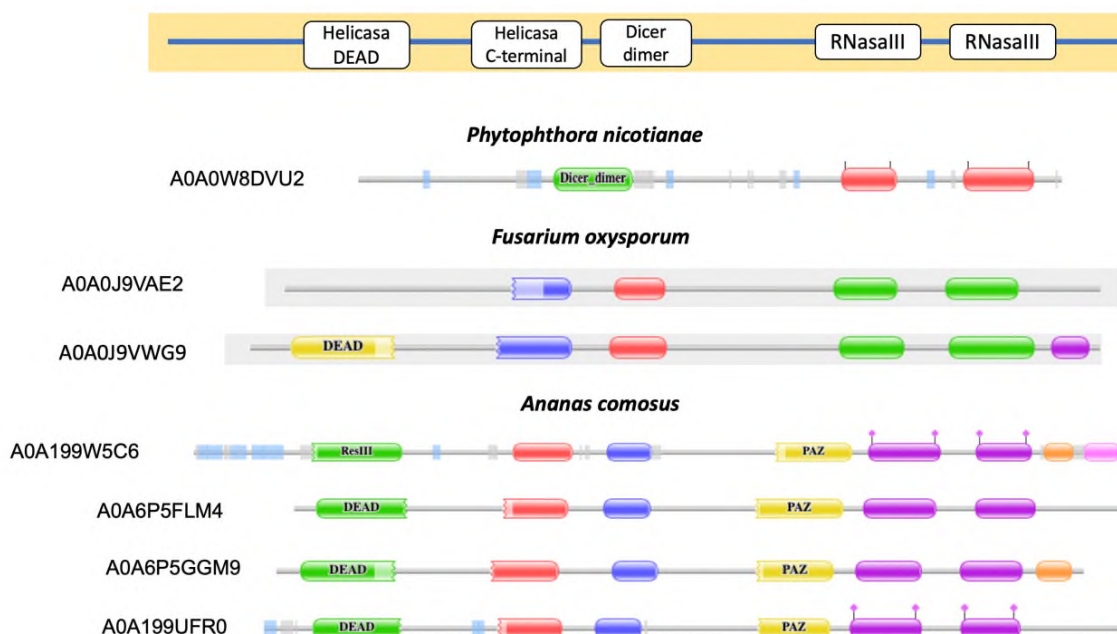


Figura 27. Estructura y localización de dominios de DCLs en los patosistemas de piña.

Adicionalmente, las secuencias proteicas del patosistema *Citrus sinensis:Penicillium digitatum* ya habían sido identificadas en un trabajo previo del grupo (Santiago-Tapia, 2019), y se sometieron a una nueva búsqueda con la finalidad de incorporar las actualizaciones que desde 2019 pudieron haberse realizado en las bases de datos al respecto de estas proteínas.

En el trabajo de Santiago-Tapia (2019) se identificaron 4 secuencias DCL en *Citrus sinensis*, donde además de las 3 especificadas en la Tabla 17, se incluyó la secuencia anotada como A0A067F7B2. Sin embargo, un análisis detallado de esta secuencia reveló que, si bien existe una alta probabilidad de que represente a una proteína DICER, puesto que posee los dominios helicasa, DICER-dimer y PAZ, la secuencia está incompleta ya que no posee los dos dominios RNasa típicos de este tipo de proteínas. Por esta razón la secuencia no se incluyó en el análisis. En la Figura 29 se esquematiza la estructura y localización de dominios de las proteínas DCL en *Penicillium digitatum* y naranja (*Citrus sinensis*).

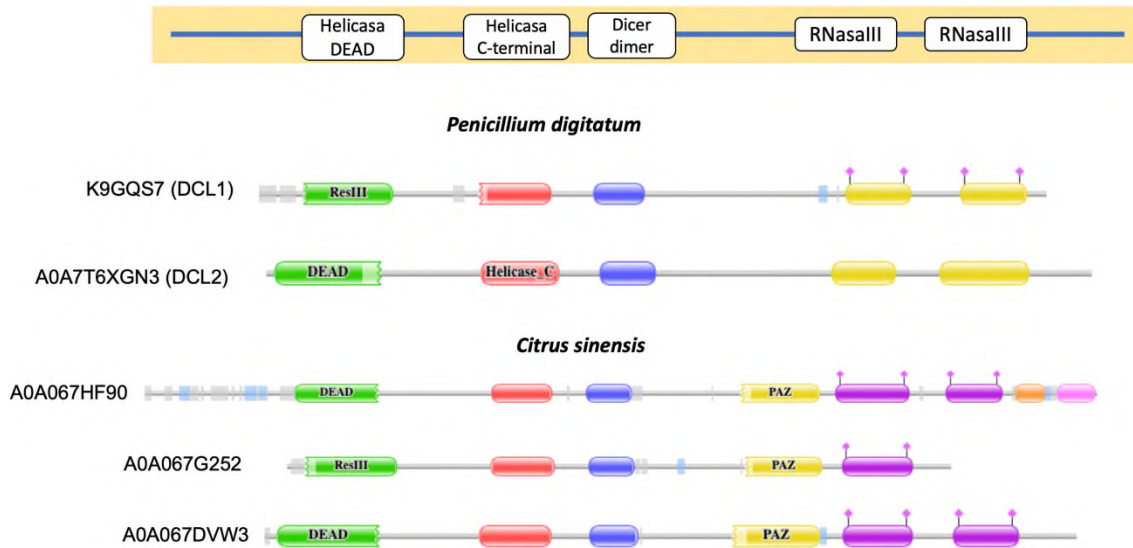


Figura 28. Estructura y localización de dominios de DCLs en el patosistema *Citrus sinensis:Penicillium digitatum*.

Se puede observar que, a diferencia de los DCLs de hongos, en los DCLs de las plantas se presenta un dominio funcional PAZ (Figuras 26-28). La función de este dominio aún no es clara, pero se sugiere que aunque no posee características suficientes para ser un sitio de unión a ácidos nucleicos, contribuye sustancialmente a la fidelidad en la longitud del corte de RNAs de doble cadena para generar RNAs de exactamente 21 nt en la ruta de biosíntesis del RNAi (Kandasamy y Fukunaga, 2016).

Las proteínas DICER identificadas en los patógenos se alinearon a los de sus plantas huésped respectivas con la finalidad de localizar regiones de baja homología. Es importante que el diseño del RNAi se lleve a cabo en zonas que no sean similares entre hongos y plantas para que no existan efectos de silenciamiento fuera del objetivo sobre todo en la planta huésped. Utilizando los programas pFam, SMART e InterPro, se localizaron sobre los alineamientos los dominios característicos de este tipo de proteínas. Los resultados detallados de alineamiento y localización de dominios se presentan en el Anexo IV.

6.8 Diseño de construcciones para la producción del RNAi

Dado que la interacción por la que se efectúa el silenciamiento génico es la complementariedad de nucleótidos, se realizaron alineamientos de la secuencias

nucleotídicas de DCLs fúngicos y de sus plantas huésped respectivas para identificar las zonas para la elaboración de los RNAi. La selección de la región de diseño en el contexto de los genes DCL completos se muestran en el Anexo V.

En la Figura 29 se presenta la localización de la región seleccionada para el diseño de RNAi de *P. nicotianae* (en sustitución de *P. tropicalis*) y su alineamiento en nucleótidos con los DCLs de *Theobroma cacao*. Para este patógeno se seleccionó la región entre el DICER-dimer y la RNasa, zona que corresponde al dominio PAZ presente en los DCLs de cacao, pero que está ausente en *P. nicotianae* y otros hongos. Si bien, en la zona seleccionada existe un grado de homología entre las secuencias, se observa que no es homólogo en fragmentos continuos de más de 3 bases. Esto es importante ya que se busca que no existan fragmentos en los DCL de las plantas con alta probabilidad de ser complementados por los fragmentos de RNAi que primariamente se dirigirían al silenciamiento de los DCLs del hongo.

Por otra parte, en lo que respecta al otro hongo patógeno de *T. cacao* identificado en este trabajo, *Lasiodiplodia theobromae*, se encontraron dos genes codificantes de DCL, por lo que se realizaron alineamientos de las secuencias nucleotídicas de cada uno de éstos contra las secuencias de *T. cacao*. El alineamiento y selección de la zona de diseño de DCL1 y de DCL2 se muestran en las Figuras. 30 y 31, respectivamente. Para DCL1 se seleccionó una región de 326 pb previa al dominio Helicasa C (Figura 30), y una región de 304 pb para DCL2 ubicada en el brazo conector entre los dominios Helicasa DEAD y Helicasa C (Figura 31).

Phytophthora nicotianae



Figura 29. Región para el diseño de RNAi en *Phytophthora nicotianae*. Se muestra la estructura y la localización de la región de diseño de 414 pb. En gris se muestra la secuencia correspondiente. KUG00462.1 es la secuencia de *P. nicotianae*. El resto son los DCL de *T. cacao*.

***Lasiodiplodia theobromae* DCL1**

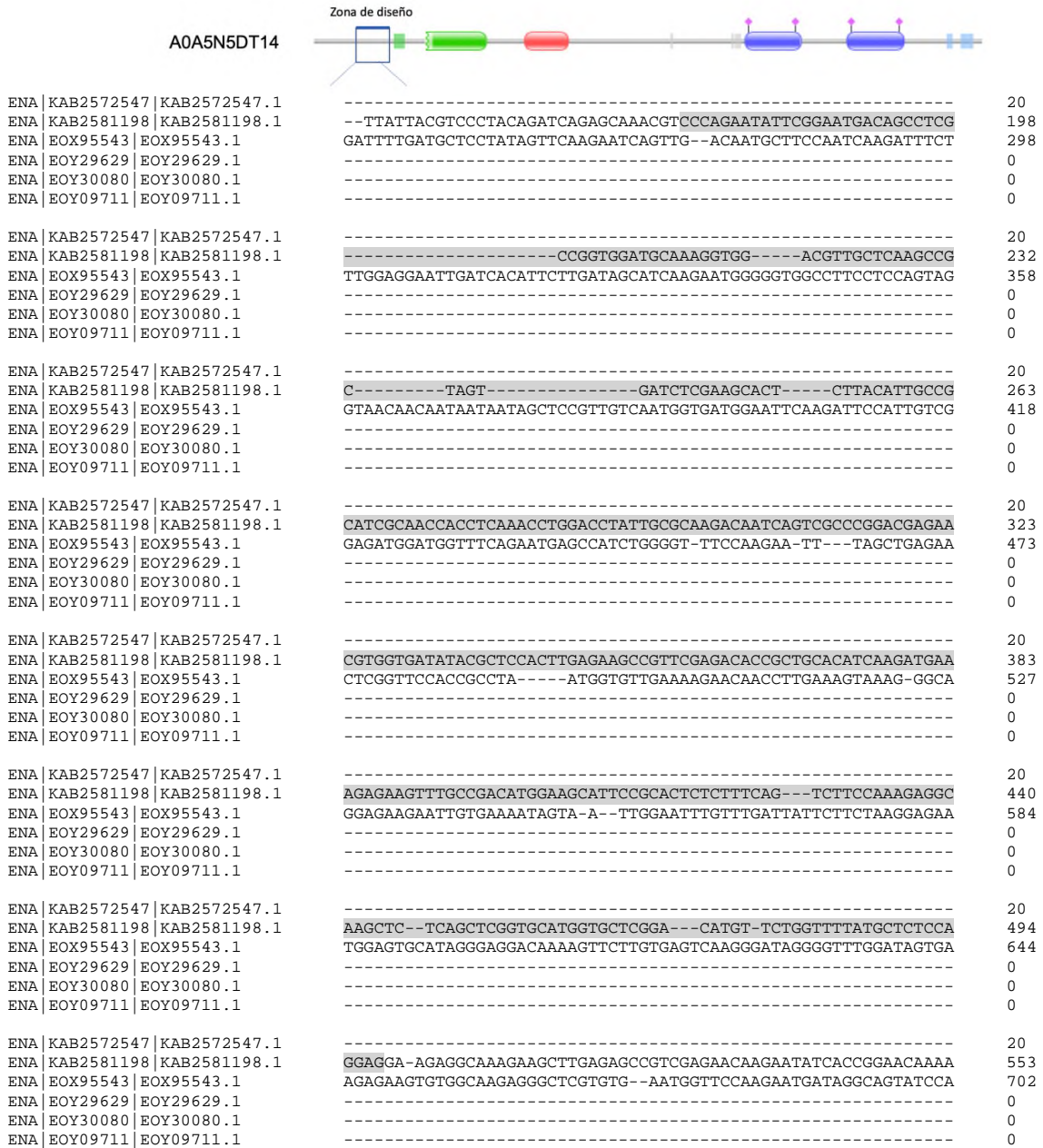


Figura 30. Región para el diseño de RNAi en DCL1 de *Lasiodiplodia theobromae*. Se muestra la estructura y la localización de la región de diseño. En gris se muestra la secuencia correspondiente. KAB2581198.1 es DCL1, y KAB2572547.1 es DCL2 de *L. theobromae*. El resto son los DCL de *T. cacao*.

***Lasiodiplodia theobromae* DCL2**



Figura 31. Región para el diseño de RNAi en DCL2 de *Lasiodiplodia theobromae*. Se muestra la estructura y la localización de la región de diseño. En gris se muestra la secuencia correspondiente. KAB2581198.1 es DCL1, y KAB2572547.1 es DCL2 de *L. theobromae*. El resto son los DCL de *T. cacao*.

Posteriormente se alineó la secuencia de DCL de *P. nicotianae* con las secuencias DCL de *Ananas comosus* con la finalidad de seleccionar la región de baja homología idónea para el diseño de los RNAs. Esta región de baja homología se presenta marcada en gris en la Figura 32, y se ubica entre los dominios DICER-dimer y RNase III.

Phytophthora nicotianae



Figura 32. Región para el diseño de RNAi en *Phytophthora nicotianae*. Se muestra la estructura y la localización de la región de diseño. En gris se muestra la secuencia correspondiente. KUG00462.1 es la secuencia de *P. nicotianae*. El resto son los DCL de *Ananas comosus*.

Para *Fusarium oxysporum*, también patógeno de piña, se identificaron dos DCLs en las bases de datos, por lo que se seleccionaron regiones de aproximadamente 250 pb de cada uno para el diseño del RNAi. Para DCL1 se seleccionó una región de baja homología en el extremo 5' del RNA mensajero, y para DCL2 se eligió la región entre los dominios de Helicasa DEAD y Helicasa C-terminal. En las Figuras 33 y 34 se muestran las zonas seleccionadas para el diseño y los alineamientos con las secuencias nucleotídicas de *Ananas comosus*.

Fusarium oxysporum DCL1

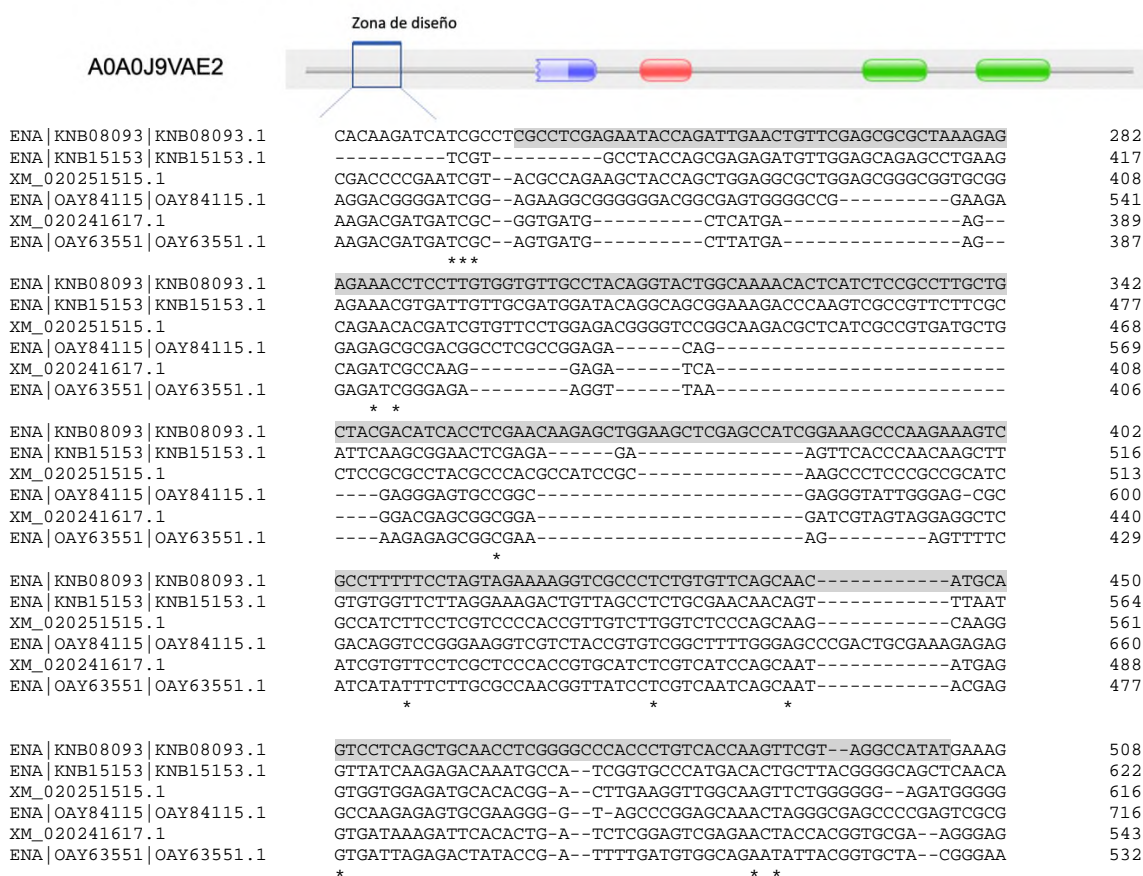


Figura 33. Región para el diseño de RNAi en DCL1 de *Fusarium oxysporum*. Se muestra la estructura y la localización de la región de diseño. En gris se muestra la secuencia correspondiente. KNB08093.1 y KNB15153.1 son las secuencias de DCL1 y DCL2 de *F. oxysporum*, respectivamente. El resto son los DCL de *Ananas comosus*.

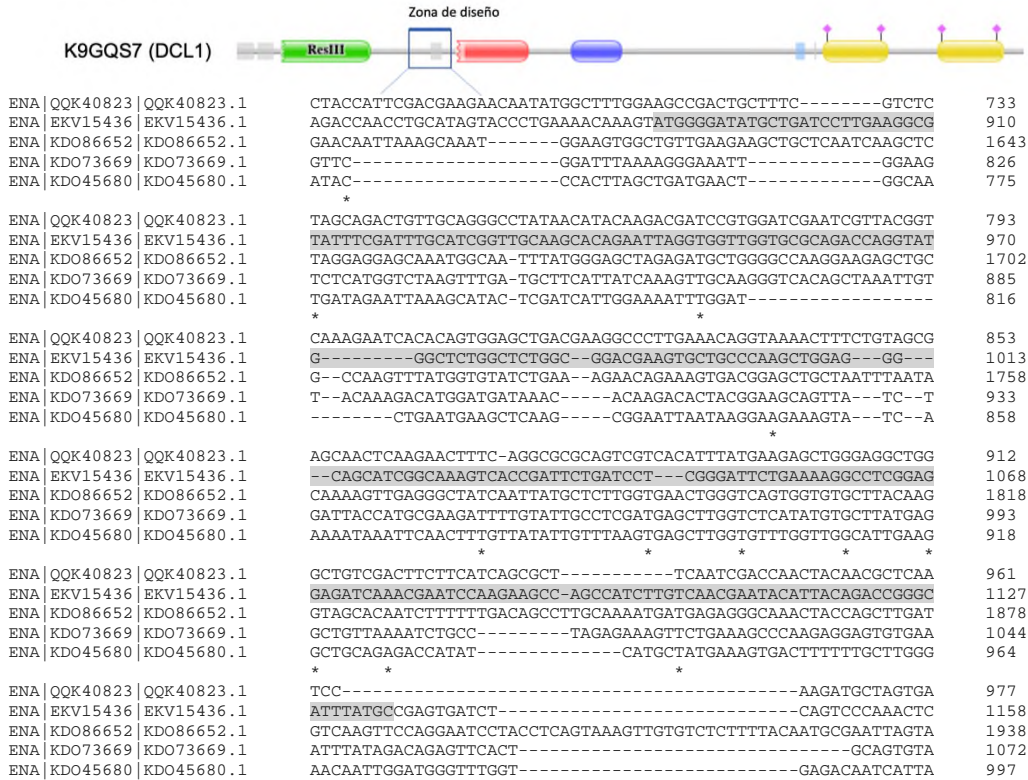
Fusarium oxysporum DCL2



Figura 34. Región para el diseño de RNAi en DCL2 de *Fusarium oxysporum*. Se muestra la estructura y la localización de la región de diseño. En gris se muestra la secuencia correspondiente. KNB08093.1 y KNB15153.1 son las secuencias de DCL1 y DCL2 de *F. oxysporum*, respectivamente. El resto son los DCL de *Ananas comosus*.

Cabe señalar que para el caso de *Penicillium digitatum*, la selección de construcción para la síntesis de RNAi se llevó a cabo previamente en el grupo de trabajo (Santiago-Tapia, 2019), pero se muestra en la Figura 35 para fines informativos.

Penicillium digitatum



Penicillium digitatum



Figura 35. Regiones para el diseño de RNAi en DCL1 y DCL2 de *Penicillium digitatum*. Se muestra la estructura y la localización de la región de diseño. En gris se muestra la secuencia correspondiente. EKV15436.1 y QKK40823.1 son las secuencias de DCL1 y DCL2 de *P. digitatum*, respectivamente. El resto son los DCL de *Ananas comosus*.

6.9 Generación de construcciones para la producción de RNAi

La síntesis de RNAi *in vitro* requiere la actividad de la RNA polimerasa y de la presencia del promotor T7. Para tal efecto, como se especifica en la sección de Materiales y Métodos, las regiones de diseño seleccionadas se amplificaron con oligonucleótidos específicos (Tabla 7). En el caso de patógenos de los cuales se identificaron 2 DCLs, éstos se amplificaron de forma independiente y después se fusionaron mediante una reacción de PCR de fusión (Tabla 8). Posteriormente, una vez obtenidas las fusiones, se anexaron las secuencias del promotor T7 en cada extremo del producto de fusión (Tabla 8). Para patógenos con un solo DCL identificado, la región seleccionada se amplificó y se agregó el promotor T7 por PCR.

En las Figuras 36, 37 y 38 se muestran los resultados de la amplificación de los DCLs con oligos específicos, los productos de fusión (en su caso) y la adición de secuencias T7 en los extremos de los fragmentos amplificados para los hongos patógenos *Phytophthora nicotianae*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente. Para *P. nicotianae*, se obtuvo el producto primario de amplificación a partir de la zona de diseño seleccionada (Figuras 29 y 32), con un peso molecular de 414 pb (Figura 36, carril DCL1Pni). Después de la adición del promotor T7 en ambos extremos, se obtuvo un producto de PCR de 460 pb (Figura 36, carril DCL1Pni+T7).

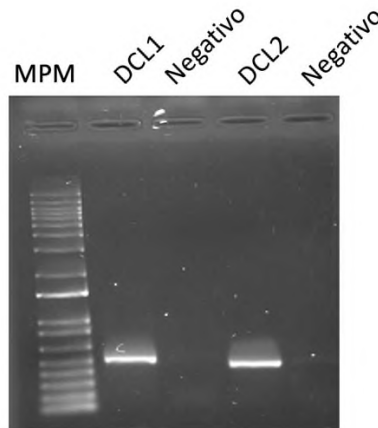


Figura 36. Electroforesis de productos de PCR obtenidos de amplificar la región seleccionada en *Phytophthora nicotianae* para la síntesis de RNAi (carril DCL1 Pni; 414 pb), y del producto adicionado con secuencias del promotor T7 (Carril DCL1 Pni +T7; 460 pb). Se puede observar el aumento del peso molecular del producto DCL1 Pni + T7 en 46 pb debida a la adición de las secuencias T7. MPM: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder. Negativo: Control negativo de la reacción.

Para el caso de los hongos *Lasioidiplodia theobromae* y *Fusarium oxysporum* se realizó una construcción quimérica, ya que para ambos hongos se encontraron secuencias anotadas como DCL1 y DCL2. Esta construcción permitió la unión en tándem de las dos regiones seleccionadas para ambos DCLs, lo que hace posible la síntesis del RNAi en una sola reacción. Brevemente, al igual que todos los productos de PCR, éstos fueron amplificados a partir de DNAg y purificados para eliminar oligonucleótidos residuales. Con estos productos se realizó una reacción de PCR para incorporar los oligos complementarios. Después se realizó una *overlapping* o PCR de fusión para la unión de los DCLs por complementariedad, y por último se realizó una PCR final para la unión del producto a los oligos T7 usando los oligonucleótidos unidos al promotor T7.

En el caso de *Lasioidiplodia theobromae*, los productos de las regiones seleccionadas para la amplificación fueron de 326 y 304 pb para DCL1 y DCL2, respectivamente (Figura 37; carriles DCL1 y DCL2). Los productos con oligos complementarios incorporados incrementaron su tamaño en 18-21 pb (Figura. 37; carriles DCL1+comp y DCL2+comp). Después de la incubación para promover la complementación de los extremos en ambos fragmentos, y de realizar la PCR de fusión, se obtuvo un producto de 630 pb (Figura 37; carril Unión DCLs) para finalmente obtener un producto de 676 pb al agregar los promotores T7 a los extremos de la molécula (Figura 37; carril Unión DCLs+T7).

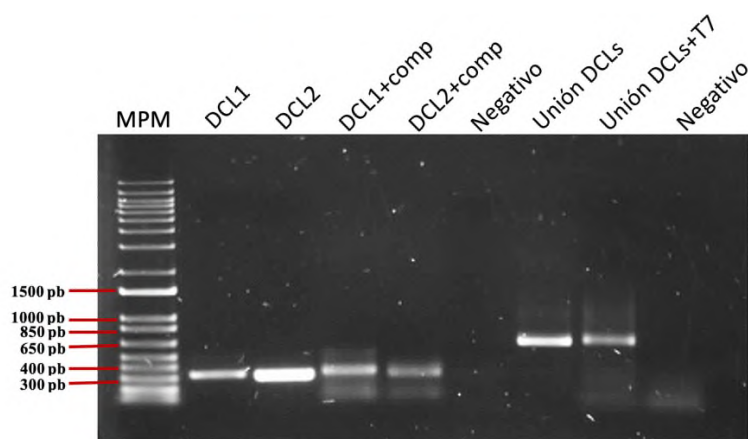


Figura 37. Electroforesis de productos de PCR de amplificación de las regiones seleccionadas en *Lasioidiplodia theobromae* para la síntesis de RNAi (carril DCL1: 326 pb. Carril DCL2: 304 pb), de los productos adicionados con secuencias complementarias, del producto de fusión (carril Unión DCLs: 630 pb) y de la incorporación de secuencias del promotor T7 (Carril Unión DCLs+T7; 676 pb). MPM: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder. Negativo: Control negativo de la reacción.

En el caso de *Fusarium oxysporum*, los productos de las regiones seleccionadas para la amplificación fueron de 300 y 313 pb para DCL1 y DCL2, respectivamente (Figura 38; carriles DCL1 y DCL2). El producto de fusión resultó en 613 pb, como se esperaba (Figura. 38; carril Unión DCLs). Finalmente se obtuvo un producto de 159 pb al agregar los promotores T7 a los extremos de la molécula (Figura 38; carril Unión DCLs+T7).

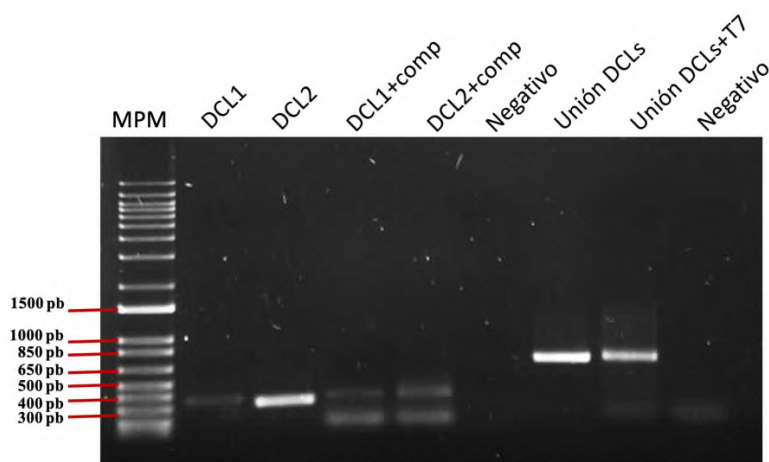


Figura 38. Electroforesis de productos de PCR de amplificación de las regiones seleccionadas en *Fusarium oxysporum* para la síntesis de RNAi (carril DCL1: 300 pb. Carril DCL2: 313 pb), de los productos adicionados con secuencias complementarias, del producto de fusión (carril Unión DCLs: 613 pb) y de la incorporación de secuencias del promotor T7 (Carril Unión DCLs+T7; 659 pb). MPM: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder. Negativo: Control negativo de la reacción.

Cabe señalar que para el caso de *Penicillium digitatum*, la construcción de la fusión DCL1-DCL2 y la adición del promotor T7 se llevó a cabo previamente en el grupo de trabajo (Santiago-Tapia, 2019).

Después de obtener los productos finales esperados, éstos se purificaron y se emplearon en reacciones de ligación con el vector PGEM T Easy y posteriormente se transfirieron a *E.coli*. Las colonias individuales transformadas de *E. coli* (Figura 39) se seleccionaron y se procedió a la extracción de DNA plasmídico.

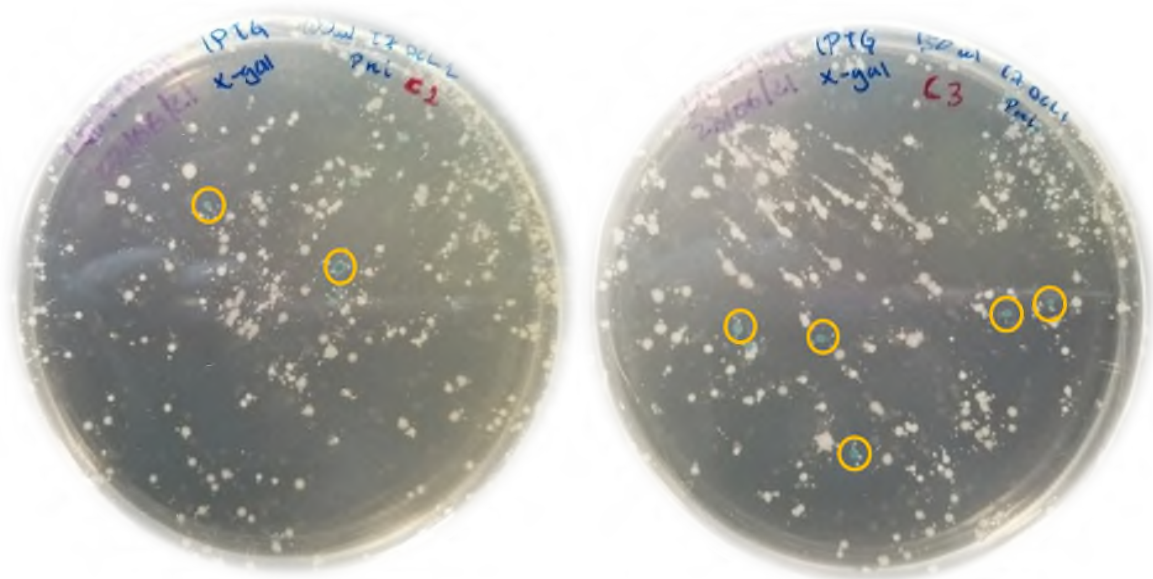


Figura 39. Crecimiento de colonias blancas (transformadas) y azules (no transformadas, círculo amarillo) en medio LB suplementado con ampicilina.

6.9.1 Escrutinio de plásmidos

Después obtener células transformadas se extrajo el plásmido mediante lisis alcalina como se describe en el Anexo VI. El DNA plasmídico fue empleado como molde en reacciones de PCR con los oligos unidos al promotor T7. De esta manera se verificó que el inserto estuviera en el plásmido. Como se puede observar en la Figura 40, todas las colonias seleccionadas de la transformación con DCL de *Phytophthora nicotianae* resultaron exitosas ya que todos los plásmidos poseen el inserto de interés de 414 pb.

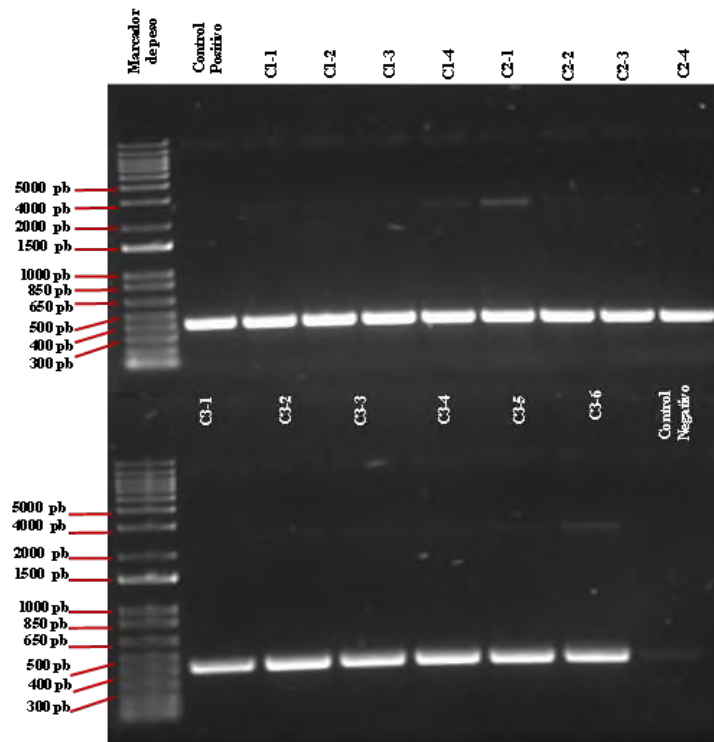


Figura 40. Amplificación de regiones esperadas de 414 pb a partir de los plásmidos extraídos de las colonias transformadas con el inserto de interés de *P. nicotianae*.

Para el caso de de las células transformadas con los insertos de interés para el patógeno *Lasidiopodia theobromae* se aislaron 6 colonias. Todas resultaron positivas, con un inserto en el tamaño esperado de 676 pb (Figura 41).

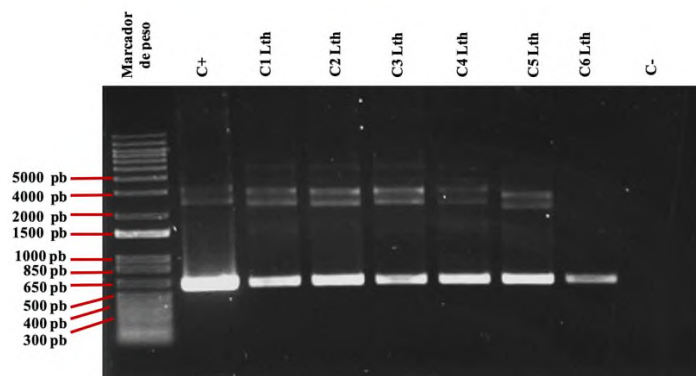


Figura 41. Amplificación de regiones esperadas de 676 pb en los plásmidos extraídos de las colonias transformadas con el inserto de interés de *L. theobromae*.

Para el caso de *Fusarium oxysporum* se aislaron un total de 5 colonias, todas positivas al amplificar las regiones de interés con el peso esperado de 659 pb (Figura 42).

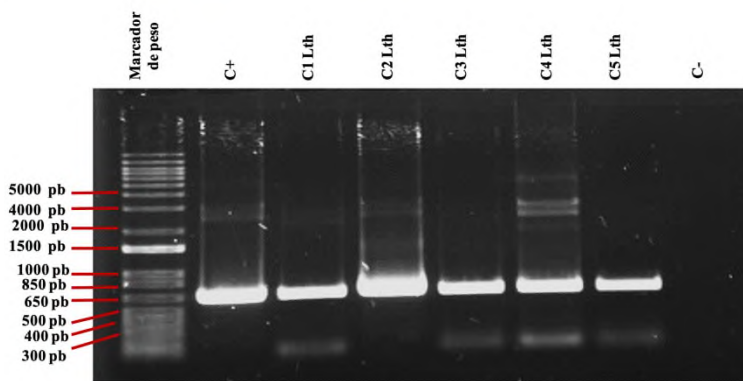


Figura 42. Amplificación de regiones esperadas de 659 pb en los plásmidos extraídos de las colonias transformadas con el inserto de interés de *F. oxysporum*.

6.9.2 Secuenciación y análisis de las construcciones

Después de verificar la amplificación de las regiones de interés clonadas en el vector para cada uno de los patógenos, los plásmidos se purificaron y se enviaron a secuenciar en ambas direcciones mediante secuenciación capilar de Sanger. Una vez obtenidos los electroferogramas de la secuenciación se procedió a verificar la existencia de las secuencias de interés unidas al promotor T7.

Como puede observarse en la Figura 43, para *Phytophthora nicotianae* la región enviada a secuenciar contenía la región de interés, sin embargo, se detectaron diferencias en un par de bases. Esta diferencia es consistente en las secuencias obtenidas desde ambos extremos del vector, por lo que se concluye que son diferencias reales. Por otra parte, la clonación fue eficiente y la construcción reúne las características necesarias para emplearse como molde en la producción de RNAi.

```

>DCL+ T7 Pni F secuenciación
GGGCGACTATATAGGGCGATTGGGCCCACGTCGCATGCTCCCGGCCGCATGGCGGCCGGGAATTGG
ATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATCAAAGCAACCACCAACGCTGTCATTAGACTGGGACTATGTTCCG
TGAGATCATCGGGAAGCCTTTGCTTGAGCCTTTGTGGCCATTCCCGACTACGGGTGCTACTGGGAATGCA
AAGGATCCAACCGACGAGTGGATCTGCGTCCGACGATCGCTTAAATGTCAGCTATGTCGTCGAGGCTG
TCACCTAATCGCACGGTGGATGATATTGCAAAGAGTATTTGGCAGACGAACAAGCGTGGGCGACTCACTT
GAAAAAGGGAAAGTCGACCCAGGAAATCCGATCCTGGGTGCTTGGCAAACCCGTCACAGCTCGAGGAA
GCCGACGAGATCAACCATTGATCCATGGCATCCAAGTTCCTCCGATCGTCCCATCATTCGGAGAGTCA
TGCAGCGCAACAATGACGAACTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTG

T7 Forward: TAATACGACTCACTATAGGGAGA
T7R reverse: TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA

```

```

>DCL1 Pni región de interés esperada, de acuerdo a la secuencia
anotada en la base de datos
TAATACGACTCACTATAGGGAGATCAAAGCAACCACCAACGCTGTCATTAGACTGGGACTATGTTCCGTGA
GATCATCGGGAAGCCTTTGCTTGAGCCTTTGTGGCCATTCCCGACTACGGGTGCTACTGGGAATGCAAAG
GATCCAACCGACGAGTGGATCTGCGTCCGACGATCGCTTAAATGTCAGCTATGTCGTCGAGGCTGTCA
CTAATCGCACGGTGGATGATATTGCAAAGAGTATTTGGCAGACGAACAAGCGTGGGCGACTCACTTGAA
AAAGGGAAAGTCGACCCAGGAAATCCGATCCTGGGTGCTTGGCAAACCCGTCACAGCTCGAGGAAAGCC
GACCGAGATCAACCATTGATCCATGGCATCCAAGTTCCTCCGATCGTCCCATCATTCGGAGAGTCAATGC
AGGCAACAATGACGAACTCCCTATAGTGAGTCGTATTA

```

Figura 43. Análisis de secuencia de la construcción para la síntesis de RNAi de *Phytophthora nicotianae*. Comparación de la secuencia amplificada en este trabajo con la secuencia de DCL anotada en bases de datos para DCL1 de *Phytophthora nicotianae*. La secuencia de DCL se muestra en color verde oscuro. Las bases diferentes se muestran en color rojo.

En el caso de *Lasidiopodia theobromae*, la construcción contiene las dos regiones de interés seleccionadas para DCL1 y DCL2 (Figura 44) sin haberse encontrado algún cambio de bases. En cuanto a la incorporación de las secuencias T7, se observa que únicamente se logró la unión del promotor en el extremo que corresponde a DCL2. Posiblemente este producto se enriqueció por una purificación deficiente del producto de PCR previo, ya que pudo haber acarreado oligonucleótidos específicos que carecen del promotor T7 y que se utilizan en la síntesis de los productos de PCR primarios. Estos oligonucleótidos residuales son más pequeños que los que contienen al promotor T7, y por tal se unen preferencialmente a los sitios en el ADN molde, enriqueciéndose durante la reacción de PCR.

```

>Lth Forward secuenciación
CTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTGTGATTCCAGAAATATTCGGAATGACAGCCTCGCCGGTGGATGCAAAGG
FGGACGTTGCTCAAGCCGCTAGTGATCTCGAAGCACCTTACATTGCCGCA TCGCAACCACCTCAAACCTGGA
CCTATTGCGCAAGACAATCAGTCGCCGGACGAGAACGTGGTGATA TACGC TCCACTTGAGAAAGCCGTTTCGAG
ACACCCGCTGCACATCAAGATGAAAGAGAAAGTTGCCGACATGGAAGCATTCCGCACCTCTCTTCAGTCTTCCA
AAGAGGCAAGCTCTCAGCTCGGTGCATGGTGTCTGGACATGTTCTGGTTTTATGCTCTCCAGGGCCTGAGCT
TGTGCAGTTAAAT TACCCTGGTCAATATTTAGACCCCTCTGCCGGGCCACCAGTCCTTGCTGCTCTGGCTAAC
GTCTATCACCGGTACGACATCTGGAGGATCCATACATCCTTAGTCTGCGTAAAAAAGCATCAGAGACCACGG
ATGAGACCCGGGACCAAGCTTAAGAGAGCTGGAGAAGCTGCTACACAATAGAAAGACATATATCCACGAGCA
GCTGAAGAAGCTCTACTCGCGAGCGCTCGGTATCTATAATGAGCTTGGTGGACCTCCAACAGAGTTCTACATC
CGTCTCCCTATAGTGAGTCTATTAAATCGAATTCGCCGGCCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGG

Región DCL1
Región DCL2
T7 reverse

```

Figura 44. Análisis de secuencia de la construcción para la síntesis de RNAi de *Lasiodiplodia theobromae*. Se observa la ausencia del promotor T7 en el extremo de DCL1.

Para el caso de la construcción realizada a partir de los DCLs del patógeno *Fusarium oxysporum* se observó una inserción no esperada en DCL1, marcada con letras rojas en la Fig. 45 que probablemente se trate de un intrón. Además se encontraron varios cambios de bases a lo largo de la construcción, y sucedió algo similar a lo observado en la construcción de *Lasiodiplodia theobromae*. Como se puede observar en la Figura 46 se logró fusionar los dos insertos de interés para DCL1 y DCL2. De igual forma se incorporó al promotor T7 en el extremo de DCL1, sin embargo la construcción carece de la secuencia del promotor T7 en el extremo de DCL2.

```

>Fox Forward secuenciación
TTTAATACGACTCACTATAGGGAGACGCCTCGAGAATACCAGATTGAACTGTTTCGAGCGCCTAAAGAGAGAAA
CCTCCTTGTTGGTGTGCCTACAGGTA TGTTCGCTACCAATCTGGAGGCTCGCTAATAGAGTAGGTA CTGGCAA
AACACTCATCTCCGCCTTGCTACTACGACATCACCTCGAACAAGAGCTGGAAGCTCGAGCCATCGGAAAGCCCA
AGAAAAGTCGCCTTTTTCCTAGTAGAAAAGGTCGCCCTCTGTGTTTCAGCAACATGCAGTCTCAGCTGCAACCTC
GCAGCCCAACCAGTCAACCAAGTTCGTGGCCATATGAAAGGAATGACAAGACCAAAGAATACTGGGATGTGGA
CGCTATCTGCGTTACTC CAACCACTCATCGAGAGCAACTACTCAAGCATGTCAACAAGCCTCACCTCATTGCT
CACTCTACGATGCTACGAAGATACCTCCCGTACGCCACTGATGCAACAAC TGCAATCAGAATACTCGAACATG
GATATCGCAAAGGATCCTGAGGTTCTTAAGTTAAAAGCTCTTGTCGCTAATGATGATA GAAGCGGAAAAGTTA
ATGAACGTGATTATGAAGCACGACAGCTTCTCGCAACAGCAAATCAGAGGCCCTCTGGAACAAGAGTAGAGAAAT
CCTTGCCGAAC TAATCACTAGTGAATTCGCCGGCCCTGCGAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCC

T7 directo
Región DCL1
Región DCL2

```

Figura 45. Análisis de secuencia de la construcción para la síntesis de RNAi de *Fusarium oxysporum*. Se observa la ausencia del promotor T7 en el extremo de DCL1. En rojo se muestran las bases adicionales o que sufrieron cambios en la secuencia obtenida experimentalmente.

A pesar de que no se obtuvieron las construcciones completas para ambos patógenos, *L. theobromae* y *F. oxysporum*, puesto que carecen de uno de los promotores T7, la fusión de los DCLs se logró con éxito. Para agregar el promotor faltante se pueden emplear como molde los plásmidos que contienen la construcción, y usar el oligonucleótido directo que contiene a T7 en la reacción. Haciendo uso de este proceso se podrán obtener con facilidad construcciones que contengan los dos promotores T7 y que servirán de base para la síntesis de RNAi *in vitro*.

6.10 Producción del biofungicida de RNAi

Para la evaluación de los RNAi como control de hongos fitopatógenos, se seleccionó a *Penicillium digitatum*, puesto que se contaba con una construcción de fusión de DCL1 y DCL2, con secuencias T7 a los extremos, y por lo tanto apta para la síntesis de RNAi (Santiago-Tapia, 2019). Además, *P. digitatum* es un hongo de fácil cultivo y rápida esporulación, condiciones que facilitan los bioensayos de actividad (Qian *et al.*, 2019).

Para esto se procedió con la síntesis de RNAs usando el molde previamente diseñado y construido del ensamblado de las regiones seleccionadas de los genes DCL1 Y DCL2 de *Penicillium digitatum* (Santiago-Tapia, 2019). Para la síntesis se utilizó el kit MEGAScript RNAi (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se logró la síntesis de aproximadamente 100 μ L de dsRNAs largos (ldsRNAs), de los cuales se midió la concentración en un Nanodrop (2000). Posteriormente, partiendo de la concentración obtenida de ldsRNAs, se utilizaron 10 μ g en una reacción para la producción de sdsRNAs de ~22-24 pb, empleando la enzima ShortCut RNase III (New England Biolabs). Después de la reacción se recuperó un aproximado de 35 μ L, se determinó su concentración en nanodrop y se corroboró la presencia de los productos en un gel de agarosa al 2%, los cuales se encuentran íntegros y en el tamaño esperado (Fig. 46).

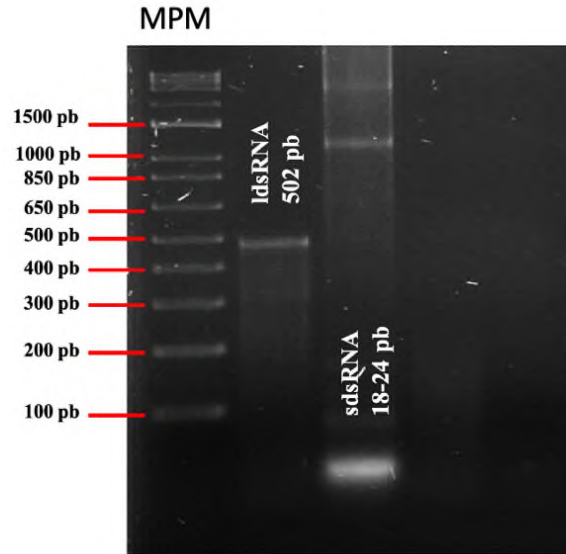


Figura 46. Electroforesis de agarosa a 2 % de los productos de la síntesis de RNAs de doble cadena largos (ldsRNA) y de RNAs de doble cadena cortos (sdsRNA) obtenidos a partir de las construcciones de DCL.

6.11 Ensayos de actividad fungicida

6.11.1 Condiciones para el crecimiento de *P. digitatum*

Para evaluar el efecto fungicida de los dsRNAs obtenidos, se establecieron experimentos preliminares para identificar las condiciones adecuadas para el establecimiento de los bioensayos. Para esto se partió de suspensiones de esporas de *Penicillium digitatum* y se realizaron resiembras en medio sólido. Se determinó el tiempo adecuado de incubación y temperaturas óptimas de crecimiento. Para las condiciones del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Papaloapan, se registró un tiempo de incubación del inóculo inicial entre los 10 y 12 días como tiempo adecuado para la germinación de las esporas a una temperatura óptima de crecimiento de 25 °C.

6.11.2 Conteo de esporas de *P. digitatum*

Para determinar las concentraciones de esporas de *P. digitatum* se realizaron diluciones y se contabilizaron las esporas en hematócitos. La dilución de la que se obtuvo un número de esporas adecuado para el conteo al microscopio fue la dilución 1:100 (Figura 47).

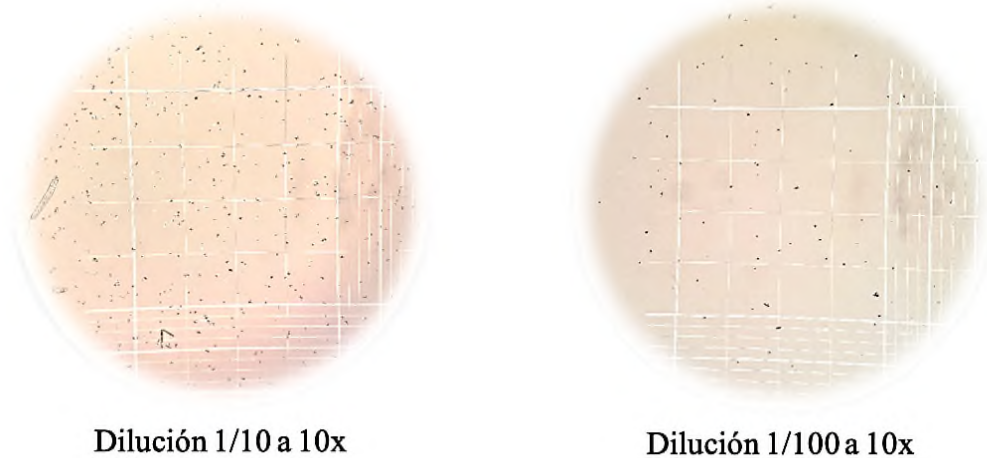


Figura 47. Conteo de esporas a diferentes diluciones. La dilución 1:100 permitió un mejor conteo en un rango de 10 a 50 esporas por cuadrícula.

Los resultados mostraron que la mejor concentración que permitió un número adecuado de esporas para un fácil conteo en cajas fue de 5×10^3 e/mL, dando un rango de 50 a 100 esporas por caja, mientras que la concentración de 5×10^5 e/mL dificultó el conteo ya que germinaron más de 5000 esporas por caja (Figura 48). Una vez que se estandarizó la concentración adecuada para el conteo, se procedió al establecimiento de los bioensayos.

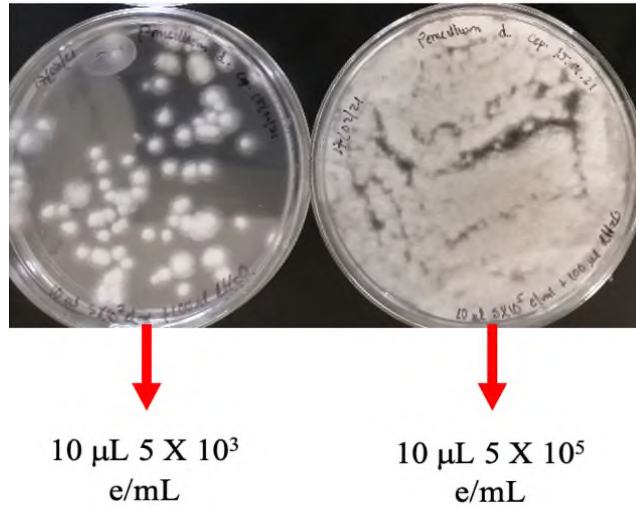


Figura 48. Densidad de esporas germinadas de *Penicillium digitatum* a diferentes concentraciones de siembra.

6.11.3 Inhibición de la viabilidad de esporas

Una vez que se estandarizó la concentración adecuada de inóculo para el conteo, se procedió al establecimiento de los bioensayos, como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Las esporas se trataron con los RNAs largos o cortos durante 24 h. Al término, las muestras se plaquearon en cajas con medio PDA sólido.

A continuación se muestran los resultados expresados en porcentaje de inhibición de la germinación obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes con dsRNAs largos (Tabla 18) y dsRNA cortos (Tabla 19).

Tabla 18. Efecto de los RNAs largos (ldsRNAs) en la germinación de esporas de *P. digitatum*.

NÚMERO DE COLONIAS Y PORCENTAJE DE INHIBICIÓN						
TUBOS	CAJAS	CONTROL (0 µg)	1 µg	0.5 µg	0.25 µg	0.125 µg
1	1	27	39	11	14	0
2	1	27	6	10	39	11
3	1	40	20	10	10	30
1	1	46	32	18	16	7
2	1	39	15	4	5	6
3	1	42	26	14	14	6
1	1	127	58	46	50	41
2	1	100	39	33	24	30
3	1	127	50	34	36	18
MEDIANA		42	32	14	16	11
X̄ TOTAL CONTROL		58.44				
% INHIBICIÓN			36	72	68	78

Tabla 19. Efecto de los RNAs cortos (sdsRNAs) en la germinación de esporas de *P. digitatum*.

NÚMERO DE COLONIAS Y PORCENTAJE DE INHIBICIÓN						
TUBOS	CAJAS	CONTROL(0 µg)	1 µg	0.5 µg	0.25 µg	0.125 µg
1	1	27	9	13	18	22
2	1	27	8	13	6	1
3	1	40	7	13	14	6
1	1	92	9	5	7	7
2	1	49	5	3	3	4
3	1	56	5	2	6	2
1	1	73	35	44	43	48
2	1	56	12	19	19	17
3	1	57	29	13	22	21
MEDIANA		56	9	13	14	7
X̄ TOTAL CONTROL		58.44				
% INHIBICIÓN			82	74	72	86

Con la prueba de comparación de medias se puede observar que la media global de germinación de esporas para los RNAs largos es igual a 22.83, en contraparte con la media global para los RNAs cortos, que es igual a 14.16 esporas, siendo estas últimas los que tienen un efecto más significativo en la germinación (Figura 49). Mumbanza *et al.*, 2013, reportan que para *Mycosphaerella fijiensis* y *Fusarium oxysporum*, obtuvieron desde 11.8 hasta 28 esporas germinadas para *M. fijiensis* y 61.07 a 102.5 esporas para *F. oxysporum*. A pesar de ser diferentes hongos los reportados, los números de esporas germinadas para *P. digitatum* caen en el rango de lo reportado con 7 a 48 esporas germinadas.

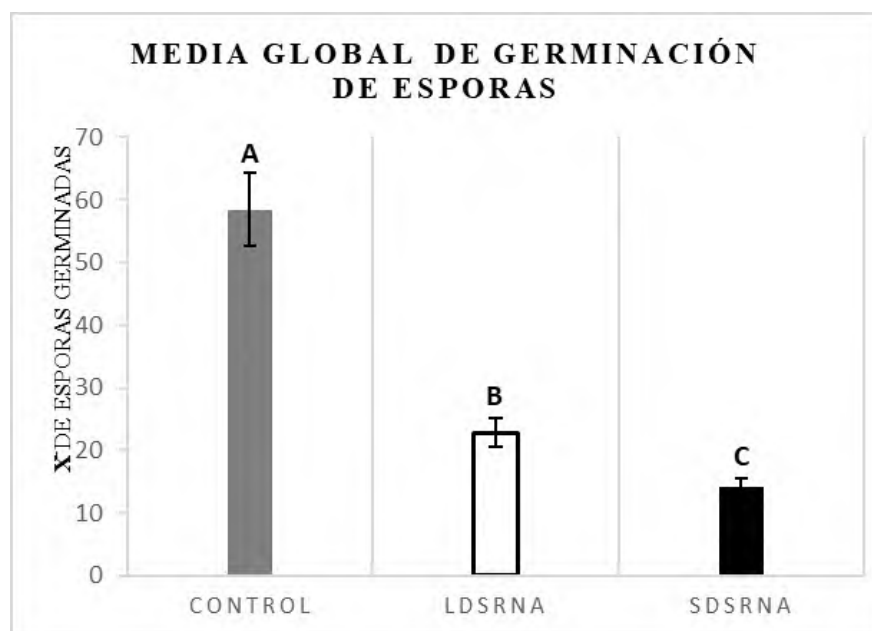


Figura 49. Diferencia de medias de germinación de esporas por tipo de RNA utilizado en los tratamientos ($p < 0.05$).

Mumbanza *et al.*, 2013 determinaron el efecto de los RNAi largos (ldsRNAs) en la germinación de esporas de hongos fitopatógenos, pero no trabajó con RNAi cortos (sdsRNAs). No se conoce otro trabajo en el que se hayan echo estudios en la germinación de esporas *in vitro* usando ambos tipos de RNAi como el realizado en este trabajo en el que se probó el efecto tanto de RNAi largos (ldsRNA) y cortos (sdsRNAs).

Para determinar las concentraciones de dsRNAs que tienen efecto significativo en la germinación de las esporas de *Penicillium digitatum* se realizó un análisis de varianza de dos vías a los resultados de la aplicación de las diferentes concentraciones de los RNAs.

Como resultado se encontró que los datos no provienen de una población con distribución normal, por lo que se decidió ajustar los datos utilizando la transformación de Johnson, la cual está diseñada para el ajuste de una matriz de datos que incluyen el 0 y números negativos (Minitab Support, 2018). Al realizar el reanálisis se encontraron diferencias significativas entre las medias de los RNAs y de las concentraciones con un $p < 0.05$, lo cual fue corroborado con la prueba de Tukey y la prueba de LSD de Fisher, donde para una mejor representación de los datos debido al ajuste se grafican las medianas para cada tratamiento (Anexo VII).

En la figura 50, se puede observar que las medianas más bajas de germinación de esporas se encuentran en los tratamientos en donde se utilizó 1 y 0.125 μg de sdsRNAs con valores de 9 y 7 esporas germinadas respectivamente, no obstante, se puede observar una uniformidad en las esporas germinadas tratadas con sdsRNAs.

La mayoría de los trabajos realizados hasta el momento muestran que existe un silenciamiento significativo al momento de usar ambos tipos de RNAi sobre el tejido del organismo huésped (Wang *et al*, 2016; Koch *et al*, 2017; Koch *et al*, 2018 y Song *et al*, 2018), sin embargo, no se explica el efecto de específicos de los RNAs pequeños. En este estudio se observó un mayor efecto de RNAi pequeños (sdsRNA), así mismo, no se logró ver un efecto significativo al aplicar concentraciones altas de RNAi largos (ldsRNA), muy posiblemente debido a la saturación de complejo DICER (McLoughlin *et al*, 2017) incapaz de procesar la cantidad de RNAi aplicada.

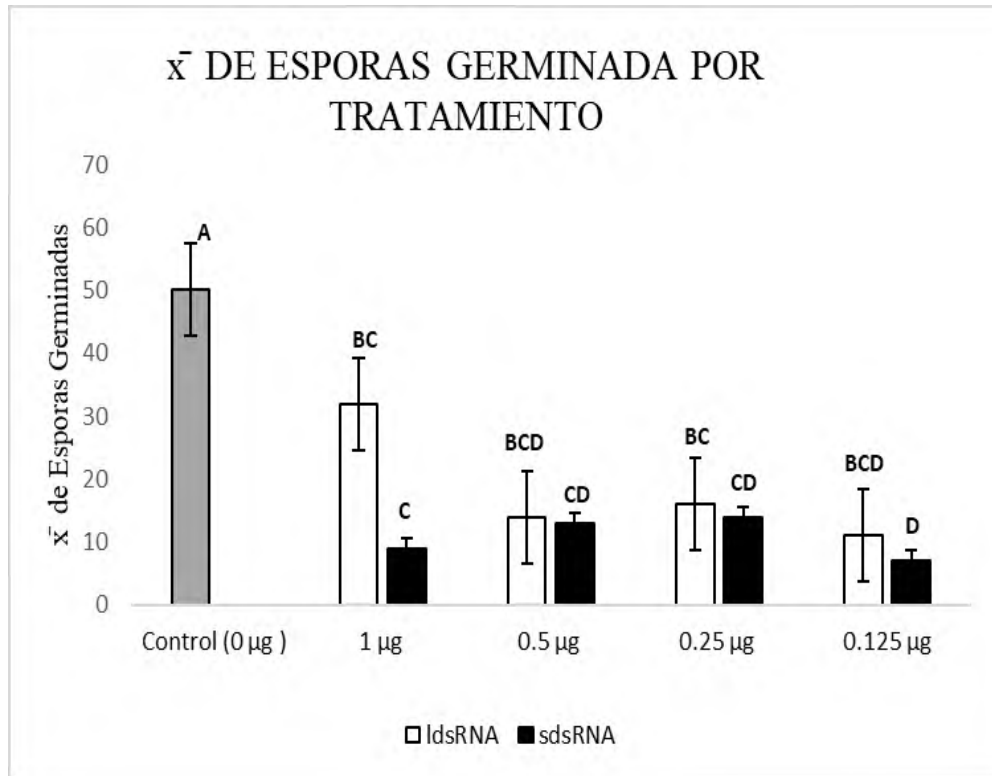


Figura 50. Efecto de la concentración de RNAi en la germinación de esporas. Las concentraciones de dsRNAs con el mayor efecto inhibitorio de la germinación corresponden a tratamientos de 125 ng/µl de ldsRNA, 250 ng/µl y 500 ng/µl de sdsRNA ($p < 0.05$).

Recientemente se ha demostrado que los ldsRNA al ser absorbidos por el huésped o patógeno son procesados parcialmente por las enzimas DICER propias de los organismos escindiéndolos en sdsRNA (Koch *et al*, 2016), lo cual al parecer incrementa la eficiencia del mecanismo de silenciamiento. En este caso, al ser un estudio estrictamente *in vitro* la maquinaria DICER del hongo podría no ser capaz por sí solo de procesar una concentración alta de ldsRNA, haciendo que el efecto no sea significativo, ya que para concentraciones de 1 µg /µl, solo se logró un 36.28% de inhibición (Figura 51). El caso contrario se obtuvo al usar una concentración menor de ldsRNAs como se observa en la Figura. 51, donde conforme disminuye la concentración de ldsRNA se incrementa el efecto de inhibición, pasando de 36.28 % a 72.12 % al reducir a la mitad la concentración de ldsRNA aplicado (500 ng/µl), obteniéndose un mejor porcentaje de inhibición a la concentración mas baja con 125 ng/µl con un 78.09 % de inhibición.

Esto sugiere que la capacidad de las enzimas DICER para el procesamiento de ldsRNA es limitada, y en los experimentos realizados en este trabajo se muestra claramente que a concentraciones bajas los RNAs son procesados eficientemente y posiblemente escindidos a sdsRNA, siendo estos últimos los que finalmente tienen efecto silenciador, como se describe a continuación.

En el caso de los sdsRNA aplicados directamente, ocurre un comportamiento completamente diferente a lo observado con los ldsRNAs, ya que todas las concentraciones evaluadas tuvieron un efecto significativo en la inhibición de la germinación de esporas de *P. digitatum*. La concentración más alta de 1 µg/µl mostró una inhibición del 82.07 %, la cual se mantuvo al disminuir la concentración, con 74.11 % de inhibición a 0.5 µg/µl, seguido de 72.12 % a 0.250 µg/µl e incrementándose con la concentración más baja 0.125 µg/µl con 86.06 % de inhibición. Kotch *et al*, 2016 y Wang *et al*, 2016 mostraron experimentalmente que los ldsRNAs y sdsRNAs sintetizados artificialmente son absorbidos por las plantas y se acumulan dentro de ésta. Parte de estos dsRNAs son transportados por el sistema vascular, siendo los ldsRNAs parcialmente procesados por la enzima DICER de la planta o en su caso del patógeno, pero los sdsRNAs se quedan intactos esperando ser transportados al patógeno donde ocurrirá el fenómeno de interferencia de RNA y por tanto el silenciamiento génico.

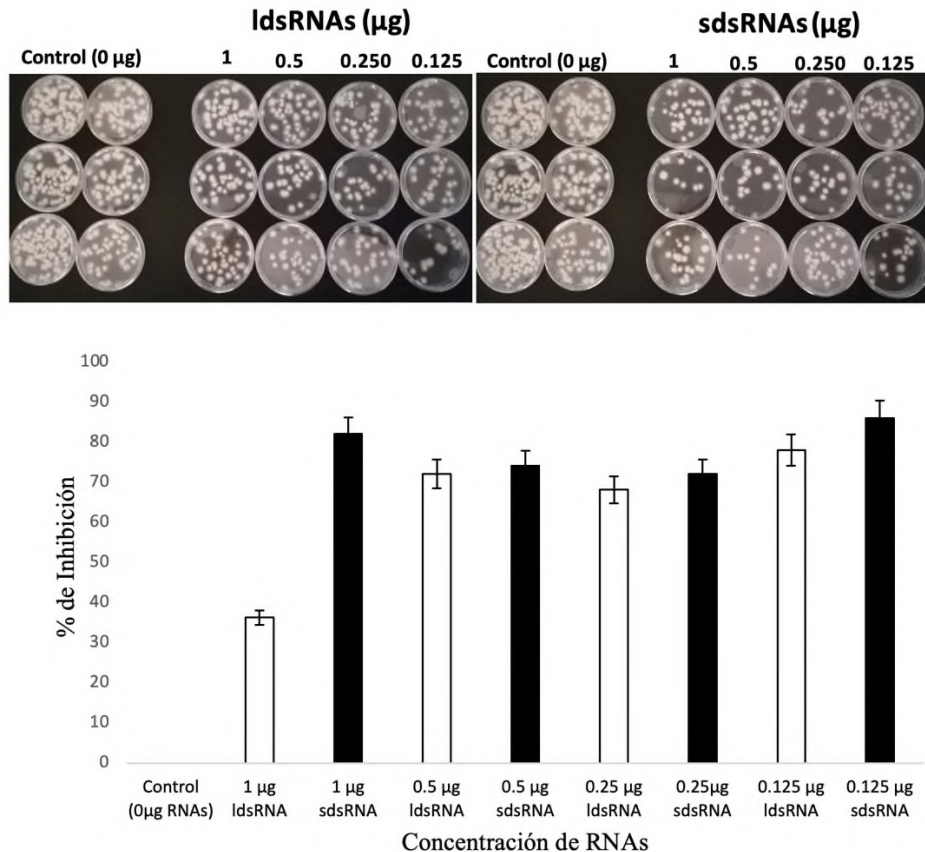


Figura 51. Representación gráfica del efecto inhibitorio de ldsRNAs y sdsRNAs sobre la germinación de esporas *in vitro*. En la gráfica inferior se muestra el porcentaje de inhibición. El mayor efecto ocurre a concentraciones de sdsRNA de 1 µg y 0.125 µg, con 82 % y 86 %, respectivamente.

Este mismo mecanismo podría ocurrir en las pruebas de germinación de esporas *in vitro* con los resultados antes mostrados, donde se hipotetiza que los sdsRNAs una vez introducidos en las esporas empiezan a silenciar la traducción del RNAm del DCL del patógeno. Por otra parte, los ldsRNA, al ser largos, deben ser digeridos por una enzima DICER para escindirlos a sdsRNA y estos finalmente actúan para silenciar el gen. Se han documentado algunos casos en que los insectos y nemátodos solo son capaces de absorber RNAi de mas 50-60 pb o superiores cuando se aplican como alimento (Bolognesi *et al.*, 2012). Además de ésto, existen evidencias que indican la importancia de diversos factores, además de la longitud de los dsRNAs, tales como la selección de la región de diseño de los dsRNAs y la concentración aplicada (Joga *et al.*, 2016). Para el caso de hongos, se ha demostrado que una gran mayoría absorben los dos diferentes tipos de RNAi exitosamente cuando se aplican en aspersión, lo

cual es una ventaja para el uso de RNAi como control de hongos fitopatógenos (Wang *et al*, 2016).

En cuanto al rango de concentraciones que tienen un mejor efecto sobre la germinación, se ha demostrado experimentalmente *in vivo* e *in vitro*, que se alcanzan efectos significativos de silenciamiento usando desde 20 ng de ldsRNA o sdsRNA (Wang *et al*, 2016) hasta concentraciones de 2 µg (Koch *et al*, 2018). En el presente estudio las concentraciones en las que se obtuvieron mejores resultados fueron de 125 ng/ µl de ldsRNA y de 125 ng/ µl, hasta 1000 ng/µl de sdsRNA, lo cual concide con lo reportado por Mumbanza *et al*, 2013, quienes aplicaron concentraciones de 600 ng/µl en los bioensayos *in vitro* con los hongos *Fusarium oxysporum* y *Mycosphaerella fijiensis*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que bajo las condiciones experimentales empleadas, los sdsRNA son más efectivos que los ldsRNAs en inhibir la germinación de esporas de *P. digitatum*, y que la actividad biofungicida alcanza un límite máximo que no es posible superar incrementando la concentración de los sdsRNAs.

6.12 Ensayo de silenciamiento de la expresión de DCL

El análisis de silenciamiento génico requiere el empleo de técnicas sensibles y de carácter cuantitativo que permitan determinar la expresión de los genes de interés. Para este tipo de análisis, la técnica ideal es la PCR cuantitativa (qPCR), también llamada PCR en tiempo real (Wong & Medrano, 2018).

Para el análisis de expresión de los DCLs en *Penicillium digitatum* se extrajo RNA de micelio fúngico incubado con 1 µL de sdsRNA (RNAi cortos) por 72 horas en caldo Papa-Extrosa (PD) y posteriormente se sintetizó cDNA a partir de RNA obtenido. Se verificó la integridad del RNA mediante un gel desnaturizante con agarosa al 1% (Figura 52) y posteriormente se realizó una PCR para verificar la ausencia de DNA genómico (Figura 53).

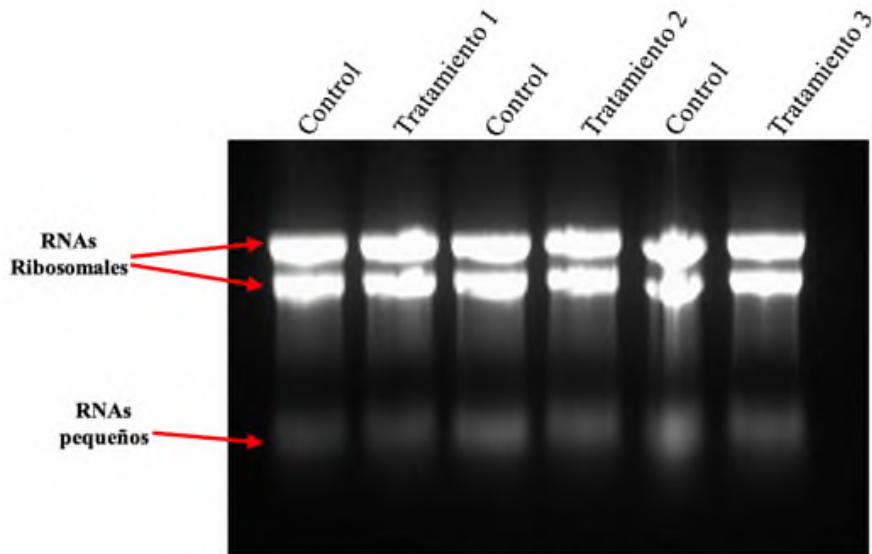


Figura 52. Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1%, de RNA total obtenido de las muestras para los análisis de expresión de DCLs.

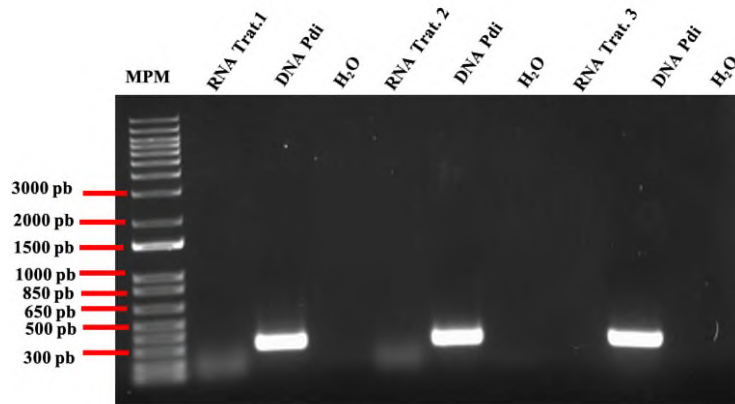


Figura 53. Gel de agarosa al 1% que demuestra la ausencia de contaminación de DNA genómico en las extracciones de RNA. Se muestran los productos de PCR obtenidos a partir del RNA extraído (carriles RNA Trat.1, 2, 3) sin producto amplificado, y productos amplificados a partir del DNA (carriles DNA Pdi) como controles positivos.

Para determinar la eficiencia de los oligos diseñados para la amplificación de cada gen involucrado (DCL1, DCL2 y Actina) se realizaron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000, del cDNA de Pdi sintetizado a partir de RNA sin tratamiento, para de esta forma evaluar la eficiencia de los oligos al disminuir la concentración de cDNA como se observa en las Figuras 54 y 55.

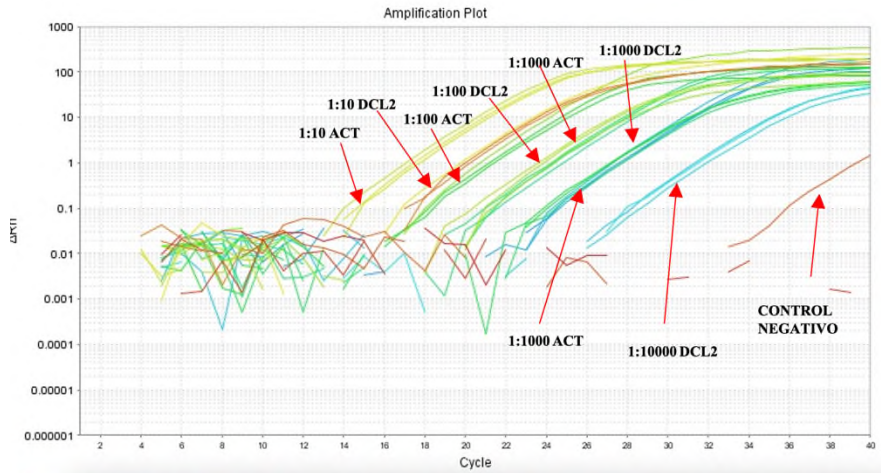


Figura 54. Curva de normalización de fluorescencia (ΔR_n) con respecto a número de ciclos durante la amplificación por PCR.

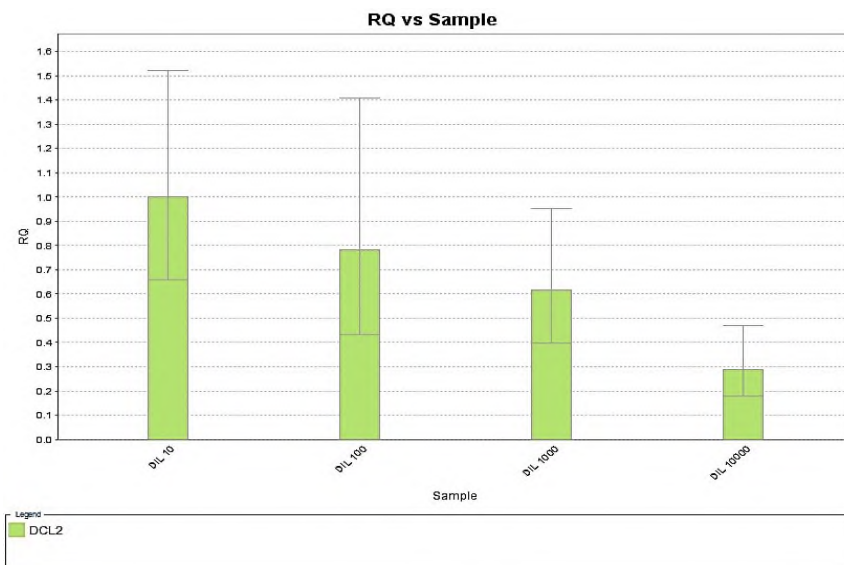


Figura 55. Cuantificación relativa (RQ) de la amplificación de DCL2 en las diluciones seriales de cDNA.

Como se puede observar, tanto los oligos diseñados para la amplificación del gen de actina como los diseñados para el DCL2, son sensibles a la cantidad de cDNA que hay en la muestra, lo cual es un buen indicador para la realización de las qPCR, donde se busca detectar el silenciamiento génico, específicamente de los genes DCL1 y DCL2.

Este ensayo también nos indica la abundancia relativa de cada gen en las muestras basados en los valores de Ct para actina a la dilución 1:10 = 15.5 y 23.4 para DCL2, demostrando que el gen constitutivo es más abundante que DCL2. Este mismo experimento se realizó con los oligos diseñados para DCL1, sin embargo, el gen se empieza a expresar a partir del ciclo 22, lo cual indica una baja abundancia del gen DCL1 en las muestras, no obstante, los valores de Ct para las muestras concentradas como la dilución 1:10 (Ct= 29.1) fueron suficientes para los fines de este trabajo de investigación, ya que para el análisis de expresión posterior se usó una dilución 1:5.

Por otra parte, las curvas de disociación muestran un producto único de amplificación en las reacciones, como se observa en la obtención de curvas bien definidas y con un solo pico máximo a la temperatura señalada por la línea punteada (Figura 56). Esto es un resultado que garantiza que la fluorescencia corresponde al producto específico amplificado y no existen artefactos u otros productos de amplificación no deseados que pudieran aportar fluorescencia a las reacciones.

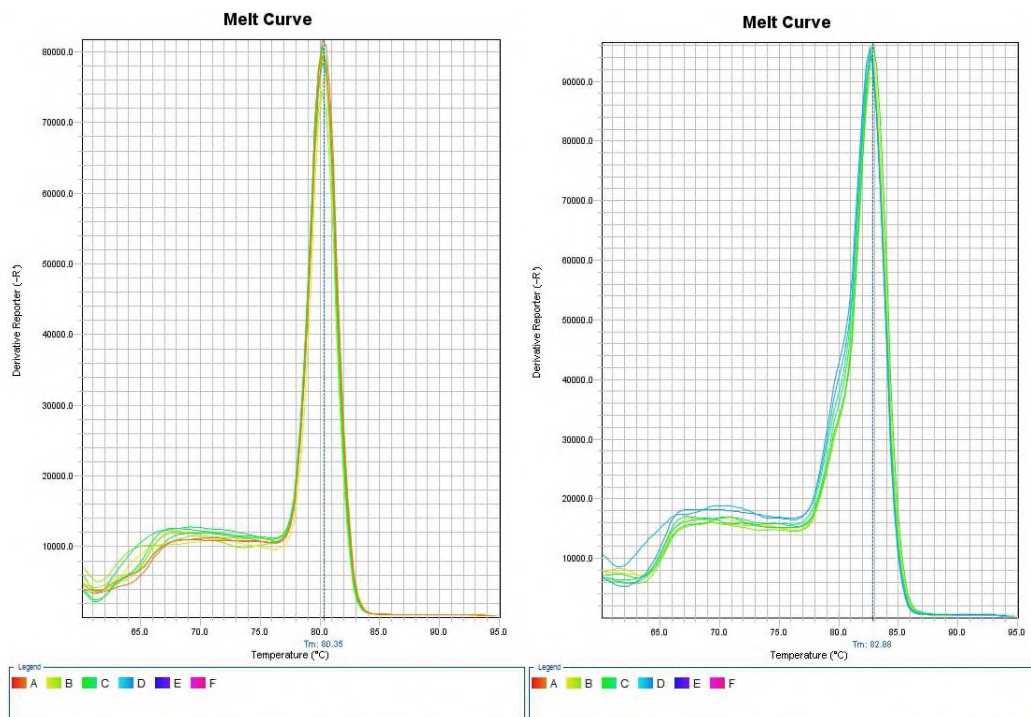


Figura 56. Curvas de disociación (melting) de la amplificación de DCL2 (izquierda) y el control constitutivo de Actina (derecha).

Para la validación de silenciamiento génico de DCLs en *Penicillium digitatum* se estableció un diseño experimental usando como materia prima el micelio del hongo siguiendo la metodología establecida por Islam *et al*, (2021). Para este experimento era deseable realizar las pruebas directamente sobre esporas, pero esto no fue posible ya que no se logró obtener RNA en cantidad e integridad suficiente a partir de las esporas tratadas. Por lo tanto se empleó micelio.

Como resultados de los tres experimentos establecidos se encontró una disminución estadísticamente significativa en la expresión relativa (ER) de los genes DCL1 y DCL2 del patógeno con respecto al control ($p < 0.05$), en cada uno de los experimentos, excepto por los valores de expresión obtenidas en el experimento 2 (Figura 57). Para el primer experimento realizado se puede observar el silenciamiento de los genes, ya que los valores de ER para los genes DCL1 y DCL2 se redujeron 1.7 veces con respecto al control. Para el experimento 2 no se observó el silenciamiento de DCL1, sin embargo, para DCL2 se redujo la expresión en 1.7 veces. El experimento 3 también mostró silenciamiento con una reducción en la ER de DCL1 en 2.5 veces con respecto al control. Para el caso de la ER de gen DCL2 solo se redujo en 1.04 veces.

Los trabajos previos realizados para el control de *Penicillium italicum* que están directamente relacionados con la estrategia SIGS, han demostrado un efecto en el silenciamiento de genes DCL1 y DCL2, usando protoplastos, donde se reportan niveles de reducción de expresión de 5.8 veces para DCL1 y 2.4 veces para DCL2 (Yin *et al*, 2020), sin embargo, en las pruebas donde se usaron dsRNAs desnudos se obtuvo un nivel de silenciamiento menor. Los valores obtenidos en este trabajo están por debajo de lo reportado usando protoplastos, pero coinciden con los resultados obtenidos para DCL2 en donde aplicaron 800 ng de dsRNAs directamente en heridas de naranjas.

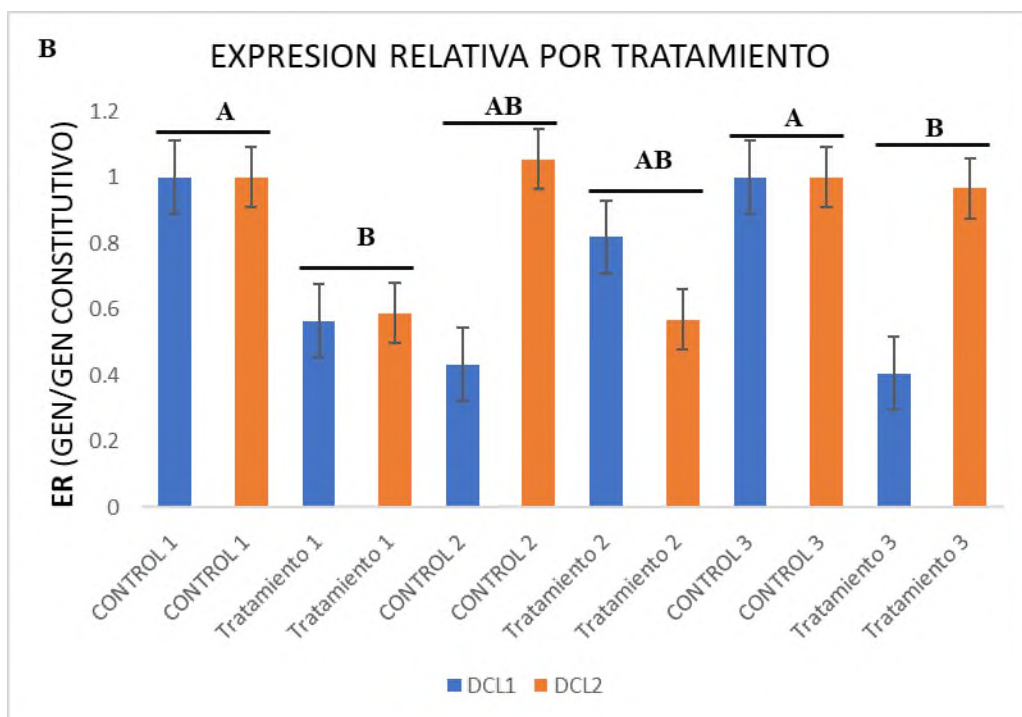


Figura 57. Expresión relativa de los genes DCL1 y DCL2 en el crecimiento micelial de *P. digitatum* *in vitro* en caldo PDA (Papa-Dextrosa). Las letras diferentes corresponden a medias estadísticamente diferentes con $p < 0.05$.

Los resultados de este bioensayo en medio líquido muestran que los sdsRNAs, son poco efectivos para inhibir el crecimiento micelial del hongo en comparación con la inhibición de la germinación de esporas, a pesar del efecto de silenciamiento génico observado. Existe la posibilidad de que los tiempos de incubación con el RNAi tenga influencia sobre la estabilidad de los dsRNAi.

A diferencia del experimento con esporas, donde se mantuvo el tratamiento con RNAi solo 24 h, en el experimento del micelio se llevó a cabo en 72 h. Es probable que, en este último, el tiempo de incubación (72 hrs), además de los componentes propios del caldo PD (Papa-Dextrosa), hayan promovido la degradación de los sdsRNAs aplicados, lo cual disminuyó el efecto sobre el crecimiento del hongo. Islam *et al*, (2021), demostraron que el efecto de los dsRNA aplicados para el control de *B. fuckeliana* en fresas fue mayor sobre el crecimiento micelial del hongo después de las 72 horas utilizando minicélulas como vesículas protectoras de los dsRNAs, lo cual no sucede cuando se aplican los dsRNAs desnudos y de manera directa.

En este trabajo los sdsRNAs se aplicaron de manera directa al medio de cultivo, lo cual posiblemente redujo la concentración inicial de los RNAs utilizados. No obstante, se logró observar una disminución en la expresión de los genes DCL1 y DCL2 *P. digitatum* como corresponde al proceso de silenciamiento génico.

De manera general, promediando los valores de ER de cada uno de los experimentos realizados se observa una disminución significativa con $p < 0.05$ para el gen DCL1 de 1.37 veces con respecto al control, así como una disminución de la ER de DCL2 de 1.44 veces (Figura 58). Con estos resultados se demuestra que los dsRNA tienen un efecto significativo en la germinación de esporas *in vitro*, sobre todo los sdsRNAs que demostraron tener un efecto mayor en el porcentaje de inhibición y una reducción estadísticamente significativa en la expresión de ambos genes DCLs.

Estos resultados sugieren que los sdsRNAs y concentraciones bajas de ldsRNAs se pueden utilizar como un tratamiento preventivo de las enfermedades causadas por *P. digitatum*, sin embargo, se recomienda proteger las moléculas de dsRNAs mediante el uso de nanopartículas, vesículas artificiales o alguna otra forma de protección para garantizar el efecto deseado y su uso como un tratamiento curativo de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos.

Se ha demostrado experimentalmente que existe un mejor silenciamiento de genes DCLs cuando se usa una construcción quimérica como molde para la síntesis de RNAi para ambos genes en conjunto, que cuando se sintetizan y aplican RNAi de interferencia por separado (Wang *et al*, 2016; Yin *et al*, 2020; Islam *et al*, 2021), los resultados de este trabajo coinciden con esta conclusión, y se refuerza la hipótesis de que si se atacan a más de un gen de virulencia del patógeno las posibilidades de un tratamiento preventivo y curativo se incrementan.

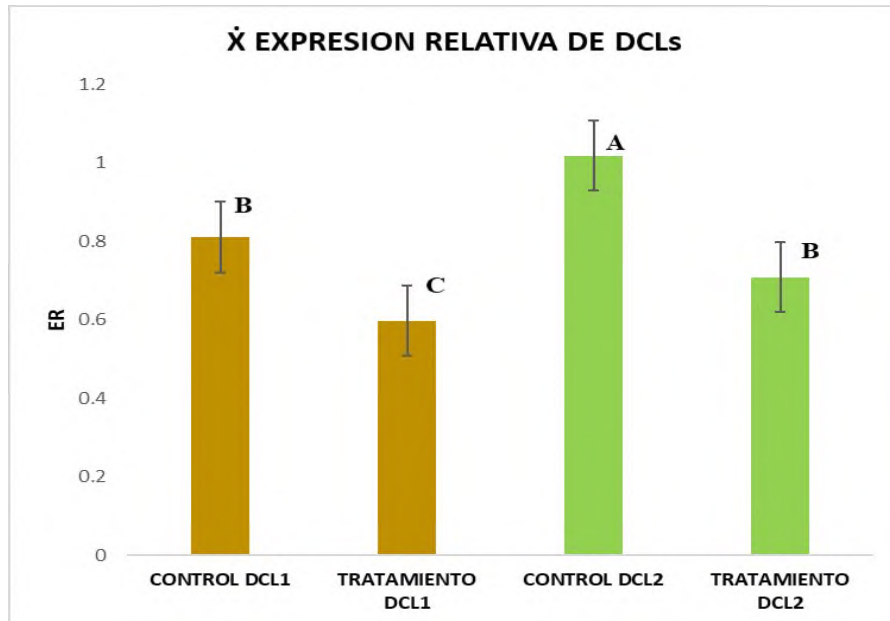
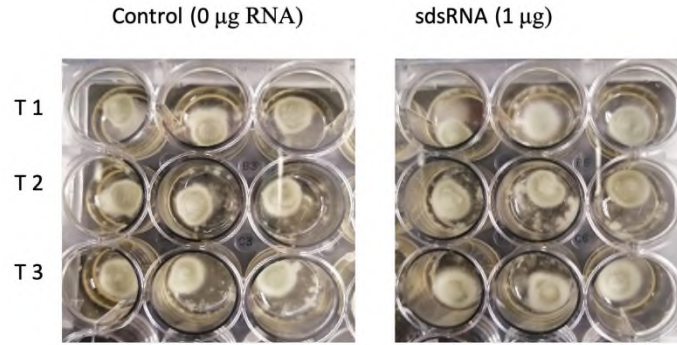


Figura 58. Resultados de ER de DCLs mediante qPCR. Se observa que existe una disminución de la ER de DCL1 1.3 veces con respecto al control y para DC2 1.4 veces. Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes con $p < 0.05$

6.13 Ensayos *in vivo* preliminares

Para comprobar la actividad biofungicida de los dsRNAs diseñados para el control de *P. digitatum*, se realizaron pruebas preliminares consistentes en la aplicación de sdsRNAs sobre la superficie de frutos de naranja. Al transcurrir 24 h de la aplicación, se inoculó una suspensión de esporas de 5×10^5 e/mL de *P. digitatum* en el mismo sitio de aplicación. Los resultados de los bioensayos preliminares se muestran en la Figura 59.



Figura 59. Ensayos preliminares de actividad *in vivo* del biofungicida de sdsRNAs sobre *P. digitatum* inoculado en la superficie de frutos de naranja.

En el bioensayo preliminar de actividad *in vivo* se logró observar una tendencia general del tratamiento con dsRNAs a inhibir el crecimiento de *P. digitatum* sobre los frutos de naranja. Sin embargo, se requiere realizar pruebas detalladas para controlar las variables que intervienen, principalmente la concentración del inóculo de hongo y las condiciones de crecimiento, lo que permitirá disminuir la variabilidad en el efecto observado y obtener estimaciones estadísticas concluyentes.

7. CONCLUSIONES

- Se logró el aislamiento de *Phytophthora tropicalis* y *Lasiodiplodia theobromae*, en mazorcas de cacao, dos hongos ampliamente reconocidos como patógenos para el cultivo. No obstante, no se logró el aislamiento de *Moniliophthora roreri*.
- Por su parte, en el tejido de piña se aisló a *Phytophthora tropicalis* y *Fusarium oxysporum*, los cuales constituyen dos de las amenazas más importantes para el cultivo de piña en la región del Papaloapan.
- Se identificaron los genes DCLs en los patógenos de interés y se seleccionaron las regiones para el diseño de los RNAi. Las construcciones para la síntesis del RNAi, ya sea de DCLs únicos o fusionados, se obtuvieron con éxito para todos los patógenos.
- Para el caso del patosistema *C. sinensis-P. digitatum* se sintetizaron RNAi (ldsRNA y sdsRNA) para el silenciamiento del patógeno y se establecieron bioensayos *in vitro* en medios de cultivo PDA a concentraciones de 1, 0.5, 0.25 y 0.125 µg de dsRNAs largos y cortos, obteniendo como resultado un mejor silenciamiento con sdsRNAs a una concentración de 1 y 0.125 µg con 82.07 y 86.06 % de silenciamiento.
- Se realizó la validación de silenciamiento de genes DCL en *Penicillium digitatum* como efecto del tratamiento con RNAi a partir de la fusión de DCL1 y DCL2, observando una disminución estadísticamente significativa en la expresión relativa (ER) de los genes DCL1 de 1.37 veces y DCL2 en 1.44 veces con respecto al control. Esto demuestra que la aplicación de RNAi como biofungicida es eficiente para el silenciamiento del gen objetivo.

8. PERSPECTIVAS

- Para desarrollar estrategias biotecnológicas para la protección vegetal es necesario el reconocimiento de la microbiota asociada a los cultivos de interés comercial en la región. El estudio del genoma, el transcriptoma y el proteoma de los patógenos de interés en la interacción con la planta huésped permitirá ubicar los genes más importantes expresados durante la infección, proporcionando una base para hacer una mejor selección de los genes dianas a silenciar.
- Adicional al estudio genómico es necesario conocer los cambios evolutivos que han experimentado estos genes a través del tiempo y entre reinos, esto con la finalidad de eficientizar la selección de las regiones más importantes entre los genes y con ello asegurarse de no tener efectos fuera del objetivo. Esto permitirá ofrecer herramientas seguras para el uso de RNAi para el control de hongos fitopatógenos.
- Con los resultados obtenidos se observó que existe un efecto silenciador de los RNAi usados contra los genes DCLs de los patógenos evaluados, sin embargo, se espera que solo una fracción de los RNAi sea útil. La degradación natural de los RNAi usados es una situación inminente, por lo que se sugiere que para obtener resultados más eficientes se diseñe una construcción quimérica de al menos tres genes vitales para el patógeno. Así mismo, existe una necesidad del uso de tecnologías de protección de los RNAi para asegurar la entrega exitosa de los RNAs al gen diana, y con ello incrementar el potencial del silenciamiento génico inducido por aspersión.
- Finalmente para los patosistemas que quedaron pendientes a evaluar se sugiere incluir al menos otro gen de importancia para el patógeno para asegurar un efecto significativo al momento de hacer las pruebas de inhibición *in vivo* y con ello aumentar las posibilidades de éxito en la actividad biofungicida.

9. BIBLIOGRAFÍA

Achicanoy L. H. (2001). Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 1 y 2 (54): 1251-1273

Acosta-Pérez J. A., *et al.* (2012). Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. Universidad y Ciencia. 28(3):245-258,2012

Betancourt R. I., *et al.* (2012). *Fusarium mexicanum* Agente Causal de la Malformación del Mango en Jalisco, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 2 (30): 116.

Betti F., *et al.* (2021). Exogenous miRNAs induce post-transcriptional gene silencing in Plants. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-01005-w>

Cai Q., *et al.* (2018). Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi—natures blueprint for modern crop protection strategies. ELSEVIER. Doi: 10.1016/j.mib.2018.02.003

Carmona M. & Sautua F. (2017). La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en los cultivos extensivos. Agronomía y Ambiente 37 (1): 1-19

Chávez-Ramírez B., *et al.*, (2021). Morphological and molecular identification of *Phytophthora tropicalis* causing black pod rot in Mexico. Doi: <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1870003>

Cheng E., *et al.* (2015). Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat. Plant Biotechnology Journal. Doi: 0.1111/pbi.12352

CIMMYT (2020). Plagas, enfermedades y cambio climático: ¿están vinculados? Consultado en: <https://www.cimmyt.org/es/noticias/plagas-enfermedades-y-cambio-climatico-estan-vinculados/>

CONAPO, (2012). Proyecciones de la población de México 2005-2050, Consejo Nacional de Población. México D.F.

Cuervo-Parra J. A., *et al.* (2014). El cultivo del cacao, enfermedades, identificación de hongos, modelado y métodos de control. Revista de Divulgación Técnica Agrícola y Agroindustrial. ISSN: 1852 – 7086

Dean, R., *et al.* (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular plant pathology, 13(4), 414–430. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

Dou, T., *et al.* (2020). Host-induced gene silencing of Foc TR4 ERG6/11 genes exhibits superior resistance to *Fusarium* wilt of banana. doi: 10.1111/pbi.13204.

Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. (1996). Phytophthora diseases worldwide. Am. Phytopathol. Soc. St. Paul, MN.USA. 562 p

Espinosa-Rodríguez C. J., *et al.* (2015). Etiology of the heart rot of pineapple (*Ananas comosus*. L. Merrill) MD2 cultivar in Isla, Veracruz, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 33 (1): 104- 115.

FAO. (2012). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas. E-ISBN 978-92-5-307348-1

FAO. (2014). México: el sector agropecuario ante el desafío del Cambio Climático. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Ciudad de México.

FAO. (2016). El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación. Cambio Climático Agricultura y Seguridad Alimentaria. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma 2016.

FAO. (2017). El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación. Aprovechar los Sistemas Alimentarios para Lograr una Transformación Rural Inclusiva. Roma 2017.

FAO. (2019). El sistema alimentario en México - Oportunidades para el campo mexicano en la Agenda 2030 de Desarrollo Sostenible. Ciudad de México.

FAOSTAT (2020). Pesticides Use. Consultado en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>

García-Gutiérrez C. & Rodríguez-Meza G. D. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa.

García H. J. *et al.*, (2018). Estado actual de la investigación sobre plaguicidas en México. Rev. Int. Contam. Ambie. 34 9-60: DOI: 10.20937/RICA.2018.34.esp01.03

González-Mendoza D., *et al.* (2010). A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. Genet. Mol. Res. 9 (1): 162-166

Guo X.-Y., *et al.* (2019). Host-Induced Gene Silencing of MoAP1 Confers Broad-Spectrum Resistance to *Magnaporthe oryzae*. Front. Plant Sci. 10:433. doi: 10.3389/fpls.2019.00433

Guzmán-Plazola P., *et al.* (2016). Perspectiva campesina, intoxicaciones por plaguicidas y uso de agroquímicos. IDESIA 3 (34): 69-80

Ibrahim N.F., *et al.*, (2015). First Report of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* Associated With Pineapple Rot in Peninsular Malaysia. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0227-PDN>

Hirooka T. & Ishii H. (2013). Chemical control of plant diseases. The Phytopathological Society of Japan. DOI 10.1007/s10327-013-0470-6

Holder M & Lewis P. O. (2003). phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. Doi: 10.1038/nrg1044

Hua C., Zhao J.-H., & Guo h.-S. (2017). Trans-Kingdom RNA Silencing in Plant–Fungal Pathogen Interactions. *Molecular Plant*. Doi: 10.1016/j.molp.2017.12.001

Huang C.-Y., *et al.* (2019). Small RNAs – Big Players in Plant-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe*. Doi: 10.1016/j.chom.2019.07.021.

INEGI (2018). Encuesta Nacional Agropecuaria ENA 2017 Conociendo el campo de México. Consultado en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ena/2017/doc/ena2017_pres.pdf

Islam W., *et al.* (2017). Host-Pathogen interactions modulated by small RNAs. *RNA BIOLOGY*., doi: 10.1080/15476286.2017.1318009

Islam M T. & Sherif S. N. (2020). RNAi-Based Biofungicides as a Promising Next-Generation Strategy for Controlling Devastating Gray Mold Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2072; doi:10.3390/ijms21062072.

Joga, M., R., Zotti, M., J., Smagghe, G., Christiaens, O (2016). RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Frontiers in Physiology*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00553>

Juárez-Becerra G. P., *et al.* (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Ingeniería de Alimentos*. Puebla México.

Kalyandurg, P. B., *et al.* (2021). Spray-induced gene silencing as a potential tool to control potato late blight disease. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-21-0054-SC>

Koch A., *et al.* (2013). Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase–encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *PNAS*. Doi: 10.1073/pnas.1306373110

Koch, A., *et al.* (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)

Koch, A., *et al.* (2018). RNA-based disease control as a complementary measure to fight *Fusarium* fungi through silencing of the azole target cytochrome P450 lanosterol C-14 α -demethylase. *European Journal of Plant Pathology*, 152(4), 1003-1010.

Koch A., *et al.* (2019). SIGS vs HIGS: a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium* FgCYP51 genes in infected host and non-host plants. *Molecular Plant Pathology* 20 (12), 1636–1644: DOI: 10.1111/mpp.12866

Kumar S. V. & Pandey P. (2020). *Physical Methods in Management of Plant Diseases*. New Delhi, India. ResearchGate. Consultado en: <https://www.researchgate.net/publication/299488729>

Litterer L. 2009. Comparing Cloning Efficiency of the pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vectors to the TOPO TA Cloning® Vectors. Consultado en: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/comparing-cloning-efficiency-of-pgemt-and-pgemt-easy-vectors-to-topo-ta-cloning-vectors/#ArticleBody-d5d1ab26-0e73-4c07-9c3b-1538c1fa2f55>

Liu, G., *et al.* (2021). Extracellular Vesicles: Emerging Players in Plant Defense Against Pathogens. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.757925>

Livak K. J & Schmittgen T. D. 2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* 25: 402-408.

Lundgren J. G. & Duan J. J. (2013). RNAi-Based Insecticidal Crops: Potential Effects on Nontarget Species. *BioScience* 8 (63): doi:10.1525/bio.2013.63.8.8

Martin R. N., Abad Z. G., Balci Y. Ivoros K. (2012). Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. Doi: 10.1094 / PDIS-12-11-1036-FE

McLoughlin, A. G., *et al.* (2018). Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports*, 8(1)

McSpadden G. B. B. & Fravel D. R. (2002). *Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA*. Online. *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.

Mello C. C. & Conte J. S. (2004). Revealing the world of RNA interference. *NATURE* Vol. 431. 338–342. <https://doi.org/10.1038/nature02872>

Mezzetti B., *et al.* (2020). RNAi: What is its position in agriculture? *Journal of Pest Science* <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01238-2>

Minitab Suport (2018). Data transformations for capacity analysis. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/quality-and-process-improvement/capability-analysis/supporting-topics/distributions-and-transformations-for-nonnormal-data/data-transformations/>

Moraes B. J., *et al.* (2019). Biological Control of Citrus Postharvest Phytopathogens. Toxins: doi: 10.3390/toxins11080460

Morton V. & Staub T. (2008). Short History of Fungicides. The American Phytopathological Society. MN 55121-2097

Mumbanza, F. M., *et al.* (2013). *In vitro* antifungal activity of synthetic dsRNA molecules against two pathogens of banana, *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* and *Mycosphaerella fijiensis*. Pest Management Science, 69(10), 1155-1162.

Nowara D., *et al.* (2010). HIGS: Host-Induced Gene Silencing in the Obligate Biotrophic Fungal Pathogen *Blumeria graminis*. The Plant Cell, Vol. 22: 3130–3141. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.110.077040

Nunes C. C. & Dean R. A. (2012). Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. Molecular Plant Pathology. 13(5), 519–529. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2011.00766.X

OECD (2012). Perspectivas ambientales de la OECD hacia 2050. Consultado en: <https://www.oecd.org/env/indicators-modelling-outlooks/49884278.pdf>

OEC (2020). Product imports in México. Consultado en: <https://oec.world/en/profile/country/mex>

Osorio T. C. (2014). La productividad total de los factores: la agricultura en México antes y después del Tratado de Libre Comercio con América del Norte. Una transición a la economía agrícola verde. Universidad Iberoamericana de Puebla.

Özlem B., *et al.* (2019). Small RNA inhibits infection by downy mildew pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*. Molecular Plant Pathology 20(11), 1523–1534. Doi: 10.1111/mpp.12863

Picos-Muñoz P. A., *et al.* (2014). *Lasiodiplodia theobromae* in Agricultural Crops in México: Taxonomy, Host, Diversity and Control. Rev. Mex. Fitopatol. No. 1, Vol. 33.

Raja H. A., *et al.* (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. J. Nat. Prod. 80, 756–770. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085.

Rodríguez G. M. del P. (2001). Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. Acta Zoológica Mexicana 1: 53-78. Instituto de Ecología, A. C. México.

Rosenblad M. A., *et al.* (2016). Detection of signal recognition particle (SRP) RNAs in the nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) of three lineages of ectomycorrhizal fungi (Agaricomycetes, Basidiomycota). Doi: <https://doi.org/10.3897/mycokeys.13.8579>

Rulfo V. F., *et al.* (2007). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.

SAGARPA. (2017). Quinto Informe de Labores. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México DF.

Sánchez M. D. F. & Garcés F. F. R. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.* in the crop of cocoa. *Scientia Agropecuaria* 3(2012) 249 – 258.

Schmitt I. & Barker F. G. (2009). Phylogenetic methods in natural product research. Doi: 10.1039/b910458p

Serrano C. L. & Galindo F. E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*. Ciudad de México.

Sonnino A. & Ruane J. (2016). La innovación en agricultura como herramienta de la política de seguridad alimentaria: el caso de las biotecnologías agrícolas. ResearchGate.

Song X.-S., *et al.* (2018). Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. *Molecular Plant Pathology* 19(12), 2543–2560. Doi: 10.1111/mpp.12728

Sosa B. A. & Ruiz I. G. (2017). La disponibilidad de alimentos en México: un análisis de la producción agrícola de 35 años y su proyección para 2050. Doi: 10.22185/24487147.2017.93.027

Tedersoo L., *et al.* (2015). Shotgun metagenomes and multiple primer pairbarcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. Doi: <https://doi.org/10.3897/mycokeys.10.4852>

Tinoco M. L. P., *et al.* (2010). *In vivo* trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. *BMC Biology* 8 (27): 1741-7007

Thomas C. (2002). Managing Plant Diseases with Biofungicides. *Vegetable and Small Fruit Gazette*. Recuperado el 15 de Enero 2020 en: <http://hortweb.cas.psu.edu/extension/veg crops/newsletterlist.html>

Torres D. & Capote T. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: uso de análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Ecosistemas* 13 (3): 2-6

Velásquez A.C., *et al.* (2018). Plant and pathogen warfare under changing climate conditions. *Curr. Biol.* 28(10): R619–R634. doi:10.1016/j.cub.2018.03.054

Wang M., *et al.* (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*. Doi: 10.1038/NPLANTS.2016.151

Wang M., *et al.* (2017). Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection. Elsevier. Doi: 10.1016/j.pbi.2017.05.003

Wong L. M & Medrano J. F. (2018). Real-time PCR for mRNA quantitation. Doi: <https://doi.org/10.2144/05391RV01>

Younis *et al.* (20014). RNA Interference (RNAi) Induced Gene Silencing: A Promising Approach of Hi-Tech Plant Breeding. *Int. J. Biol. Sci.* 10(10): 1150-1158. doi: 10.7150/ijbs.10452

Zaker M. (2014). Natural Plant Products as Eco-friendly Fungicides for Plant Diseases Control-A Review. *The Agriculturists* 14(1): 134-141

Zhu C., *et al.* (2019). Small RNA Functions as a Tracking Efector in Plant Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2816; doi: 10.3390/ijms20112816

Zotti M., *et al.*, (2010). RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science*. Vol. 74. <https://doi.org/10.1002/ps.481>

10. ANEXOS

Anexo I

Preparación de reactivos y soluciones

Solución de Lisis para DNA

Para 30 mL, en un tubo falcón de 50 mL se mezclan 1.5 mL de Tris 50mM pH 7.5, 3 mL de EDTA 50mM pH 8, 9 mL de SDS 3%, 0.3mL de mercaptoethanol y 16.2 mL de agua desionizada, se agita suavemente.

Agua con DEPC

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

Gel de agarosa al 1%.

Para 100 mL de gel, en un matraz de 250mL mezclar 100mL de buffer TAE 1X y 1gr de agarosa, mezclar y calentar en microondas durante varios segundos hasta que la solución quede transparente y sin grumos.

Gel de agarosa 2%

Para 100 mL de gel, en un matraz de 250mL mezclar 100mL de buffer TAE 1X y 2gr de agarosa, mezclar y calentar en microondas durante varios segundos hasta que la solución quede transparente y sin grumos.

Medio V8 para cepas de *Phytophthora ssp.*

Para preparar 400 mL de medio, mezclar en un matraz de 500 mL.













Componentes	Cantidad
Agua destilada	450 mL
Jugo comercial V8	50 mL
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	0.5 g
Agar	7.5 g







Agitar componentes con ayuda de una parrilla de agitación y un magneto, ajustar el pH a 5.5 y posteriormente esterilizar a 15 lb/pulg² a 121°C por 15 min, y vaciar en cajas de petri.

Anexo II








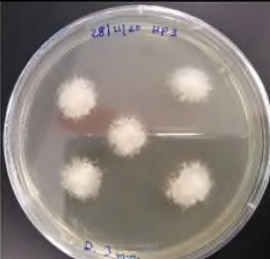

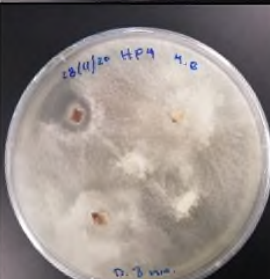

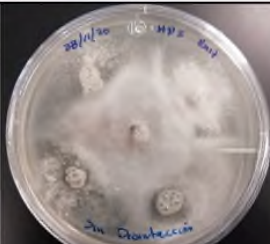
Hongos aislados de tejido de piña y cacao




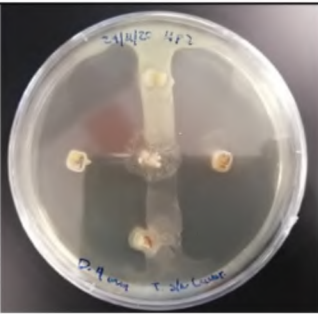

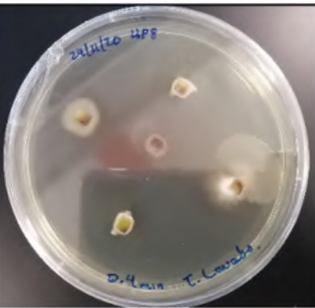


Hongos que crecieron de los tejidos de cacao y su respectiva clave de identificación.

Frutos	Clave	Cultivo	
 <p>HONGO 1 (HC1) Posiblemente <i>Phytophthora</i> sp.</p>	<p>HC1</p>		
 <p>HONGO 2 (HC2FM) Síntomas de <i>Monophthora</i> roesi</p>	<p>HC2FM L-1=Fruto chico L-2 y 3= F. Grande</p>		
	<p>HC2FM-L2</p>		
 <p>HONGO 2 (HC2FM) Síntomas de <i>Monophthora</i> roesi</p>	<p>HC2FV1-L1 HC2FV2-L1</p>		

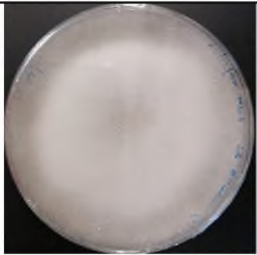
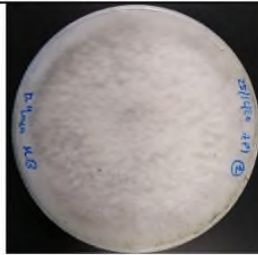
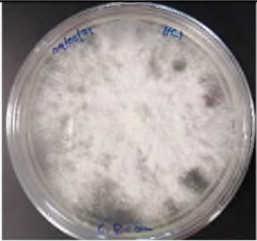

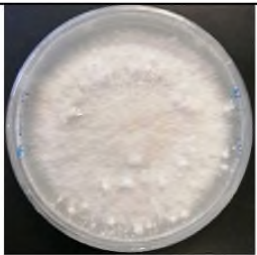
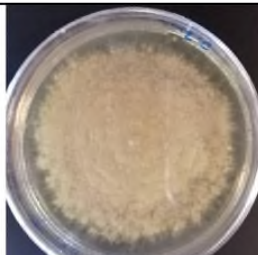
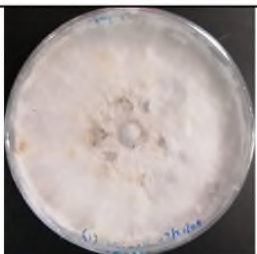



	<p>HC2FV1-L2</p>	
 <p>HONGO 3 (HC3) Síntomas de <i>Monilophthora rosei</i></p>	<p>HC3</p>	
 <p>HONGO 4 (HC4) Síntomas <i>phytophthora</i> spp</p>	<p>HC4</p>	

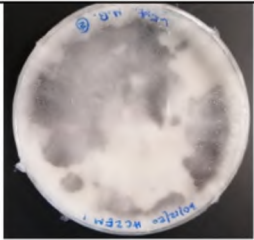
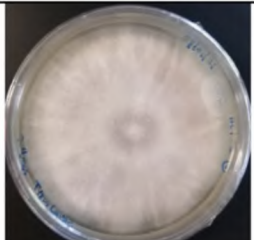



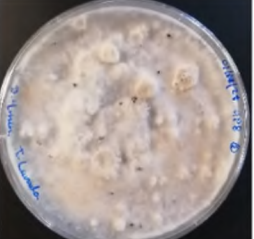
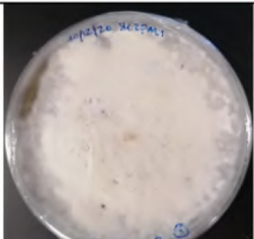


Hongos que crecieron de los tejidos de piña y su respectiva clave de identificación.




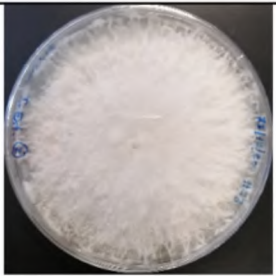
Tejido	Clave	Cultivo	
 <p>HONG01 (HP1) MB</p>	<p>HP1 MB</p>		
 <p>HONG02 (HP2)</p>	<p>HP2</p>		
 <p>HONG03 (HP3)</p>	<p>HP3</p>		
 <p>HONG04 (HP4) Micoho Blanco</p>	<p>HP4</p>		
 <p>Cultivo Raiz</p>	<p>HP5 RAIZ</p>		

 <p>HONGO 6 (HP6 CB) Mielito Blanco</p>	<p>Hp6MB</p>	
 <p>HONGO 7 (HP7) Borde de la Lesión</p>	<p>HP7</p>	
 <p>HONGO 8 (HP8) Borde de la Lesión Tejido sin lavar.</p>	<p>HP8</p>	
 <p>Lesión (LP9)</p>	<p>LP9</p>	

Hongos que se identificaron molecularmente por secuenciación del marcador ITS

CACAO			PIÑA		
1	HC1 Micelio Arocetado 4 S/D		1	HP1 Micelio Blanco 2	
2	HC1 Micelio Rosa		2	HP1 Micelio Morado P. Hifa S/D	
3	HC1 Micelio Blanco 1		3	HP3 2 Micelio Arocetado	
4	HC2FM-L1 Tejido Interno		4	HP6 1 S/D P. Hifa	
5	HC2FM-L1 Tejido Externo MB 1		5	HP6 2 S/D P. Hifa Micelio Rosa	

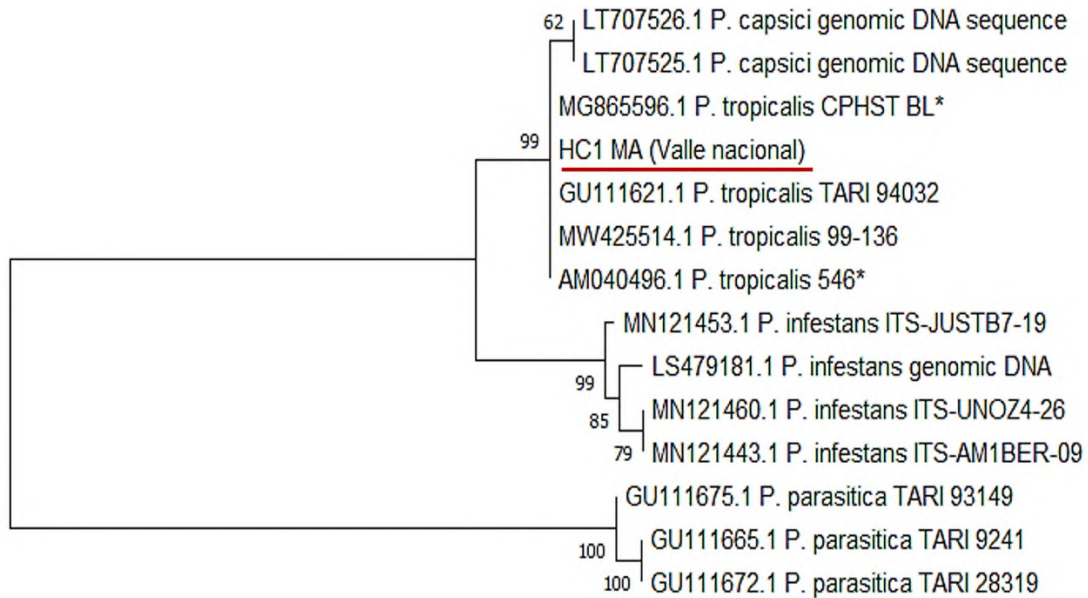
CACAO			PIÑA		
6	HC2FM-L1 Tejido Externo MB 2		6	HP7 2 M. Blanco T/Sin lavar	
7	HC2FM-L1 Tejido Externo MB3		7	HP7 1 Micelio Blanco T/Sin lavar	
8	HC2FM-L1 Tejido Externo MB 1 Crema		8	HP8 2 Tejido Lavado	
9	HC2FM-L1 Tejido Externo MB 5		9	LP9 Micelio Blanco	
10	HC2FM-L2 Tejido Externo 2				

CACAO		
11	HC2FM-L2 Tejido Externo 2	
12	HC2FM-L2 Tejido Externo 4	
13	HC2FV1-L1	
14	HC3 Tejido Externo 2	

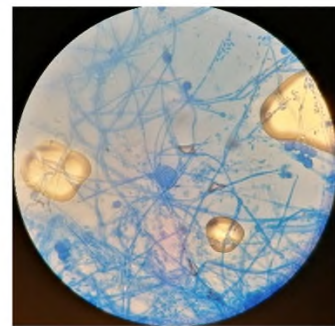
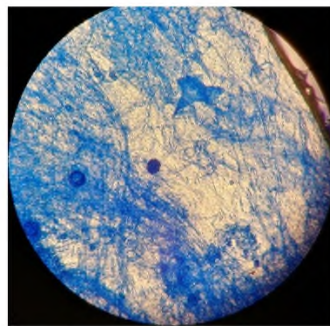
Anexo III

Árboles filogenéticos y morfología de hongos fitopatógenos aislados de tejido de cacao

1. HC1 Micelio Arroquetado 4 S/D

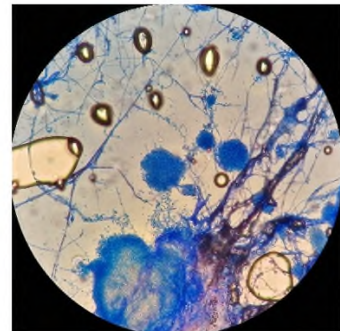
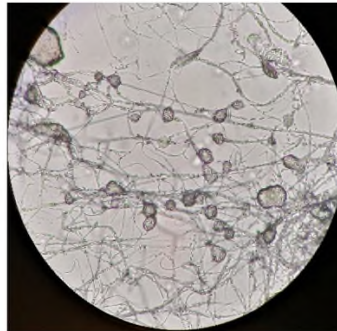
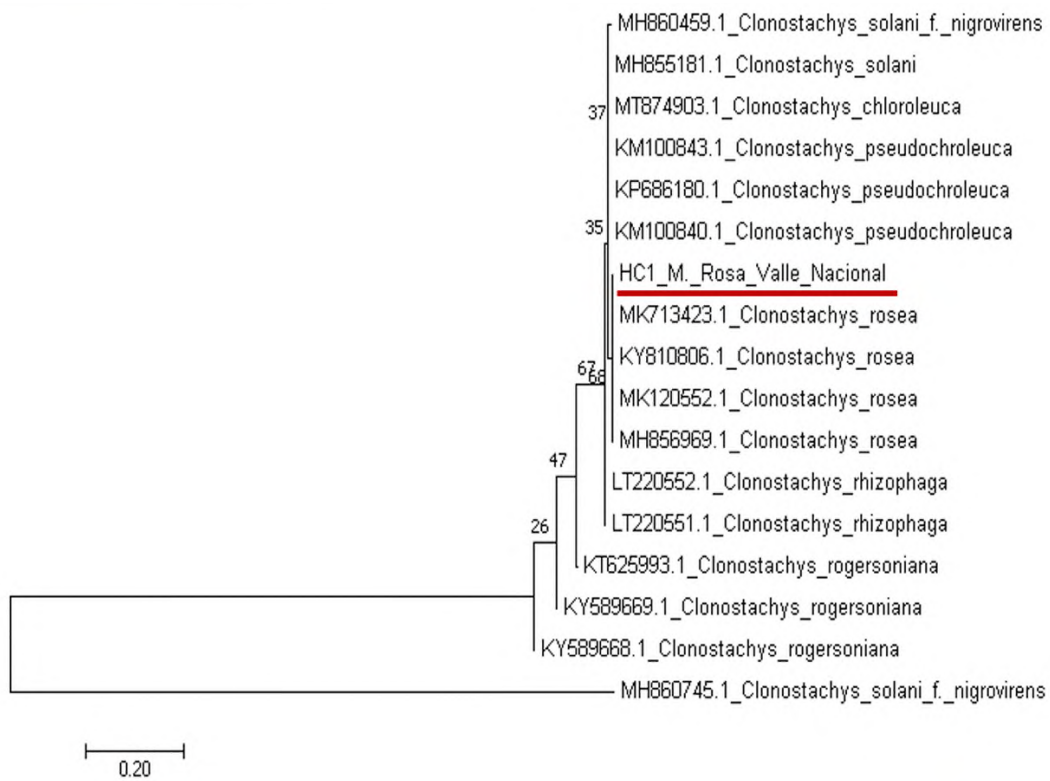


0.010



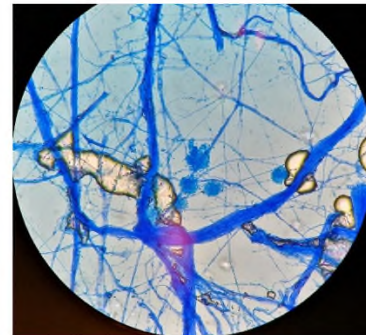
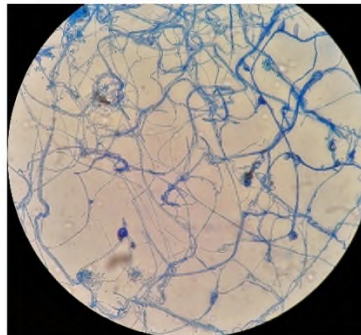
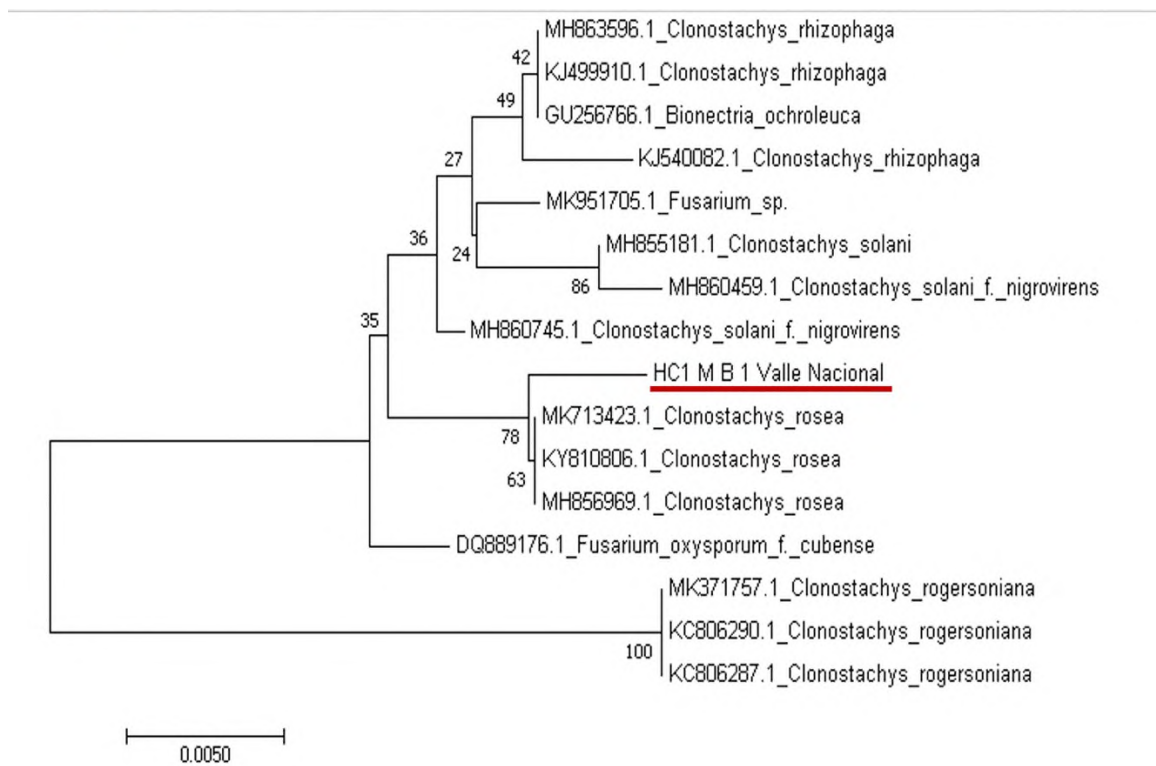
Árbol filogenético del hongo identificado como *Phytophthora tropicalis* (HC1 Micelio Arroquetado 4 S/D). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopía del micelio y estructuras reproductivas típicas.

2. HC1 Micelio Rosa



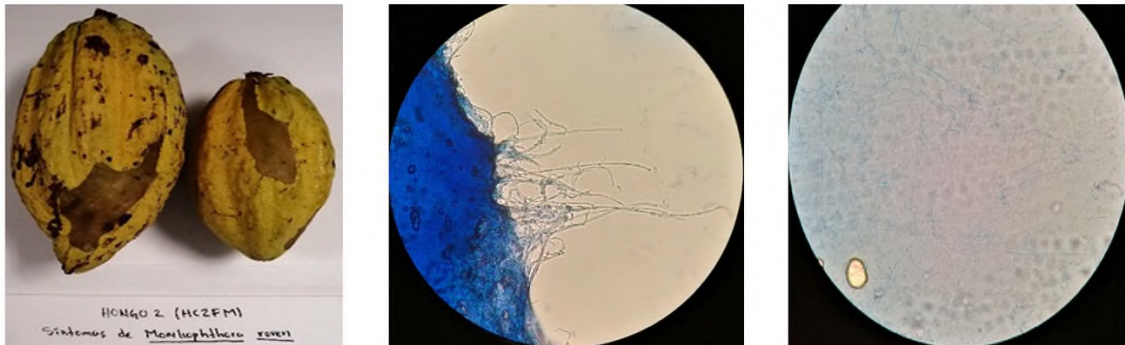
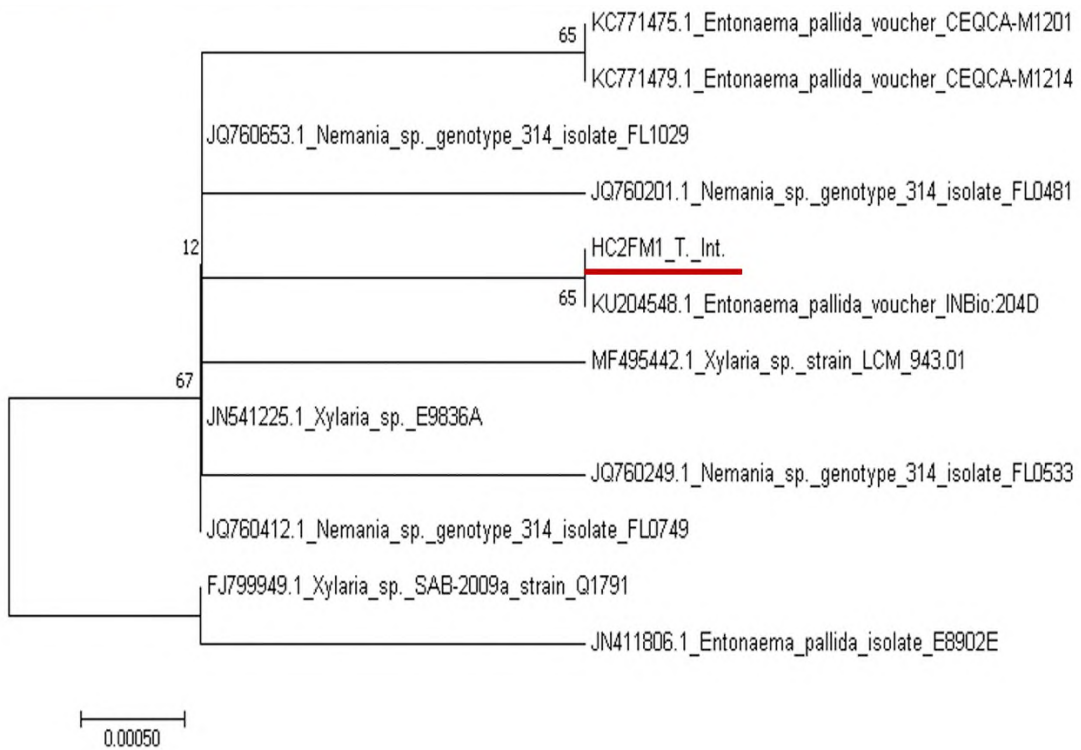
Árbol filogenético del hongo identificado como *Clonostachys rosea* (HC1 Micelio Rosa). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopia del micelio y estructuras reproductivas típicas.

3. HC1 Micelio Blanco 1



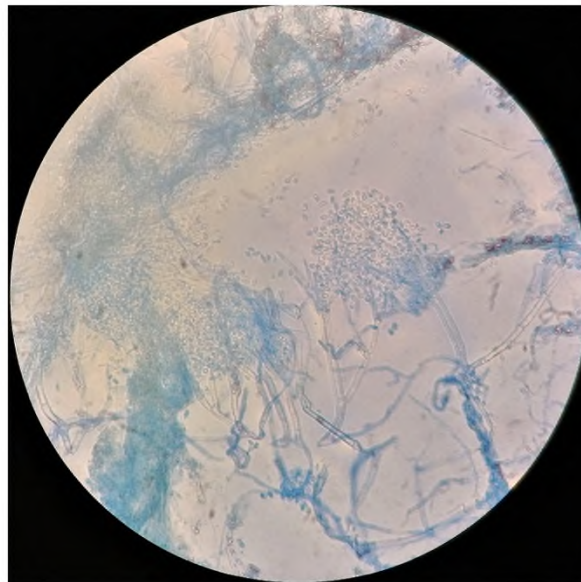
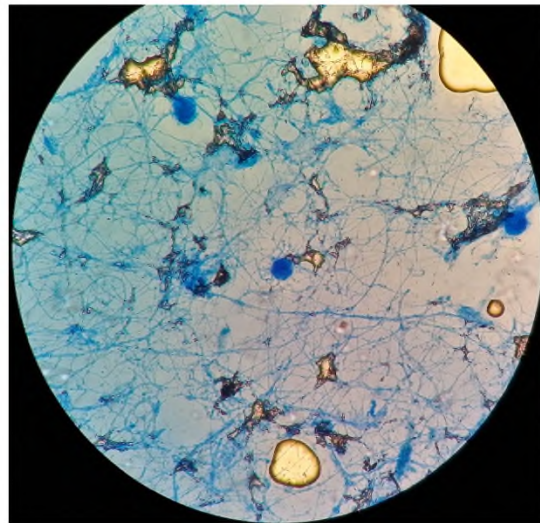
Árbol filogenético del hongo identificado como *Clonostachys rosea* (HC1 Micelio Blanco 1). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopía del micelio y estructuras reproductivas típicas.

4. HC2FM-L1 Tejido Interno



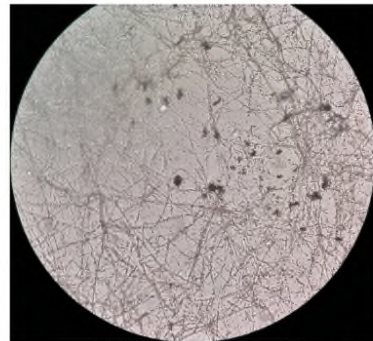
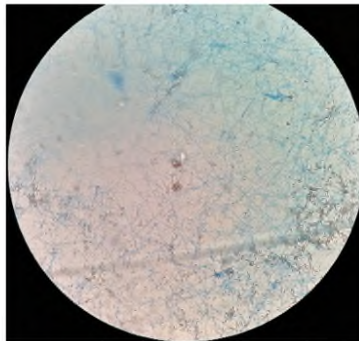
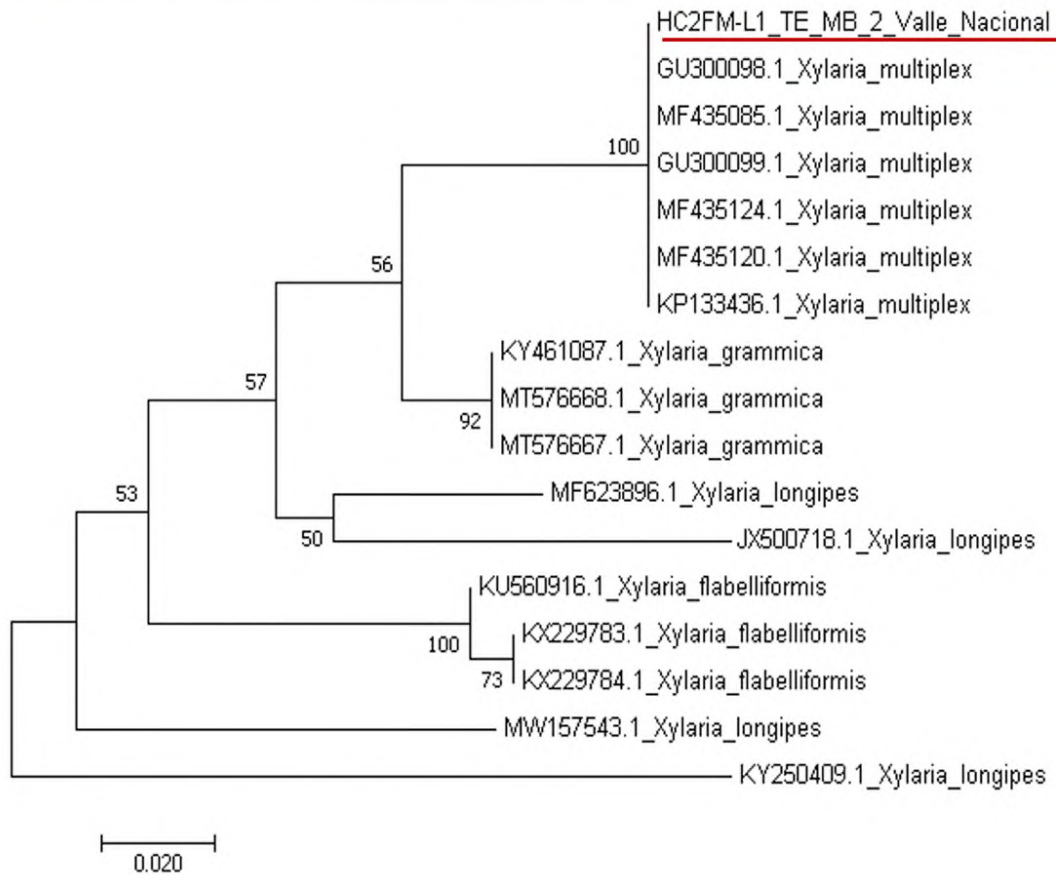
Árbol filogenético del hongo identificado *Entonaema pallida* (HC2FM-L1 Tejido Interno). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopía del micelio y estructuras reproductivas típicas.

5. HC2FM-L1 Tejido Externo MB 1



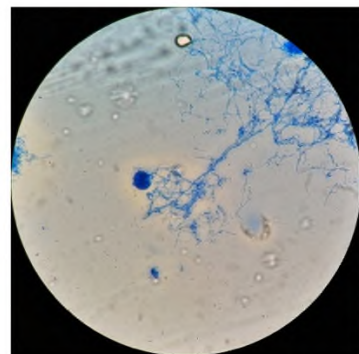
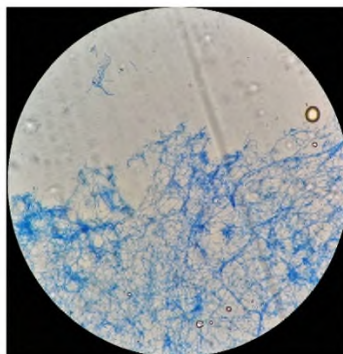
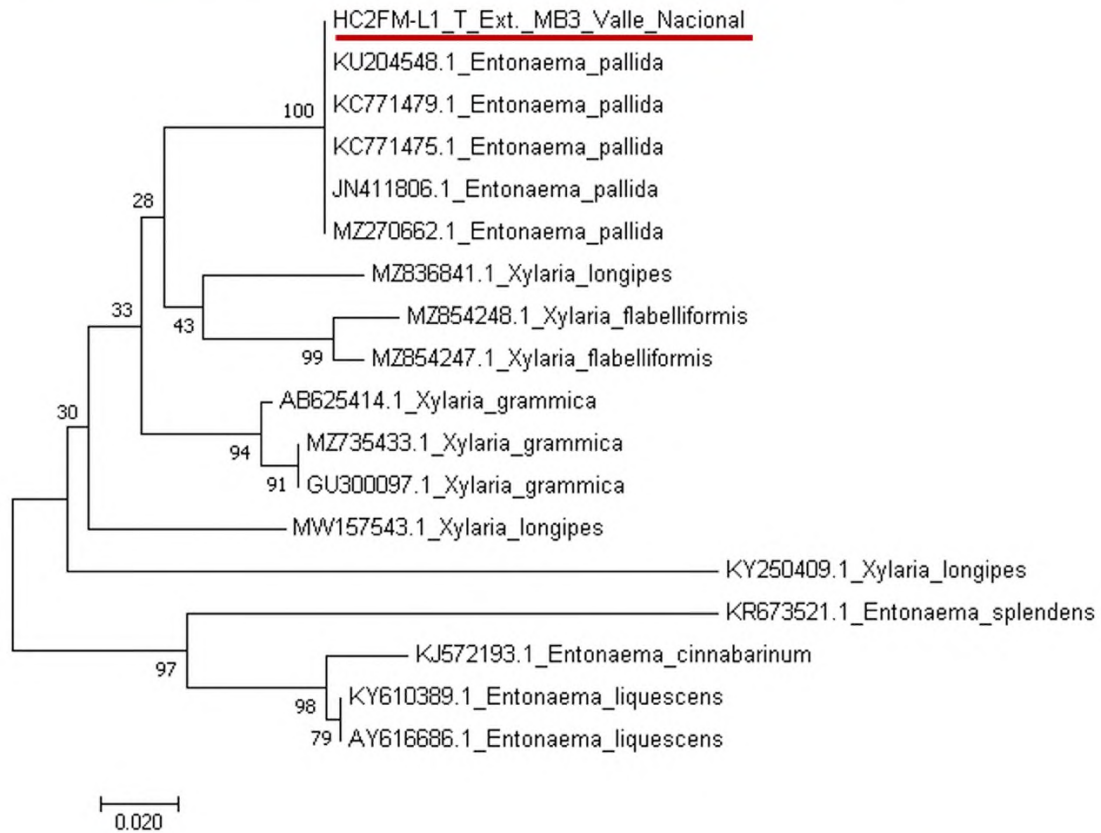
Vista de la lesión y microscopía del hongo aislado a partir de la muestra HC2FM-L1 Tejido Externo MB 1. Los electroferogramas para este patógeno revelaron una secuencia de baja calidad, por lo que no fue posible realizar la identificación molecular del aislamiento.

6. HC2FM-L1 Tejido Externo MB 2



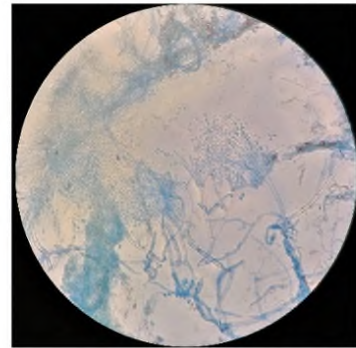
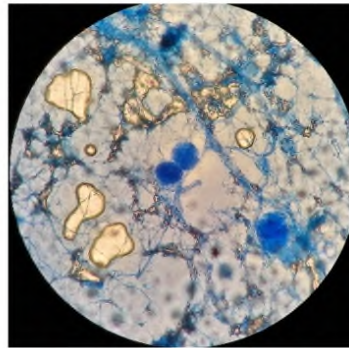
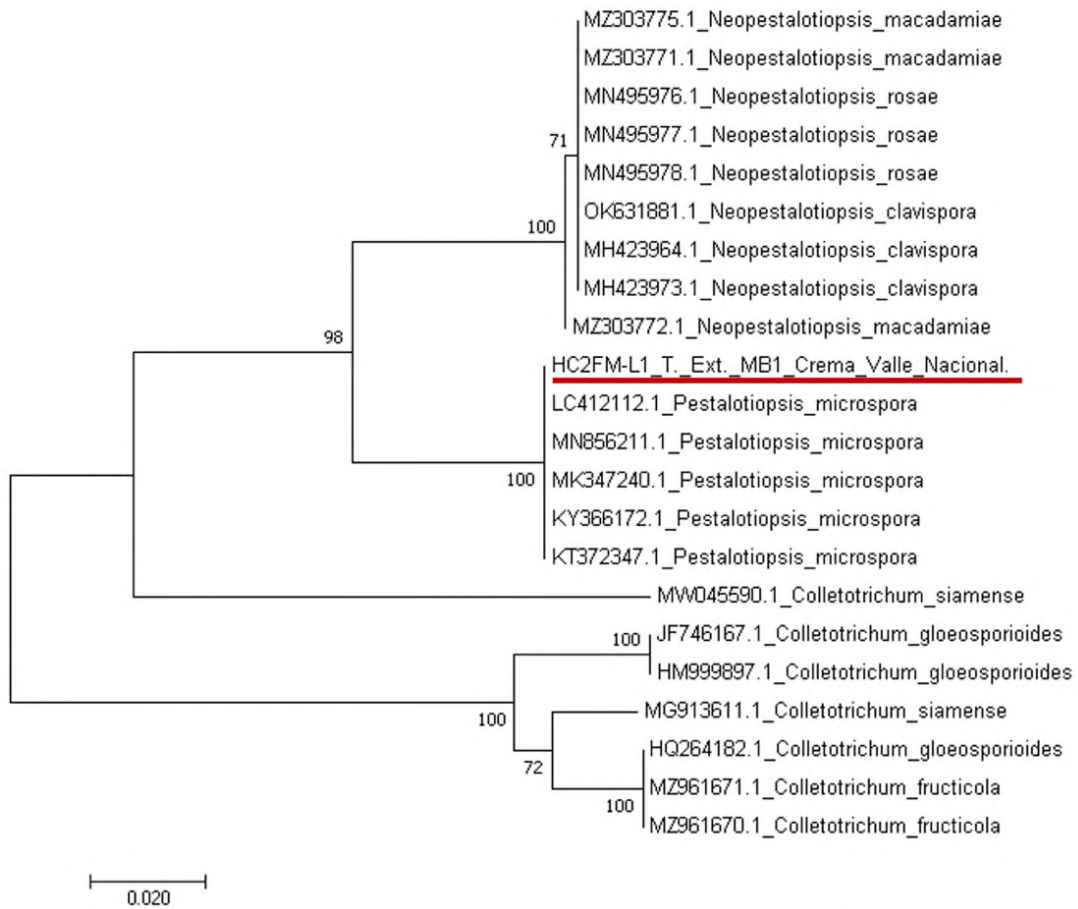
Árbol filogenético del hongo identificado *Xylaria multiplex* (HC2FM-L1 Tejido Externo MB 2). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopía del micelio y estructuras reproductivas típicas.

7. HC2FM-L1 Tejido Externo MB3



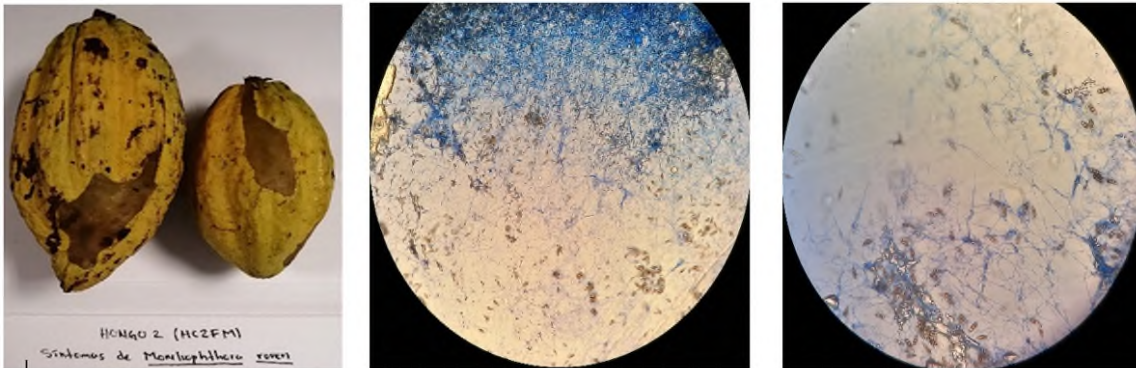
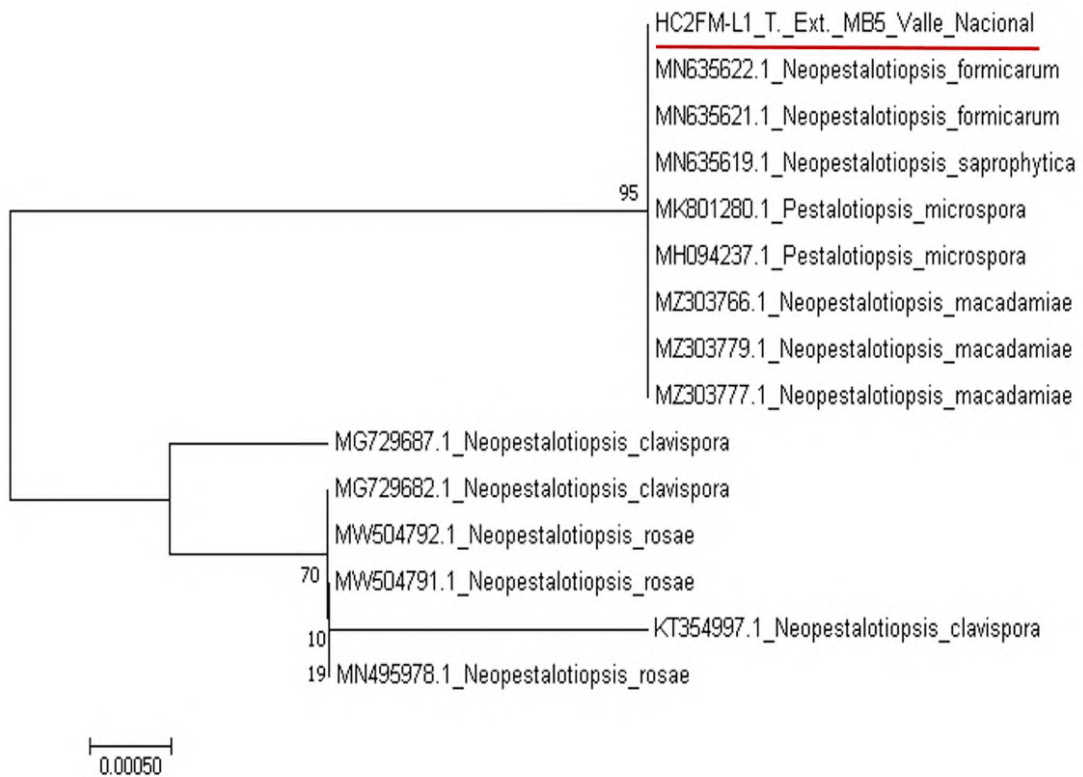
Árbol filogenético del hongo identificado como *Entonaema padilla* (HC2FM-L1 Tejido Externo MB3). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopía del micelio y estructuras reproductivas típicas.

8. HC2FM-L1 Tejido Externo MB 1Crema



Árbol filogenético del hongo identificado como *Pestalotiopsis microspora* (HC2FM-L1 Tejido Externo MB 1Crema). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopía del micelio y estructuras reproductivas típicas.

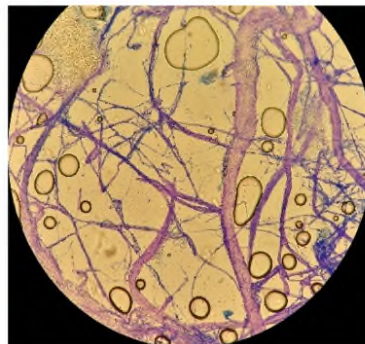
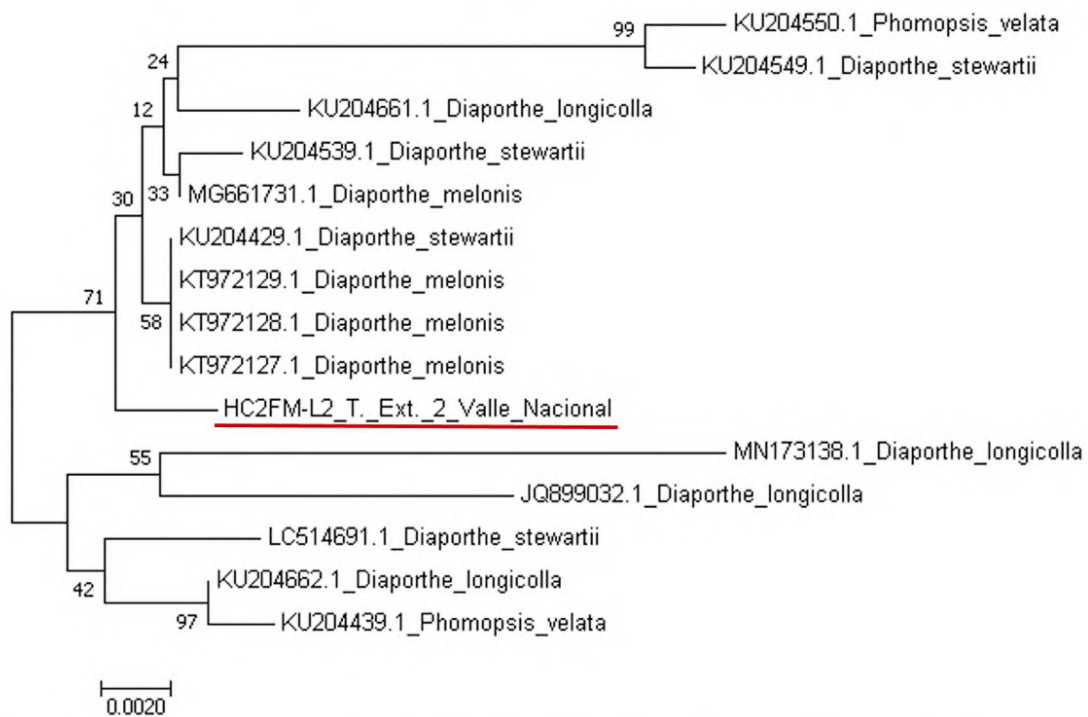
9. HC2FM-L1 Tejido Externo MB 5



Árbol filogenético del hongo identificado presuntivamente como *Pestalotiopsis spp.* (HC2FM-L1 Tejido Externo MB 5). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopía del micelio y estructuras reproductivas típicas.

*Para este hongo es necesario el uso de otros marcadores moleculares ya que se encontró 100% de identidad y cobertura con al menos 3 especies diferentes de hongos.

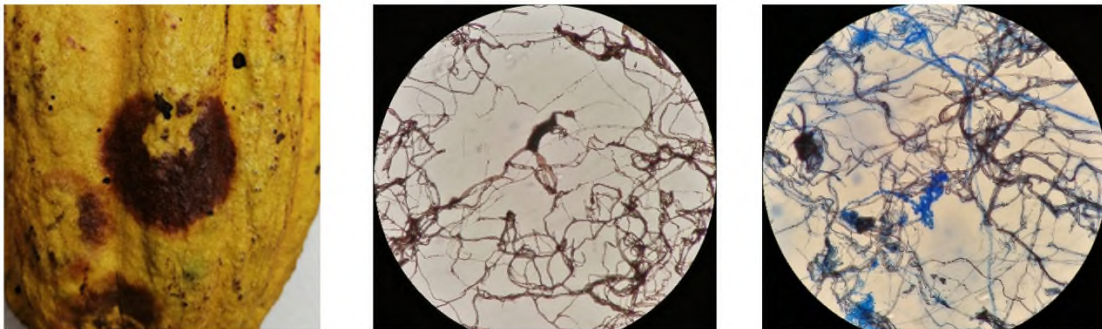
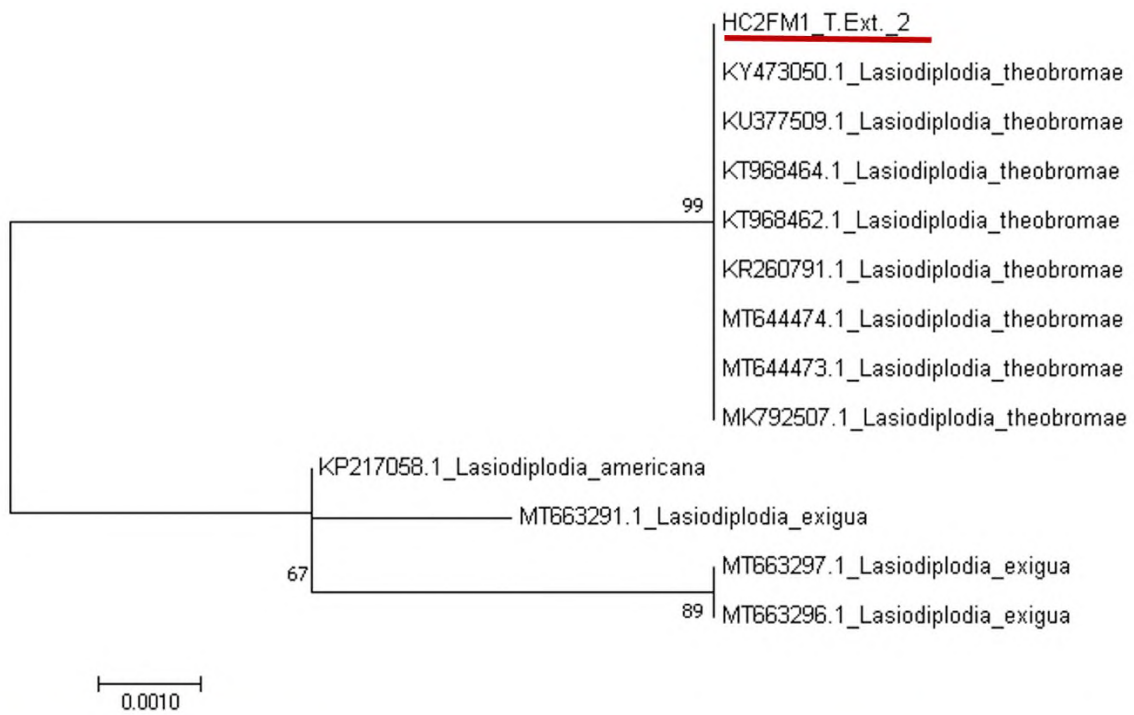
10. HC2FM-L2 Tejido Externo 2



Árbol filogenético del hongo identificado presuntivamente como *Diaporthe spp.* (HC2FM-L2 Tejido Externo 2). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopia del micelio y estructuras reproductivas típicas.

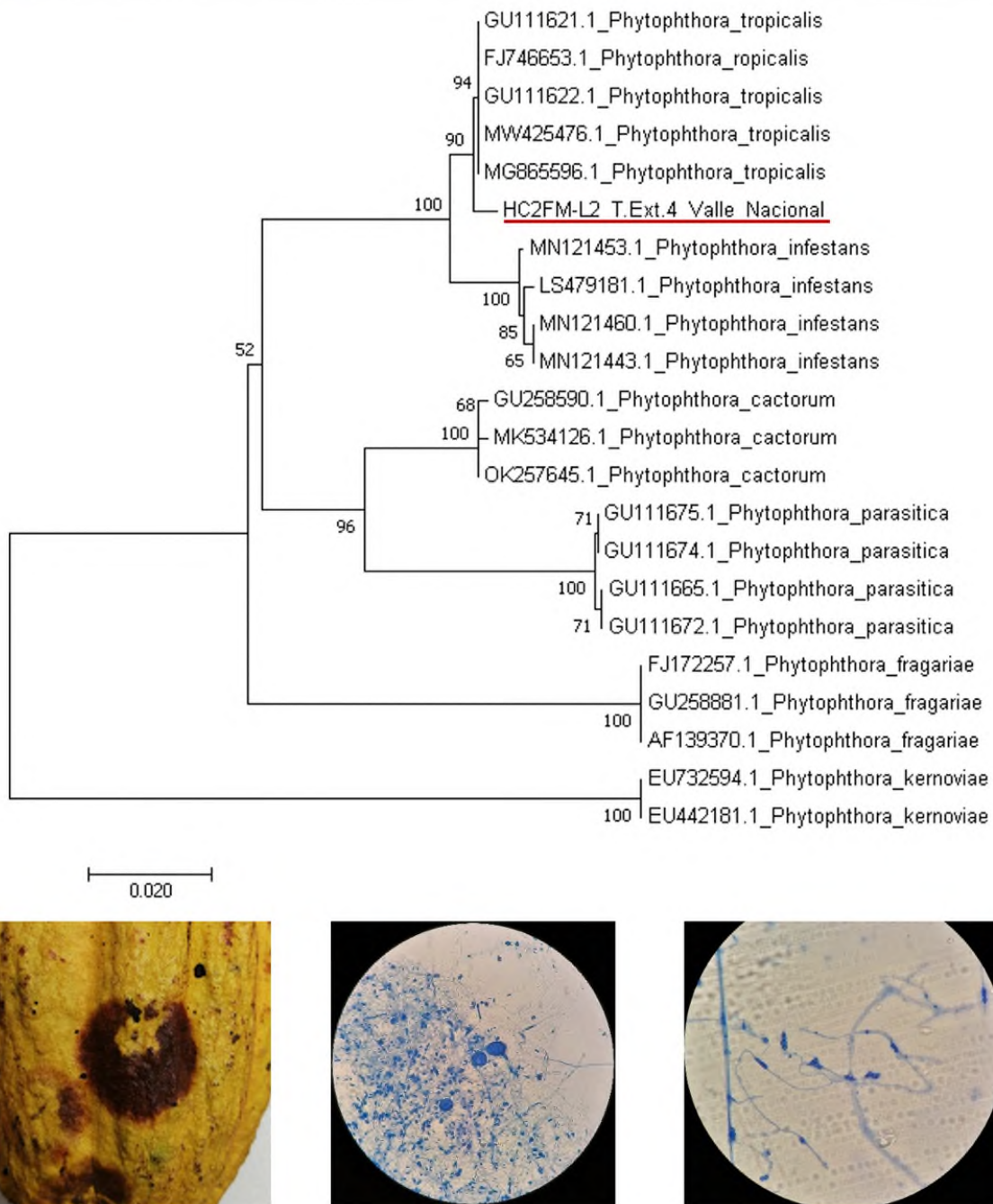
*Para este patógeno es necesario el uso de otros marcadores moleculares ya que se encontró una alta identidad y cobertura con al menos 3 especies diferentes de hongos del mismo género.

11. HC2FM-L2 Tejido Externo 2



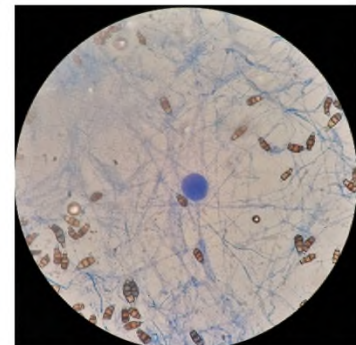
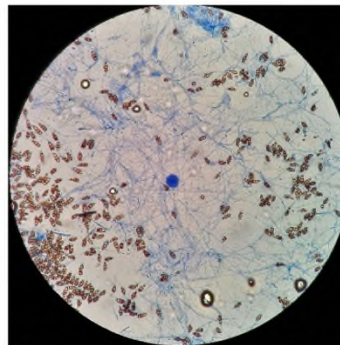
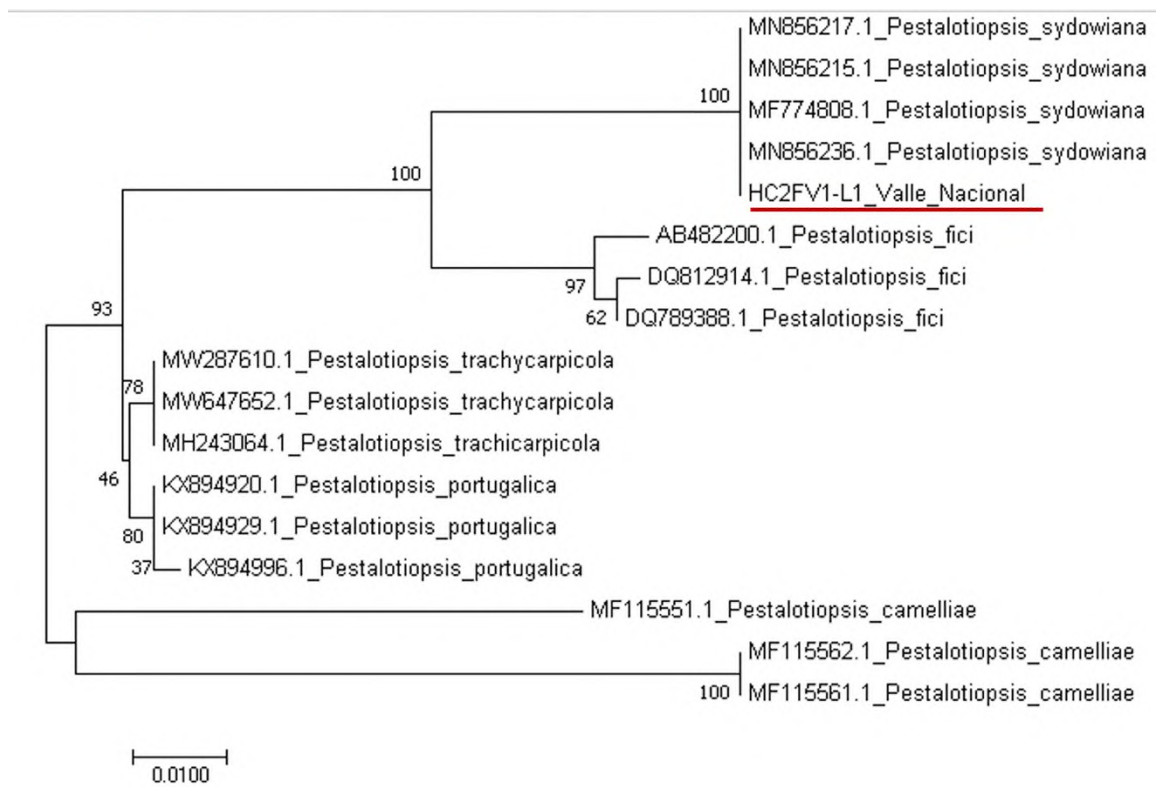
Árbol filogenético del hongo identificado *Lasiodiplodia theobromae*. (HC2FM-L2 Tejido Externo 2). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopia del micelio y estructuras reproductivas típicas.

12. HC2FM-L2 Tejido Externo 4



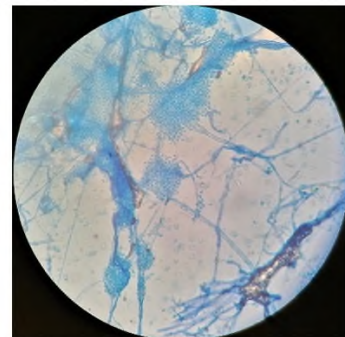
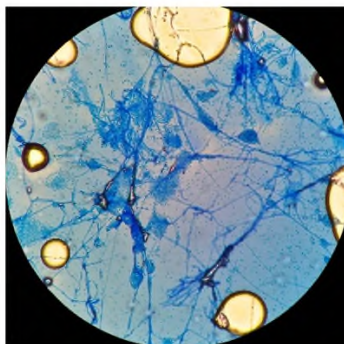
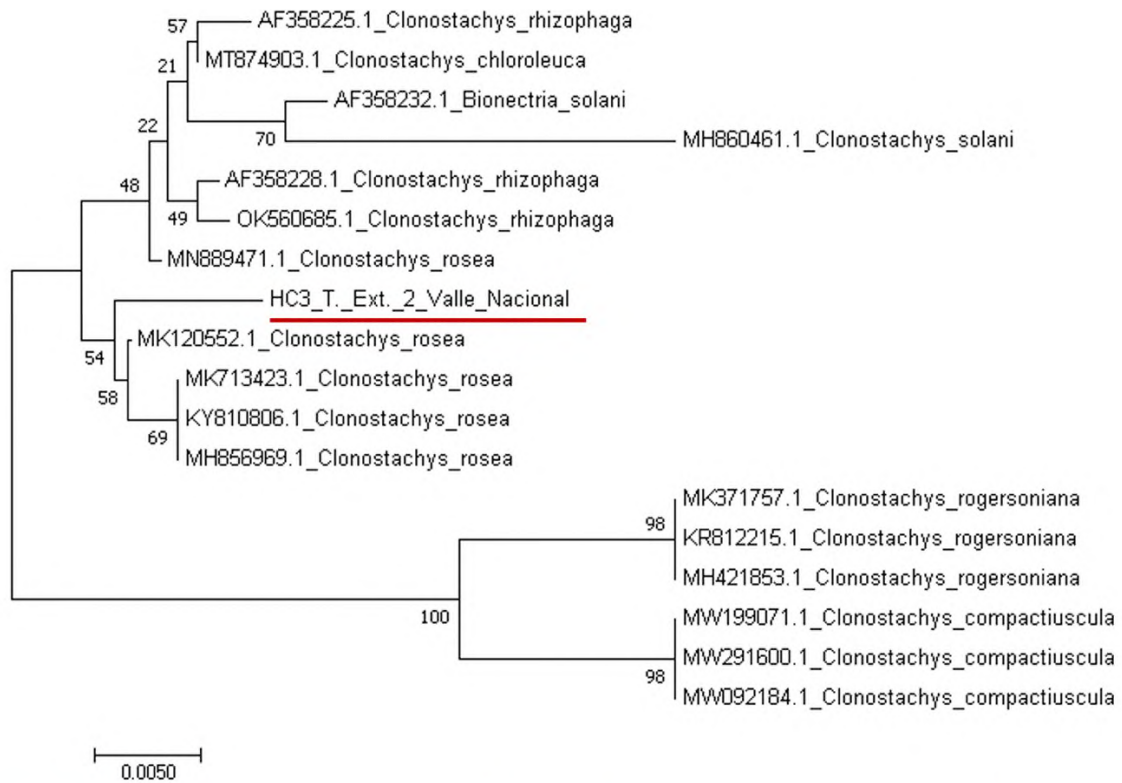
Árbol filogenético del hongo identificado como *Phytophthora tropicalis* (HC2FM-L2 Tejido Externo 4). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopía del micelio y estructuras reproductivas típicas.

13. HC2FV1-L1



Árbol filogenético del hongo identificado *Pestalotiopsis sydowiana* (HC2FM-L2 Tejido Externo 4). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopia del micelio y estructuras reproductivas típicas.

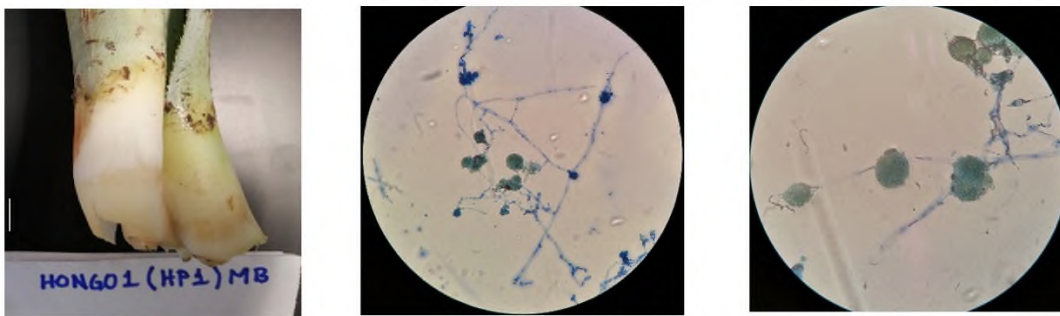
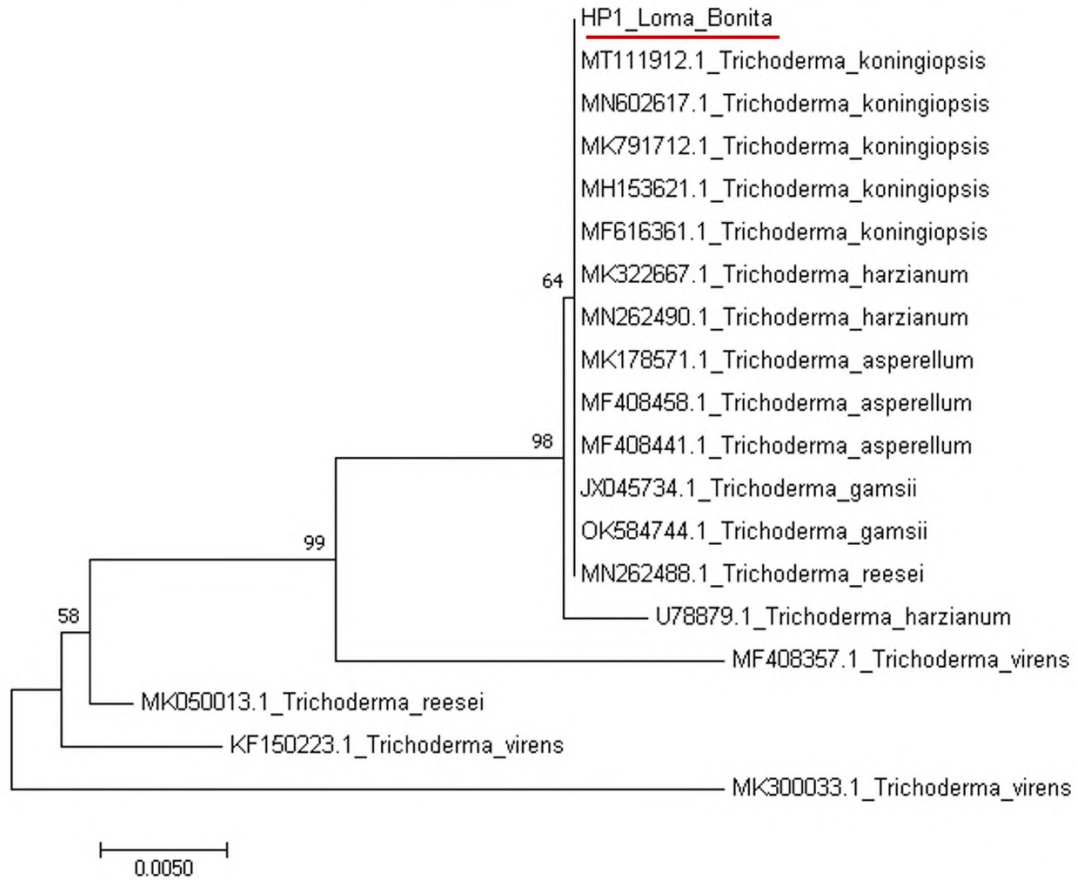
14. HC3 Tejido Externo 2



Árbol filogenético de del hongo identificado *Clonostachys rosea* (HC3 Tejido Externo 2). La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del fruto en donde se aisló el hongo, así como la microscopia del micelio y estructuras reproductivas típicas.

Árboles filogenéticos y morfología de hongos fitopatógenos aislados de tejido de piña

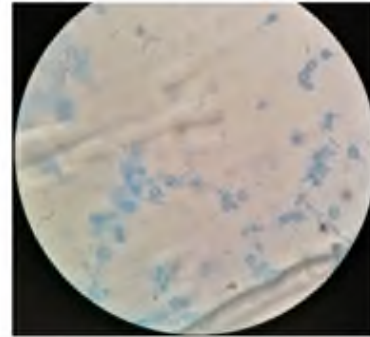
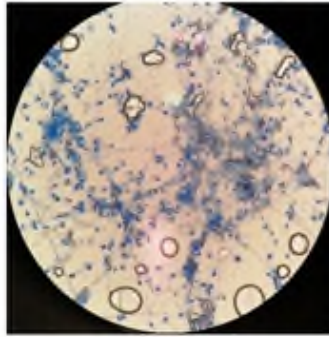
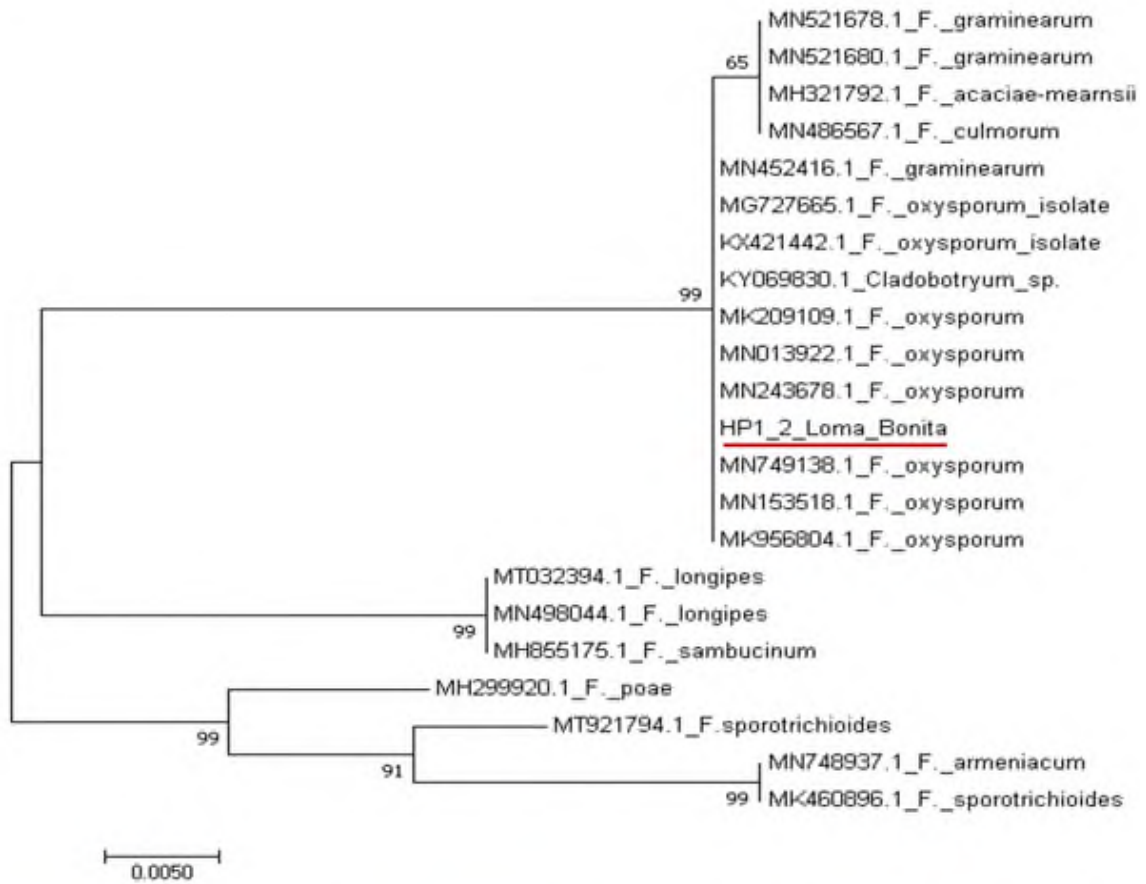
1. HP1 Micelio Blanco 2



Árbol filogenético del hongo identificado como *Trichoderma spp.* La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del tejido en donde se aisló el hongo, así como la microscopía del micelio y estructuras reproductivas típicas.

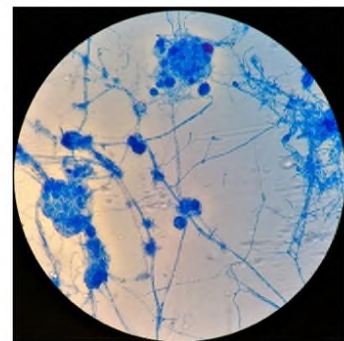
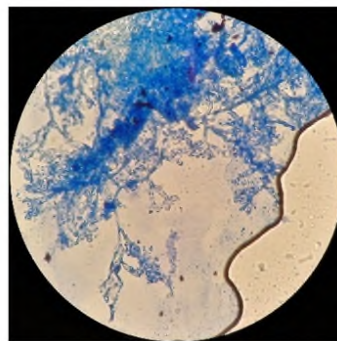
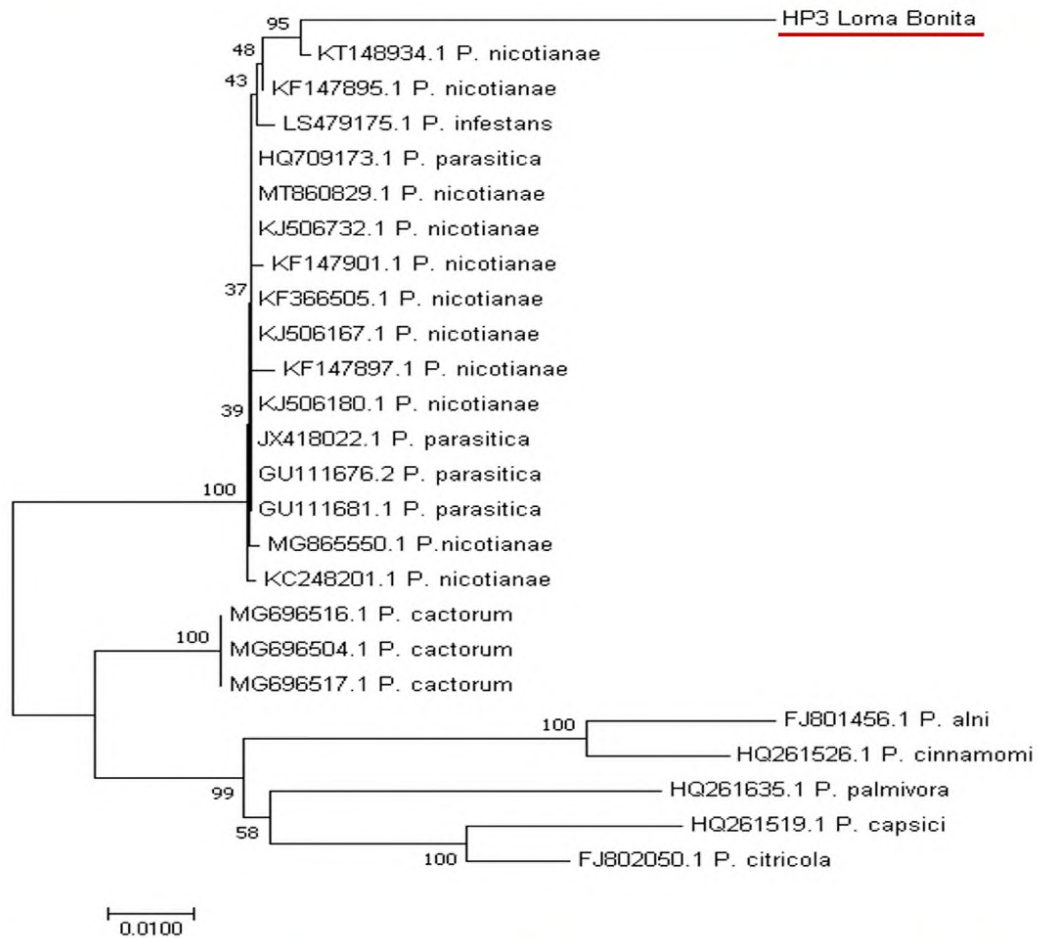
*Para este hongo es necesario el uso de otros marcadores moleculares ya que se encontró una alta identidad y cobertura con al menos 3 especies diferentes de hongos del mismo género.

2. HP1 Micelio Morado P. Hifa S/



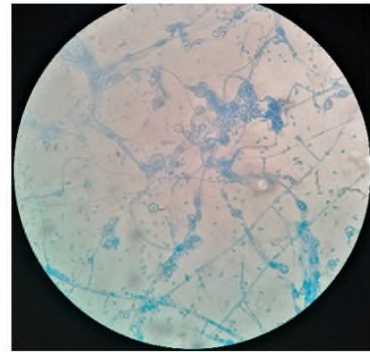
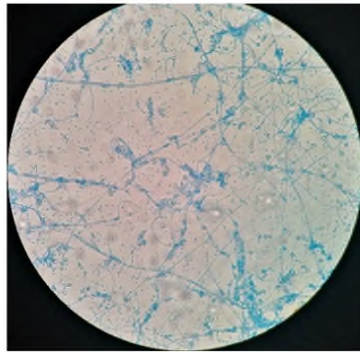
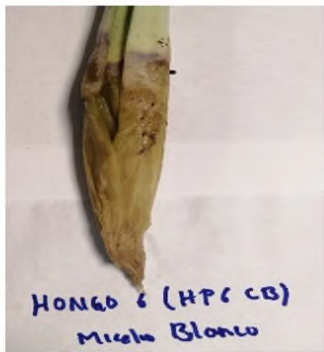
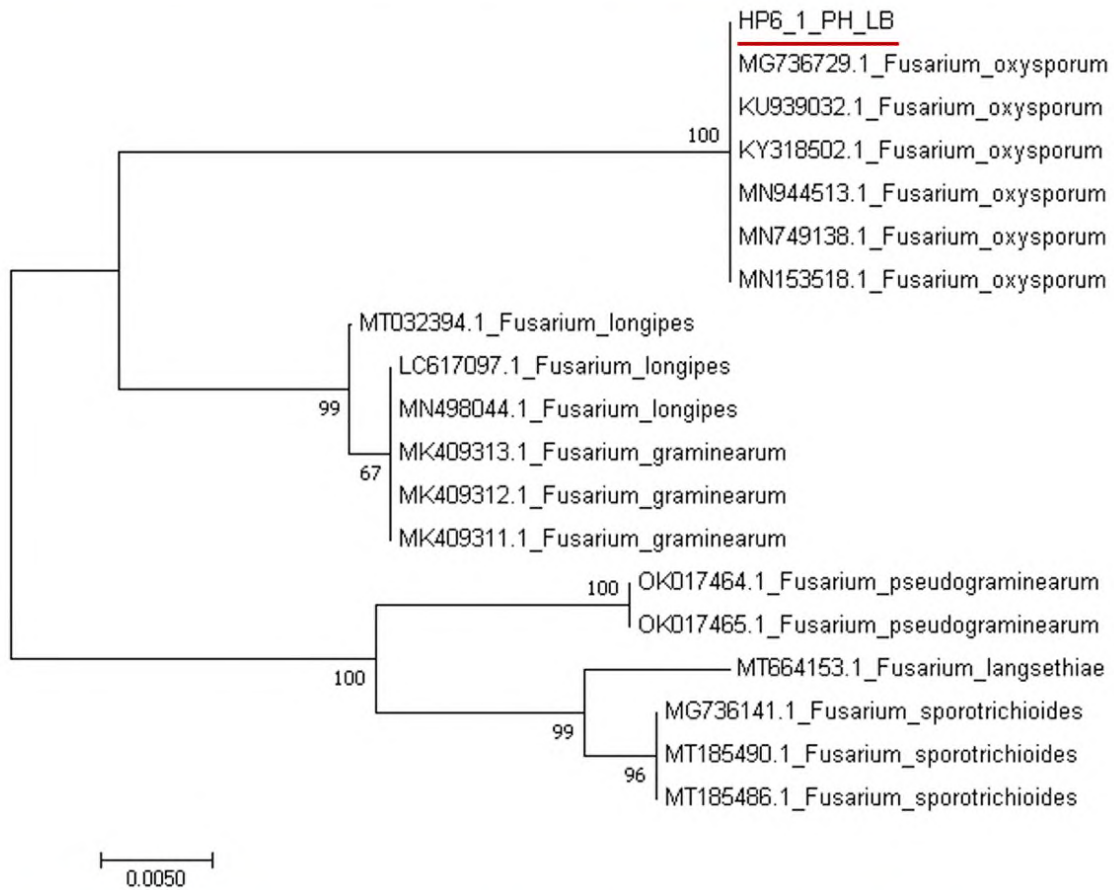
Árbol filogenético del hongo identificado como *Fusarium oxysporum*. La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del tejido en donde se aisló el hongo, así como la microscopia del micelio y estructuras reproductivas típicas.

3. HP3 2 Micelio Arrojetado



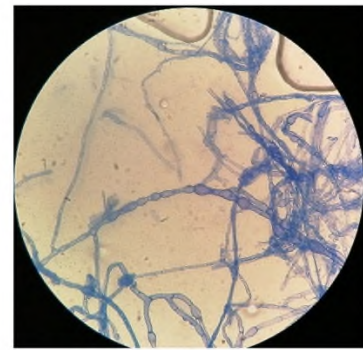
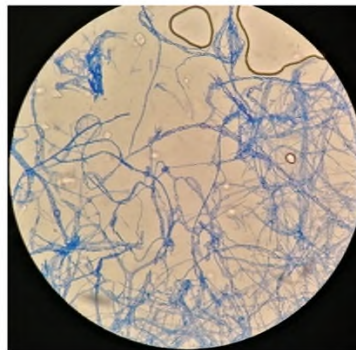
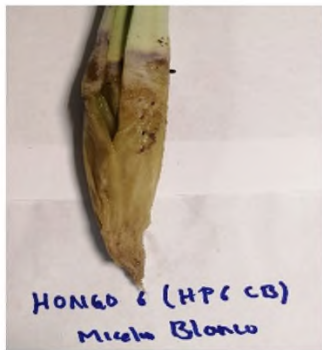
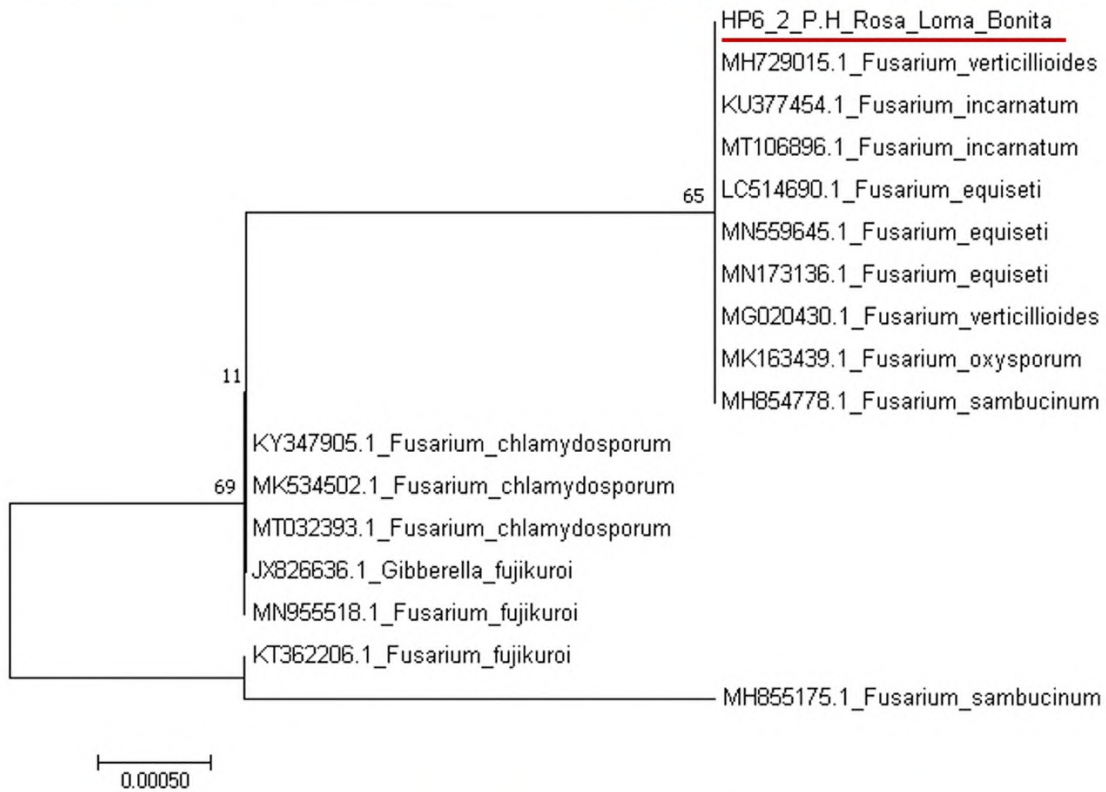
Árbol filogenético del hongo identificado como *Phytophthora nicotianae*. La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del tejido en donde se aisló el hongo, así como la microscopia del micelio y estructuras reproductivas típicas.

4. HP6 1 S/D P. Hifa



Árbol filogenético del hongo identificado como *Fusarium oxysporum*. La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del tejido en donde se aisló el hongo, así como la microscopía del micelio y estructuras reproductivas típicas.

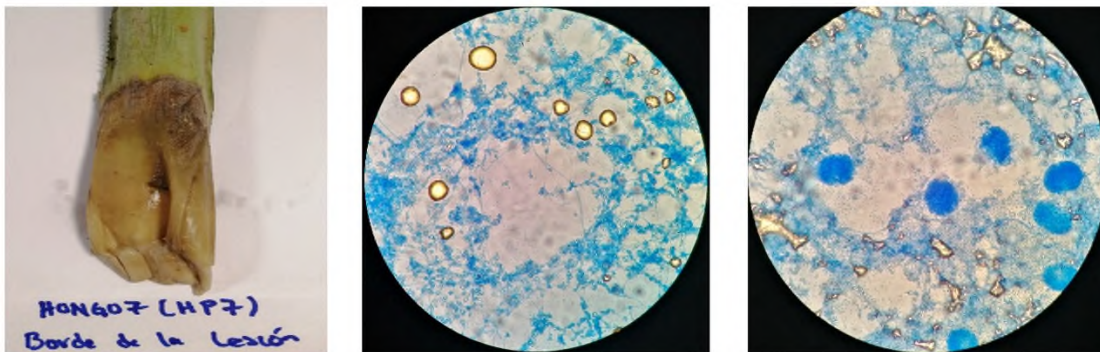
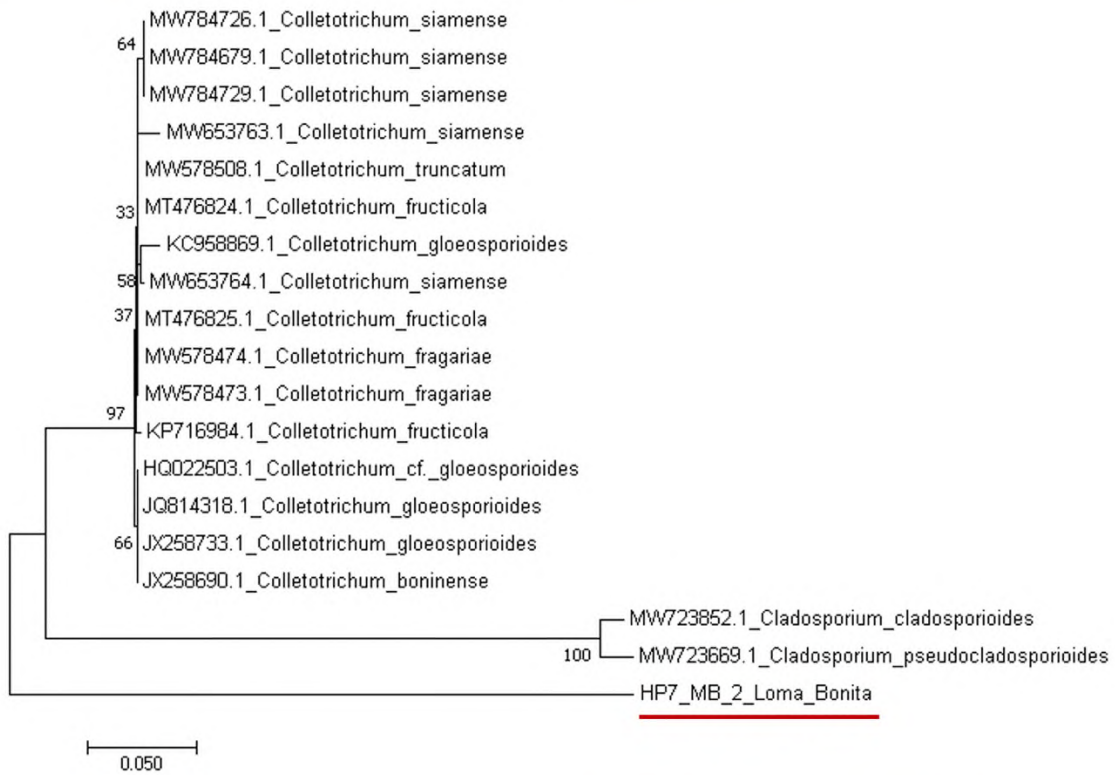
5. HP6 2 S/D P. Hifa Micelio Rosa



Árbol filogenético del hongo identificado como *Fusarium spp.* La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del tejido en donde se aisló el hongo, así como la microscopia del micelio y estructuras reproductivas típicas.

*Para este patógeno es necesario el uso de otros marcadores moleculares ya que se encontró una alta identidad y cobertura con al menos 3 especies diferentes de hongos del mismo género.

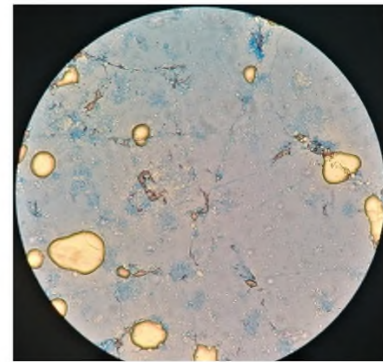
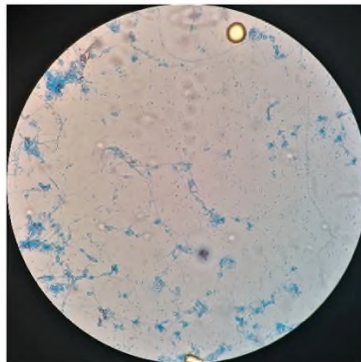
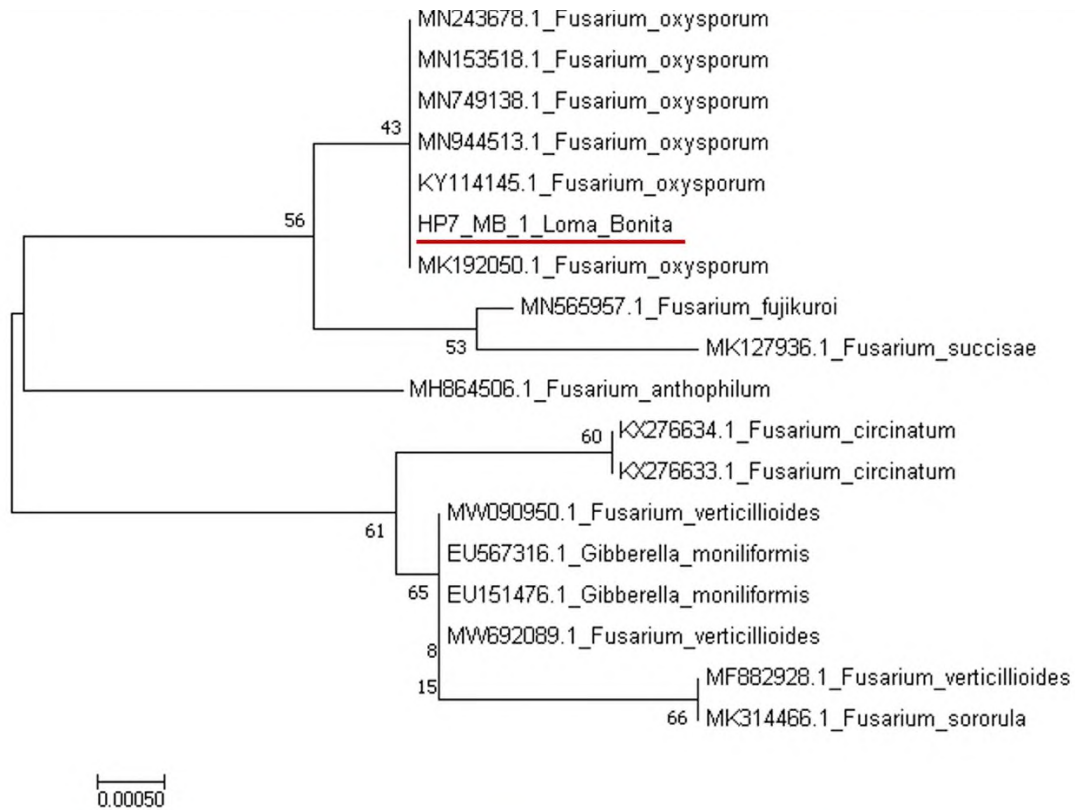
6. HP7 2 M. Blanco T/Sin lavar



Árbol filogenético del hongo HP7 2 M. Blanco T/Sin lavar. La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del tejido en donde se aisló el hongo, así como la microscopía del micelio y estructuras reproductivas típicas.

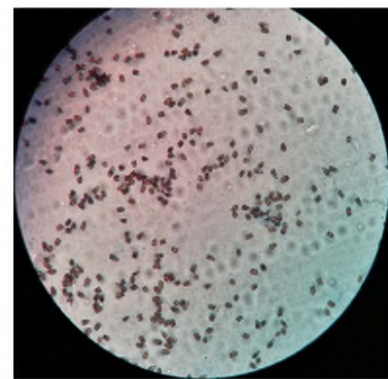
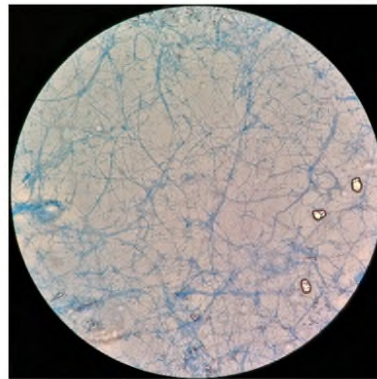
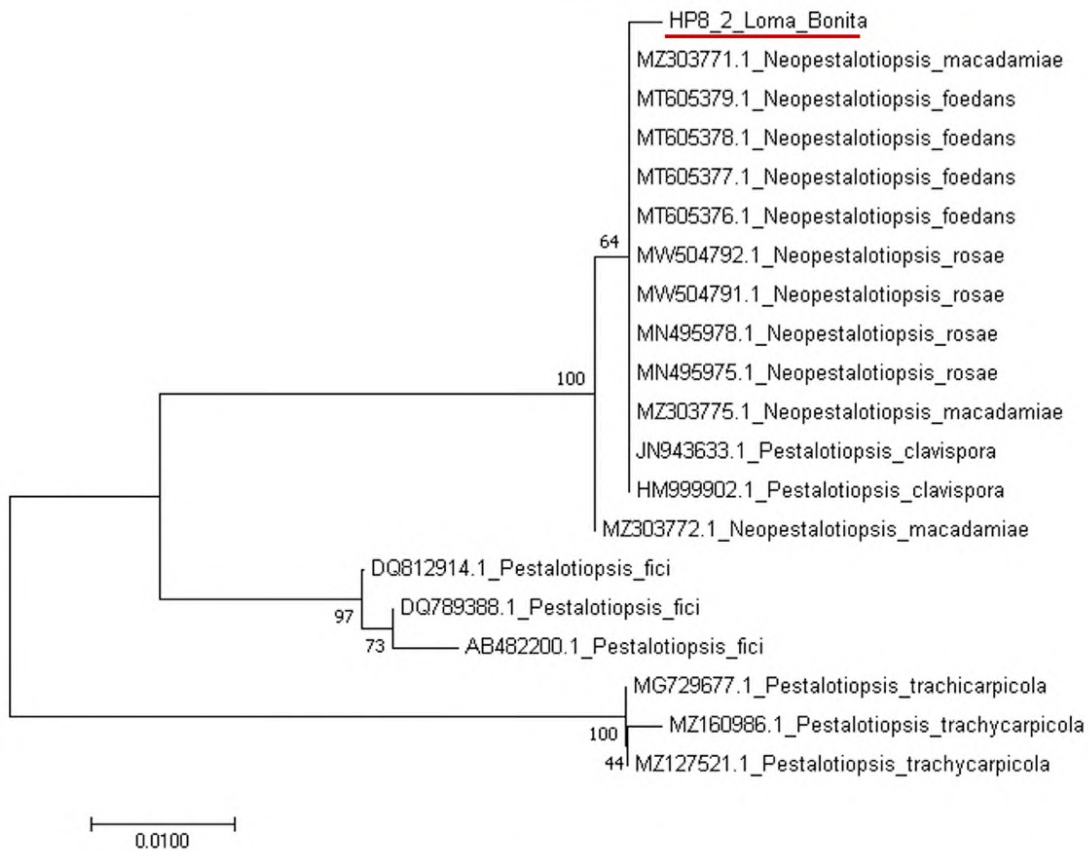
*Para este patógeno es necesario el uso de otros marcadores moleculares ya que se encontró una alta identidad y cobertura con los generos relacionados (*Cladosporium* y *Colletotrichum*).

7. HP7 1 Micelio Blanco T/Sin lavar



Árbol filogenético del hongo identificado como *Fusarium oxysporum*. La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del tejido en donde se aisló el hongo, así como la microscopia del micelio y estructuras reproductivas típicas.

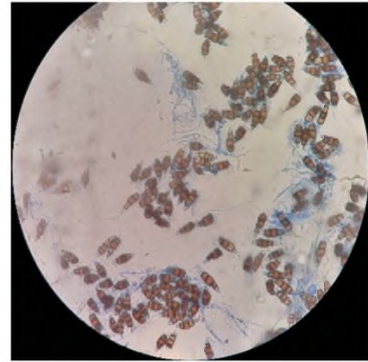
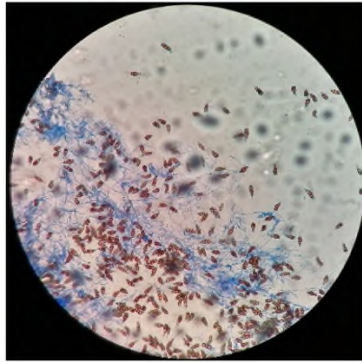
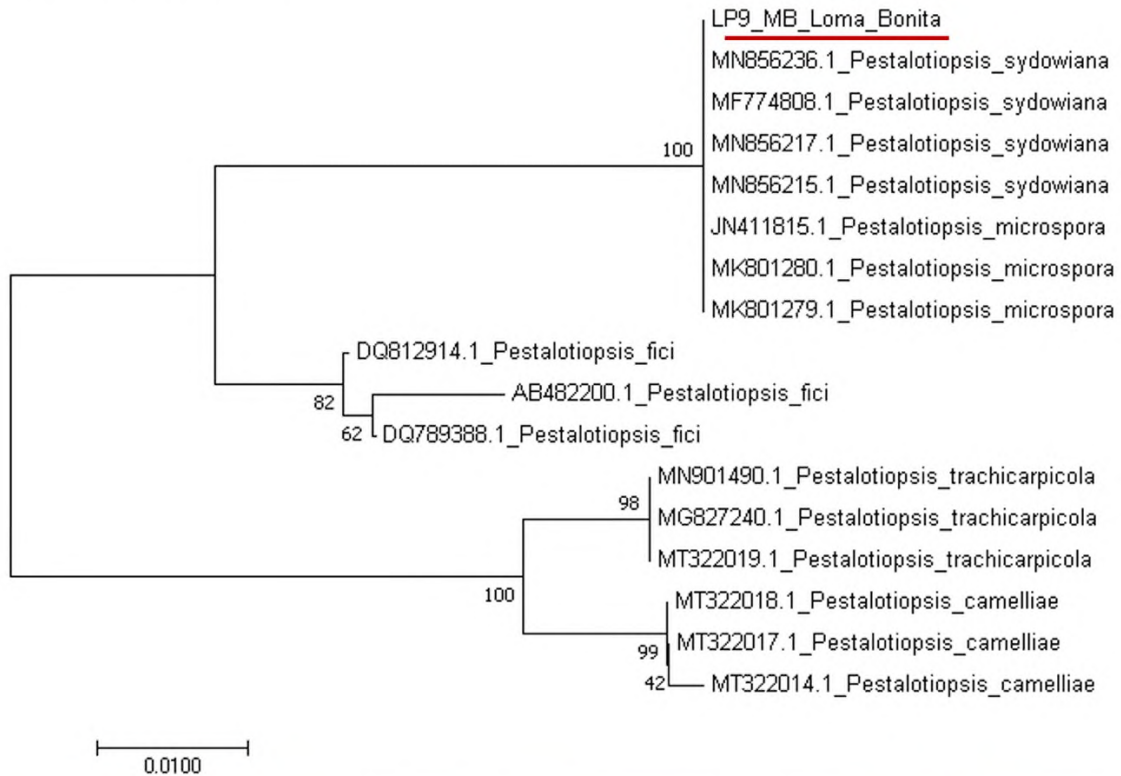
8. HP8 2 Tejido Lavado



Árbol filogenético del hongo identificado como *Neopestalotiopsis* *ssp.* La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del tejido en donde se aisló el hongo, así como la microscopia del micelio y estructuras reproductivas típicas.

*Para este patógeno se necesita usar otros marcadores moleculares ya que no se logró la separación a nivel de especie.

9. LP9 Micelio Blanco



Árbol filogenético del hongo identificado como *Pestalotiopsis ssp.* La secuencia marcada es la obtenida en este trabajo. Se observa parte del tejido en donde se aisló el hongo, así como la microscopia del micelio y estructuras reproductivas típicas.

*Para este patógeno se necesita usar otros marcadores moleculares ya que no se logró la separación a nivel de especie.

Anexo IV

Identificación de dominios y alineamiento de proteínas DCL de los patosistemas analizados en este trabajo.

Patosistema *Theobroma cacao*: *Lasiodiplodia theobromae*

Claves de dominios:

Helicasa DEAD
 Helicasa C-terminal
 Dicer-dimer
 PAZ
 RNasa III
 dsRt

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC MEYQKCKGVLSSRKLRLSSNPSIKWSEIPQRKESKLNHNSPQPFNPQNTQKHKVSGSNG 60
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC -----
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC -----
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI -----
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI -----

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC SSYWLDACEDISCDLINDFVDFDAPIVQESVDNASNQDFFGGIDHILDSIKNGGGLPPVG 120
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC -----
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC -----
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI -----
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI -----

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC NNNNNSSVVNGDGIQDSIVGDGWFQNEPSGVSKNLAENSVP PPPNGVEKNNLESKGQEKNC 180
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC -----
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC -----
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI -----
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI -----

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC ENSNWNLFDYSSKENGVHREDKSSCESRDRGLDSEEEKCGKRARVNGSKNDRQYPSRGQYY 240
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC -----
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC -----
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI -----
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI -----

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC PRDRERCSARKRVRDWDFDRDRREHVRRREHYNGSSRRDGRDRERDRREPRGYWERDRS 300
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC -----MPDGELSADGV 11
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC -----
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI -----
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI -----

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC GSNEVVFR LGTWEADRYREGKAANDKSQCNGKIEKKVEQPKEKLEEQARQYQLDVLEQ 360
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC E--PP---VTAKPKAYASPSPIAEVSEE-NG--AKV--EKKEKDPRKIARKYQLELCKK 60
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC -----MMVLDNN-DP--AKEDPSSPSNPKDLNPRGYQLEVVYEV 35
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI -----
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI -----MESPNGEPTFFCLRSYQAEVVEE 23

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC AKKNTIAFLETGAGKTLIAVLLIKSICDDLQKQKKMLSVFLVPKVPLVYQQAEEVIRER 420
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC AMEENIIVYLETGCGKTHIAVLLIYELAH LIRKP-QQKICIFLAPTVALVQQQGRVIEDS 119
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC AKKRNI IAVLDTGGGKTMIAVMLINDFGQAIRSFDNKKLIIFLAPT VHLVNNQQFEYIKLH 95
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----MH 2
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI -----
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI SLKQNIIVAMDTGSGKTHVAISR--TAAELES CNPDQLVWFIAPTVTLCHQQFCLFEKH 80
  
```



```

TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC|NSDYLLLVKSGDFFTHSRLKNYLASGDIRKESLCHASHACS-----PLRNHLYDEE|453
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI|NSRYLHMIEEGNLRHRQLVLEARQAEKLMRQFCEALPEDRLLKGNADLDDLILDRDTRF|406
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI|DSKFVIMFPDDSTFVKSPSEM-WLDLEEQMKAYLND--QRVVQAAE---QREELLEDGDD|556
* : : . . . :

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC|VYQVESTGAIVLSNSAVGLIHFYCSQLPSDRYSILRPEFTMEKHEKPGGPTFYSCKLQLP|989
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC|MYKVDSSGASISSGYISILLHQYCSKLPHEYFDPRPSFFYFDDI----GGTICNIVLP|659
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC|VYIVDATGASVTADSAVSLLQRYCEKLPQDKYVVPKPSFKLTFSG----GLYECKLLLP|604
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC|VYRFASGTACVTLSSSVGLIHFYCSRLPADGYFKPTPRCIDKE-----KGVCTLYLP|506
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI|TYTEPSTKAKLTYDSSLSVLAHFTALLPRQGEVPPFDPLYIVSPWS----GKFCIEVILP|461
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI|TYRCESTGALLTLDNAMQHLHYHFCAILGDGQHVLDLRPRFFFTVDQND---RTATVTLPL|612
* : : * : : . : : : * * * : : **

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC|CNAPFELECGPICSSMRLAQAVCLACKKLEHMGAFDMLLPDKGSGEAEAKVDQNDER|1049
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC|SNAPINQIASTPQSSVDAAKKDACLKAVEELHKLGLALNDYLLPLQKNAFEETVLESDDS|719
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC|VNAALQTIIVGPLSRNSHLAKQLVLEACKQLHQMGALDDHLLPTIEEPSQNHCVAKGKDS|664
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC|KSCPIQTVC--VQGNIKTLKQKACFEACKQLHEIGALTDNLVDPDIVAE-----EADA|556
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI|ENSPIPSAMGRICARKAISKRSAAFEACVQLREGGYLDENLLPIYTKQLPAMRNAR----|517
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI|SSPG-----A-----|617

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC|DPLPGTARHREFYPEGVANILQGEWILSGRDGTEDSKILHLYMYTIKCVNSGSSKDPFLN|1109
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC|GSSEDEDSRGELEHMLVPAALKEPWTN-----LEDYVLLNSYYIKFIDP-----E-DR|767
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC|GSGAGTTRKRELHGHTTCIHALSGSWG-----KPDAAVFFAYKFNFSJNI-----I-SV|712
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC|GEIGREPYN-DDQPIFFPPELVNQ-CE-----HEDMKKYCYLIELKQNF-----DYEF|603
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI|--LALNCKKTSAYDMMTKP---QLWAATRGTTPPE---LHITVIELPD-----GLER|561
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI|-----YGEGE-----RQFLEFGGESRPALEVYAEQLQAGLSP-----|648

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC|KVSDFAVLFGKELDAEVLMSVDFLIARAMITKASLVFRGS-IDITESQLASLKSFHVRL|1168
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC|SYKEFGLFVKSPKPEARMELDLHLARRRSMVTKLVPSGV-AEFNRKEIMQAOHQFQEMF|826
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC|VYSGFVLLIESKLADDVGNIELDLYLIRKM-VKTCVSSCGQ-VHLDADQMMKAKRFQEFF|770
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC|PVHNIMLLVRSQLEIDNLSKMGFELEVDKRGF-LTVNLKYVGL-IRLDPSQVILSKRFQIAV|661
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI|PNQPLAILTRTPPLPSL---PEFFIFLNSGTASMVQLTPLTSVFKCSFDEVQYLTYTLRV|618
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI|-----TI-----GLLHPKGVV-G----APLMFRRFQIPD|672

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC|MSIVLDVDV-----DPSTTPWDPKAYLFPVVGDKFVDPVKEIDWDLVD|1213
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC|FKVILDRSKFLSEYV-----PLGNNEVFASSSSTFYLLLPVILHNCE-NKVMVDWKIK|879
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC|FNGLFGRLFVFGSKSGSTRREFLLQNKTSLSLWSPSNMVLPLLE-DSLS-NELRINWPAVT|828
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC|FRVLMDHKVEKLTE-----VLGDPR--SGNNSDIDYLLLPST--YLG-QNPVIDWPSVC|710
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI|FKDIFNKTYEED-----HAKMSYWIAPMKACYQLVDGGFY-GLRDILDWAALE|665
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI|ISMTE-----|678

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC|NIIITDAWSNPLQRRAPRDVLTGNTERTLGGDRREYFGKLRHGIAFGHKPHPTYGIRGAV|1273
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC|RCLSSPLFKTPA-----E-----AVEN--GNFP--S-----|901
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC|ACTFAVEFLNKN-----SLLGTEQSDGDG--GNLS--LNRTGS-----|862
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC|SVLFSYENVWKD-----HVCNAG-----|728
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI|EVQKHVEYHWTAEMSDDFL-----|684
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI|-----ENLQEE-----|685

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC|APFDVVKATGVVPTRDVIEVQEGDLTKGKLIIMADGFLHAEDLVGKIVTAAHSGKRFYVDS|1333
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC|-----GVCLELANGCRDVRDVKNSFVYAPHKVAFYFITN|935
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC|-----SVTECK----GTNIIHFANRSDVNNLRNMVVVAIHTGRIYSILE|903
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC|-----MIQTKSGLLCACMIENSLVCTPHNGHAYIVKG|760
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI|-----LDKYLVDKWDGRRRFFTEC|703
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI|-----EATVQVCS-----|694

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC|IRYDMTAETSFPKREGYLGPL---EYS--SYADY-YKQKYGVELRHKQOQLIRGRGVSY|1386
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC|IVGEKNGYSPIYRDSG-----TLSHVEHLKMSDIHLKHPEQPLLRKPLFK|980
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC|LVSNTSADSSFNIEIVDSV-SS---EFA--TFSEY-FHKKYGIVLKHHPGQPLLLQLQSHN|955
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC|FLKNLNTANSLKLRNGSV-----M--TYMEY-YELRHGIQLRFSQVSPFLDARHVPF|808
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI|LKGDLPKTPDPVEDAVKGGKTVHEHRKDILNYSISLYKMSRAKADSTWNRDQPVIEARQVLH|763
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI|-----AFPKRDRFLHYIRDS--A--QYGMY-----|715

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC|CKNLLSPRFEHSEGE-----SEEALDKTYVFLPPELCF--VHPLSGSLVRGAQRLPSIM|1439
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC|LRNLLHNRKPEDSE-----SNELDEYFIDLPELCLQKIIIGFSKDIGSSLSLLPSIM|1032
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC|PHNLLVNFNDEGVSAKASQAGLVNEKPRNHVHMPPELLL--VLDVPIVLDLAFYLLPSLM|1013
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC|VHNYLHRCKRQK-----EKESSNAFVELPPELCLDVIMSPISISTFYSFTFIPSIM|858
TR|A0A5N5DT14|A0A5N5DT14_9PEZI|RRNMLAEPERREG-----DLRSKVYLCPEPLR--ISTLHPAAVATYIIFPAVI|809
TR|A0A5N5D4R5|A0A5N5D4R5_9PEZI|-----TKETILPAEGFL--MSRLPVAYSMPAAFPASIL|746
: * : . : : :

```

TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	RRVESMLLAVQLKRIIQFS-----VPASKILEALTAAS-----CQETFCY	1479
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	HRLENLLVAIELKHFVSASFPEGAEVTANKVLEALTTEK-----CQERFSL	1078
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	HRLESLLMASQLREEINFH-SSNFDIPSSLIIEALITTLR-----CCESFSM	1058
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	YRLESLLLATNLKMKQDHCQVNVNITPTMKVLEAITTK-----CQENFHL	904
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	HRIDQYLIALEACQLGLD-----IRPDLALEAVTKDSNTTEEHGEEVLNFRGMNNY	863
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	HRYELFMIVQELCDTAVRSV--G-FTNHLELVLRAITASS-----TNENDY	788
			* : : . : *	
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	ERAEELLDGDAYLKWVSRFLFLKYQKHEGQLTRMRQLMVSNMVLQYALSGLQSYIQAD	1539
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	ERLESGLDAFLKFAVGRHLFLLDALDEGGLTRRRSNVAVNSNLFKLATRSNLQVYIRDQ	1138
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	ERLELLGDSVLKYAVSCHLFLRYPKNHEGQLSAKRSWAVCNSTLHKLGTDRRLQGYIRDS	1118
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	ESLETLGDSFLKYAVCQQLFKTHQNHGEGLLSIRKEKIIISNTALCMLGCDKLPKGFIRNE	964
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	ERLEFMGDCFLKMATSIALFGENPDDNEFDFHVKRMCLVCNQLFETAKELQTKYIRSM	923
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	QRLEFLGDCILKYSTAVQLMADFLHWPEYSYLERKDRIVSNGALAKASRRTGLDKFIITK	848
			: * : ** . * : : * * . * : *	
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	RFAPSRWAAPGVLVPEFDETDKGDTSFLDQEQATVDVPIPVKEHSDGFEDEEMEDGEIESD	1599
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	PFDPCCQFYALGHPCQ---IICITKE-T-----EGTTHS-QYNCQADHANSEVRC	1181
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	AFDPRRWVAPGQLSLRFPVPCCKCGVDSL-----EVPLDK-KFQTEDPKVKVKGKSC	1166
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	PFVKSWIIPGYNSGSYA-----LNE-ETLCS-----TRKIY	995
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	AFSRRTWYPDGLKMLEG-----KGHK-----RTGE	948
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	AFTGSKWRPRYQDILAT-----SQAA	870
			* :	
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	SSSYRVLSSKTLADVVEALIGIYYVEGGKNAANHLMKWIGIQVESDPDEM-----E	1650
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	SRNHHHLHKKTTIADVVEALVGAFIVDRGFKAATAFLRWIGIRVDFQHSQV-----N	1232
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	DRGHRWMCSKTISDCVEALIGAYYISGGLIAALHMMKWLGIIDAEVDPALV-----V	1217
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	VSGRRKLNKKVADVVEALIGAYLSVGGEAAGVFLFNWIGINVDFTNIPY-----Q	1046
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	EVIKHGLGDKTTIADVCEALIGAAAYLTHDSRDEWKQENWDNAVKAVTNLWASPEHTMKKWS	1008
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	LQESQTLSTKTLADVVEALIGAAAFVEGGIHKALHCTSTFL-----TSLEWK	916
			: : * : : * * : : *	
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	SMVTPSSVP--E----SI-LRSVNFDALEGALNIKFKNRALLVEAITHASRPSS---GVS	1700
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	N--VCAASKRFM---PL-CSKVDTGALENLLGYQFLHKGLLLQAFVHPSHNKH---GGG	1282
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	EAIRCASVRTYV-----PT----DETHIELKMGYNFSSKFFLQEAALTHASV--G---EFY	1264
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	RQFKVHA-----EKLNVNRVLESLLNYSFQDPDLLVEALTHGYSYMLA-E-IPE	1092
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	EYFDAYEKPAYLD-AEPTAAQMDLVNQAQAEKHPYFRSAKLLRSAFIHPSPYPTFE-KVP	1066
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	SLHHCRTILQDHAAEEHASAPVHLHLEVEELIGYTFKKNYLLLEALTHASFTAPREAASS	976
			* * : * : * *	
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	CYQRLEFVGDVAVLDHLITRHLFFTYTNL-----PPGRLTDL	1736
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	CYQRLEFLGDAVLDLYLITSYLFVSYPKL-----KPGQLTDL	1318
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	CYQRLEFLGDSVLDLLITQYLYHNHTDI-----DPGELTDL	1300
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	CYQRMEFLGDSVLDLYLITVHLYSKYPRM-----SPGLLTDL	1128
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	SYQRLEFLGDSLIDNACITWLWYNFPDK-----DPQWLTEH	1102
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	SYQRLEYLGDVAVLDYIISGRLYAHRKPAANANASNDGGSTIPPRGHADELPHWMTMSI	1036
			.***:***:***:*** *	
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	RAAAVNNENFARVAVKHQLH-----	1756
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	RSVSVNNKSFANVAVDRSLH-----	1338
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	RSASVNNESFAQVAVRHDLH-----	1320
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	RSASVNNDCYALSAVKAGLH-----	1148
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	KMAMVSNRFLGAVCVKLGPH-----	1122
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	RAALVNASFLAFLCMEATIFEPRTDVVVFAPSSTTTAAPLPLSTALANEQPYTVPGTPSRK	1096
			: . * . . : . :	
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	---VHLRHGSSALEK-----QIRDFVKEVQDELLK-PGFNSFGLGDKCAPKVLGDIVE	1805
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	---KFLICDSCPLSE-----AIGKYVDFITSSP-E---RGL---FEGPKCPKVLGDIVE	1382
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	---KHLQHCSTLLSN-----QISEYVQSFPESHDT---IRS---GPGIKGPKALGDIVE	1365
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	---KYILHASQKLHK-----EIAETVESFKELSMK-YTFGW---ECDKSFKVLADIIIE	1195
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	---KHLKYYHSQLEY-----QIRDYVTEIREAEHNANGARDFVWSVKPPPKCLPDIVE	1172
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	ALWHFLRHSSPTLLASATAATARHERYSEDIWRALRQHRRYPWRLFAKVGAEKFFSDIVE	1156
			: . * . . : . : * : : * *	
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	SIAGAIFLDSGRDTSVVWRVFPQLLHPM-----V-	1834
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	SSFGAILLDTGFNLNRVVKIMLSILDPI-----K-	1411
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	SIVGAILDITNMLNLEWVRIVEPLLSPI-----V-	1394
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	SLAGAI FVDSGYDKHAVFRSIRPLEPL-----I-	1224
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	AYVGALFVDSEYDFAEVQKFFEMHIKWY-----FE	1202
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	AVLGAVIDSTTNSLSVGDNEMVDGAEQEKNGKVVLEEEELACERFLEKIGLMDVL	1216
			: * : * : * :	
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	----TPETLPMHPVRELQERCQ-----QOAEGL-LEYKASRSGNLA---TVEVFIDGV-Q	1879
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	----SLSTVQLNPIRELQELCQ-----SCNWD-LKFLTSKSGRN-FSVDAKVKAGDVPL	1459
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	----TPDKLELPLRELNELCD-----SLGYF-IKEKCIYNGEI-VHAKLQLQLDDILL	1442

TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	----TPETIKFHVKELNELCO---KEHFE-ORPATVSHDNGVTSITTEVFANGMV	1273
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	DITIIYDSYANAHPIVRLHRLFLEVLGCTEHKVMVQELPTITPGAPVRCI-AGVMVHN-RI	1260
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	DRFMRDEVDCCLHPKTQLGRLAG---SDKVVVE-----W-DEGDLD	1252
			* . *	
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	IGVAQNPQKKMA-----QKLAARNALAVLKEKETAEAK	1912
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	AVSAINPNRKDA-----IRTASQQIYAKLKALGYAPKS	1492
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	IGEGFDRIRKVA-----KGKAASYLLKELENRGISRKR	1475
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	HTSSASNNKMA-----RLLACKEVLSK	1306
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	IAEGMASSGKNA-----KAKAAKFALDDLETMPLFQF-	1292
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	AGEAESPEGGMKGRFRCRVGLGETWVGDWVDGETRHAETEAADRAVLTVAQGRS--W	1310
			* . *	
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	EN-----	1914
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	KSLEEVVKTSRKMEEALIGFDETPVDV---ADPDTNGSAKMKLQOSVENDFNPRIHFIN	1548
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	-----RK-----QGCADST-----QTDDDSLEPTNHKRO	1500
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	V-----	1307
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	-----KEMYGCDCDEQSDEECCGDDDDAGDLVEVGE--AEDTHVRIVK--	1334
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	-----RGME-RWEGASGDEIE---GGNG---DGDEVKSESESEVDQVV-----	1346
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	-----TEENG-----KKKKNGNQT	1928
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	KAINLCKPRNSPVSSPMPSFEVKAGCMPSPIEVKGALPCSSNVDPACGIDTPSRGESLQ	1608
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	RRAKIQ-----LLEDSTTVPSPTHSSKRACSTTPP-TPVIA---TINTKKG	1543
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	-----	
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	RGV-----	1337
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	AGAVIGDDSDMDDA-----TPQPSH-----AI-----	1368
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	FTRQTLNDICLRRNWMPFVRCVNEGPAHA-----KRF-TFAVKV-NTADRGWTD	1977
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	ARSRLRHETCAINCWAPPLPECCDEEGPSH-----LRSF-TFKVMLVIEEADMLI	1658
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	GPRTALFELCKLLWMPPTFTATEHKSSTLVEIGEGTERKKGFISFVSNITLNIPIRFGTI	1603
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	-----	
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	-----	
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	-----	
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	ECIGEPMPSVKKAKDSAAVLLLELLN-KWYS-----	2007
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	CFGSPRTKKAABEHAEGALWYKHEGYLH----	1690
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	ECTGDARADKKSLLDSAALVMLYLEQRGKLIIGES	1639
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	-----	
TR	A0A5N5DT14	A0A5N5DT14_9PEZI	-----	
TR	A0A5N5D4R5	A0A5N5D4R5_9PEZI	-----	

Patosistema *Theobroma cacao*:*Phytophthora nicotianae*

Claves de dominios:

Helicasa DEAD
Helicasa C-terminal
Dicer-dimer
PAZ
RNasa III
SRP

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC MEYQKCKGVLSSRKLLRSSNPSIKWSEIPQRKESKLNHSPQPFNPQNTQKHKVSGSNG 60
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC -----
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC -----
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----
TR|A0A0W8DVU2|A0A0W8DVU2_PHYNI -----

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC SSYWLDACEDISCDLINDVDFDAPIVQESVDNASNQDFGGIDHILDSIKNGGGLPPVG 120
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC -----
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC -----
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----
TR|A0A0W8DVU2|A0A0W8DVU2_PHYNI -----

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC NNNNNSSVVNGDGIQDSIVGDGWFQNEPSGVSKNLAENSVPPPNGVEKNNLESKGGQEKNC 180
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC -----
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC -----
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----
TR|A0A0W8DVU2|A0A0W8DVU2_PHYNI -----

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC ENSNWNLFDYSSKENGVHREDKSSCESRDRGLDSEKCGKRARVNGSKNDRQYPSRGQYY 240
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC -----
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC -----
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----
TR|A0A0W8DVU2|A0A0W8DVU2_PHYNI -----

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC PRDRERCSARKVRVDWDEFDRRDREHVRRREHYNGSSRRDGRDRRERDREPRGYWERDRS 300
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC -----MPDGELSADGV 11
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC -----
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----
TR|A0A0W8DVU2|A0A0W8DVU2_PHYNI -----

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC GSNEVVFRGLTWEADRYREGKAANDKSQECNGKIEKKVEQPKEKLEEQARQYQLDVLQ 360
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC E--PP---VTAKPKAYASPSPIAEVSEE-NG--AKV--EKKEKDPKIKARYQLELCKK 60
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC -----MMVLDNN-DP--AKEDPSSPSNPKDLNPRGYQLEVVYEV 35
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----
TR|A0A0W8DVU2|A0A0W8DVU2_PHYNI -----MDAALWEHQREIAAV 15

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC AKKKNTIAFLETGAGKTLIAVLLIKSICDDLQKQKKMLSVFLVPKVPLVYQQAQAEVIRER 420
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC AMEENIIVYLETGCGKTHIAVLLIYELAHLIRKP-QQKICIFLAPTVALVQQQGRVI EDS 119
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC AKKRNI IAVLDTGGGKTMIAVMLINDFGQAIRSFDNKKLIIFLAPTVALVQVFEYIKLH 95
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC -----MH 2
TR|A0A0W8DVU2|A0A0W8DVU2_PHYNI ARHRSVLVSSQPVGKTFMSCALLSEAASSNSTQVN-VVAVAASPS-----GRSA 64

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC TGYQVGHYCGEMG--QDFWDARRWQR-----EFETKQVLVMTAQILLNLRHSIIK 469
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC LDFKVGTYCGNCR---HLKNHQDWEK-----EMEYEVLVMTPOILLRSLYHCFIR 167
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC TNLEVEQYYGAKG--VDEWNAGCWNK-----EIKEHDVLVMTPOILLDALRKAFLS 144
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC TDLVNGKYWGEMD--VDFWDAAKWKQ-----EIEKYEVLVMTPOILLNGLRHSFFK 51
TR|A0A0W8DVU2|A0A0W8DVU2_PHYNI LQTQLARLRCGHRVLCSDSNTASQWLGDQEFARKQLHNAQVQIAILSPLILQEIILRKKTL 124
      ::      *      .      *      : : : : **      *      :      :

TR|A0A061DZU3|A0A061DZU3_THECC MEAINLLILDECHHA--VKKHPYSLVMSEFYHTT--PKNRPSVFGMTASPVNLIKGVSS 524
TR|A0A061GR83|A0A061GR83_THECC MDLIALLIFDECHHAQIKSNHPYAEIMRAFYDKA--TASTLPRIFGMTASPIVVGKDASS 224
TR|A0A061GJM5|A0A061GJM5_THECC LEMVSLMIIDECHRA--TGNHPYTKIMKEFYHKS--N--NKPKIFGMTASPVISKGVSS 197
TR|A0A061EY61|A0A061EY61_THECC INMIKVLIIDECHHA--RGKHPYACIMTEFYHHKLEAGVSDLPRIFGMTASPIKSKAASP 109
TR|A0A0W8DVU2|A0A0W8DVU2_PHYNI LINVDLLVVKDWDLVHAELP-SFFSLLTNLMDEM--TTATTLRIFATSTLPASKMDWNP 180
      :      : : : : .      .      :      : :      :      :      :      :      :      :
    
```


TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	QQAVCLAACKLHEMGAFTDMLLPD---KSGSEEA	EAEKVDQNDERDPLPGTARHREFYPE	1064
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	KKDAACLKAVEELHKLALNDYLLPL---QKNA	FEETVLESSDSGSSEDEDSRGELHEM	734
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	KQLVCLEACKQLHQMGALDHLHLP---IEEFS	QNHCVAKGKDSGSGAGTTKRKELHGT	679
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	KQKACFEACKQLHEIGALTDNLVDP---IVAB	-----EADAGEIGREPYN-DDQPI	570
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	KGIVAFKACQELLKGLLDRHFRSKLLD	DQVATIHKDDVGTNNSN---GETSTGDDTIV	562
			: . . . * : : * * : . . .		
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	G-----VANIL-----	QGEWILSGRDGTEDSKILHLYM	1092
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	L-----VPAAL-----	KEPWTN-----LEDYVLLNSYY	757
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	T-----CIHAL-----	SGSWG-----KPDAAVFFAYK	702
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	F-----FPPEL-----	VNQ-CE-----HEMCKKYCYL	592
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	LGENDETPAQLADLSTQSSYDLPVSAVELSLRPIRSLTREASSSEEGEE	WSTTMCFY	621
			: . . . * : . . .		
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	YTIKCVNSGSSKDPFLNKVSDFAVLFGKELDAEVL	SMSVDLFIARAMITKA-----SLV	1146
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	IKFIPDP-----E-DRSYGFGFLVFKSPLPKEA	ERMELDLHLARRRSVMT-----KLV	804
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	FNFSNCNI-----I-SVVSYSGFVLLIESK	LADDVGNIELDYLIRKM-VKT-----CVS	748
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	IELKQNF-----DYEFFVHNIMLLVRSQLE	IDNKSIMGFELEVDRGF-LTV-----NLK	639
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	-----GLSGAHYAILATNELYTGNTNTGWR	YDFATSGVMSPFIQPI TLAK	666
			: : . . . * : . . .		
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	FRGSIDITESQLASLKSFHVRLMSIVLDVDV	-----DPSTTPWDPKAYL	1191
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	PSGVAEFNRKEIMQAQHFQEMFFKVIDLRSKFL	SEYV-----PLGNNEVFASSSSTFYL	858
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	SCGQVHLADQMMKARFQEFFNGLFGRFLVFG	SKSSGTRREFLLQNKTSLSLWSPSNMYL	808
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	YVGLIRLDP SQVILSKRFQIAVFRVLM	MDHKVEKLTE-----VLGDPR-SGNNSDIDYL	691
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	YPIKLTTLTKQELHDLVHLFHLVVMRLACMGV	QDAVRDVIASDN---VWNEFSEQNDKGYL	723
			: : . . . * : : . . .		
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	FVPVVGDKFV-DPVKEIDWDLVDNIITDA	---WSNPLOQRARPDVYLGTNERTLGGDRR	1246
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	LLPVILHNCE--NKVMVDWKIKRCLSSPL	---FKTPA-----E-----AVEN--G	897
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	LLPLE-DSLS--NELRINWPAVTACTFAVE	---FLNKN-----SLLGTEQSDGDG--G	853
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	LLPST--YLG--QNPVIDWPSVCSVLF	SYE---NVWKD-----HVCNAG-----	728
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	VVPSVMDESKQPPTLSLDWDYVREIIGKPLLE	PWPFPPTGA-----T-----G	767
			: : * : : * : : * : : *		
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	EYGFGLRHRGIAFGHKPHPTYGIRGAVAFP	DVVKATGVVPTRDVIEVQEGDLTKGKLIMA	1306
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	NFP--S-----	-----GVCLELA	908
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	NLS--LNRTGS--	-----SVTECK-----GTNI IHFA	876
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	-----	-----MIQTK	733
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	NAK-----	-----DPT	773
			: : . . . * : : . . .		
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	DGFLHAEDLVGKIVTAAHSGKRFYVDSIRYDM	TAE---TSFPRKEGY-LGPLEYSSYAD	1361
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	NGCRDVRDVKNSFVYAPHKVAFYFITIN	VGEKNGY---SPYRDSG-----TLSH	954
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	NRSVDVNNLRNMVVVAIHTGRIYSILELVS	NTSAD---SSFNEIVDS-V-SSEFAITFSE	930
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	SGLLACACMIENSLVCTPHNHGAYIVKGL	KNLNTAN---SLLKLRNGS-V---MTYME	783
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	DEWICVPTPYRLNVSYVVEAVINRIVDD	IRKEYLADEQAWATHLKKGKSTPGNP--	ILG-
			: : . . . * : : . . .		
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	Y-YKQKYGVELRHKQQLIRGRGVSYCKNLL	SPRFEHSEGE---SEEALDKTYIV--F	1413
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	VEHLKMSDIHLKHPEQPLLRKPLFKLRNLL	HNRKPEDSE-----SNELDEYFI--D	1004
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	Y-FHKKYGIIVLKHQPQLLLKQSHNPNHLL	VNFNDEGVSAKASQAGLVNEKPRNHV--H	987
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	Y-YELRHGILQLRFSQVSLDARHVFVPHNYL	LHRCKRQK-----EKESNAFV--E	830
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	---RWQTRQOLEEADADQPLIHGIQVPP	IVPIIRRVMQRNNDG-----SIAQYKTKFNERL	883
			: : . . . * : : . . .		
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	LPPPELCF--VHPLSGSLVVRGAQRLPSIM	RRVESMLLAVQLKRIIQFS-----VPASKIL	1465
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	LPPPELCQLKIIGFSKDIGSSLPSIMHRL	ENLLVAIELKHVFSASPFEGAEVTANKVL	1064
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	MPPPELLL--VLDVPIVLLKAFYLLPSLM	HRLESMLLASQLREEINFH--SSNFDIPSSLIL	1044
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	LPPPELCDVIMSPISISTFYSFTFIPSIMYR	LESLLLATNLKMKQDHCQVQNTVPTMKVL	890
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	LIPQYTS--RLRLTKSRFFDAMGLVPLLYE	FERKCKQISHLMGKI-----GLELD-MTLL	934
			: * : . . . * : : . . . * : . . .		
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	EALTAASCQETPCYERAELLGDAYLKWVSR	FLFLK-YPQKHEGQLTRMRQLMVSNMVL	1524
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	EALTEKQERFSLERLESIGDAFLKFAVGR	HFLFL--HDALDEGLTRRRSNVAVNSNLF	1123
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	EALTTLRCCESFSMERLELLGDSVLKYAV	SCHLFLR-YPKNHEGQLSAKRSWAVCNSTLH	1103
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	EAITTKKQENFHLESLETLGDSPLKYAVC	QQLFKT-HQNQHEGLLSIRKEKIIISNTALC	949
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	-----DDATTKPAYERLEILGDTFLKLE	TSWYMYEQRKDIYQEGQLTQLRRDIIRNDRLN	989
			: * * * * * : : * : : * : : * : : *		
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	QYALSKGLQSYIQADRFAPSRWAAPGVLP	VDFEDTKDGDTSLFDQEQATVDVPIPVKEHSD	1584
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	KLATRNLQVYIRDQPFDPQCFYALGHPCQ	---IICTKE-T-----EGTHS-	1166
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	KLGTDRRLQGYIRDSAFDPRRWVAPGQL	SLRPVPCGVDLSL-----EVPLDK-	1151
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	MLGCDKLPGFIRNEPFDVKSIIIPGYNS	SGSYA-----LNE-	985
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	QFALAARLHHYMLYPAE-----	-----VEQH	1010
			: : . . . * : : . . .		
TR	A0A061DZU3	A0A061DZU3_THECC	GFEDDEMEDGEIESDSSSYRVLSSKTLAD	VVEALIGIYYVEGGKNAANHLMKWIGIQVES	1644
TR	A0A061GR83	A0A061GR83_THECC	QYNCQADHANSEVRCRNHHWLHKTKIAD	VVEALVGFIVDRGFKAATAFLRWIGRVDF	1226
TR	A0A061GJM5	A0A061GJM5_THECC	KFQTEDPKVKVKGKSCDRGHRWMSKTI	SDCVEALIGAYYSGLLIAALHMMKWL	GIDAEV
TR	A0A061EY61	A0A061EY61_THECC	ETLCS-----TRKIYVSGRKLKNNK	VADVVEALIGAYLSVGGEAAGVFLN	WIGINVDF
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	PFQCWKPSCMG--KTPDPVAPAKWIAD	VLEAITGAYLVGQGEKGARVFLKWIGV	SVLE
			: : * : : * : : * : : * : : * : : *		

TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	KEELR-----LVYGVSSERT--ESDGAANLIQKLRAINYLALGELGQWCAYKVAQSFLTAL	573
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	-----EI--IKASRKRLSNNHAKICHCLDDVGLICAIEATKICTETL	338
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	-----AA--EESARKRISR LHATFIYCLSHLGLWLAAKAAESLSRKE	336
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	-----EI--LEASKKSLSCYHAKILLYCIDNGLGICATEAAKVCIENTI	388
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	KVDLVHVFRMELELGNSSAAVYDERKKQDKVNRFIQDAEVVKKHLGQWCLWKFVELELQAN	299
			: : * : :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	-QN-----DERANYQVDVKFQEQYLMKVVGLLQCQLSEGAVTKNDSNANMRNGDCQCT	626
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	-HL--PYTPDSCNLSLENLQHHKDFLKEVLHTIEENLHDGYE-----TLLNSEGGC-	386
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	-TYLFFWGEKKDELGENTVRLFSQAVFEVLS---EYVSKD-----R--CIGDDF-	379
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	-HA--LYATEEFEFSSKSLKLYLCEVLLSIEEILPQGY-----ELINTECGS-	436
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	LQACIVDDPDVNNRKRKRKQOQEDA---VDVDDPMDGEGND-----DELDSDE---	344
			: : : :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	EELEEGELPDSHAVSGGEHVDIIIGAAVADGKVT PKVQALIKILKLYQHTEDFRAIFVE	686
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	-----LEATKLGYSVSKLYELIQIFQSFVPRQVLCILFVE	422
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	-----KADIAAGLITTKVHCLVQSLIEYRTVHDLRCLIFVE	415
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	-----QELTRRGYISP KLDALVHTFRSFGSSEVLCILFVE	472
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	-----GEVDEEEVEMVDSI-----	359
			* : : : :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	RVVAALVLPKVFSELPSLSFKCASLIHNNNQEMRTCQ-MQDTIARFRDGRVTLVATS	745
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	RIITARVVERLIRKICYLSHFIVSYLTGGSSSDALTPKVQKETLDSFRSGKVNLLFTTD	482
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	RVITAIVLQSLLCNLSQLSGWGIQYIAGNNSGLQSRNEQMKIVDAFRSAKVNIIIVATQ	475
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	RIITAKVIERFMKKDNNLSHFSISYLTGGSSSKDCLTPKVORSTLELFRAGKVNLLFTTD	532
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	-----	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	VAEEGLDIRQCNVVIRFDLAKTVLAIYIQRGRARKPG SDYILMLERENLSHETFLRNARN	805
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	VAEEGIDVPQCSFVIRFDLPKTVRSYVQSHGRARQSA SQYIIMLERGNVMQRDLL-----	537
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	VLEEGLDVPSCKLVVRFDPSTTVCSFIQSRGRARMRN SDYLLIVDRSYLSWPVIVTRYWH	535
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	VAEEGIHVPCNSWVIRFDVVPKTLCSFVQSRGRARRSN SYVYVLMLEGNVEQRDQL-----	587
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	-----	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	SEETLR-----KEAIERTDLSHLKGTPLRNP-----	831
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	-----FDIMRSKHSMT-DTTLHRDPDAYSFKL	563
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	DTTPVPMALQKTPYFNSNADSANLSKSLASFLKSGDIMREESLKL-AATRCKPLD-----	588
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	-----FDIMLSEYVQ-NFASCRDN-ITFSFD	612
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	-----	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	IDILPGSMYQVESTGAVVSLNS AVGLIHFYCSQLPSDRYSILRPEFIMERHE -----	883
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	PGDEETYDYIDSTGARVTVDSVSLIYKYCERLPRDKYTPRPVIFQFTQYG-----	615
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	TPMFKEEYRVTGAVITLSSVALIYFYCAKLPDGYFKPSRPFVIEESG-----	640
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	LPSEGKYSYRVDSTGATVTADSSVSLIHKYCEKLPKDRYFTPKPFVIVAKD-----	664
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	QPVVNPYELVHRDGTGAILNVN SVSCLSKFCDTLPLGLDLYDRRPOYIVRRIISIVKHMAYS	419
			*** : : * : : * * * : :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	-----RPGGPTEY	891
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	-----GSY	618
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	-----GLY	667
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	LKKAKKKLLKYNSKLRDKIDALKAEAEQRANAVIDENGDESIDGDEESTSSASSDGRFHF	479
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	SCKLQLPCNAPFE-KLEGPICSSMRLAQAVCLAACKKLHEMGAFTDMLLPDKGS ---G	946
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	ECTLTLPPNAVFQ-TLVGPVSRNSHKAKQLACLDACKKLHKMGALDDYLTPIREE ---I	673
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	VCTLYLPRGCPTE-TIHA--EGERNLLKQIVCLEACKKLHEIGALTDYLLPBCVV ---Q	693
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	ECTLVLPNNAVFQ-RLVGPLSDSRNLAKQLVLSLEACKKLHLLGLVSLDHLPPFVED ---P	722
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	SATLKLPGALGIKKQLHSQQVETQDEAKGIVAFKACQELLKKGLLDRHFRSKLLDDQVAT	539
			: : * * : : : : * * * * : :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	ERGEKV-EQNDEGDPLPGTARHREFYPE--GVAEILQ----GEWILSGRDGSHKQQLFK	998
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	LEHEND-KTKKKTADGAGTTKRKELHGT--TTSAMS----GTWAHQKAGVTLQG--YK	723
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	SDDGDQDTAIESYRDDQP-----D--YFPGELI----DSWFAFLGLGLYHC--YK	735
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	METNYA--GSDNYTSGAGTTKRKELHGM--TNVCALS----GSWAHRPDNVTLNA--YG	771
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	IHKDDVGTNSSNETGTALNDD--TIVLGENDETPAQLADLSTQSSYDLPEVVS---A--VE	591
			: : : :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	LHMYAVTCV-NIGTSKDPFLTQVS-----DFAVLFGSELDAEVLSTMTMDLFVAR	1046
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	LEFQC-DK-----VGQNY-----NFVLLIDATLDEDVASLELNLNLLD	761
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	IMFDQSSC-----VDAAFR-----DMILVVKSDLGSDVNTSFLNLEGIR	774
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	LSFVC-DQ-----EGENYS-----GFILLIESTLDDVDASAEIELFLIP	809
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	LSLRPIRSLTREAASSSEEGEEWSTTMCIFYGLSGAHYAILATNELYTGNTGWRVDFAT	651
			: : : *	

TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	TMVTKAS---LVFRGPIEIM--ETQLVLLKSFHVRMLMSIVLDVDVE-----	1087
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	-KMAKAT---VSRCGPIELG--MEQVEQAKLFQELFFNGLFGKLFMGSKLSGVPRQF-L	813
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	DSL-TVN---LKYIGVIHLS--REQVTMAKRFQTTVLSVLIHHDVAK--LNNIS-DC--	822
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	DKTVYTF---VSPCGKIQLD--KEQVEKAKLQFQEFFNFIQGRFLRFRSR-CGVQREF-L	861
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	SGVMSPEIQPITLAKYPIKLTTLTKQELHDVLFHFLVVMRL-----ACMGVQDAVRD	702
			* : : *	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	---PSTTPWD---PAKAYLFVPIVAEKCV-NPVEEIDWMLIDNIVNEHAWKNPLQRAR	1138
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	LKEDDTLLWS----TLNMYLLPLKPSVQDHGGVSINWEGINESASLVRMLRNIHSPT	868
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	---LPKELPS---TEVVYLLPLIAGK-----VDWPCIKSAVFSAGTVG---SQD	863
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	FREGHEILWS----SFNMYLLPLKPSQLS-HANTNINWAVIDACSSVVEYLRSIYSLD	915
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	VDIASDNVWNEFSEQNDKGYLVVPSVMDESKQPPTLSLDWDYVREIIGKPLL-EPLWPF	761
			* : * : *	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	PDVYLGNTNERTLGGDRREYFGKLRHGMAFGQKAHPTYGIRGAVAEFDVVKASGLVPNRD	1198
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	-----AKNN-----LDGSS-----	878
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	-----TMSC-----CCRI-----	871
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	-----GEY-----CPGSS-----	924
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	T---TGAT---G-----N-----AKDPTDEWICVPTYRL-----	784
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	YGVSMDEAYYYSQGLKFMADTCMDTKELVGRIVTAAHSGKRFYVDSVRYEMNAEN-SFP-	1256
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	-----NNSTNEEEDI IHLANKSEVRQNVKNI VVLA IHTGKIYSVLEVSTDL SADS -PFD-	931
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	-----GARFVQITDGHMCSCLQNSLVYTPHNHFFYCVTGI LNDLNANS -HLK-	919
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	--TALNSTGTLSSEMIHLANKSLNIWCLKDSVVL SIHTGRIYSVLDVIYDSTPES-SFA-	980
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	-----NVS-----YVVEAVTNR-----TVDDIRKEYLADEQAWAT	814
			: : *	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	-RKEGYLGPLEYSSYADYYRQKYGVELIYKKQPLIRGRGVSYCKNLLSPRFEHSEAR---	1312
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	-GASD-NPASAYKTFSEYFNKKYGI V LKHSTQPLLLKXSHNPHNLLSSKSKDEGDAVAA	989
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	-LK-----CGDVLTYKNYKTRHHLDLICDWEPLLAGRQLLKVQNFHLRRPFRKE---	968
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	-EMSD-EKPTSFASFADYYQKYNIALQHPGQPLLLKQSHNPHNLLFAKSKYKDGSS---	1035
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	HLKKGKSTPG--NPILGRWQTRQQLLEADADQPLIHGIQVPIVPI IRRVMQRNN-----	867
			: : : : *	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	--DGESEENLDKTYVYF-LPPELCL--V-----HPLPGALVRGAQRLPSIMRRVESL	1359
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	KTHNGSIPVRKPKQNHVH-MPELHV--H-----INIPLDVLKSFYLLPSLMHRMESL	1038
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	-----KESSGVNIE-LPELCLRVIL-----PAISVDTLCSFSFAPSIMHRIQCM	1011
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	--TGEWILVEKEQVHAR-IPPELHV--H-----IDMSVDILKSFYLLPSVMHRLES	1082
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	--DEGSIAQYKTKFNERLLIPQYTSRLRLTKSRFFDAMGLVPLLYEFERKCKQISHLMGKI	925
			: * : : : :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	LLAVQLKDMI-----NYPVPASKILEALTAASCQETFCYERAE LLGDAYLKVWVSRFLF	1413
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	MLASQLRREV-AFNPSNSCIPSSLILEAITMRCCEDFSLERLELLGDSVLKYAVTCHLF	1097
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	LLASRLKILLDHCVENVNI PAIKLLEALT TTKCREEYSLSEALGDSFLKYASSHYLF	1071
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	MLASQLRLDI-GCSDNNTNISSSLILEAITTLRCCENFSLERLELLGDSVLKYVMGNLF	1141
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	-----GLELDMTLDDATTKPAYERLEILGDTFLKLETSWYMY	963
			* : . * * * * : * : :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	LKY-PQKHGQLTRMRQMVSNMVLQYALNKGLOSYIQADRFPASRWAAAPGLVPVDFED	1472
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	LKF-PEKNEGQLSSRRTQIICNATLHRLGMKRNIIQYIRDSFPDFRRWLAPGQISIRPVP	1156
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	QKY-QHHHEGILSAKKDKIISNAALCRVGAHDLPGYIRDEEFNPKKVVIPGFHYDS---	1127
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	LKY-PKKHEGQLSDHRSRAVCNSTLHKLGTSRGLQGYIRDSAFDPRRWVAPGQISLRPFP	1200
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	EQRKDIYQEGQLTQLRRDIIRNDRLNQFALAAARLHHYMLY-----PAEVEQHPFQ	1013
			: : * * * : : * * : : * :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	TKELDSSIFYEESPADDGELQ-K-DYYDDCEENFREDGEIEGDS---SCYRVLSSKTLAD	1527
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	CK-----CPVEDSGFSKKGIVYVND-----NKSIVIGKSCDKGHRWICSKTISD	1200
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	-N-----DGSKMSSNSKYIYI-----RQRRSISKSRVAD	1156
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	CN-----CGVDLMCPMERRYITE-----DSSVVLGKPCDKGHRWMCSTIAD	1243
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	CW-----KPSCMGKTP-----DPVVAPAKWIAD	1036
			* : * : *	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	VVEALIGVYVVEGGKIAANHLMNWIGIQVELDPLEIPP-PKPYNI-----	1571
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	CVEALIGAYYVGGGLSAAIAILQWFGIDCEFEHELIVEATRASI-----	1245
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	SVEALIGAYLSTAGESAALIFMKSIGMEIEFHQMVVEKPVLANP-----	1201
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	CVEALVGAYYVGGGLSAAALSMSWLGFNVTFTTKLVQDAKFSASH-----	1288
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	VLEAITGAYLVGQGEKGARYFLKWIIGVSVLEHPSTNFARFPYPCFPNELYDATMTSGGA	1096
			* * : * * * * : * : *	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	-----PESVMRSIDFDSLEGTLNNRFRDRGLLVEAITHASRPSG--	1611
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	-----WGYLPKIDEIEILEAKLYRFDVKGLLEAITHASRQELG--	1285
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	-----EMLINVKQLEGLLNYKFNDPSSLVEALTHGYSQVFD-----	1237
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	-----LPYFLKNDIEELESKLNRYFSVKGLLEAITHPSLQELG-----	1328
TR	A0A0W8DVU2	A0A0W8DVU2_PHYNI	EYPLSLNFKVPQFEDLPKRLMLLQQLKXTRFNKRLLLEAVTHPSVGLVLHIDQMDVNA	1156

```

. * : * * * * : * : * * *
TR | A0A199W5C6 | A0A199W5C6_ANACO -----V--SCYQRLEFVGDAVLDHLITRHLFFTYTDLPPGRITDL 1649
TR | A0A6P5FLM4 | A0A6P5FLM4_ANACO -----A-WYCYQRLEFLGDAVLDLITWHLFKNHEDVDPGELTDL 1324
TR | A0A6P5GGM9 | A0A6P5GGM9_ANACO -----I-PRCYQRLEFLGDAVLDHLSTVYLFYKYPGISPGLTDL 1276
TR | A0A199UFR0 | A0A199UFR0_ANACO -----I-DYCYQRFEFLGDSVLDLLITWHLFISYKNIDPGELTDM 1367
TR | A0A0W8DVU2 | A0A0W8DVU2_PHYNI EGNTGGDVEVMSRSQKKKKTWVGKDYERLEYLGDALIEYLTLSYAFLMYDKWLPGLSQW 1216
                                     * : * : * * * :
                                     * : * : * * * :

TR | A0A199W5C6 | A0A199W5C6_ANACO RAAAVNNENFARVAVKHK-LHAHLRHGSSALEAQIREFVKEVQE----- 1692
TR | A0A6P5FLM4 | A0A6P5FLM4_ANACO RSASVNNENFAQVAVKHK-LQHHLQHSGGLLEQITEYVKGLED----- 1367
TR | A0A6P5GGM9 | A0A6P5GGM9_ANACO RSASVNNDCYAHAAVKAG-LHKHIRHASSALHRQMTFYLENFGQ----- 1319
TR | A0A199UFR0 | A0A199UFR0_ANACO RSAAVSNVNFQAQAVRNN-FHHHLQHSGGILLDQITEYVKSLE----- 1410
TR | A0A0W8DVU2 | A0A0W8DVU2_PHYNI KSATVSNDALGKTALACFGVDECIFAGCVRIDPETMERVANIERKYARPEAKTGLSPAFE 1276
                                     : * : * *
                                     : * : * *

TR | A0A199W5C6 | A0A199W5C6_ANACO -----ELSKPGFN SFGLGDKCAPKVLGDIVESIAGAI FLDSGRDTSIVVTVFQPLLHPM 1746
TR | A0A6P5FLM4 | A0A6P5FLM4_ANACO -----SNE-ENYSLMLKGLSKGPKVLGDIVESIAGAILDITKLDLNKWEIFKQLLSPI 1420
TR | A0A6P5GGM9 | A0A6P5GGM9_ANACO -----PSS-GS-SYGWESGVALPKVLGDIVESLAGAIYVDSGKNKETVWTSIKLLEPEI 1371
TR | A0A199UFR0 | A0A199UFR0_ANACO -----YDG-NEDVLLPLSTHKAPKVLGDIMESIAGAI FIDADLNLDMVWQIFKPLLSPI 1463
TR | A0A0W8DVU2 | A0A0W8DVU2_PHYNI AVGVSKKKAKSKSAPSGGNSHTLPKMFADVFEALVAAVFLDSGQDLQLIRDVFMGPLLNT 1336
                                     * : * : * * : * :
                                     * : * : * * : *

TR | A0A199W5C6 | A0A199W5C6_ANACO VTPETLPMH VRELOERCOQQAAGLEFKATRAGNVAIVE--VFVDG-VQIGTAONPKRK 1803
TR | A0A6P5FLM4 | A0A6P5FLM4_ANACO VTPENLELAPYRELTELCSHHGYFLKVCSCMNERDVVVAILEVQLKDVLLIRQGRERSKKD 1480
TR | A0A6P5GGM9 | A0A6P5GGM9_ANACO VTPETIEYHPVRELNELCSRKSYKKSRYRVTHQNGVASIVAIEVQADGSSYTATRTGPNKKT 1431
TR | A0A199UFR0 | A0A199UFR0_ANACO ITPDKLVLPWRELIELCSHLGFFINTQCKTGEVV-AEISVQLGDDLLIAHGHDKNRKG 1522
TR | A0A0W8DVU2 | A0A0W8DVU2_PHYNI VEQDAYA-----YVCHESGLALDN---GGDEL-MEDLVFSSD-----EED----- 1372
                                     :
                                     :
                                     *
                                     *

TR | A0A199W5C6 | A0A199W5C6_ANACO VKLARNALNTEKEKDSALKRDPEKNGERRNG----- 1836
TR | A0A6P5FLM4 | A0A6P5FLM4_ANACO AKGQAFLLLKDLLEERGLYSRYASKRQSEENDVEIKNTEDSHDITMDKDKPTQPREKEL 1540
TR | A0A6P5GGM9 | A0A6P5GGM9_ANACO AKKLAAKAVLQSLKAGTSQTTKDVN--IEAHLSCM----- 1464
TR | A0A199UFR0 | A0A199UFR0_ANACO AKAKAALHILRDLELGPSPDYSFAENN-----C----- 1550
TR | A0A0W8DVU2 | A0A0W8DVU2_PHYNI -----

TR | A0A199W5C6 | A0A199W5C6_ANACO -----TQMFTRQTLNDICLRRQWPMPQYRCVNEG GP----- 1867
TR | A0A6P5FLM4 | A0A6P5FLM4_ANACO TDSGNNRGDSVLSAPAHLTVMKQKGGPRTALVELCKRLQWPMPSPFESNAEKLSEDIVCPG 1600
TR | A0A6P5GGM9 | A0A6P5GGM9_ANACO -----LLDDYSRQKQPVNLSLKMEKGGSR T ALFQLCKIFQWPMPKFEFTEQRFRTP I I IDG 1606
TR | A0A0W8DVU2 | A0A0W8DVU2_PHYNI -----

TR | A0A199W5C6 | A0A199W5C6_ANACO ----AHAKRFVYAVRVNTSDRGWTDECIGEMPMSVKKAKDSAAVLLLELLNRSYPDNNNN 1923
TR | A0A6P5FLM4 | A0A6P5FLM4_ANACO LRGGVGPQIFVSNITLHLPCN-AVINLTGERRPDKKSSQD SAALVMLYELERRGKCLIKE 1659
TR | A0A6P5GGM9 | A0A6P5GGM9_ANACO -----
TR | A0A199UFR0 | A0A199UFR0_ANACO VAT-PNFNSFTSAITLHIPNS-KVVTLLGEERTDKNAAKDSAAALMMLKQLGLCVLEK 1664
TR | A0A0W8DVU2 | A0A0W8DVU2_PHYNI -----

TR | A0A199W5C6 | A0A199W5C6_ANACO NNNNNNDNDINNNNNHNNNNNNNNNN 1948
TR | A0A6P5FLM4 | A0A6P5FLM4_ANACO I----- 1660
TR | A0A6P5GGM9 | A0A6P5GGM9_ANACO -----
TR | A0A199UFR0 | A0A199UFR0_ANACO P----- 1665
TR | A0A0W8DVU2 | A0A0W8DVU2_PHYNI -----

```



```

* :::****: . *** :*: * . :
TR |A0A199W5C6 |A0A199W5C6_ANACO |VPM-PLEIVIQYDKAATLWSLHE--QI----KQMEVAVEEAARSSRRSKWQFMGARDAG |520
TR |A0A6P5FLM4 |A0A6P5FLM4_ANACO |VPS-AKEVNRYDPKLALYD----DLKEQLGELLISKYDNLQNSPSYQYKQDAD--- |298
TR |A0A6P5GGM9 |A0A6P5GGM9_ANACO |IPF-SAVKIKLYQHWDIPSDLYI--RVTKRLENLK-----LKKLQGLGDV--MLSS-- |296
TR |A0A199UFR0 |A0A199UFR0_ANACO |SPS-ATLVNRYDAYKFNNE----KLTKLHSSFEKIDDTLVSLQKSPSNKFKDNTN--- |348
TR |A0A0J9VAE2 |A0A0J9VAE2_FUSO4 |HRKKQTEETVNYSRPEAPDDTKT--HLWEQIFAL-----VSRN--EQFKLS---- |328
TR |A0A0J9VWG9 |A0A0J9VWG9_FUSO4 |VNK-PHLIRSLYDATKIPPRTPMLQQLQSEYSNMDIAKDPVCLKL-----ALVANDEK |378
* . :
TR |A0A199W5C6 |A0A199W5C6_ANACO |SKEELRLVYGVSERTESDGAANLIQKLRAINYALGELGQWCAYKVAQSFLTALQN----- |575
TR |A0A6P5FLM4 |A0A6P5FLM4_ANACO |-----EIIKASRKRLSNHAKICHCLDDVGLICAEATKICTETLHL---PY |342
TR |A0A6P5GGM9 |A0A6P5GGM9_ANACO |-----AAEESARKRISRLHATFIYCLSHLGLWLAAKAAEELSRSKETY-LFFW |342
TR |A0A199UFR0 |A0A199UFR0_ANACO |-----EILEASKKSLSCYHAKILYCIDNLGLICATEAAKVCIEINIHA--LY |392
TR |A0A0J9VAE2 |A0A0J9VAE2_FUSO4 |-----LEFTKEASSVLGTWCADRYWELAMTLET-ERLA |361
TR |A0A0J9VWG9 |A0A0J9VWG9_FUSO4 |KREKLM--NVIMKHDTFSQQQIRSLWNKSRREILAEKLSWAVDHYISQMIKFTLDRIDAY |435
* . :
TR |A0A199W5C6 |A0A199W5C6_ANACO |--DERANYQVDVKFQEQYLMKVVGLLQCCQLSEGAVTKNDSNANMRNGDCQCTEELEEGE |633
TR |A0A6P5FLM4 |A0A6P5FLM4_ANACO |TPDSCNLSLENLQHHKDFLKEVLHTIEENLHDGYE-----TLLNSEGGC----- |386
TR |A0A6P5GGM9 |A0A6P5GGM9_ANACO |GEKKDELGENTVRLFSQAVFEVLS--EYVSKD-----R-CIGDDF----- |379
TR |A0A199UFR0 |A0A199UFR0_ANACO |ATEEFEF5KSKSLKLYLCYEEVLLSIEEILPQGYI-----ELINTECGS----- |436
TR |A0A0J9VAE2 |A0A0J9VAE2_FUSO4 |ARTSREFVGDIAVTRADLATEAVRRVQEL-----LETTTRRGYISP----- |390
TR |A0A0J9VWG9 |A0A0J9VWG9_FUSO4 |SAFTDAWSNED--RTYLAGHLRRINIG-----V----- |461
* . :
TR |A0A199W5C6 |A0A199W5C6_ANACO |LPDSHAVSGGEHVDIIIGAAVADGKVT P-----KVQALIKIL-LKYQHTEDFRAIIFV |685
TR |A0A6P5FLM4 |A0A6P5FLM4_ANACO |-----LEATKLGIVSS-----KLYELIQIF-QSFGVPRQVLCILIFV |421
TR |A0A6P5GGM9 |A0A6P5GGM9_ANACO |-----KADIAAGLIT-----KVHCLVQSL-IEYRTVHDLRCLIFV |414
TR |A0A199UFR0 |A0A199UFR0_ANACO |-----QELTRRGYISP-----KLDALVHTF-RSPGSSEVLCILIFV |471
TR |A0A0J9VAE2 |A0A0J9VAE2_FUSO4 |-----VQAHKFGAIDPKAEGLSAKVKSLEILSHAFTMDGTRKRCIVFV |433
TR |A0A0J9VWG9 |A0A0J9VWG9_FUSO4 |-----VDNSPPTAQTVSHKTSRLIHEL--LAAENDVVGIIFV |496
* * . : :***
TR |A0A199W5C6 |A0A199W5C6_ANACO |ERVVAALVLPKVFSELP-SLSFIKASLIGHNN--NQE--MRTCQ-MQDTIARFRDGR |737
TR |A0A6P5FLM4 |A0A6P5FLM4_ANACO |ERIIITARVVERLIRKIC-YLSHFIVSYLTGGSS---SVD---ALTPKVQKETLDSFRSGK |474
TR |A0A6P5GGM9 |A0A6P5GGM9_ANACO |ERVITAIVLQSLLCNIS-QLSGWGIQYIAGNNS--GLQ---SQSRNEQMKVDAFRSAK |467
TR |A0A199UFR0 |A0A199UFR0_ANACO |ERIIITAKVIERFMKKDN-NLSHFSISYLTGGSS---SKD---CLTPKVQRSTLELFRAGK |524
TR |A0A0J9VAE2 |A0A0J9VAE2_FUSO4 |EKRYTARLLSDLYSQPSMRILGMSASYMVGCCQSTNSFFG---TMSFREQVLLALHEPKRGN |490
TR |A0A0J9VWG9 |A0A0J9VWG9_FUSO4 |KERTAAHTLCELLNNYPPTRDRYRVGAIWGAASSYGLQKQKVVEYSSGGPQVLDFFRSGA |556
: . : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :
TR |A0A199W5C6 |A0A199W5C6_ANACO |VTLLVATSVAEGLDIRQCNVVIRFDLAKTVLAIYQSRGRARKPQSDYILMLERENLSHE |797
TR |A0A6P5FLM4 |A0A6P5FLM4_ANACO |VNLLFTTDVAEEGIDVPCSFVIRFDLPKTVRSYVQSHGRARQASQYIIMLERNVMQR |534
TR |A0A6P5GGM9 |A0A6P5GGM9_ANACO |VNIIVATQVLEGLDVPSCKLVRVDFPSTTVCSFQSRGRARMNSDYLLIVDRSYLWSP |527
TR |A0A199UFR0 |A0A199UFR0_ANACO |VNLLFTTDVAEEGIDVPCSFVIRFDLPKTVRSYVQSHGRARQASQYIIMLERNVMQR |584
TR |A0A0J9VAE2 |A0A0J9VAE2_FUSO4 |TNCLFTTPVAEEGIDVPCDLVIRFDLYNSVIQYQLQSKGRARQASRYITMMEEGNLTHI |550
TR |A0A0J9VWG9 |A0A0J9VWG9_FUSO4 |INLLVATSVLEEGIDVPACNLVVSFDEIATLKSFIQRRGRARMQESKMIALLSSSTDI-- |614
. : . : * * * * : . : * * * * : . : * * * * : . : * * * * : . : * * * * :
TR |A0A199W5C6 |A0A199W5C6_ANACO |TFLRNARNSEETLR-----K-----EAIERTDLSHLKGT |826
TR |A0A6P5FLM4 |A0A6P5FLM4_ANACO |DLL-----FDIMRSKHSMT-DT |550
TR |A0A6P5GGM9 |A0A6P5GGM9_ANACO |IVPTRYWHDTTPVPMALQKTPYFNSNADSANLSKLSFLKS----GDIMREESLKL-AA |581
TR |A0A199UFR0 |A0A199UFR0_ANACO |DQL-----FDIMLSEYYVQ-NF |600
TR |A0A0J9VAE2 |A0A0J9VAE2_FUSO4 |RSAKQALRDSQALE-----KFCLYLSADRKLHDDLIDEDMEM--- |587
TR |A0A0J9VWG9 |A0A0J9VWG9_FUSO4 |---RAWEELEKGM---KERY-----EDDQRELARLDEQ |641
* . :
TR |A0A199W5C6 |A0A199W5C6_ANACO |PRLNP-----IDILPGSMYQVESTGAVVSLNSAVGLIHFYCSQLPSDRYSILRPEFI |878
TR |A0A6P5FLM4 |A0A6P5FLM4_ANACO |TLHRDPDAYSFKLPGDEETYDYIDSTGARVTVDSVSLIYKYCERLPRDKYTPRPIFO |610
TR |A0A6P5GGM9 |A0A6P5GGM9_ANACO |TRCKPLD-----TPMFKEEYRVKTTGAIIVTLSSVVALIYFYCAKLPDGYFKPSPRFV |635
TR |A0A199UFR0 |A0A199UFR0_ANACO |ASCRDN-ITSFSDLPESEKYSYRVSTGATVTADS SVSLIHKYCEKLPKDRYFTPKPFFD |659
TR |A0A0J9VAE2 |A0A0J9VAE2_FUSO4 |-----MVERMQHQVYKIPSTGARLTFPA SLEILARFVSHLSTDSYAKVE--YQ |633
TR |A0A0J9VWG9 |A0A0J9VWG9_FUSO4 |-----ARAEIDSTYIIVKNTGARLDLDRNARQHLDLDFCQIVFRSDYVGLPQDYL |690
* . : * * * * : . : * * * * : . : * * * * : . : * * * * :
TR |A0A199W5C6 |A0A199W5C6_ANACO |MERHERPGGPTEYSCKLQPCNAPFEKLEGP I---CSSMRLAQAVCLAACKKLHEMGAF |935
TR |A0A6P5FLM4 |A0A6P5FLM4_ANACO |FTQYG----GSYECLTLPNAVVFQTLVGPV---SRNSHKAKQLACLDAACKLHKMGAL |662
TR |A0A6P5GGM9 |A0A6P5GGM9_ANACO |IEESG-----VCTLYLPGKCIPIETIHA----EGERNLLKQIVCLBACKKLHEIGAL |682
TR |A0A199UFR0 |A0A199UFR0_ANACO |IVAKD----GLYECLTVLPPNAAFQRLVGPV---SDSRNLAKQLVSLBACKKLHLGLV |711
TR |A0A0J9VAE2 |A0A0J9VAE2_FUSO4 |VQKVG----DRYLADVVMPLQSPVNFVKGTQ---QRSKLLAKCSAAFACKILIRDKHV |685
TR |A0A0J9VWG9 |A0A0J9VWG9_FUSO4 |FHKEETPYGGPILRATVTLPGGLPLNLRKFKSACGWKSERNAIRDAFQAYVALYEAGLV |750
* . : * * * * : . : * * * * : . : * * * * : . : * * * * :
TR |A0A199W5C6 |A0A199W5C6_ANACO |TDMLLPKDGSGERGEKV-EQNDEGDPLPGTARHREFYPEGVAEILQGEWILSGRDGSHK |994
TR |A0A6P5FLM4 |A0A6P5FLM4_ANACO |DDYLTPIRIBELIHEHEND-KTKTKTADGAGTTKRKELHGTITISAMSGTWAHQKAGVTLQG |721

```

TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	TDYLLPECVVQSDDGQDQTAIESYRDDQP-----DYFPGELIDSWFAFLGLGLYHC	733
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	SDHLLPFVEDEMETNYA--GSDNYTSGAGTTKRKELHGMNTNVCALSGSWAHRPDNVTLNA	769
TR	A0A0J9VAE2	A0A0J9VAE2_FUSO4	DGNLQPTFKKKVHAMRN-----ARLAVSSNK-KA--DYDMRLRPEIWAERGEW--TEC	733
TR	A0A0J9VWG9	A0A0J9VWG9_FUSO4	TDNLAPLNAKSEKVEEK-----TDLMPEPLFDPVQVIAQRWKS GC	790
			* * *	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	Q--LFLKLMHYAVTCVNIGTSKDPFLTQVSDFAVLFGSELDAEVLMSMTMDLFDV-ARTMVTK	1051
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	----YKLEFQC-DK-----VGQNSYFNVLIDATLDEEDVASLELNLYL-LD-KMAK	765
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	----YKIMFDQSSC-----VDAAPFRDMILVVKSDLGSDFNVTSPFNLEG-IRDSL-T	778
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	----YGLSFVC-DQ-----EGENYSGFILLIESTLDDDDVASAEIELFL-IPDKTVY	814
TR	A0A0J9VAE2	A0A0J9VAE2_FUSO4	F--ATTITIKGDGDA-----LRKAIAGKSLILLSRKP IPKLP-GVPLFFGNGNSSIA	781
TR	A0A0J9VWG9	A0A0J9VWG9_FUSO4	DKQFYLFTEFTDEF-----PGPCSFVDMPLALID--LPRKITLYPGNGSKWSI	836
			: : : * : : :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	ASLVFRGP IEMETQLVLLKSFHVRMLMSIVLDVDVE-----PSTTPWDP	1096
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	ATVSRGPIELGMEQVEQAKLFQELFFNGLFGKLFMGSKLSGVPRQFLKEDDTLWSTL	825
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	VNLKYIGVIHLSREQVTMAKRFQTTVLSVLIHHDVAK--LNNIS-DC--LPKELPSTE	831
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	TFVSPCGKIQLDKEQVEKAKLFQEFFFNIGFGRLLFRSR-CGVQREFLFREGHEILWSSF	873
TR	A0A0J9VAE2	A0A0J9VAE2_FUSO4	ELTPNQDALQLSPEEADGLTKFTHR VFADVFSKEYDT-----TSDQ	822
TR	A0A0J9VWG9	A0A0J9VWG9_FUSO4	VCDSFV-----DIPDEVSSKEPDQ-----T	856
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	KAYLFPVPIAEKCV-NPVEEIDWMLIDNIVNE-----HAWKNLQRRAPDVYLG TNERT	1149
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	NMYLLLPLKPSVQDHGGVSINWEGINESASL-----VRLMRNIHSPT-----	868
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	VVYLLLPLIAGK-----VDWPICIKSAVFS-----AGTVG--SQD-----	863
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	NMYLLLPLKPSQLS-HANTNINNAVIDACSSV-----VEYLRSIYSLD-----	915
TR	A0A0J9VAE2	A0A0J9VAE2_FUSO4	YPYLLAPYADSPQS-DTRSHIDWDVNVNLVSKNEV-----LEWENAPE-----DFFV-----	867
TR	A0A0J9VWG9	A0A0J9VWG9_FUSO4	SALL-----AMNFQHRWPVEDREHVIKMSIASTTIFPAPHVTRDD-----	896
			* * *	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	LGGDRREYFGFKLRHGMFAFGQKAHPYTGIRGAVAEFDVVKASGLVPNRDYGVS	1209
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	----AKNN-----LLDGSS-----NNSTNE	884
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	----TMSC-----CCRI-----G	872
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	----GEY-----CPGSSS-----TALNSTGTL	933
TR	A0A0J9VAE2	A0A0J9VAE2_FUSO4	-----MGAFP-----FRGDG-----	906
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	SQGLFMDTTCMDTKELVGRIVTAAHSG-KRFYVDSVRYEMNAENSFPRK-----E	1259
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	EEDI IHLANKSEVRQNVKNIVVLA IHTG-KIYSVLEVSTDLSDSPFDGA-----S	934
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	VARFVQTI DGHMCSQQLQNSLVYTPHNH-HFYCVTGILNDLNANSHLKLK-----	921
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	SEEMIHLANKSLNIWCLKDSVVL SIHTG-RIYSVLDVIYDSTPESSEFAEM-----S	983
TR	A0A0J9VAE2	A0A0J9VAE2_FUSO4	-----NKLVTDPYDGGKRLVIKIDKTKKPSDPTPEGPVPSRSRAYR	909
TR	A0A0J9VWG9	A0A0J9VWG9_FUSO4	-----MEEAKHRVLRDQYKT-PFHYVGT-----	930
			* * :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	GYLGPLEYSSYADYRQKYGVELIYKQPLIRGRGV----SYCKNLLSPRFEHSEAR---	1312
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	D-NPASAYKTFSEYFNKKYIIVLKHSTQPLLLKHS----HNPHNLLSSKSKDEGDAVAA	989
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	----CGDVLT YKNYKTRHHLDLICDWEPLLAGRQL----LKVQNFHLRRPFRKE----	968
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	D-EKPTSFASFADYQYKYNIALQHPPGQPLLLKQS----HNPHNLLFAKSKYKDG S---	1035
TR	A0A0J9VAE2	A0A0J9VAE2_FUSO4	SVEPTIMQYSNSLYYKSRQVVK-WRDDQPVVKAELL----SLRRNLLDEF-EV-----	956
TR	A0A0J9VWG9	A0A0J9VWG9_FUSO4	-----IPSKPDFYDQVR-PFYEYDKGFLNEEYLVLERWGLRVLLHDL-----	972
			: : : * : : :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	--DGESEENLDKTYVFLPELCL--VHPLPGALVRGAQR LPSIMRRVESL LLAVALQKDM	1368
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	KTHNGSIPVRKPNHVMHMPPELLV--HINIPLDVLKSFYLLP SLMHRMESLMLASQLRRE	1047
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	-----KESGGVNIELPELRCRILPAISVDTLCSFSFAPSIMHR IQMMLLASRLKKI	1020
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	--TGEWILVEKEQVHARIPPELLV--HIDMSVDILKSFYLLP S VMHRESLMLASQLRLD	1091
TR	A0A0J9VAE2	A0A0J9VAE2_FUSO4	-----DEKVNMECFIILEPL--HVSPLPIDVVSMAFAFPAI IHRIDSVLIVLDA---	1003
TR	A0A0J9VWG9	A0A0J9VWG9_FUSO4	--KDGQAKSSTKPYECLPISYAR--VDRVKRRRVKCGFLPHI IHELEVQLIASLST	1028
			: . : * : : : : :	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	I-----NYPVPASKILEALTAASCQ-----ETFCYERAE LLGDAYLKWVV	1408
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	V-AFNPSNSCIPSSLILEAITMRCQ-----EDFSLERLELLGD SVLKYAV	1092
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	LLDHCVENVNIPAIKLEALTTKKCR-----EEYSLESL EALGDSFLKYAS	1066
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	I-GCSDNNTNISSSLILEAITTLRCC-----ENFSLERLELLGD SVLKYVM	1136
TR	A0A0J9VAE2	A0A0J9VAE2_FUSO4	---CNLLDLEIPPELAL EAMTKSDNSG EYDTEQINFQTMGDNYERLEFLGD CFLKMAT	1060
TR	A0A0J9VWG9	A0A0J9VWG9_FUSO4	LLKPVG---IKNLQVLVEAVSSPSAR-----EPVDYQRLEFLGDSILKFC T	1071
			* * * : : * * * * *	
TR	A0A199W5C6	A0A199W5C6_ANACO	SRFLFLKYPQKHEGQLTRMQMVSNMVLVQYALNKGLOSYIQADR FAPSRAWAPGVLV	1468
TR	A0A6P5FLM4	A0A6P5FLM4_ANACO	TCHLFLKFPKNEGQLSSRRRTQI ICNATLHRLGMKRNIIQGYIRDSPFDRRWLAPGQISI	1152
TR	A0A6P5GGM9	A0A6P5GGM9_ANACO	SHYLFQKYQHHEGILS AKDKI I SNAALCRVGCADHLPGYIRDEEFNPKKVVIPGFHYD	1126
TR	A0A199UFR0	A0A199UFR0_ANACO	GCNLFKYPKHEGQLSDHRSRAVCNSTLHKLGT SRGLQGYIRDSAFDRRWVAPGQISL	1196
TR	A0A0J9VAE2	A0A0J9VAE2_FUSO4	TISIYTLMPDGNCEKYHVERMLL ICNQNLFNHADVDRKLEFVRSKAFDRRTWYDPLPKK	1120
TR	A0A0J9VWG9	A0A0J9VWG9_FUSO4	VTQAYSEHPSWPEGLLNHFKDR LVSNERLQVCLKGLSKF ILSKPF TALKWRPRYLDI	1131


```

TR |A0A6P5GGM9 |A0A6P5GGM9_ANACO -----
TR |A0A199UFR0 |A0A199UFR0_ANACO VAT-PNFNSFTSAITLHIPNS-KVVTLLEERTDKNAAKDSAALAMLLKQLGLCVLEK 1664
TR |A0A0J9VAE2 |A0A0J9VAE2_FUSO4 -----
TR |A0A0J9VWG9 |A0A0J9VWG9_FUSO4 -----

TR |A0A199W5C6 |A0A199W5C6_ANACO NNNNNNDNDINNNNNHNNNNNNNNNNK 1948
TR |A0A6P5FLM4 |A0A6P5FLM4_ANACO I----- 1660
TR |A0A6P5GGM9 |A0A6P5GGM9_ANACO -----
TR |A0A199UFR0 |A0A199UFR0_ANACO P----- 1665
TR |A0A0J9VAE2 |A0A0J9VAE2_FUSO4 -----
TR |A0A0J9VWG9 |A0A0J9VWG9_FUSO4 -----

```

Patosistema *Citrus sinensis*:*Penicillium digitatum*

Claves de dominios:

Helicasa DEAD
Helicasa C-terminal
Dicer-dimer
PAZ
RNasa III
IsRE

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

TR |A0A067HF90 |A0A067HF90_CITSI MEGETRVSDIVGGGESNQSSYWLDACEDILIDEFVNFDTSVVQDSVDNTSNQDSLNSDFF 60
TR |A0A067G252 |A0A067G252_CITSI -----
TR |A0A067DVW3 |A0A067DVW3_CITSI -----
TR |K9GQS7 |K9GQS7_PEND2 -----
TR |A0A7T6XGN3 |A0A7T6XGN3_PENDI -----

TR |A0A067HF90 |A0A067HF90_CITSI GGIDHILDSIKNGSGLPNSNGNLLKNGSEDSTGGENHQAEGLILLSNNGSDKDGVDRKRK 120
TR |A0A067G252 |A0A067G252_CITSI -----
TR |A0A067DVW3 |A0A067DVW3_CITSI -----
TR |K9GQS7 |K9GQS7_PEND2 -----
TR |A0A7T6XGN3 |A0A7T6XGN3_PENDI -----

TR |A0A067HF90 |A0A067HF90_CITSI LENCENVNGYLGVNGKAGGRLSDHFTKENGVHRDNGNNDHEASRIRDFDSEDRFSKRARVS 180
TR |A0A067G252 |A0A067G252_CITSI -----
TR |A0A067DVW3 |A0A067DVW3_CITSI -----
TR |K9GQS7 |K9GQS7_PEND2 -----
TR |A0A7T6XGN3 |A0A7T6XGN3_PENDI -----

TR |A0A067HF90 |A0A067HF90_CITSI VCKNESQYSSRGQYCSSDKDRVFGKRRLRDLDDIGRRDRDPMRREHYNGSSRKDVDRKD 240
TR |A0A067G252 |A0A067G252_CITSI -----
TR |A0A067DVW3 |A0A067DVW3_CITSI -----
TR |K9GQS7 |K9GQS7_PEND2 -----MEPEDVTSDLSSDE----- 14
TR |A0A7T6XGN3 |A0A7T6XGN3_PENDI -----

TR |A0A067HF90 |A0A067HF90_CITSI FRDREPRGYW-ERDRLGSGMVFRLLGSWEADHNAGKEANGINQECNGKVGKKSEAKEKM 299
TR |A0A067G252 |A0A067G252_CITSI --MHSP-----L--NSLKRFSFGEVHS-PNPPDMGSSGHDHAVDGP----SSSTNS 41
TR |A0A067DVW3 |A0A067DVW3_CITSI TLPFAENYQLEALENALKQNTIVFLETGSGKTLIAIMLLRSYAYLLR----TEEVSAD 17
TR |K9GQS7 |K9GQS7_PEND2 --AATPRLTESHRQRA-QNA---SFT-----ALLEEHVINTPSNPNGEHVEVSDAE 60
TR |A0A7T6XGN3 |A0A7T6XGN3_PENDI -----TESHRQRA-QNA---SFT-----MD-----SMGLSN 8

TR |A0A067HF90 |A0A067HF90_CITSI PEEQAFPPYQLDVLQAKKKNTIAFLETGAGKTLIAVLLIRSICNDLQ---RQNKKMLAV 355
TR |A0A067G252 |A0A067G252_CITSI INFIPRIYQLKVFVAKRRNTIAVLETGAGKTMIAVMLIKDIAQAIR----SNGFKLLII 97
TR |A0A067DVW3 |A0A067DVW3_CITSI TLPFAENYQLEALENALKQNTIVFLETGSGKTLIAIMLLRSYAYLLR----KPSPFVAV 72
TR |K9GQS7 |K9GQS7_PEND2 -LSTAR---LLAKTEPGGGVLDPLLDGTGSGKTLVAVLLKHLQMELNKRAHGTKPRVAF 116
TR |A0A7T6XGN3 |A0A7T6XGN3_PENDI SAYRSRGGYQLEMLEASRKENIIVAMDTGSGKTHIAILRIIHELET-----CNTPKLLW 62
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

TR |A0A067HF90 |A0A067HF90_CITSI FLVPKVPVLYYQQAQAEVIREQTGY-VVGHYCGEMGQDFWDAQ-RWQREFDTKQVLVMTAQII 413

```



```

TR |A0A067HF90|A0A067HF90_CITSI|LHEMGAFTDMLLPDKGSGEQQEKVDQNDGEPELPGTARHREFYPEGVADILQGEWILSGR|1031
TR |A0A067G252|A0A067G252_CITSI|LHQVGAALNDHLLPSVEEPESENNLISKKNESLPGAGTTKRKELHGTTPIRALSGRWG----|711
TR |A0A067DVW3|A0A067DVW3_CITSI|LHQIGALTDNLLPDIIVVEKHDAQKR---GNEP--YNAEHPYFPPPELVNQSP-----|672
TR |K9GQS7|K9GQS7_PEND2|LKRRLNLDHFNFSVYHKKR---LPAM--RNAKLAITSKRTDQY---KMRTKPSIWAR---|701
TR |A0A7T6XGN3|A0A7T6XGN3_PENDI|LHSYGLVNDNLLPLTRKPELRFSD-----QTTLPSIVQAAEQYDPY--VDLAQGWASG--|680
*: . . . : :

TR |A0A067HF90|A0A067HF90_CITSI|DGCTGSKLFLHMYTVKCVNNGISKDPFLT-----QVSDFAVLFSSELDAE|1077
TR |A0A067G252|A0A067G252_CITSI|--EKCGVILHAYKFNFACSIVT-----E-----IYSGFVLLIESELND|748
TR |A0A067DVW3|A0A067DVW3_CITSI|--QDTKITYHCYLIELKQHFNY-----DI-----SARNIVLAMRTELESE|710
TR |K9GQS7|K9GQS7_PEND2|--QGTIPIRLYAILIR---LIPSEPLTR-----AH-GSIVLLSREQITA|740
TR |A0A7T6XGN3|A0A7T6XGN3_PENDI|--QLCQTRL-----KICSNQSVDEDLAISIIILPRLTPMHPPIPLYWDSSETSFFELQFDPQ|732
: . .

TR |A0A067HF90|A0A067HF90_CITSI|LASLKNFHVRLMSIV-----LD-----|1094
TR |A0A067G252|A0A067G252_CITSI|VGNF---ELELYLVSKTVKATVSSSQVHLDADQMSKAKCFQELFFNGLFGKLFVKSKSS|805
TR |A0A067DVW3|A0A067DVW3_CITSI|IKKV-NFDLEV--ERGLRVTNKKHLGRQLIIPNQVLLCRRFQITLFRVIMDNHNDK----|763
TR |K9GQS7|K9GQS7_PEND2|IPTF--PVFLDDDIETTVQSLCIDGCLVASEELEIVTAFTLAVFHDVFKTKYKH----|793
TR |A0A7T6XGN3|A0A7T6XGN3_PENDI|ISTFETTP-----EILDQMRRITALYLQAP-----S-|758
: ..

TR |A0A067HF90|A0A067HF90_CITSI|-----VDVEPYTTPWDPKAYLFPVVDKSV-DP---MNELDWDLVEKITKD--AWTN|1143
TR |A0A067G252|A0A067G252_CITSI|GSREFFLKRRETNLSWSPSYMYLLPLEIVNTFGDG---SWRINWSGINPCASV-----|855
TR |A0A067DVW3|A0A067DVW3_CITSI|-LNEILDG--FELRDNLEIDYLLPS-----T---GQLIDWKTVAIVLFP-----|802
TR |K9GQS7|K9GQS7_PEND2|-----VSEQFPYWLVPAREDIDVGMSTSLFDIIDWTALKVYQDNPKLWVST|839
TR |A0A7T6XGN3|A0A7T6XGN3_PENDI|-S-----RQRGDRDFVALFIPDISHEYLG-----EWLTVYEGKEPA-----|794
: : * :

TR |A0A067HF90|A0A067HF90_CITSI|PLQARAPDYYLGTNERT-LGGDRREYGFGLRHRGMAFGQKSHPTYGIRGAIQFDVVKAS|1202
TR |A0A067G252|A0A067G252_CITSI|-VEFIKEKSFLGAAQCN-NNGG-----NSSPCRT-----|882
TR |A0A067DVW3|A0A067DVW3_CITSI|-----R-----DNGSKHNM-----NCST-----|815
TR |K9GQS7|K9GQS7_PEND2|DM---EPESLLNRFIYDDWNGKYRYFP---LA---VDPNLRPSDP-----PP|877
TR |A0A7T6XGN3|A0A7T6XGN3_PENDI|-----LEVYSR-----NPNTPPMGI-----|809

TR |A0A067HF90|A0A067HF90_CITSI|GLVPDREAMQIHNADMPTGKLMMDASCANAGDLEGRIVTAAHSGKRFYVESIRYEMTAE|1262
TR |A0A067G252|A0A067G252_CITSI|--SPC-----KTGCHKGDVVIHLANGSVDAKNLKDMVVLAIHTGRIYSIVEIVNNSSAES|934
TR |A0A067DVW3|A0A067DVW3_CITSI|-----MFNARIVHTKSGPLCTCKIHNSLVCTPHNGQIYICITGVGLHNLANS|861
TR |K9GQS7|K9GQS7_PEND2|SYAPCRKW-----SD-----DIMNWS---L|894
TR |A0A7T6XGN3|A0A7T6XGN3_PENDI|--VR-----DQS|814

TR |A0A067HF90|A0A067HF90_CITSI|SFPKRKEGYLGPLEYSSYADYYKQKYGVELIFKKQPL-IRGRGVSYCKNLLSPRFEHSEEQ|1321
TR |A0A067G252|A0A067G252_CITSI|PFDGNT---DDSKTFVNYFSEKYGIVLIHPGQPL-LRLKQSHNPHNLLVNFNDGGGSG|989
TR |A0A067DVW3|A0A067DVW3_CITSI|LFTRNNGSV----TTYKKHYEERYGIQLCFDREPL-LNGRRI FHVQNYLSKCRQQKQ--|913
TR |K9GQS7|K9GQS7_PEND2|SLSK-----NSRPFK-----FNRCIWTQPV-LQAEVLCLRRNFLDMADBEK--|935
TR |A0A7T6XGN3|A0A7T6XGN3_PENDI|KFSE-----PRMFNKWIAPSQVTKASPIEVECSSLPRRRNLLQKRALNVA--|859
: : * :

TR |A0A067HF90|A0A067HF90_CITSI|EG--EGEEILDKTYVFLPPELFCFIHPLPGSL-----VRGAQRLPSIMRRVESMLLAI|1372
TR |A0A067G252|A0A067G252_CITSI|KGSKSGMNTKPKQMHHMPELLVRVDVPI SV-----VKSLYLLPSVMQRLESMLLAS|1042
TR |A0A067DVW3|A0A067DVW3_CITSI|-----KEPSKISFELPPELCLRIIMAPISLST-----FYSFTFVPSIMHRLQSLLLAV|960
TR |K9GQS7|K9GQS7_PEND2|-----LSNSRCVICPQPLVLSSTISKVSAATCFVFPATITRMESYLIAE|978
TR |A0A7T6XGN3|A0A7T6XGN3_PENDI|---EDGEADAPKKSIVLPAVACVIDKLPKQG-----LFGLFISAILDRLEASLVAH|908
: : * :

TR |A0A067HF90|A0A067HF90_CITSI|QLKDKI-----NYPVP-ASKILEALTAAS-----CQETFCYERAE LLGDA|1411
TR |A0A067G252|A0A067G252_CITSI|QLREEINCH-SRNFHIP-SSLILEALTTLG-----CCESFSMERLELLGDS|1086
TR |A0A067DVW3|A0A067DVW3_CITSI|NLKNMLLDHLCMQNVTIP-TIKVLEAITTK-----CQEDFHLESLETLGDS|1005
TR |K9GQS7|K9GQS7_PEND2|EGCKLLG----LGGIK-LEFALEALTKDSDNTEEHRSLQIHVQRGMGKNYERLELLGDS|1032
TR |A0A7T6XGN3|A0A7T6XGN3_PENDI|RLNDTILKG---VGIQNIDHVIATAISAPI-----AQASTNYQRFEFFGDS|950
. . : : * :

TR |A0A067HF90|A0A067HF90_CITSI|YLKVVVSRFLFLKYPQKHEGQLTRMRQQMVSNLVLYQYALSKGLQSYIQADRFPASRWAA|1471
TR |A0A067G252|A0A067G252_CITSI|VLKYAVSCHLFLTYPKKHEGQLSARRSWAVCNSTLHKLGTDRKIQGYIRDSAFPDRRWVA|1146
TR |A0A067DVW3|A0A067DVW3_CITSI|FLKYAASQQLFKTYQNNHEGLLSVKKERIISNAALCKLGCQKLPGFIRTESFDPKMWII|1065
TR |K9GQS7|K9GQS7_PEND2|VLKMATISISL FVNQPDDEYDYHVNRMLCICNKNLFKNATELKLKYEFIRSRGFSRHMWYP|1092
TR |A0A7T6XGN3|A0A7T6XGN3_PENDI|VLKFTVSCQLFRPNTNWEHYLSESRDKLVQNTRLAHAALDIDGIDCFILTSRFTTPRKWAA|1010
** . * * : : * * : . : * *

TR |A0A067HF90|A0A067HF90_CITSI|PGVLPVDFEDTDKDGDS-----LFDQEKSVAEKDLGTDKNYNEYEDDDMEDGELEGD|1523
TR |A0A067G252|A0A067G252_CITSI|PGQLSLRPVPCCEGVDTEVPLDGKFFTDTKVV-----VG--KPC|1185
TR |A0A067DVW3|A0A067DVW3_CITSI|PGDNSGSYELN---DD-----SLFNGR-----KIY|1087
TR |K9GQS7|K9GQS7_PEND2|PGLSLEYGRDHAK-----FVD|1108
TR |A0A7T6XGN3|A0A7T6XGN3_PENDI|PLIRNK-----LEA|1019
*
```

TR	A0A067HF90	A0A067HF90_CITSI	SSSYRVLSKTLADVVEALIGVYVVEGGKDAANHLMKW-IGIQVESDPE---EVGCPSPRP	1579
TR	A0A067G252	A0A067G252_CITSI	DMGHRWMSKTIADCAEALIGAYVGGGLIAALYMMKW-LGIDADLEVS---LVDDCITR	1241
TR	A0A067D VW3	A0A067D VW3_CITSI	VTGRKKVKSKTVADVVEALIGAFSTGGENVGLIFLDR-IGIKVDFVNV-----PYQ-	1138
TR	K9GQS7	K9GQS7_PEND2	SEGKHSLSSEKTIADVCEALIGASLLSGGDDHRYDMAVKAVTVFVNSQKHTATSWKDYISA	1168
TR	A0A7T6XGN3	A0A7T6XGN3_PENDI	STAKRSISTKVLADVVESLIGAAVVDGGIRKAQAQLHRFLP-EIDL-----FTTEISP	1071
			. : : *.:** *:*:* * * : :	
TR	A0A067HF90	A0A067HF90_CITSI	ACVPESV-----LRSDVFALEDALKIKFKDRGLLVEAITHASRPSS-G-VSCYQRLEF	1631
TR	A0A067G252	A0A067G252_CITSI	ASLRSYV-----PRINEIKDIESKIGYEFTVKFLLQEAITHASV--Q-E-FYCYQ----	1287
TR	A0A067D VW3	A0A067D VW3_CITSI	RQFQVHA-----ERLVNVRHLESLLNYSFRDPSLLVEALTHGSYMLP-EIPRCYQRLEF	1191
TR	K9GQS7	K9GQS7_PEND2	YSIPLYQKKAADGFEMNLAQQIFEKVGYEFKYPRLLRSFAFTHPSYPLTWAKVPCYQRLEY	1228
TR	A0A7T6XGN3	A0A7T6XGN3_PENDI	LTLPPS---KGASSLINHRLAGLIGYTFKDPALLTEALTHASCEYD-TSTQSYQRLEF	1126
			. : : * * * .:*:* * * *	
TR	A0A067HF90	A0A067HF90_CITSI	VGDAVLDHLITKHLFFSYTNLPPGRLTDLRAAAVNNENFARVAVKHK-----	1678
TR	A0A067G252	A0A067G252_CITSI	-----	
TR	A0A067D VW3	A0A067D VW3_CITSI	LGDAVLDYLIITVYLYNKYPGLSPGYLTDMRSASVNNDCYALSSVKHG-----	1238
TR	K9GQS7	K9GQS7_PEND2	LGDALDMVCVEHLFHRFPTRDPQWLTEHKMAMVSNKFLGALAVKLG-----	1275
TR	A0A7T6XGN3	A0A7T6XGN3_PENDI	LGDAVLDMVMMAVIAAHPVEMDQGPMTLLKHSVVNANLAFFCMELCAPDEPTHVPQFAN	1186
TR	A0A067HF90	A0A067HF90_CITSI	-----LHVHLRHGSS-----ALDRQIRDFVKEVLEELLKPGFNSFGL---	1715
TR	A0A067G252	A0A067G252_CITSI	-----	
TR	A0A067D VW3	A0A067D VW3_CITSI	-----LHKHILHASH-----ELYKRINITVDSFEKLSLGS---TFGW--E	1273
TR	K9GQS7	K9GQS7_PEND2	-----LHLHLQHFSN-----PLMIQNSKYAEELQLAESESNGEVNYW--L	1313
TR	A0A7T6XGN3	A0A7T6XGN3_PENDI	GEINFVPHQQIHLWRFLRSHGPNVKSAREACLERHHGLRDEIRDALE--HGSQYPWELF	1244
TR	A0A067HF90	A0A067HF90_CITSI	GDCKAPKVLGDIVESTAGAIPLDSDGRDTSVVWQVFQPLLDPMVTP---ETL-PMH	1770
TR	A0A067G252	A0A067G252_CITSI	-----	
TR	A0A067D VW3	A0A067D VW3_CITSI	SVTSFPKALGDIIESLAGAIFVDSSCNREVVQFSIRPLEPMTIP---ETM-RFHPVRE	1328
TR	K9GQS7	K9GQS7_PEND2	STSDSPKCLPDMLEAYLGAIFVDSSFDFTVIEAFFKRHILPFFHDMSIYDTFANRHPTT-	1372
TR	A0A7T6XGN3	A0A7T6XGN3_PENDI	ARLRADKFLSDIVESVLGAIFIDCCGNLDVCRAFVERIGLVWYIRRVIADGNVVVHPRNT	1304
TR	A0A067HF90	A0A067HF90_CITSI	QERCQQQAEGLEYKAS-RSGNLA-TVEVYIDGVQVGV---AQNPOKKMAOKLAA	1821
TR	A0A067G252	A0A067G252_CITSI	-----	
TR	A0A067D VW3	A0A067D VW3_CITSI	LTEYCQKNHFSMKKPVASRISGKAAVTVEVQANGRLFHT----FLDADKKTAKKVACK	1383
TR	K9GQS7	K9GQS7_PEND2	-----	
TR	A0A7T6XGN3	A0A7T6XGN3_PENDI	AQNMVKGAGTLVFKRKRVESGGMATYRCSAVVNQTEIALVEGCASAEAEVKVANVVIEH	1364
TR	A0A067HF90	A0A067HF90_CITSI	VALAVLKEKETAEAKEKGDENGKKRKNGTQTFTRQTLNDICLRRNWPMPLYRCVREGGPA	1881
TR	A0A067G252	A0A067G252_CITSI	-----	
TR	A0A067D VW3	A0A067D VW3_CITSI	EVLKSLRA-----SFPGT-----	1396
TR	K9GQS7	K9GQS7_PEND2	-----	
TR	A0A7T6XGN3	A0A7T6XGN3_PENDI	LTLHPIGST-----	1373
TR	A0A067HF90	A0A067HF90_CITSI	HAKRFTYAVRVNTTDKGWTDCEVGEPMPSVKKAKDSAAVLLLELLNKWYS	1931
TR	A0A067G252	A0A067G252_CITSI	-----	
TR	A0A067D VW3	A0A067D VW3_CITSI	-----	
TR	K9GQS7	K9GQS7_PEND2	-----	
TR	A0A7T6XGN3	A0A7T6XGN3_PENDI	-----	

Anexo V

Secuencia de nucleótidos seleccionados para la síntesis de RNAi para *L. theobromae* y *F. oxysporum*.

DICER 1 (4014 nt)

Helicase C Morado

Dicer-dimer Verde

Rnase III Rojo

>ENA|KAB2581198|KAB2581198.1 *Lasiodiplodia theobromae* Dicer-like protein 1

```
ATGGTCCTTTGTTGACCCGCTGAAGTCCTCGCCAGTGCCTCATGCATTCCTTCATCACCATGGAGCAGATCAATCTACTAATCTTCGACGAAGCTCATC
ATGCCAAAAAGGGCCACAGCTACGCTAAGATCATCAATGATTATTACGTCCTACAGATCAGAGCAAAACGTCCTCCAGAAATATTCGGAATGACAGCCTCCG
CGGTGGATGCAAAAGTGGACGTTGCTCAAGCCGCTAGTGATCTCGAAGCACTCTTACATTGCCGCATCGCAACCACCTCAAACCTGGACCTATTGCGCA
AGACAATCAGTCGCCCGGACGAGAACGTTGGTATATACGCTCCACTTGAGAAGCCGTTGAGACACCCGCTGCACATCAAGATGAAAGAGAAAGTTTGGC
GACATGGAAGCATTCCGCACTCTCTTCAGTCTTCCAAAGAGGCAAGCTCTCAGCTCGGTGCAATGGTCTCGGCACATGTTCTGGTTTTATGCTCTCCAGG
AGGAAGAGGCAAGAAGCTTGAGAGCCGTCGAGAACAAGAAATATACCCGGAACAAAAGGTTCAAGTCGATATCGGCCCTCGACGAGGAGGTAGCAAG
ATTGAGAGAAGCTGCAAAAGATGGTTAGCAGTCATATGTTCCGCGAGCCTCAGCTGAACCTTGACATGTCTGAGTTCAAAGGCTTTGGAGCTGCACAGTTG
GCTGTTCCGGTACTTTGAACGGCAACGAAAGCAAGGTGATCGTCTTCTGTCGAGCGGCGAGACACTGCTCGTCTGTTGACCCCGCTTTCAGCAGCATT
GGAGGCCAGCACTCAAATCCGGCATGATCGTCGGTAGTACGGGCAAAGGGAATGACCTCAACATCACCTTCCGCGACCAGGTTCATGACTCTCTTAAAA
TTCAAAAAGGGGGAATGAACTGCCTGTTTGAACCTCTGTGCTGAGGAAGGCTCGACGTACCCGACTGCAACCTAGTCTGTCAGATTGACACCTTTAC
AAAACGATGATCCAGTATGTGACGTCAGTCCAGGGGCCGAGCCCGGCACAAGAATTCGGATACCTTGACATGATTGAGGAGGGCAATTTACGCCACAGGCA
GCTTGTCTGGAAGCTCGCCAGGCAGAGAAGTTGATGCGGCAGTTCGCGAGGCTTTCGCGAGGCTTTCGCGGAGGATCGCCTCCTGAAAGGAAACGACGCGGATCTGG
ATGACCTATTCTCGATCGCACAGACTTTAGAAGTTACACGGAACCCAGCACCAAGGCGAAGCTCACCTATGATTCCAGCTCAGCGCTCTGCTCACTT
TACAGCACTACTCCCCAGGCAGGGAGAAGTTCTTTGATCCTCTCTATATTGTCCTTGGTTCAGGTAAATTCATCTGTGAGGTTATCTCCAGAA
AATTCACCCATCCCATCAGCAATGGGTCGCTGTGTGCGCGAAAGGCTATTTCAAAACGCTCAGCAGCCTTTCGAAAGCATGTGTCCTCAACTCCGGCAAGGC
GGGTACCTCGACGAGAATCTCTGCGCATACACAAAAGCACTTCTCTGCTATGAGAACCGCCCGGCTGGCATTGAATTGCAAGAAGACTAGTGCCTAC
GATATGATGACGAAGCCGCAACTGTGGGCAGCTACCCGTTGTAACAACCTCCGGAAGAACTACATATCACTGTCAATTGAACTTCCAGATGGTCTTGAAGG
CGAATCAGCCGCTAGCGTACTTACTCGTACACCTCTCCAAAGCCTCCGGAGTTTCCAATTTTCTCAATTTCTGGAACCGCGAGTATGGTCCAGCTGA
CGCCTTTGACGCTGTCTTCAAATGCAGCTTCGATGAAGTTCAGTATTTGACTACATACACTCAGGGTGTCAAAGACATCTTCAACAAGACATACGA
AGAGGACCACGCAAGATGTCCTATTGGATTGCCCGATGAAGGCTTGTATCAGGTGCTTGTGGTGGATTTTATGGTTTACGAGACATCTCGATTGG
GCAGCTTTGGAGGAGTTCAAAAGCACGTTGAGTACCATTTGACGCGGAGATGTCGGATGATTTTCTTCTGGACAAGTATCTGGTCGACAAGTGGGAC
GGAGGTCGGGCTTTTTACGGAATGCCTAAGGGAGATCTGAAGCCGACAGACCTGTGCCGGAAGACGCTGTCAAAGGAAAGACGGTGAACACAG
GAAAGACATCCTGAACTACTCCATTAAGTCTGTATAAGATGTAAGAGCGAAGGCCGACTCAACCTGGAACCGTGATCAGCCGGTAAATCGAAGCAAGGC
AGGTGCTCCATCGCCGCAACATGTTGGCGGAACCCGAGAGGCGTGAAGGCGATCCTCGATCAAAGGTGTACCTGTGTCGGAACCTCTGAGGATATCAA
CGTTCATCCCGCAGCTGTGGCCACCATCTACATCTTCCCGCTGTGATCCATCGCATAGACCAATATCTCATTGCGTTGGAAGCTTGTCACTCTGGG
ACTGGACATCCGTCCTGACTTGGCGTTGGAGGCGGTGACGAAGGATTCCGACAACCCGAGGAACACGGAGAAGAGGTTCTGAACTTCCGCCCGCGTA
TGGCAACAACCTACGAAGCTTTGAATTCATGGGAGATTGTTTTCTCAAGTGGCCACTCGATTGGCCCTTCCGAGAGAATCCGGATGACAATGAGT
TCGATTTCCATGTCAAGAGGATGTGCCTGGTGTGCAACCAAAACCTGTTTGAAGTGCAAAAGAGCTGCAGCTACCAAGTACATCCGACGATGGCAT
TCTCAAGAAGAACGTTGGTATCCGGATGGCCTAAAGATGTTGGAAGGCAAAGGCCACAAGAGAAGTGGAGAAGAAGTGTCAAGCATGGTCTTTGGTGAC
AAGCAATTGCCGAGCTTCCGAGGCTCTCATTGGGGCGGCGTATTGACACACAGCAGTTCGAGACGAATGGAAGCAAGAAAACCTGGGATAACCGTGT
GAAGGCAGTACCAATCTCGTGGCCAGCCAGAACACACCATGAAGAAGTGGTTCAGAGTATTTTACGCAATACGAGAAGCCAGCTTATCTCGATGCGG
AGCCACCGCCGCGCAAAATGGATTTAGTCAATCAAGCCGAGAAGGAGCACCATACCCGCTTCCGTTACGCGAAGCTGTTGAGATCGGCCTTCATACACC
CTTCTTACCTACACATTCGAGAAAAGTACCCTCTACCAGCGCTTGGAGTTCCTGGGCGACTCGCTCATTGACAACGCTTGTATTACCTGGCTAGTCTAC
AACTTTCGGCAAAAGACCCTCAGTGGCTGACGGAGCACAAGATGGCCATGGTGTCCAAACAGATTTCTCGGCGCCGCTGCGTGAAGCTCGGATTCCAC
AAGCACCTCAAGTACTACCACTCACAGCTCGAATACCAGATCCGCGACTACGTCACCGAAATCCGCGAGGCGGAGCACAACGCCAACGGAGCGCGCA
TTCTGGGTGTCGGTCAAGCCGCGCCGAAGTGCCTTCCGACATAGTCGAGGCATACGTCGGCGCGCTGTTCTGTCGACAGCGAATACGACTTCGCCGA
GGTCCAGAAGTCTTCGAGATGCACATCAAATGGTACTTCGAGGACATCACCATCTACGACTCGTACGCCAACGCGCACCCCATCGTCCGCTCCACCG
CCTTCTCCTGAGGTGCTCGGCTGCACCGAGCACAAGTGCATGGTCCAGGAGCTGCCGACTATACGCCCCGCGCCCGGTCAGGTGCATCGCCGGTGT
CATGGTACACAACCCGATTAATGGCGAGGATATGGCTTCTTCTGGGAAGAACGCCAAGGCTGCGAAGTTTGGCGTTGACGACCTTGAACCAT
GCCGCTGTTCCAGTTCAAAGAGATGTACGGATGTGACTGCGACGAGCAGAGTGTGAAGAGGAATGCGGTGATGACGATGACGATGCGGGTATTGG
TGGAGGTTGGTGAAGCCGAAGATACTCATGTTCTGATTGTGAAGAGGGGAGTTTGA
```

Región seleccionada para la producción de RNAi (250 pb)

Dicer 2 (4107 nt)

DEAD/DEAH box Helicase Azul

Helicase C Verde

Dicer-dimer Morado

Rnase III Rojo

>ENA|KAB2572547|KAB2572547.1 Lasiodiplodia theobromae Dicer-like protein 2

ATGGAGTCGCCGAACGGAGAGCCTACCTTTTTCTGCCTGCGGTCTACCAGGCTGAAATGGTCGAGGAGAGCTTGAAGCAAAACATCATTTGTTGCTATG
GACACGGGACGGGGAAGACCCACGTCGCAATATCCCGTACTGCTGCCGAGCTGAAAGCTGCAACCCAGACCAGCTGGTCTGGTTTATTGCGCCTACT
GTCACCCTCTGCCACCAGCAGTTCTGTCTCTTTGAGAAGCATCTCCCGCATATGAGATCCGCTTTCTCAGCGGCAATGATAACGTGACCCGTGGACGG
ATCAGAACATTTGGGATGCCGTTCTCAGAAATGTCGCATCGTCGTGTGCACCCCGGCTGTGCTGTTGATGCTGTGACCCATGCCTTTGTGAAGCTCCC
CCGACTTGGCCTTCTGATATTCGACGAGGCCACATGTGTCGAGGCAACCATCTCCAGTGCATATGCAGAGATTCTACCACCACCTGTTGCAAAAT
GGCGATCGCGACAGCCTGCCAAGATCCTCGGCTTGACAGCGAGTCCGGTGTGCTGCAAAACGCAAGCGGCCTGGAGATTATCGAACCGACGCTCAA
TGCAATCGCAAAACTCCCAAGATTTCATCGAACAGACCTCCTCGCTTACACACAGGCCTGAGCTTGTGCAGTTAAATACCCCTGGTCAATATTTAGAC
CCCTCTGCCGGGCCACCAGTCTTGTGCTCTGGCTAAGCTCTATCACGCGTACGACATCTTGGAGGATCCATACATCTTAGTCTGCGTAAAAAAGCAT
CAGAGACCAGGATGAGACCCGGGACCAAGTCTTAAGAGAGCTGGAGAAGTGTCTACACAAATAGAAAGACATATATCCACGAGCAGCTGAAGAAGCT
CTACTCGGAGCGCTCGGTATCTATAATGAGCTTGGTGGACCTCCAACAGAGTTCTACATCCGGAGTTGCATCGCAAGTTTGTATGCCTTTAAACCAAC
TCAAGCCACTTGTACTTGTACTGGTTCATCAGCCGAAGGCAAGCATCTCCACGACATGCTCGCACCCTGGCCGACGCCCGCTGTGAGCCAGCATACG
GGAATACATGACAGTCTATCACCAAAGATGAATACTCTCGTCGATCTTCTTGTCTGTAATGGAATGCTGACTTACCAGGATCATCTTCTGTCGAGCAGC
GGCTACCGTTGCTGCAATGGACCTGTTCTGTGCAACCCCTCGGCTCGGGACTTGTTCAGTGTGCGCACCTTTGTGCGCACCTCCATGACCGTTCA
CAGGAAATCCCATCTCGGATCGGCGACGAGTGAATAACAAACACGACAGCAGACTCTTGAAGAAATCCGCGCTGGCAAGAAACCTTATTGTGCG
AACCGCGTCTTGGAAAGAAGGTATTGATGTATCCAACCTGCCATATTGTCTATTGCTTCAAGCCCAAGAACCTCAAGTCTTTCATTACGCGCCGCGG
CGTGGAGGAAGAGGACTCAAAGTTGTCTATCATGTTCCCTGACGACTCCACCTTTGTCAAGTCTCCAGAAATGTGGTGGACCTGGAAGAGCAAAATG
AAGGAGCGTATTGAAATGATCAACGGGTAGTCCAAGCAGCAGAAACACGGAAGAACTCGAAGAGGATGGAGACGACACCTACCCTGCGAATCG
CGGGGCGCTTCTCAGCTCGATAACGCCCGCAGTTTACCATTCTGCGCCATTCTCGGCGACGGACAACACGTTGATCTACGGCTCGGTTCTTCTTC
ACGGTAGATCAAAATGATCGCAGCAGTGTACCGTCACTTGGCGAGCTACCGGGTGCCTATGGCGAAGGGCAACGCGCAGTTTCTAGAGTTTGGCGGT
GAAAGCAGACTTGCACCTTGTAGTCTACGCGGAGTTCAGGCTGCGCTCAGCCCCACGATAGGTCTTCTACATCCGAAAGGAGTTGTAGGCGCCCTTTG
ATGTTCCGCGCTTCCAAATCCTGATATCAGCATGACCGAAGACGAGAATCTCCAGCAAGAAGAAGAGGCGACTGTCCAAGTTGTCTGCTCAGCATTT
CCCAAAAGGCGTGTACTTCTGCATTATATCAGAGATTCCGCCAAATATGGCATGTATACGAAGGAAACCATATACCAGCCGAAAGGTTTCTCATGAGC
AGGCTACCAGTAGCTTATCCATGTTCCGCGGCTTCTCTGCTCAGATTTTGACCCGCTACGAGCTTTTCTCATGATCGTTCAAGAGCTTTGCGACACTGCA
ACGCTCCGTTGGTTTTACTAATCATGAACTGGTACTGCGCGCATCACCGCATCGTCGACGAACGAAATGACTACAGAGACTGGAATTTTTGGGGGA
TTGCATTTGAAATACAGCACCAGCGTCCAGCTCATGGCAGACTTCTCCACTGGCCGAGAGCTATCTCACTGAAAGTAAAGATCGCATTGTTTCCAA
GGTCACTCGCTAAAGCTACGCGCCACCGGCTCGACAAATTCATCATCTAAAGGCTTCCAGGCTTCCAAATGGCGGCCACGCTATGTGCAAGAT
ATCTTAGCCACATCTCAAGCTGCTCTACAAGAGAGTCAACGCTATCTACCAAGACCTGGTGTATGTGGTCGAGTCGCTCATCGGTGCCGCTTCTGTT
AGGGCGGCATACATAAAGCGCACCTTGCACATCCACCTTCTCACCAGCCTCGAATGGAAGTCGCTGCACCACTGCCGACGATCTGCAGGACACCG
CGGGGAGGAACACCGGTCAGCGCCAGTGTCCACCTCGAGCGGTTGAGGAGCTCATCGGATACACGTTCAAGAACCAAGTCCCTCGGAAGCC
TGACACACGCGTCTTACCAGCGCCCGGGAAGCCGCTCCTCATCTACCAACGCTCGAGTATCTCGGCGACGCGCTCTCGACTACATCTCCGG
CCGGGTGACGCGCACCGCAGAAAGCCAGCAGCAACGCCAACGCGCAGCAACGCGCGGTAGCACGATCCACCCCGCGGCCACGCGCCGACGAGCA
TGCCGCACTGGACGATGCATCCATCCGGGCGCCCTCGTCAACCGGCTTCTCTGCTGATGGAGGGCAACCATCTTCCGATGGAGGGCAACCATCTCG
CGTCTTTTCTGCTCTTATCCACCAGCAGCGCTCCCTTCCCTTTCGACAGCAGTGGCAAACGAGCAACCATACACCGTCCCGGCCACGCGCTCC
CGCAAGGCGGTGGTGCATCTTCTGCGACACTGCTGCGCAGCTGCTGCGCTCCGCGACGCGGCTACCGCCCGCAGCAGGCTATAGCGGAAGACCA
TGCCGCGCTGCGGCGAGTACCCCTGCGCGCTTGGCCAAAGTTGGGCGGAGAAAGTTCTTTTCGGAATCTGTCGAGGCGGTGCTGGT
GCTGTCTTTATCGATTGCGAGCAAAACAGTTCTTTGTCTGTTGGTATAATGAGATGTTGACGGGCGAGAGGACAGGAGAAAAATGGAAAGGTTGTG
CTGGAGGAAGAGGAAACTTGAAGCCTGCGAGCGGTTCTGGAAGAATCGGATTTGATGGACGTGCTGGATAGGTTTACAGGGGACGAGGTCGACTG
TTTGACCCAAAGACGCGAGCTGCGGCTGGCGGTTAGCATAAGTGGTGGGAGTGGGAGTGGGAGGAGGAAAGGAGCTTGGACGCTGGCAGGCGGATCGC
CGGAGGAGGAATGAAGGGGAAGAGGTTTAGGTGTAGAGTGGGCTTGGGAGACATGGGTTGGTACTGGGTTGACGGGAGACTAGGCACGGTGC
AGAAACGAGCGCGGATCGGGCGGTTGACCTTGTGGCGCAAGGGCAAGTTGGAGGGGATGGAGAGGTTGGAGGTTGCGAGTGGCGACGAG
ATCGAAGTGGAAATGCTGATGGAGTGAAGTGAAGAGCGAAGAGAGTGAAGAAGTGCATCAGGTTGTGCTGGTGTGATTGGGGACGATTCCGA
CATGGATGTACGATCTCTCAGCATCTCATGCGATTAA

DICER 1 (4503 nt)

Helicase C Azul
Dicer-dimer Verde
RNase III Rojo

>ENA|TVY63342|TVY63342.1 Fusarium oxysporum f. sp. cubense Dicer-like protein 1

ATGTCGGATCACGAGTACATCGACACTGATGACGAAGACGATCGATATCGCCTCATCGTAAACCCTTGAAGCCTCGAAAGACTACGGAAAAGAAGCT
CCGAGACCAAGCTGCTTACAGGCGCACATAGAGAAGACACAGAGAGATGCCGCAAGGAGTGGCGTTCTTTACGCGATCCTAGTAAACAGTCCCTCG
CCAGCTCATGAACCAGAACGAGAGCCAAAGATCATCGCCTCGCCTCGAGAATACCAGATTGAACTGTTCGAGCGCGCTAAAGAGAGAAAACCTCCTT
GTGGTGTGCTACAGGTACTGGCAAAACACTCATCTCCGCTTGTACTACGACATCACCTGAAACAAGAGCTGGAAGCTCGAGCCATCGGAAAAGCCC
AAGAAAGTCCGCTTTTCTAGTAGAAAAGGTCGCCCTTGTGTTACGACAACTGCACTGCTGCAACCTCGGGGCCACCCTGTCAACAAAGTTCTG
TAGGCCATATGAAAGGCAATGACGAAAGACCAAAAGAACTACTGGGATGAGAAAGTTGGCGAAAACATGGTTGGTCTGACTGCTAGATCTCTCGGCT
GCCTCACTTGGCGTTCATACCATGTCCCGAATAAACCTCCTCATCTTCCGACGAGGCACACCACAGAAAGAAGCACCCTGACGCTCGTATCATGG
ACGGGTATTATGGCAAAACGAAAGGCGAAAAGCCTCGCGTACTGGGAATGACTGCTTCCGCTGTGGATGCGCGAACCAAGGACGTAAGAGACTGCTCC
CTGGAGCTTGAGAGGTTCTTGCAGCCAAATGCAACGATTCAGATGAGGTGCTGATGGAAACCATGCACCAGAAAGAACCAACCGCAAGAACTGT
CAACTACAGCAGGCTTGAAGCTCCCGATGATACAAAGACACATCTATGGGAGCAGATTTTGGCCTAGTTTCTCGCAACGAACAGTTCAAGTTGTGCT
CGAATTCACAAAAGAGGCTCTGTCAGTCTCGTACTTGTGTGGGACCGCAGTATGGGAGCTTGAATGACAGATCCCGAGACTGCAACCGCTCGCAGC
CAGAACTAGTGGGAATTTAGGAGACATTCAGTAACAAGAGCAGATAGCAACAAGGCGCTCGGCGGTGTCACGAAATCAAGGAACTGTTACGGCTCAC
AGTTCCGTTGCAATCGACCAAAAGGCGAAGGGCTCTCGGCCAAGGTGAAAAGTCTCCATGAGATCTTGTGCGACGCTTTTCAATGGATGGACCAAGC
GTTGCATTGTTTTGTGAGAAAGGATACACAGCCGCTTACTTTCGGATCTCTAATGCCAACCTTCCATGAGGATCCCGAAGTGTCTGTTTATACAT
GGTTGGCTGTCAACTCAACCAATTCGAGCTTCGGCACCATGTGCTTTCGAGAACAAGTCCAGTCTCCACGAAATCAAGGCGGCAATCAACCAAGCTT
TTCAACAACACTTGTCCAGATGAGGGCATCGATGTTCCAGATTGCGACCTGTTATTCTGTTTCTGATCTTCAACTCCGCTCATCCAATATTGCAATCCAA
AGGACCGGCTCGACAAGCAGCTCTCGATATATACCATGATGGAGGAGGAAATTTGACACATATCGAAGTGCAGAAACAAAGCTTGAAGATGAC
AGGCTTGGAAAAGTTCTGCTCTCTCTTTCTGCTGACCGCAAACTCATGATGATTTGATAGACGAGGACATGGAGATGATGGTTGACCGCATGAC
ATCAAGTGTACGAGATACCTTCGACAGGCGCACGCTTACGTTTCCCGCCAGCCTTGAATCTGGCCAGATTTGTTTCTCACTTGTCAACTGTACAGCTA

CGCCAAAGTTGAATACCAAGTACAGAAGTTGGCGATCGATATCTAGTCTGACCTGGTTCATGCCATTACAGTCCCGGTCAACTTTGTGAAGGGTACCCA
ACAGCGTAGCAAATTTGCTGGCCAAAGTGTTCAGCATTGAAAGCTGCAAGATACTGATCAGAGACAAACATGTTGACGGCAATCTTACGCCGACATT
CAAGAAAAAGTTTACGCTATGCGGAACGCACGGCTAGCTGTGAGTTCAAAACAAGAAGGCTGACTACGACATGCGATTGCGGGCAGAGATTTGGGCTG
AACGAGGGGAGTGGACTGAATGTTTTGCGACTACAATACCATCAAAGACGGGAGCGCCCTAGGAAGGCAATAGCCGGAAAGTCGTAAATACCTTTCT
CGCGAAGCCGATCCGAACTGCCAGGTTCCTCTATTTTTGGCAATGGACATTCCTCTATTGTGTAATTGACGCCTAATCAGGATGCTCTTAACT
CAACCTGAAGAAGCTGACGGATTGACCAAACTCACTCATCGGGTATTCGCGGATGTGTTGAGCAAAAGATAACGATACCAGTCCGACCAATATCCATA
CCTCTCGCACCTTATGCCGACAGTCCCAATCAGACACTCGATCACATAATTGATGGGATGTGTCAACCTTGTGAGCAAGAACAGGTTGCTCGAATG
GGAGAATGCGCCAGAAGACTTCTCGTCAACAAGCTTGTGACTGATCCATACGATGGAGGACGCAAGCTTGTCAATCAAGGATCGACAAAACGAAGA
AGCCATCCGACCAACACCCGAAGGAGTCCCGAATCAAGAAGCAGATCTTATAGGTCTGTGGAACCGACAATCATGCAATACAGTAACAGCTGTGAT
ATAAATCTCGCCAAAGGTAAGTGGCGAGATGATCAGCTGTGGTCAAGGACAGCTTCTGTCTTGGCAGAAACCTTCTGATGAGTTTGAAGTTG
ACGAGAAGATCAACATGGAGTGTTCATCTTGGAGCCTCCATGTGTCTCTACCTATCGATGTGGTCTCTATGGCCATGGCATTTCAGCAAT
CATCCACCGAATAGATTCCGTCTGATTTGTTGGATGATGTAATCTCCTTACCTTGAATTCACCCAGAACTCGCACTGGAGGCCATGACCAAAAGAC
AGCGCAACTCTGGGGAGCATGACACAGAACAGATCAATTTCCAAACAGGCATGGGCGACAACATGACAGGCTAGAGTTCTCGGCCACTGTTTTCTA
AAGATGGCCACCAGTCAACTACACACTGATGCTGACGGAATGAGTGCAAATACCAGTTGAGCGCATGCTTCTCATTTGCAACCAAAACCTC
TTCAATTCAGCGTTGATCGCAACTCCAAGGTTCTGCGGATCCAAGGCTTTGACAGACGAAACATGTTACCCGATCTTCAATGAGAAAGGAAAG
GCACCGAAAACCTCGATGAAGCATAATCTGGCCGACAAGCAGATTGACAGCAGTATGTGAGGCTCTCATTTGGGGCAGCATACCTCACAAGCAAGGCCAG
CAACATGGATCTAGCTGTCAAAGCCGTGACGCGAATGACCAAGTCAAAGAACCACAGGATGAAGGCTTCAAAGATTACTATAAAGCCTACAAGGTC
CTGAGTGGCAGGAAGGTAATGCGTCCGCTTCAACGCAAGCTTGTGCAAAAGGTTGGCACAAGCTACAGGATTCGCAAGTTCAGGATTCGCAAGCTTCC
AGAGTGCATTCAAACATCTTCGTGGCCGTATGAGTCTGTCCAGATTATCAGCCCTCGAATTTCTGGGCGATTCACTTCTCGACATGGCCGTCGTCGA
TTATCTCTATAAACTTCCCGAGCAGACCCTCAGTGGCTGACGGAACACAAGATGGCCATGGTATCGAATCAGTTCCTTGGATGCTCTCGCTTAAAG
CTTGGTCTGCACCGACTCTCCAGCACATCGAATCTTCTAGCCAAATCCGCGATTATGTGCTGCAACTCGAAGTTGTAAGAAAGGAAAGTCTCGCA
AGGAAGCGAAAGAAGATGGGACTCCCATGCGCAAGGACTTCTGGCTGAAGGTGGATTCCGCAACCAAGGTTTACGCCGATGTGATTGAAGCTCTGTG
GAGCCATGTTGTCGATTCAGTACAAATTTTCGGTTGTCGAGAATTTCTTACCAAGTTCATCCAGCCATATTTCCACGACATGAGACTTTACGATACC
TTTGGCAACAAGCAGCATGCTTTCCTCCAAAGAGATGCACTAGGATTCAGGATTCAGGATTCAGGATTCAGGATTCAGGATTCAGGATTCAGGATTCAGG
GCAGATCAAGGATGGCGCGCTGAAGGATACCGAAATATGCGCTGTTTCATGGTGATCAAAATGTTATCGCGGATGACACATCTGAGAGTGGGAG
GTATTCTAAGCAGCGTGGCGGACGAAAGCGCTCGAGATACTTGATTCTGTTGGTGAGGATGTTGAGGCGGCAAGAGGTTTTTGGGGTGTGATTGTCA
CCTGGAGGAGGGATGTTGAGGTTGATCATGGAACAGCTGTTGA

Región seleccionada para la producción de RNAi (250 pb)

DICER 2 (4794 nt)

DEAD/DEAH box helicase Morado

Helicase C Azul

Dicer dimer Verde

RNase III Rojo

>ENA|TVY65056|TVY65056.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Dicer-like protein 2

ATGATGGAATCGATGAAGAGAAGTCTCTAACAGTGGGAGCGAGACTCCTCACGGTCCGAGAGTCTGCCACCCTCGACACCATCAACATGATT
GATGTGCAAGAAACAGTGACCTTAATCCCTACCAGATAAGGCCCTAAATGGAACAAAGGCGCAAAACAGTCCAAAGATGATCTCCAGTCCCGGA
CATCATCAGGCTCGTGCCTACCAGCGAGAGATGTTGGAGCAGAGCTGAAAGAAACAGTGTATTGTCGATGGATACAGGACGGGAAAGACCCAAAG
TCGCCGTTCTTCGATTCAAGCGGAACTCGAGAGAAGTTCACCAACAAGCTTGTGTGGTCTTAGGAAAGACTGTTAGCCTCGCAACACAGTTTA
ATGTTATCAAGAGACAAATGCCATCGGTGCCATGAGACTGTTACGGGCGAGCTCAACATCGATGATGTTGCGCCAGAAGTTTGGCCTCGAATCTCA
AGGCACCTCGTATCATCGTATCATCTTACATCTTCCGCTGATGCTTGTGCCAGCCTTGTGCACAATGGACATGCTGCAATGCTGCAATGCTGCA
GTCATAATTTGGTAAAGAACAGCTCTGGGCGGAAGATCATGATGAACTTACCATCGACACAAGAAGCTGGGTATGCCAGTACTGCCATACTTGGC
TTGACTGCCAGTCCATTAATCTCATAGATCTAAGGAGATCGAAAACTAGAGAATACAATGGACGCTATCTGCGTTACTCCACCAGTCTCATCGAGAG
CAACTACTCAAGCATGTCACAAAGCCTCACTCAATTCGCTCACTTCTAGCTATGCTAGGATGCTAGCAAGTCCCTCCCGTACGCGCACTGATGCAACA
AATACTCGAATGATGATCGCAAGGATCTGAGGTTCTTAAAGTAAAGGCTTGTGCTAATGATGAAAAAAGCGGAAAAGTTAATGAACGTTG
ATTATGAAGCAGCAGCTTCTCGCAACAGCAATCAGAGGCTTGGAAACAAGAGTAGAGAAATCCTTGCAGAACTGGCAGCTGGGAGTAGACCA
TTACATTTACAGATGATCAAGACCTTCTTGCAGAGATCGACTCATACAGTACTTTCAACGATGATGTTCTAACAGGACAGGACCTTCTGCGAGA
CACTTGGCGCAATCAACATCGGTGTGTTGCAACTACCACCAACCGCTCAAACCTGTCTCACAAAACTAGCCGACTGATCCATGAACCTTCTGGC
GCGGAGAACGATGATGTTGGAATCATATTCGCTAAGGAACGCACTGACGCGCATACACTTTCGCGAGCTTCTTAAACAACTACCCCTTTCGAGATCGTT
ACCGCTCGGTGCAATAGTCCGGGCTTCGAGCTACGGACTTCAGAAACAAAAGTCTATGAGTACTCCAGTGGTCTTGGCCCTCAAGTCTCGATGATT
TCAGATCAGGGGTATCAATCTCCTGGTGGCTACCAGTGTCTTAGAAGAAGGCATTTGATGTTCCCGCATGCAACCTAGTTGTGCTCTCGACGAGATCGC
TACCCTCAAGTCAATTCACAGCGCGTGGACGAGCTCGCATGCAAGAAATCCAAATGATTGCCCTGTGAGCTCAAGCACAGACATCCGCGCTGGGA
AGAAGTGGAGAAAGGATGAAGAAAGCTTACGAAGATGACCAACGAAATTTGGTCTGATTGGATGAACAGGACGGGCGGAGGAGATTGATCCACC
TACTATATCGTGAAGAACACAGGAGCAGGCTCGACTCGACAATGCTCGACAACACCTGGATCGCTTTTGTCAAATGTTTTCCGCTCAGATTATGTCG
GTCAACTCCCGACTACGTTCTTCCATAAAGAAGAGACTCCATACGGGCGACCGGATCTTGGAGACTACGGTTACTTTGGCAGGAGGTTGCCCACAAAC
TTGCTAAAGTTCAAAGTCTTGGCGGTGGAAGTCTGAAACGCAATGCCATGAGAGATGCGGCATTTCAAGGATACGCTGCTTTGACGAAGCAGGCTGG
TCACAGATAAAGTTCGCCCTCTCAATGTAAGTCAAGAGAAGTGGAAAGAAAGACCCGACCTAATGCCGAGCCCTATTCGACCCTGGGTCCAGATCG
CCCAACGCTGGAAGTGGGTTGTGATAAGCAATTTACTTGTTCGAGTTTACCGATGACGAGTTCGCGGCGCTTGTTCATTGACGTATGTTACTGCT
CTGATGACCTGCTCGCAAGATACGTTATACCCTGGGAATGGCTCCAAAGTGGTCCATCGATGCGGATTCGTTGTCGATATCCGATGAGGATCTT
CAAAGAACCAGATCAAACTTCGGCTCTTGGCTATGAACTTTCAGCACCCTGGCGGTCGAAGATCGCGAGCATGTTATCAAGATGTCCATAGCCA
GTACGACATCTTCCCTGCCCCACGCTACCCGGGATGACATGGGTGCAATACCCTTCCGCGGAGATGGGGTGAAGAGGCGACGAAACACAGAGTTC
TTGTGCGGAGACCAATAACAAAGCCTTCACTACGTCGGCAGTTCCTCAAACCTGATTTTTGTGATGTGCAACGCCATCTAATGAATGATGACAA
AGGTCCATTGAATGAAGATCTGTTTCTGAAAGATGGGGTCTTCGAGTCCGACTTACTTATGATTGAAAGGATGGTCAAGCCAAAGTCAAGCACTAA
CTAGAGTGTGTTGTTCCCAATTTCTATGCCCGTGTGATAGGTTCAAGAGACGAGTCTGCAAGTGGGCTGTTTCAATCCACATATCATATGAG
CTAGAGTGCAGCTTATGCAATTTCTACACTTCTGAAAGCAGTGGCATCAAGAATTTGCAAGTGGTCTGAGGCGCTAAGCTGCCCTCA
GCGCTCGTGAACCTGTGACTACCAAGACTTGAAGTTTGGGGGACTTATTTTTGAAGTTTGCACCGTCACTCAGGCTTATTCTGAACACCCGCTCGTG
CCCGAAGCCCTTCTGAATCATTTAAAGATCGACTCTGATCCAAACGAAAGCAGTCCAAACGAGTATGCTTGAAGAAAGGGCTCTCAAAGTTCATCTTTCGA
AGCCTTCCACCTGAGTGAATGGAGGCGCGCTATCTGATGACTTCTTAAAGAAAAACCTGCCCTCGACCCGCGCAGTGGTGGATCGAAGACCT
TGCCGATGTTGCTGAGGACTTATCGGAGCCTTACAGACGAGGAGGCTGACAAAGGCCCTTAAATGCATTTCAGTCTTTTTGGCGCAGACTGCA

ACTGGCATCAAGAGGGTGTGGCTAGAGACATTCTCTTTGCTGCAGCTCCTAGCGACGTTTCAGCTTCCAGTAACCTTGAACCCCTTGAAGACCTGATCAA
GTATAAATCAAGAAGAAGTCTCTGCTGATCGAAGCAGTTACTCATGGTTCATATGCTACAGCCATGCAGGAAAAATCCTACGAGCAGCTCGAGTTTCT
GGGGGACGCTGTTCTGGATTATATCGTTGTCACCAAAATGTTTCAGCACGATCCGCCAATTCCTACTGGTCGCCTTCATATGATCAAAACGGCCATTGTG
AATGGGGAGTTTCTTCACTTGTGAATCTGGTCAACTCTATCCAACGAAAAGACTTGGAAAGTTAGGCCGATGGTGAGCTTGTAAACAAAACACTGCA
CTCCACTTTGGAAGTTCATGAGGTTAACTCTCCGAAATGGCCAATGTCATGTTAGAAAACCGAGGAGAAATTCGAGTCCATGCGACGGGAGCTTGTG
ATAGCTTTGTGGGGTGTGGTCACTACCCCTGGGCGCTCCTCGCACGCCTTACCCCCAAAAGTTTTATTCTGATATGTTTGAAGCTCTTCTCGGTGCCGT
CTGGGTCGACTCGGGATCTATCGAAGAATGCATGCGTGTCTTGAACATTTTCAGGTAACGGACTATCTGGAATTTGTTATCAAGGAGGACATACACGT
TCAGCATCCCAAAGAGGAACTTTCTAAGTTCGCTGATAGACAAAAGATGAAATACACTACAGCCCTGATCGAAGAACCCGAGCCTCGATGGAGTTGTG
GAGTCACAAATGGAGAGCGGTTGGTAGGAGAAGTCGAAGGTTCTCTCAACAAGGTTGAGGCTATGACCAAAGCTGCGGAGAATGCGATTCGACTTTTG
ACAGAGGAGATGAATGCAAGAGATGACCTTGCACAGAAACAGGACGAGGTCACGGCCGATACTTCGCCAGAGAAGGAGTCCACTGATCATTAAATGGA
AGGCATTCTAACCGATAACCCGAGGACAAGGAGCCGTTGTTCTCCAAGAAAGAGAACAAGATGAAGTCGTTGGTCGAGCCACTGAAGAACGAGA
ATACGAAGAAGTTAGCCGCCACCCAAAGGAAGTGGAGTTAGCTCGTAGGCCATAGAGGAGGATTTGATCGATTTCGGAGGACGAGATGTCGGAG
GACGAGATGTCGGAGGACGAGATGTCGGAGGACGAGATGTCGGAGGACGAGATGTCGGTCGACCGTCCAAGGAAGTGGATTAGGCCATCATCCAC
GGAGGAGGATTTGATCGGGTTCAGACGACGAGACATCGGACGACCGTCCAAGCAAAAAGAGACCAGTTGACGTTTCAGAAGATCACCAGATAGCTG
ATCTTCCAGAGAAGAAAAAGTCTAAGAAATTTGA

Región de baja homología seleccionada (250 pb)

Anexo VI

Extracción de Plásmido por lisis alcalina

1. Centrifugar el cultivo bacteriano en tubos de 1.5 mL a velocidad máxima por 2 minutos y almacenar en hielo a 4 °C. De ser posible dejar el sedimento bacteriano lo más seco posible haciendo decantación.
2. Resuspender el pellet bacteriano en 100 µL de solución alcalina de lisis I (Tris HCL 1M, EDTA 0.5 M y H₂O desionizada) enfriada en hielo y agitar por vortex. Asegurarse de que todo el sedimento esté inversa en la solución.
3. Agregar 200 µL de solución de lisis alcalina II (NaOH 10 N, SDS 5% y H₂O desionizada) recién preparada a cada suspensión bacteriana, tapar el tubo y mezclar a mano unas 10 veces. Posterior colocar el tubo en hielo.
4. Agregar 150 µL de solución alcalina helada III (CH₃CO₂K 5 M, Acido glacial acético y H₂O desionizada) cerrar el tubo y dispersar la solución mediante inversión, varias veces. Incubar el tubo en hielo por 5 minutos. Centrifugar el lisado bacteriano a velocidad máxima (12000 rpm por 5 minutos a 4 °C). Transferir el sobrenadante a tubos nuevos.
5. Agregar un volumen igual de fenol-cloroformo y agitar con vortex. Centrifugar la emulsión a velocidad máxima durante 2 minutos a 4°C. Transferir la capa superior acuosa a un tubo nuevo.
6. Precipitar el DNA plasmídico agregando 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente. Mezclar agitando por vortex y dejar reposar la mezcla durante 2 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a velocidad máxima por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente retirar el sobrenadante por decantación sin remover el pellet.
7. Agregar 1 mL de etanol al 70% e invertir el tubo cerrado varias veces para el lavado del pellet, después centrifugar a velocidad máxima por 2 minutos a 4 °C. Volver a eliminar el sobrenadante por decantación y dejar secar a temperatura ambiente para evaporar el etanol sin deshidratar el pellet.
8. Finalmente disolver el pellet en 30 µl de H₂O desionizada estéril libre de nucleasas y añadir 1 µl de RNAsa (10 mg/ µl) e incubar a 37 °C por 30 minutos, pasado este tiempo medir la concentración de DNA plasmídico. Guardar los tubos a -20 °C hasta su posterior uso.

Anexo VII

Tablas de ANOVA

ANOVA y prueba de Tukey del promedio general de los dsRNAs y sRNAs.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	1	150.2	150.22	7.05	0.038
Error	6	127.9	21.31		
Total	7	278.1			

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
dsRNA	4	22.83	A
sRNA	4	14.167	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
RNAs	1	2.930	2.9296	5.15	0.026
Concentracion	9	33.447	3.7164	6.54	0.000
Error	79	44.903	0.5684		
Total	89	81.022			

Comparisons for AJUSTE

Tukey Pairwise Comparisons: RNAs

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

RNAs	N	Mean	Grouping
ldsRNAs	45	0.581338	A
sdsRNA	45	-0.447211	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Fisher Pairwise Comparisons: RNAs
Grouping Information Using Fisher LSD Method and 95% Confidence

RNAs	N	Mean	Grouping
ldsRNAs	45	0.581338	A
sdsRNA	45	-0.447211	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Concentracion
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Concentracion	N	Mean	Grouping
0 µg	9	1.69693	A
0 µg	9	0.66838	A B
1 µg	5	0.25957	B C
0.25 µg	9	0.18098	B C
0.5 µg	9	0.05374	B C
0.125 µg	9	-0.06147	B C
1 µg	13	-0.12097	B C
0.25 µg	9	-0.44677	B C
0.5 µg	9	-0.59188	C
0.125 µg	9	-0.96787	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Fisher Pairwise Comparisons: Concentracion
Grouping Information Using Fisher LSD Method and 95% Confidence

Concentracion	N	Mean	Grouping
0 µg	9	1.69693	A
0 µg	9	0.66838	A B
1 µg	5	0.25957	B C D
0.25 µg	9	0.18098	B C
0.5 µg	9	0.05374	B C D
0.125 µg	9	-0.06147	B C D
1 µg	13	-0.12097	C
0.25 µg	9	-0.44677	C D
0.5 µg	9	-0.59188	C D
0.125 µg	9	-0.96787	D

Means that do not share a letter are significantly different.