

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Diseño de sRNAs sintéticos como
biofungicidas potenciales contra hongos
patógenos de frutos tropicales

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

LAURA BEATRIZ SANTIAGO TAPIA

Director de tesis
Dr. Julián Mario Peña Castro

Co-Director de tesis
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

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 del Dr. Julián Mario Peña Castro y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto SEP-CONACYT Ciencia Básica (287137) asignado al director de tesis, una beca nacional de maestría (291236) y una beca de Movilidad 2018 en el Extranjero (291250) asignadas a la autora de la presente.

Fragmentos del presente trabajo se presentaron en el siguiente congreso:

Laura Beatriz Santiago-Tapia, Fernando Solano-García, Blanca Estela Barrera-Figueroa y Julián Mario Peña-Castro. Identificación de blancos moleculares para el diseño de fungicidas de sRNAs sintéticos contra hongos patógenos de frutos tropicales. Xalapa, Veracruz del 15 al 19 de Octubre del 2018. XII Congreso Nacional de Micología. Ponencia.

Agradecimientos

A la Dra. Hailing Jin del Centro de Biología Celular de Plantas de la Universidad de California Campus Riverside EUA, por su apoyo y capacitación en la técnica SIGS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las becas otorgadas.

Al Dr. Roberto Garibay Orijel del Laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el Curso Biología Molecular de Hongos.

A la Dra. Gabriela Heredia Abarca de la Red Biodiversidad y Sistemática del Instituto de Ecología A. C. Xalapa, Veracruz, por el curso Bases teóricas y metodológicas para la identificación y aislamiento de micromicetos conidiales (anamorfos) de los restos vegetales.

A los integrantes del Comité Tutorial que evaluaron de inicio a fin este trabajo de tesis: Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia, Dra. Sandra del Moral Ventura y al Dr. Julián Mario Peña Castro por sus aportaciones realizadas a este proyecto.

Al jurado de tesis el Dr. Edgar García López y el Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García.

Al Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo, Dr. Alejandro Aparicio Saguilán, Dra. Jacqueline Capataz Tafur, QFB Leticia Saldaña Medina y MCQ Beatriz Castro Ilario por compartir reactivos y equipos usados en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Mario Valera Zaragoza y la Dra. Sandra del Moral Ventura jefes de la División de Estudios de Posgrado, a la Dra. Rubí Guadalupe Utrilla Coello y al Dr. Miguel Ángel Peña Rico coordinadores de la división del Posgrado en Biotecnología, por los trámites y su apoyo durante la maestría.

A Fernando Solano García y Karla Flor Esquivel Aguilar estudiantes de la Ingeniería en Biotecnología de la Universidad del Papaloapan del programa Verano científico de la UNPA, por su apoyo y trabajo brindado en este proyecto.

A mi co-asesora la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, por su gran conocimiento y tiempo brindado para la elaboración de este trabajo.

A mi director de tesis el Dr. Julián Mario Peña Castro a quien debo de reconocer su infinito apoyo, comprensión y recursos necesarios para la elaboración de este trabajo.

Dedicatoria

A mis padres Esteban Santiago Hernández y Laura Beatriz Tapia Olmedo, a quienes debo todo lo que soy, por los valores que me enseñaron, el constante trabajo que uno debe de llevar acabo, el nunca rendirse, estar consiente que todo en esta vida tiene una solución y el siempre superar nuestras propias metas. Gracias mami, gracias papi por su apoyo incondicional, los amo con todo mi corazón.

A mis hermosos hermanos Esteban Santiago Tapia y Laura Stefany Santiago Tapia, por su apoyo que siempre me han brindado, esa complicidad que hemos tenido desde niños para protegernos y ayudarnos entre nosotros, gracias por siempre escucharme y chiquearme los amo infinitamente mis pechochos.

A mis tías Gaudencia Santiago Hernández y Teresa Santiago Hernández, por el gran apoyo que me han brindado, así como la motivación por seguir adelante y superarme como profesional, gracias tía gau, gracias tía tere por siempre preocuparse por mí y mis hermanos, gracias por consentirnos y chiquearnos, las quiero mucho.

A Dany mi gran amigo de años, gracias por tu apoyo, compañía y cuidados que me brindaste durante esta etapa de mi vida, te admiro mucho por tu espíritu de lucha y perseverancia, tengo la confianza que te irá muy bien y cumplirás todas las metas que te propongas, te quiero dany.

A Jere mi compañera y gran amiga, gracias por brindarme tu amistad y apoyo durante este tiempo, no olvidaré las grandes pláticas que teníamos donde hacíamos y deshacíamos el mundo, los chismes a la hora de comer, las risas y las fiestas que nunca faltaron, te deseo éxito en tus futuros proyectos, te quiero jere.

A Sosa mi compañero y amigo, gracias por tu compañía y todo el apoyo que me brindaste durante este tiempo, recordaré siempre las peleas tan divertidas que teníamos ya que siempre expresábamos puntos de vista diferentes. Tú siempre de tan buen humor que me contagiabas, te deseo éxito en tus futuros proyectos, te quiero sosa.

A la Dra. Blanquita mi co-asesora, muchas gracias por todo el conocimiento que me transmitió, usted es una de las mujeres que más admiro, por su forma de tratar, enseñar y motivar a sus alumnos un docente así vale mucho y hace la gran la diferencia en la formación de futuros profesionistas. Como investigadora, admiro su capacidad de lucha por incursionar en nuevos retos y adquirir nuevos conocimientos.

Al Dr. Julián mi asesor de tesis, gracias por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, es un acto que valoraré siempre ya que gracias a usted encontré el área de interés donde quiero seguir formándome para llegar hacer un investigador como usted. Gracias por la confianza depositada en mí y espero no haberle fallado, gracias por enseñarme los valores con lo que debe de contar un investigador, como una ética profesional sólida, hablar con la verdad siempre, no perder el objetivo principal de la investigación, abrir nuevos caminos y siempre estar dispuesto a experimentar nuevas cosas, así como llevar acabo colaboraciones con otros centros de trabajo.

Contenido

Resumen	9
Abstract	10
1 Introducción	11
1.1 Predicciones de la demanda de alimentos	11
1.2 Pérdidas de frutas en América Latina y México	11
1.3 Enfermedades de los cultivos en México y su combate	14
1.4 Fungicidas químicos	16
1.5 Resistencia a los fungicidas	19
1.6 Repercusiones del uso de plaguicidas en México	20
1.7 Biofungicida	21
1.8 RNA en la interacción planta-patógeno	22
1.9 Tecnología HIGS	23
1.10 Tecnología fúngica SIGS	26
2 Justificación	29
3 Hipótesis	30
4 Objetivos	31
4.1 General	31
4.2 Particulares	31
5 Materiales y métodos	32
5.1 Aislamiento de los hongos patógenos	32
5.2 Microscopía	32
5.3 Identificación molecular	34
5.3.1 Extracción de DNA por medio del método REExtract-XNAP	34
5.3.2 Extracción de DNA por medio del método fenol-cloroformo	35
5.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa PCR con la enzima Platinum Taq DNA	

Polymerase, utilizando DNA extraído con el método REExtract-XNAP	36
5.3.4 Limpieza de productos de PCR por medio del método ExoSAP-IT de las muestras de DNA extraído con el método REExtract-XNAP	39
5.3.5 Reacción en cadena de la polimerasa PCR con la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase utilizando DNA extraído por el método fenol-cloroformo	39
5.4 Electroforesis con buffer TBE.....	40
5.5 Electroforesis con buffer TAE.....	41
5.6 Limpieza de productos de PCR por medio del método GeneJET de las muestras de DNA extraído con el método fenol-cloroformo.....	41
5.7 Secuenciación Sanger en ambas direcciones (5´-3´ y 3´-5´) partiendo de DNA extraído con el método REExtract-XNAP	42
5.8 Secuenciación Sanger una dirección (5´-3´) partiendo de DNA extraído por el método fenol-cloroformo	42
5.9 Edición de las secuencias.....	42
5.10 Construcción de árboles filogenéticos.....	43
5.11 Identificación de genes DCL1 y DCL2 en hongos identificados y diseño de sRNAs	43
5.12 Diseño de los sRNAs	44
5.12.1 Diseño de oligonucleótidos	44
5.12.2 Amplificación de DNA genómico de <i>P. digitatum</i>	45
5.12.3 Amplificación de la secuencia Dicer en <i>P. digitatum</i>	45
5.12.4 Purificación de producto de PCR por el kit MinElute PCR Purification de la amplificación DCL1 y DCL2 de <i>P. digitatum</i>	48
5.12.5 Adaptación de oligonucleótidos complementarios y promotores T7	48
5.12.6 Ligación del constructo (ds-RNA) en el vector pGEM-T Easy	50
5.12.7 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> One Shot Top10.....	51
5.12.8 Extracción del plásmido por lisis alcalina	52
5.12.9 Digestión con la enzima de restricción EcoRI.....	52
5.12.10 Purificación del plásmido por AMPure XP	52

5.12.11 Secuenciación del plásmido por método Sanger en ambas direcciones (5'-3' y 3'-5')	53
6 Resultados y discusión	53
6.1 Aislamiento de hongos patógenos de frutas.....	53
6.2 Microscopía	53
6.3 Amplificación del gen 18S a partir de ADN extraído con REExtract-XNAP	54
6.3.1 Extracción de DNA y amplificación de la zona ITS	54
6.4 Amplificación del gen 18S a partir de DNA extraído con fenol-cloroformo.....	62
6.4.1 Extracción de DNA y amplificación de la zona ITS	62
6.5 Análisis filogenético	65
6.6 Genes blanco DCL1 y DCL2 del hongo	71
6.7 Diseño de los sRNAs	74
7 Conclusiones	86
8 Perspectivas	87
9 Bibliografía.....	88
Anexo 1 Preparación de Reactivos y Soluciones	95
Anexo 2 Morfología macroscópica y microscópica de los hongos aislados	100
Anexo 3 Árboles filogenéticos	131
Anexo 4 Secuencia de la proteína DCL en aminoácidos y nucleótidos las regiones en amarillo son las zonas potenciales para el diseño de los sRNAs	149
Anexo 5 Secuencias de las muestras LB6, LB15, LB20, del plásmido pGEM-T Easy utilizando los promotores M13 y SP6	164

Resumen

México es el primer exportador de frutas tropicales, con un valor en 2016 de \$2,480 millones de dólares o 27% del mercado mundial. No obstante, las pérdidas por hongos fitopatógenos ascienden a un 30% con la consecuencia de que los agroquímicos más producidos en México son los fungicidas con un valor de importación de 186 millones de dólares anualmente. En la actualidad, hay fungicidas que consisten en pequeñas moléculas de ácido ribonucleico (20-30 bases; sRNAs) con complementariedad de bases y capacidad de silenciar genes esenciales en el hongo, por ejemplo, los mensajeros de las proteínas DICER, claves en la regulación génica. Los sRNAs se han probado mediante silenciamiento génico por aspersión (SIGS), donde se asperjan sobre la planta para inhibir al hongo. Dado que no se ha probado esta tecnología contra hongos fitopatógenos de frutas tropicales, en este trabajo se diseñó una estrategia microbiológica y molecular para el diseño de construcciones de DNA aplicables en SIGS. Para lo anterior, se asilaron 19 hongos de diferentes patosistemas de frutas tropicales entre las que destacó *Penicillium digitatum* aislado de naranja. Con la información de género y especie, se observó que los DICERs de *P. digitatum* tienen una longitud de 3000-5000 bases. Estas secuencias se alinearon con los genes DICER de naranja y se identificaron dos secciones que poseen baja identidad mutua en el brazo conector entre el dominio de Helicase ATP-binding y Helicase C-terminal y entre el dominio de RBD y el de RNAsa III que se usaron para el diseño de los sRNAs en una quimera concatenada. El trabajo realizado hizo disponible una colección de hongos patógenos de frutas, su identificación molecular, la caracterización de información molecular disponible de cada uno de ellos y la obtención de construcciones de sRNAs para la posible fitoprotección de la naranja ante *P. digitatum*.

Abstract

Mexico is the main exporter of tropical fruits, with a value in 2016 of MDD \$2,480 or 27% of the world market. However, losses from phytopathogenic fungi amount up to 30% with the consequence that the most produced agrochemicals in Mexico are fungicides with an import value of \$186 million annually. Currently, there are fungicides consisting of small molecules of ribonucleic acid (20-30 bases; sRNAs) with complementarity of bases that are able to silence essential genes in the fungi, for example, the messengers of DICER proteins that are essential for gene regulation. sRNAs have been tested in spray-induced gene silencing (SIGS), where they are sprayed on the plant to inhibit the fungi. Since this technology has not been tested against phytopathogenic fungi of tropical fruits, this research was designed as a microbiological and molecular strategy for the design of DNA constructions applicable in SIGS. The results included the isolation of 19 fungi from different pathosystems of tropical fruits. Among them *Penicillium digitatum* isolated from orange stood out. With the information of genus and species, it was observed that the fungal DICERs of *P. digitatum* have a length of 3000-5000 bases. These sequences were aligned with the orange DICER genes and two sections were identified that have low mutual identity in the connector arm between the Helicase ATP-binding domain and C-terminal Helicase and between the ds RBD domain and the RNAsa III that were used for the design of sRNAs in a concatenated chimera. This research made available a collection of pathogenic fruit fungi, their molecular identification, the characterization of available molecular information from each of them and sRNA constructions for the possible phytoprotection of orange against *P. digitatum*.

1 Introducción

1.1 Predicciones de la demanda de alimentos

El crecimiento demográfico es un concepto que desde mediados del siglo XX ha adquirido año tras año una relevancia importante para el ser humano; estudios reportados por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), predicen que para el año 2050 aumentará la población mundial a 9700 millones, lo que significa una mayor extensión superficial alrededor del mundo para la producción de alimentos, para satisfacer la demanda de comida. A raíz de dicha predicción, la ONU estimó que el mundo necesitará producir un 50% más de alimento para poder abastecer en su totalidad a la población dentro de 35 años (ONU, 2015).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) en los últimos 50 años la agricultura ha obtenido mejores rendimientos en la producción de alimentos gracias a la combinación de diversas áreas del conocimiento como la genética, la agronomía y a partir de los años 90 la biotecnología. No obstante lo anterior, en la actualidad se necesitan nuevas tecnologías para poder lograr maximizar la producción de alimentos y/o nuevas herramientas para alargar la vida funcional de los productos de consumo. La combinación de estrategias tiene como objetivo una disminución en las mermas que se sufren en la actualidad y cumplir con las necesidades poblacionales de nutrición.

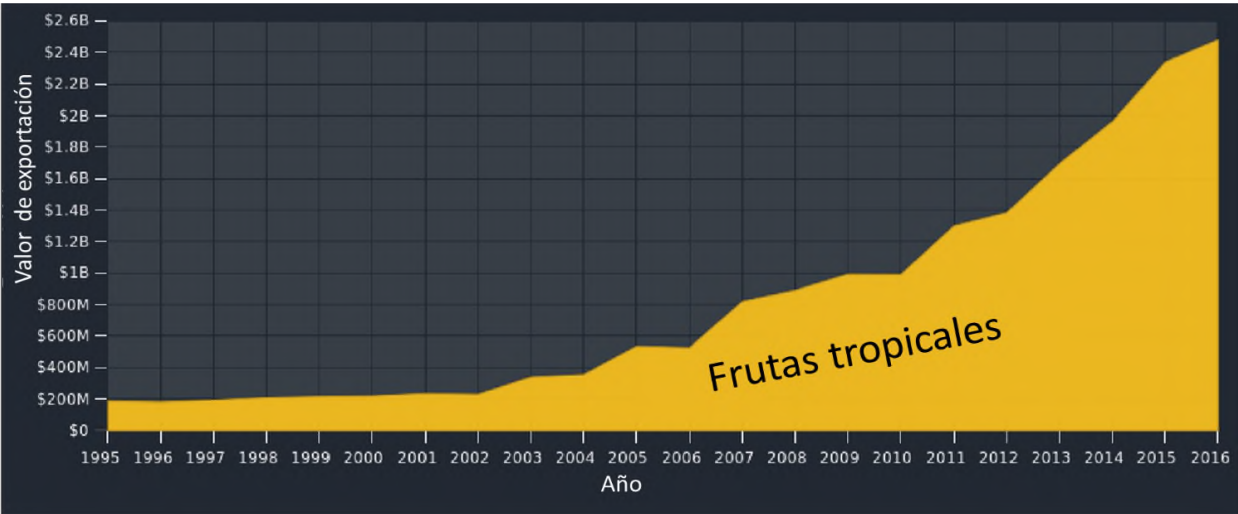
1.2 Pérdidas de frutas en América Latina y México

En el caso de América Latina, en 2016 la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y la FAO dieron a conocer que los niveles de mermas alcanzan 127 millones de toneladas de alimentos al año, lo que equivale a un desperdicio de 223 kilogramos por habitante en la región (SAGARPA, FAO, 2016).

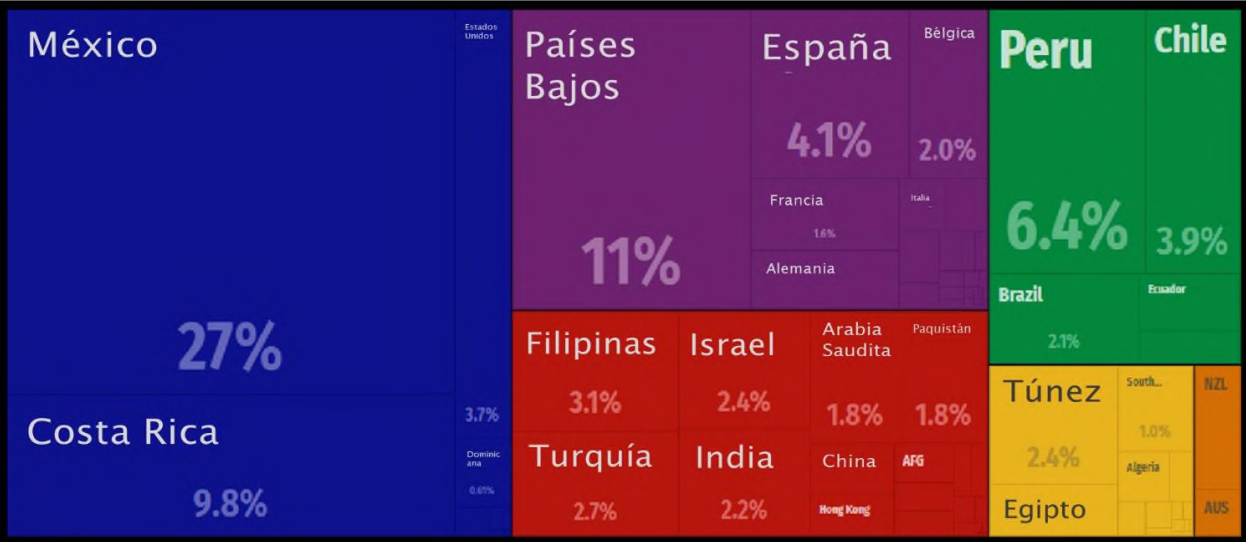
México posee tres lugares de importancia en el mundo, la 14ª nación más grande, con una superficie territorial de 1 millón 964 mil 375 km², es la 12ª nación más poblada, con 121.6 millones de habitantes y es la 13ª nación en producción mundial de cultivos

agrícolas; con lo cual 26.9 millones de hectáreas están destinadas para la agricultura obteniendo una producción anual de 246.2 millones de toneladas (SAGARPA, 2016). De tal forma, México tiene un gran potencial en la producción de alimentos y a su vez el reto que presenta ser uno de los países más poblados de Latinoamérica.

En México se producen y exportan frutas tropicales, uno de los principales alimentos de América y el mundo. Desde el año 2010 y hasta la fecha (Grafica 1), se ha presentado un incremento significativo en su producción posicionando a México como el primer exportador internacional de frutas tropicales, con el 27% de la producción anual y un valor de exportación de \$2.48 Billones de dólares americanos (Grafica 2) (OEC, 2016).



Gráfica 1 Valor de Exportación de frutas tropicales en México expresado en Dólares Americanos (Modificada de OEC, 2016).



Gráfica 2 Comparación de las proporciones en la producción de frutos tropicales en el mundo (Modificada de OEC, 2016).

El estado de Oaxaca tiene una producción agrícola importante. En su territorio se cosechan diversos productos agrícolas como son materias primas, cereales, semillas, legumbres y frutas, siendo estas últimas las que presentan una gran susceptibilidad a los hongos fitopatógenos que se encuentran en el ambiente. Esto último se traduce en una vida de anaquel menor en relación a los demás productos y en un problema muy importante para los productores ya que significa un tiempo limitado para el transporte y acomodo de las frutas en el mercado nacional o internacional. A continuación se presentan las principales frutas tropicales producidas, además de su volumen de producción al año la cual está directamente relacionada con el lugar que ocupa en la producción nacional con respecto a cada fruta, destacando su importancia económica para la nación.

Tabla 1 Producción anual de frutas tropicales y el lugar obtenido del estado de Oaxaca en la producción nacional. (Elaborada con información del Atlas Agroalimentario 2018)

Frutas Tropicales	Producción Anual 2017 (Toneladas)	Posición en la Producción Nacional
Papaya	288,160	1°
Mango	148,401	6°
Piña	130,437	2°
Plátano	66,376	8°
Naranja	54,438	10°
Melón	16,882	8°

El municipio de San Juan Bautista Tuxtepec perteneciente al distrito 6 Tuxtepec de la región del Papaloapan, es el segundo más poblado del estado de Oaxaca con un total de 162,511 de habitantes (INEGI, 2015), y en él se cosechan diversas frutas tropicales de suma importancia para el estado como son papaya, mango, plátano, piña, naranja y melón. En la Tabla 2 se enlistan las frutas tropicales de mayor importancia y la participación del distrito de Tuxtepec en la producción estatal.

Tabla 2 Frutas Producidas en el distrito de Tuxtepec, Oaxaca. (Modificada de SIAP, 2017)

Fruta Tropicales	Producción Anual 2017 (Toneladas)	Porcentaje de producción del total de Oaxaca
Piña	129,955.00	99.6%
Plátano	42,615.19	64.2%
Naranja	4,918.65	9.0%
Mango	2,258.00	1.5%
Papaya	612.00	0.2%

1.3 Enfermedades de los cultivos en México y su combate

La agricultura es una actividad desarrollada por el ser humano que permitió su establecimiento en comunidades fijas, y que con el paso del tiempo ha adquirido una importancia relevante debido a la creciente demanda de alimentos que se tiene en la actualidad. La agricultura se beneficia de fenómenos de adaptación logrados por dos tipos de selección. Primero, la selección natural a factores ambientales como inundaciones, sequías, heladas, competición por nutrientes y enfermedades causadas por diversos agentes patógenos. Segundo, la selección inducida por el ser humano resultando en la domesticación de las especies vegetales consumibles por el humano, que se llevó acabo de forma independiente pero casi paralela en diferentes áreas geográficas y con periodos de tiempo relativamente largos (Khoury *et al.*, 2016).

Actualmente se utilizan conocimientos de las áreas de genética, taxonomía y biología molecular con el propósito de mejorar esta selección artificial, para hacer que las especies vegetales de mayor importancia adquieran resistencia a cambios climáticos extremos, sobrevivencia a diversos patógenos como son las plagas y/o enfermedades y cambios en sus ciclos de vida para lograr una producción acelerada, por mencionar algunas de la mejoras que se realizan en el mundo.

En el caso de agentes patógenos, las cosechas sufren diversos ataques por parte de bacterias, virus, insectos y hongos, lo que significa un número significativo de mermas en los alimentos disponibles. Los hongos fitopatógenos son causantes de diversas enfermedades y/o padecimientos en los cultivos. Con frecuencia ocasionan daño económicos sustanciales en la agricultura de una nación, un par de ejemplos son los hongos *Botrytis cinerea* (Williamson *et al.*, 2007) y *Verticillium dahliae* (Klosterman *et al.*, 2009) que causan enfermedades como el moho gris y la verticilosis, respectivamente (Figura 1), repercutiendo en la pérdida de diversos cultivos y ocasionando pérdidas económicas.

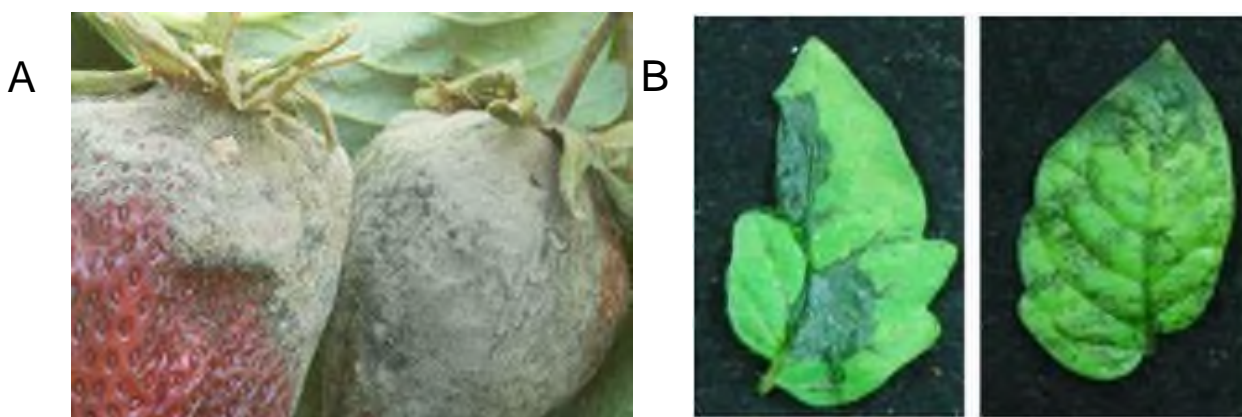
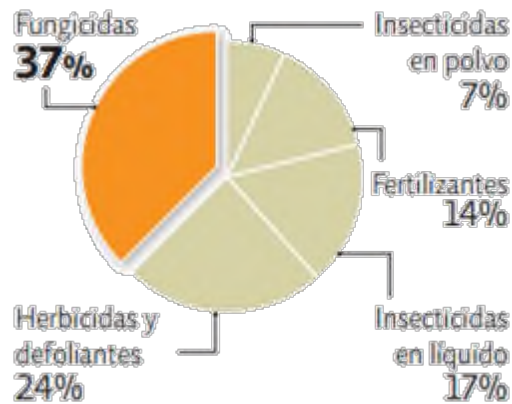


Figura 1 A) Enfermedad del Moho Gris por el hongo *Botrytis cinerea*, en cultivos de Fresas (*Fragaria ananassa*) (Tomada de Koike, 2016), B) Enfermedad de Verticilosis por el hongo *Verticillium dahliae*, en hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Tomada de Weiberg *et al.*, 2013)

Para el combate de las enfermedades se requiere la síntesis y uso de agroquímicos con la finalidad de controlar las pérdidas. En 2013, la Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria (AMIFAC) reportó que se pierden entre el 20% y 40% de la producción de alimentos a causa de plagas y enfermedades en los cultivos; y de manera más específica la pérdida por infección de hongos es aproximadamente del 30% de la producción en México (AMIFAC, 2013). Ese mismo año la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios COFEPRIS reportó que el valor de la producción de plaguicidas en México creció un 9% entre los años 2007 y 2011 (COFEPRIS, 2013). Los principales plaguicidas y su porcentaje de producción en México son los que se muestran en la Gráfica 3 (COFEPRIS, 2013).



Gráfica 3 Proporción de los principales agroquímicos producidos en México, (COFEPRIS, 2013).

La FAO dio a conocer las cantidades usadas en México de agroquímicos en diferentes años, y se registró que se usaron en promedio 4.55 toneladas de plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) por cada 1000 hectáreas entre el año 2009 y 2010. Tan sólo en 2013 se emplearon 37,455 toneladas de insecticidas, 31,195 toneladas de herbicidas y 42,223 toneladas de fungicidas (FAO, 2013). De tal forma, los fungicidas son el agroquímico con mayor demanda en la República Mexicana. Las estadísticas actuales muestran que México exporta un 8.6% del total mundial de producción de fungicidas, con un valor de exportación de \$53.7 millones de dólares americanos (Gráfica 4); en contraste, se tiene una importación del 24% con un valor de \$186 millones de dólares (Gráfica 5) (OEC, 2016). Se puede concluir que la necesidad (importación) de fungicidas en México triplica la salida (exportación) de los mismos en el país, lo que significa un importante desequilibrio económico ante este producto. Una solución sería aumentar la producción de fungicidas en México para disminuir el gasto producido por la importación y así poder lograr un balance económico sobre este agroquímico.

1.4 Fungicidas químicos

Los plaguicidas son sustancias o mezcla de sustancias que se usan de manera intensiva para controlar plagas agrícolas e insectos vectores de enfermedades en humanos y en los animales, así como, para el control de insectos y ácaros que afectan la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y alimento para animales (FAO, 2014).

Un fungicida es un tipo de plaguicida que tiene el propósito de controlar enfermedades causadas por hongos patógenos al inhibir o eliminar al hongo que causa la enfermedad. El uso de fungicidas se requiere como control de la enfermedad durante el establecimiento del cultivo, para el incremento de la producción de un cultivo en la reducción de los daños por el hongo y para el aumento del período de almacenamiento de los productos cosechados. Los fungicidas se aplican en forma de polvos, gránulos, gas y de manera más común en forma líquida. La zona de aplicación abarca desde los suelos, semillas, raíces, tallos, follajes, perímetro de la planta y por último en los productos cosechados (McGrath, 2004).

Los fungicidas se pueden categorizar por sus diferentes características. Por ejemplo pueden ser de contacto o sistémicos de acuerdo a su movimiento en la planta. Los fungicidas de contacto también son llamados protectores, y deben ser aplicados antes de que se presente la enfermedad o al presentarse los síntomas iniciales. Al ser compuestos químicos simples y de modo de acción bioquímico, tienden a presentar un mayor riesgo a que los patógenos desarrollen resistencia. Los fungicidas sistémicos, también denominados penetrantes, son los que son absorbidos por la planta y pueden viajar por medio del sistema vascular. Los blancos bioquímicos de los fungicidas son diversos y están dirigidos contra los componentes de la membrana celular fúngica, la síntesis de proteínas, la transducción de señales, la respiración, la mitosis celular y la síntesis de ácidos nucleicos (Gan *et al.*, 2011). Sin embargo, los fungicidas también se dirigen a sitios de unión no específicos donde pueden afectar directamente a los organismos no objetivo.

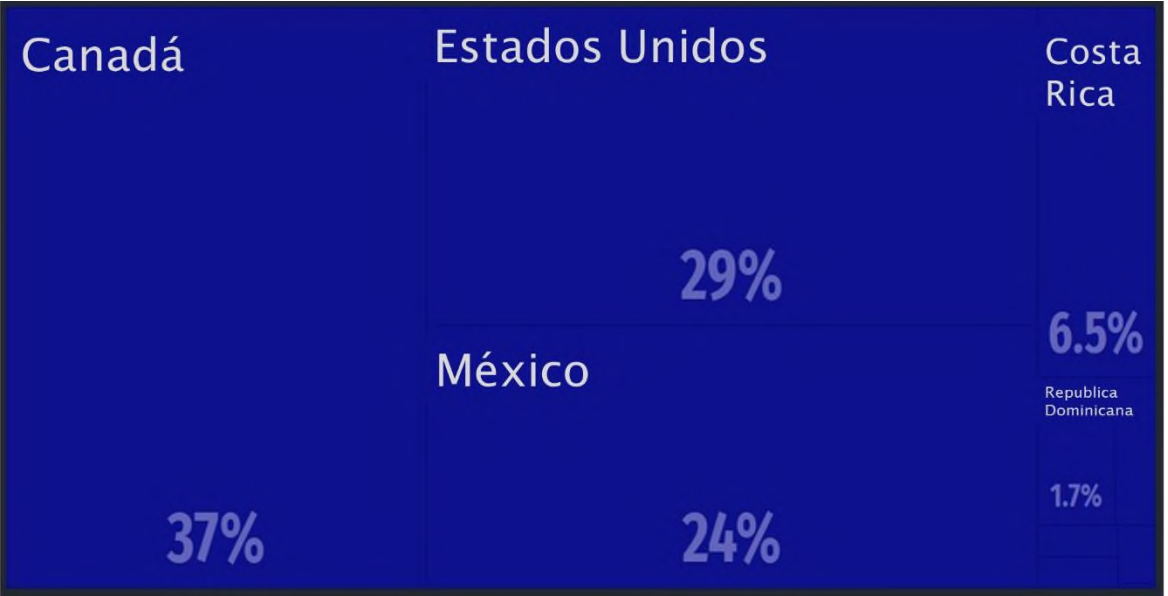
Los fungicidas requieren de repetidas aplicaciones debido al constante crecimiento de la planta y de la destrucción/remoción de su estructura por factores abióticos como lluvias y luz solar.

Muchos de los primeros fungicidas desarrollados fueron compuestos inorgánicos, a base de azufre o iones metálicos como el cobre, estaño, cadmio y mercurio, que son tóxicos para los hongos. En la actualidad los cúpricos y los sulfurados aún se utilizan ampliamente, aunque en su mayoría los fungicidas utilizados recientemente son compuestos orgánicos (McGrath, 2004).

La aplicación de fungicidas en productos cosechados es de especial manejo, ya que las enfermedades post-cosecha pueden ocurrir durante diferentes etapas, por ejemplo, durante su cosecha, su manejo en el campo, las operaciones de empaque, transporte, almacenamiento y su puesta en anaquel (Sivakumar, 2014).



Gráfica 4 Comparación de la proporción de exportación de fungicidas en América (Modificada de OEC, 2016).



Gráfica 5 Comparación de proporciones de importaciones de Fungicidas en América (Modificada de OEC, 2016).

1.5 Resistencia a los fungicidas

Como consecuencia del uso de fungicidas, los hongos han desarrollado mecanismos de resistencia. Los fungicidas químicos están diseñados para inactivar proteínas o enzimas producidas por estos hongos y así poder disminuir su capacidad de infección y desarrollo en la planta. Como resultado de esta actividad, los hongos se adaptan a través de mutaciones simples en sus genes y adquieren nueva capacidad de infectar, convirtiéndose en resistentes.

El desarrollo de resistencia a los fungicidas en un área de investigación muy importante pues los fungicidas químicos están diseñados para identificar proteínas o enzimas producidas por estos hongos y así poder erradicar la infección en la planta. Como resultado de esta actividad específica, los hongos pueden desarrollar una resistencia a ellos, debido a que una simple mutación en la ruta metabólica del hongo causa resistencia.

Según la FAO, la resistencia es una característica de fundamento genético que permite a un organismo sobrevivir a la exposición con una dosis de un plaguicida que normalmente podría resultar letal (FAO, 2014).

La resistencia al fungicida es el resultado de la modificación de un gen dominante en el hongo donde las sub-poblaciones del patógeno son muy sensibles o altamente resistentes al fungicida, esto se debe en la mayoría de los casos por la diseminación de los genes a través de las poblaciones del hongo, debido a un proceso de selección provocado por el uso repetido del fungicida. Por otro lado la resistencia también puede entenderse como una pérdida completa del control de la enfermedad, aún si se utilizan dosis más altas o aplicaciones de fungicidas más frecuentes. La mayoría de los fungicidas que hoy en día se producen tienen un solo modo de acción porque de este modo se pretende disminuir su impacto ambiental negativo, como es la protección a aquellos organismos para los cuales no está dirigido la acción del fungicida. Los hongos que son resistentes a un fungicida, con frecuencia son resistentes a otros fungicidas relacionados, aun cuando no han sido expuestos a estos fungicidas, ya que poseen el mismo modo de acción (McGrath, 2004).

De tal forma, se buscan mecanismos de acción de nueva generación en los que se cambie el esquema de acción bioquímico simple tradicional de un compuesto una enzima, y se desarrollen fungicidas con múltiples sitios de acción pero que aún sean específicos para controlar al hongo sin afectar a la planta o al consumidor final. Así, un mecanismo que cumple con estas características puede ser uno que se base en la especificidad de bases nucleotídicas (apareamiento de bases) y no en el bloqueo de un sitio activo (Wang *et al.*, 2016).

1.6 Repercusiones del uso de plaguicidas en México

Como ya se hizo mención, los fungicidas se incluyen en el grupo de los plaguicidas. En México la elaboración, utilización, monitoreo y regulación de fungicidas es un tanto laxa, por lo cual no se tiene un conocimiento específico del tipo de daños que ocasiona al ambiente y al ser humano. Debido a esto se abordara de una manera general los daños reportados en México, causados por plaguicidas.

El constante uso de plaguicidas causa daños colaterales a los cultivos como la destrucción de la fauna y flora benéfica, contaminación de los suelos, contaminación de mantos acuíferos, contaminación del aire, lesiones en cultivos rotativos por residuos de fungicidas que permanecieron en el campo, daño en los cultivos debido a altas dosis y tiempos de aplicación incorrectos, aplicación de fungicidas en condiciones ambientales desfavorables y la combinación con algún otro plaguicida. Cabe mencionar que dichos productos son también un peligro para el humano, pues las personas responsables de la aplicación de los fungicidas en el campo se encuentran expuestas a sus componentes presentando diversos problemas de salud (Damalas & Eleftherohorinos, 2011). Actualmente, se busca reducir el uso de fungicidas químicos con la creación de nuevos fungicidas usando tecnologías sustentables y amigables con el ambiente y el ser humano.

En la República Mexicana no se cuenta con un censo de los plaguicidas mayormente utilizados, sólo se tiene el dato que un gran número de compuestos que actualmente se utilizan fueron desarrollados hace más de 70 años, como ejemplo están los carbamatos y los organofosforados (García *et al.*, 2018).

La Dirección General de Epidemiología DGE reportó un aproximado de 4,000 casos de intoxicaciones por plaguicidas en 2016 (DGE, 2017). Análisis realizados a suelos de Chiapas, Veracruz y Tabasco mostraron concentraciones extremadamente altas lo que representan un riesgo potencial para los habitantes, ocasionando alteraciones hormonales, alteraciones cromosómicas, síndromes genéticos, perturbaciones en mujeres embarazadas, así como también afectaciones al ganado donde los subproductos obtenidos de ellos como son la leche y carne contienen residuos de plaguicidas, al igual que en algunos casos las cosechas donde fueron utilizados los plaguicidas también pueden contar residuos de éstos (García *et al.*, 2018).

Así, se requiere investigar moléculas con mayor especificidad de organismo blanco, menores dosis, biodegradables y con tiempos de vida útil medios. Las investigaciones recientes indican que los ácidos nucleicos pueden ser moléculas que cumplan con estas condiciones (Huang *et al.* 2019).

1.7 Biofungicida

En un principio la clasificación general de los fungicidas inorgánicos y orgánicos. Actualmente existe un grupo nuevo denominados biofungicidas que son un producto natural microbiano o bioquímico.

Los biofungicidas se dividen en tres tipos que son del tipo microbiano, genético y bioquímico. Los microbianos presentan un ingrediente activo vivo que funciona como un agente de control biológico, es decir, un organismo que tiene la capacidad de atacar o competir contra un patógeno. Los genéticos son incorporados en el genoma de la planta de forma permanente y son definidos por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 2016) como "sustancias con efecto plaguicida producidas por la planta, a partir de material genético que ha sido incorporado a ella". Finalmente, los bioquímicos están compuestos por sustancias que ocurren en forma natural. Dichos productos bioquímicos pueden ser el resultado de alguna fermentación, pueden afectar directamente a los organismos que son causantes de enfermedades o elicitores que estimulan la resistencia sistémica adquirida de la planta (SAR), es decir, reforzando los mecanismos de defensa de la planta ante el patógeno. Los bioplaguicidas usualmente presentan un espectro de acción reducido, tienen una baja toxicidad, se degradan con facilidad y por tal, se les

considera que tienen un bajo impacto negativo en el medio ambiente (McGrath, 2004).

Para el caso de los compuestos bioquímicos, se piensa tradicionalmente en hormonas vegetales, o extractos de metabolitos secundarios. No obstante, en años recientes, se han descubierto mecanismos bioquímicos que involucran señalizaciones moleculares a través de ácidos nucleicos y que fortalecen la resistencia vegetal a los hongos. A continuación, se revisarán estos mecanismos y su gran potencial para desarrollar fungicidas que fortalezcan las capacidades de fitoprotección.

1.8 RNA en la interacción planta-patógeno

Los RNAs de interferencia (RNAi) son moléculas de RNA no codificantes de un rango de 20 a 40 nucleótidos (nt) de largo, que se encuentran presentes en la mayoría de los organismos eucariotas y regulan de una manera específica la expresión génica, ya sea transcripcional o postranscripcionalmente. Los RNAi se pueden dividir en dos grupos, microRNA (miRNA) y RNA pequeño (sRNA). Los sRNAs regulan procesos biológicos en las plantas, como son, el desarrollo, el metabolismo, el mantenimiento e integridad del genoma, las respuestas al estrés abiótico y la inmunidad contra los patógenos. Este último, acrecenta la importancia de los sRNAs en la regulación de las interacciones de los patógenos con las plantas. Los sRNAs derivan de precursores de RNA bicatenario (dsRNA) perfectamente emparejados (Katiyar-Agarwal & Jin, 2010).

Las respuestas de defensa de las plantas contra los patógenos están mediadas por la activación y represión de múltiples genes, por ejemplo, las proteínas quinasas (Weiberg *et al.*, 2013). Los sRNAs endógenos del huésped son esenciales en este proceso de reprogramación de la expresión génica. En las plantas, los ataques de patógenos desencadenan múltiples respuestas inmunes del huésped. Los patógenos suministran efectores a las células huésped para suprimir la inmunidad del huésped, y las plantas han desarrollado proteínas de resistencia para reconocer efectores y provocar una resistencia robusta, por ejemplo, *Botrytis cinerea* es un patógeno que codifica dos proteínas DCL (Dicer) que producen a los sRNAs efectores contra la planta (huésped) que al llegar a la célula vegetal, se translocan y se cargan en la proteína Argonauta (AGO) de la planta para comenzar con la degradación de los RNA mensajeros (RNAm) de genes de defensa. De esta manera, se suprime la inmunidad vegetal y puede iniciar la infección (Figura 2;

Weiberg *et al.*, 2014).

La supresión no sólo ocurre en el huésped, en el patógeno pueden suceder eventos de inhibición postranscripcional provocados por las plantas. A estos procesos se les denomina silenciamiento génico postranscripcional (Nunes *et al.*, 2012). Los sRNAs producidos por el huésped se translocan en el patógeno y suprimen los RNAm de virulencia del mismo, llegando a la conclusión que se tiene un tráfico continuo de sRNAs entre diferentes reinos (Weiberg *et al.*, 2015). En biotecnología, la observación de estos fenómenos naturales, ha servido de base para el desarrollo de tecnologías de fitoprotección que se detallan en las siguientes secciones.

1.9 Tecnología HIGS

Una de las tecnologías fúngicas basadas en ácidos nucleicos es el silenciamiento génico inducido por el huésped o HIGS (*host-induced gene silencing* por sus siglas en inglés, Wang *et al.* 2016). Este método consiste en la utilización de sRNAs que son RNA reguladores cortos no codificantes, que silencian genes a través de una complementariedad de bases adecuada.

Los sRNAs se generan a partir de dsRNA o RNA monocatenario con estructuras secundarias de horquilla, también llamadas de horquilla (harpin), mediante las enzimas ribonucleasas de tipo RNasa III, conocidas como Dicer (DCL). De forma general Dicer es la primera proteína en participar y es la encargada de reconocer al RNAm y procesar la horquilla que presenta en su estructura como se muestra la Figura 3A, dicha horquilla es transportada al citoplasma donde las proteínas RISC y AGO producirán sRNAs con la capacidad de silenciar RNAm específicos y al mismo tiempo, reprimir su traducción en la célula (Nunes *et al.*, 2012).

De tal manera, si se logra modificar a este mecanismo natural de regulación de RNA para que no regule genes endógenos de la planta, sino genes de un patógeno, se puede generar una tecnología de fitoprotección. Esta posibilidad se abrió con el advenimiento de las técnicas de transformación genética vegetales y la secuenciación de los genomas fúngicos.

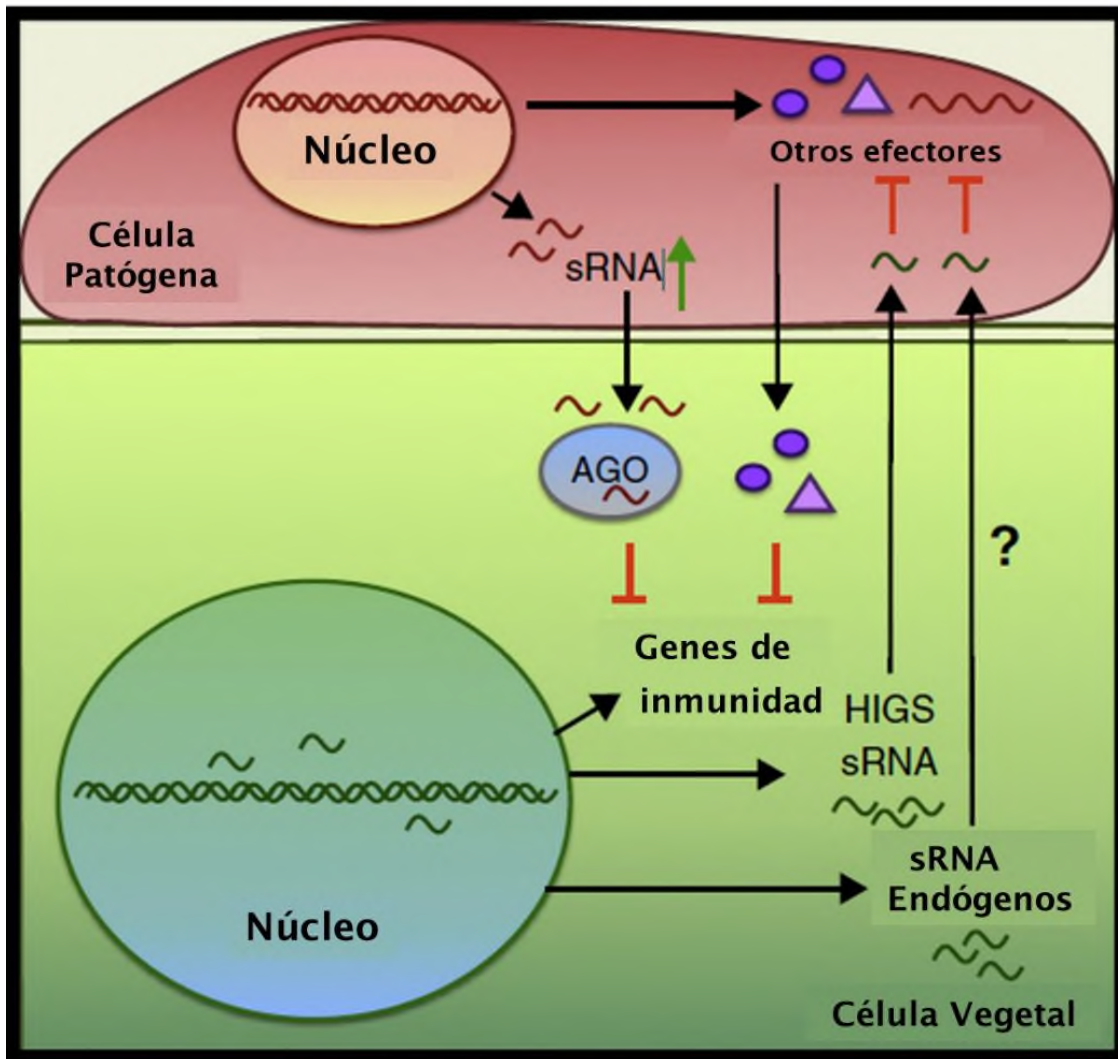


Figura 2 Interacción de los sRNA endógenos del huésped como respuesta al ataque por los sRNA del patógeno (Modificada de Weiberg & Jin 2015)

En el método HIGS, las plantas se transforman genéticamente con genes artificiales capaces de generar sRNAs que se procesan por Dicer y se cargan en las proteínas AGO para silenciar genes blanco del hongo mediante la interferencia del RNAi como se observa en la Figura 3B (Nunes *et al.*, 2012).

Se tiene el conocimiento del tráfico de sRNAs dentro del patógeno como en el huésped, lo que aumenta su efectividad (Figura 3). En el método HIGS, el desarrollo de resistencia del patógeno es baja pues el mecanismo de acción se basa en la complementariedad de decenas de bases, por lo que el hongo tendría que acumular decenas de mutaciones en una sola zona de su genoma para hacerse tolerante.

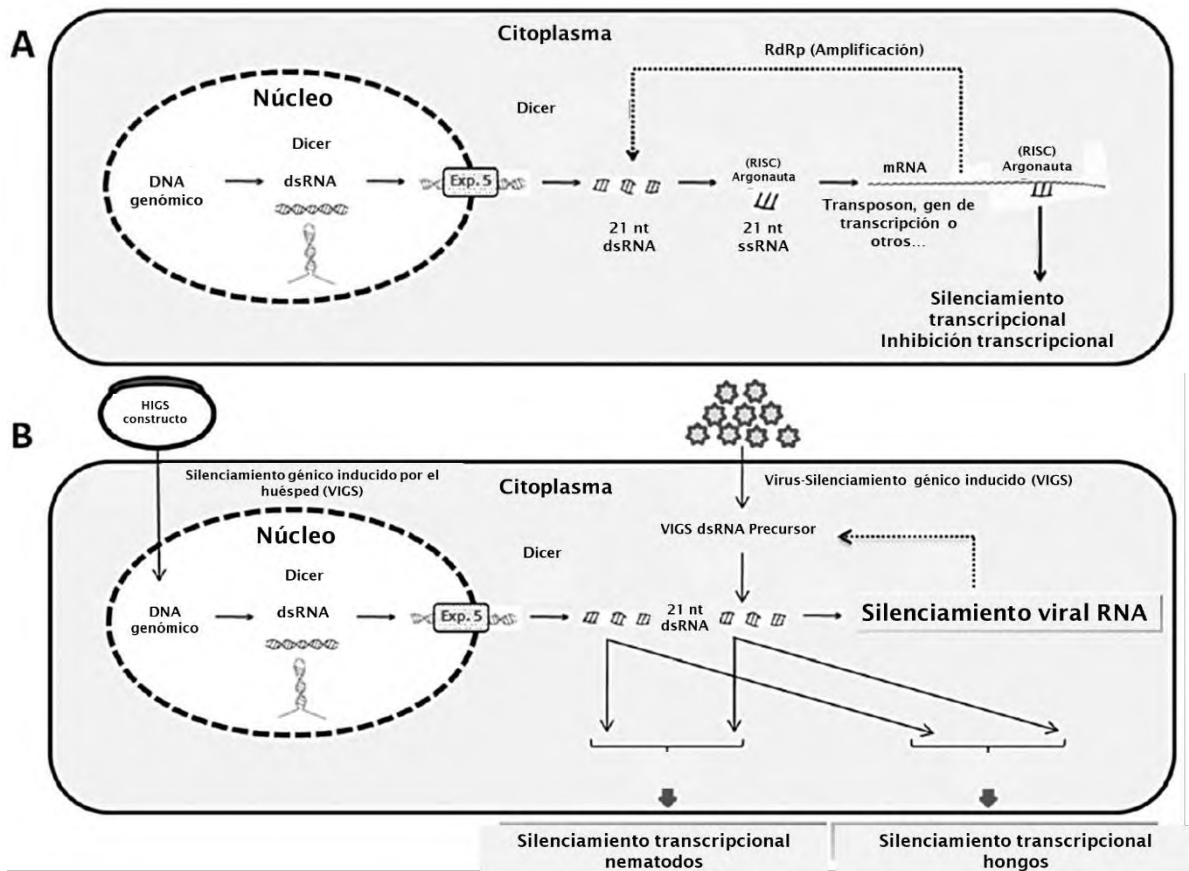


Figura 3 A) Regulación post-transcripcional, B) Silenciamiento Inducido por el Huésped (Modificada de Nunes *et al.*, 2012)

En los últimos años, se ha descubierto que las moléculas del RNA se encuentran en constante movimiento dentro de los organismos, y se han descrito numerosos casos de silenciamiento por sRNAs que viajan entre diferentes organismos. Dichos organismos pueden ser de la misma especie o de diferentes especies, por ejemplo, entre plantas (*Arabidopsis thaliana*) infectadas por hongos patógenos (*B. cinerea*; Figura 4A), humanos (*Homo sapiens*) ante el parásito causante de la malaria (*P. falciparum*, Figura 4B) y del parásito causante de mal de chagas (*T. cruzi*, Figura 4D), de bacterias (*E. coli*) contra nematodos (*C. elegans*, Figura 4C) y de plantas a hongos patógenos (Figura 4E). Como se ilustra en la Figura 4, el método HIGS para cada uno de los casos, se explota el efecto silenciador de las señales de sRNAs en los organismos con los que interactúa e implica la expresión del huésped como respuesta a la maquinaria generadora de sRNAs dirigidos contra genes en patógenos asociados, parásitos o simbiontes (Knip *et al.*, 2014).

No obstante, una desventaja de esta tecnología es que se debe desarrollar una planta transgénica específica para cada genotipo de hongo. Lo anterior es difícil pues las infecciones fúngicas raramente son causadas por un sólo hongo, y además es difícil incorporar más de un tipo de resistencia por planta.

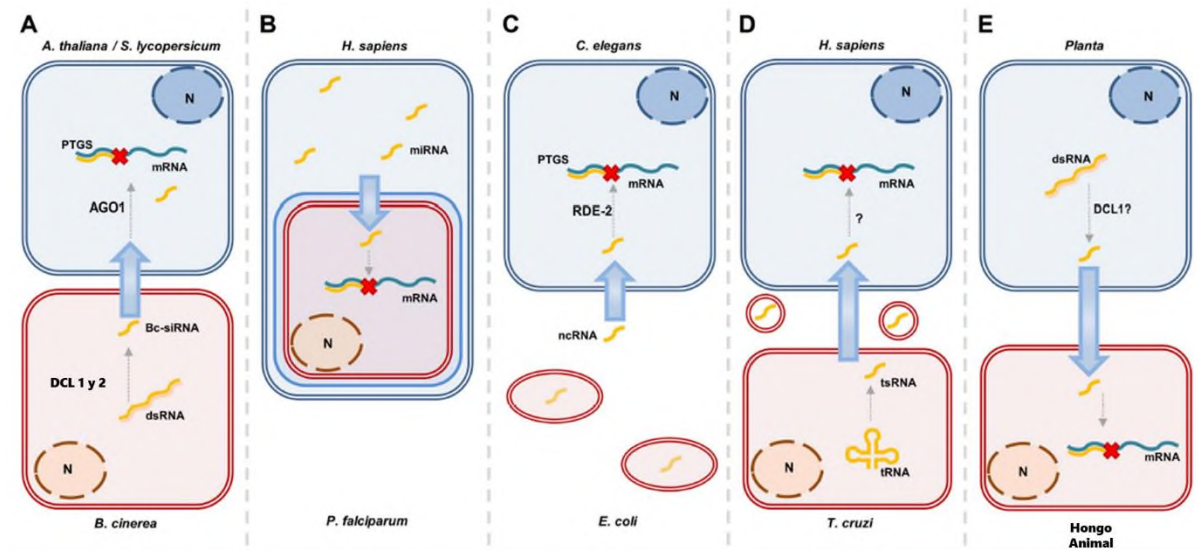


Figura 4 Esquema de acción del silenciamiento inducido por el huésped HIGS (Modificada de Knip *et al.*, 2014)

1.10 Tecnología fúngica SIGS

Estudios recientes revelaron que los sRNAs pueden moverse entre un huésped y un patógeno, llevándose a cabo una interacción entre dos reinos distintos lo que acuñó el término intercambio de RNAi entre reinos (“cross-kingdom RNAi”; Wang *et al.*, 2017). La movilidad de los sRNAs implica que algunos patógenos de plantas y animales sean capaces de liberar sRNAs en las células del huésped para modular la respuesta inmune del huésped y así aumentar su patogenicidad. Sin embargo, al mismo tiempo las células del huésped también liberan sRNAs contra el patógeno para poder contrarrestar y/o reducir la virulencia del patógeno, como se esquematiza en la Figura 5.

Estos descubrimientos abren la posibilidad de utilizar sRNAs sintéticos aplicados desde el exterior de la planta para fortalecer su respuesta en contra del hongo. Lo anterior elimina la necesidad de usar eventos de transgénesis para la fitoprotección de la planta y permite hacer formulaciones dirigidas contra familias de hongos.

Esta idea implica desarrollar un biofungicida a partir de sRNAs sintéticos para reforzar la acción de las células del huésped y reducir la virulencia del patógeno. Esta nueva generación de biofungicidas se llaman fungicidas de nueva generación basados en RNA (Huang *et al.*, 2019).

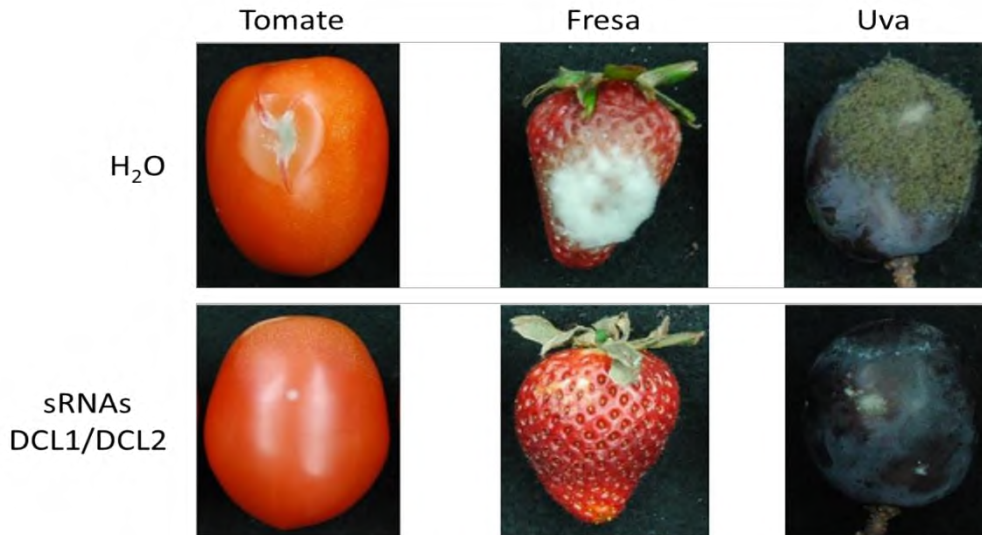


Figura 5 Fitoprotección por aplicación en spray de sRNAs exógenos en frutas de tomate, fresa y uva (Modificada de Wang *et al.*, 2016).

La forma de aplicación del fungicida se hace a través de la aspersion de la mezcla de sRNAs en la superficie a proteger. Esta aspersion diferencia a esta nueva tecnología de su antecesora HIGS y le dota de su nombre, silenciamiento génico inducido por aspersion (SIGS) (Figura 5) (Wang *et al.*, 2017). Este esquema ya se ha desarrollado y aplicado en la fitoprotección de productos finales contra el hongo *B. cinerea* (fresas, uvas, pétalos de rosa, hojas de lechuga; Wang *et al.*, 2016) así como en plantas enteras contra el hongo *Fusarium graminearum* (Koch *et al.*, 2016) con resultados prometedores de hasta 95% de reducción de la patogenicidad del hongo. A la fecha, los blancos que se han seleccionado en el hongo para ser regulados negativamente es el propio Dicer fúngico o citocromos responsables de la síntesis de membrana fúngica (Wang *et al.* 2016).

El sistema SIGS también tiene todavía aspectos que mejorar, por ejemplo, adecuaciones para alargar el tiempo de vida de los sRNAs como el uso de nanopartículas (nanoarcillas o nanomicelas). También se investiga activamente nuevos blancos

bioquímicos y la disminución de blancos no deseados en la planta (Mitter *et al.* 2017).

Otra limitación evidente en la tecnología SIGS es la síntesis a nivel industrial de sRNAs. De manera popular, se considera al RNA como una molécula difícil de manejar y costosa de producir. No obstante, recientemente Zotti *et al.*, 2018 reportan que la síntesis biotecnológica de sRNAs a través de bacterias tiene un costo de fitoprotección de 2 dólares por hectárea (Kim *et al.*, 2019).

De esta manera, con la acumulación de conocimiento de secuencias genéticas de hongos y plantas, la tecnología SIGS puede comenzar a implementarse en otros patosistemas adicionales a los reportados por instituciones norteamericanas o alemanas. En este trabajo se propone que se puede explorar la tecnología SIGS en patosistemas de interés nacional, y de los múltiples candidatos posibles, se proponen sistemas de frutas tropicales.

2 Justificación

La agricultura es la actividad de mayor producción de alimento y se ve amenazada por los diversos agentes patógenos que atacan las cosechas, resaltando que el 30% del total de fitopatógenos son hongos. En 2016, la situación de alimentos en América Latina y el Caribe indica que las mermas son de 223 kg por habitante al año. Lo anterior implica que el agricultor se ve en la necesidad de utilizar fungicidas para controlar las pérdidas de sus cosechas, con la consecuente acumulación de dichos productos químicos en el ambiente y el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos.

Con la finalidad de generar alternativas para el control de las enfermedades en plantas que limiten el impacto negativo sobre el ambiente, se han desarrollado tecnologías de nueva generación para la protección vegetal. Entre estas destacan la tecnología SIGS. Hasta la fecha, SIGS no se ha aplicado en patosistemas de frutas tropicales, por lo que en el presente trabajo se propuso diseñar y elaborar un biofungicida a partir de sRNAs (pequeños RNA) sintéticos dirigidos a hongos fitopatógenos que atacan a frutos tropicales en post-cosecha.

Para lograrlo, se requiere realizar un reconocimiento e identificación de patosistemas de interés por medio de métodos de microbiología e identificación molecular, para posteriormente explorar bioinformáticamente en las bases de datos genómicas internacionales la disponibilidad de secuencias informativas de blancos posibles para el silenciamiento. Finalmente, producir construcciones genéticas que sirvan como materia prima de generación de sRNAs utilizando métodos de biología molecular.

La información que se obtenga será el fundamento para diseñar estrategias de nueva generación que permitan alargar la vida de anaquel de las frutas tropicales, para que lleguen en óptimas condiciones al mercado y los consumidores, disminuyendo así las mermas que se presentan en el país como resultado de los diversos hongos fitopatógenos existentes en México

3 Hipótesis

Los hongos patógenos que se aíslan de frutas tropicales en la Cuenca del Papaloapan tendrán regiones útiles dentro de los genes DCL para el diseño de sRNAs en el contexto SIGS.

4 Objetivos

4.1 General

Diseñar un biofungicida, compuesto de sRNAs sintéticos contra hongos fitopatógenos que afectan a frutos tropicales

4.2 Particulares

- 1) Aislar hongos fitopatógenos del fruto de papaya, mango, naranja, melón, piña y plátano
- 2) Identificar a los hongos por secuenciación de ITS/SSU 18S
- 3) Detectar zonas de baja homología planta/hongo en genes DCL con potencial de ser blancos moleculares para una estrategia SIGS.
- 4) Diseñar y obtener una construcción de DNA quimérica que contenga a los genes DCL1 y DCL2 del hongo de un patosistema.

5 Materiales y métodos

5.1 Aislamiento de los hongos patógenos

Las frutas tropicales seleccionadas fueron papaya, mango, naranja, melón, piña y plátano y se adquirieron de un mercado local de la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. Se trasladaron al laboratorio de Biología Molecular perteneciente a la Universidad del Papaloapan para su procesamiento.

El aislamiento de los hongos se realizó dentro de la campana de flujo laminar para disminuir la probabilidad de contaminación externa de los aislados. En cada fruta se identificó en el aislado primario al número de colonias diferentes presentes en relación a su morfología macroscópica. Cada aislamiento se realizó en cajas Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) por los siguientes métodos:

I. Una colecta superficial de las esporas de cada colonia identificada con ayuda de una asa micológica, para después depositarlas por contacto en el agar.

II. Tomando un pequeño trozo de fruta afectada para depositarlo en el agar.

III. En algunos casos, se llevó a cabo un tercer método el cual fue tomar micelio del hongo que se iba a aislar y colocarlo en las cajas Petri.

Los métodos I y II se hicieron en todos los aislados, y el III sólo cuando el acceso al micelio era posible. La incubación de los aislados se llevó a cabo a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 4 días.

Los aislados se etiquetaron con H (hongo), las iniciales del color de la colonia (B blanco, V verde, N negro, G gris) y el método de aislamiento (R1 espora, R2 fruto, R3 micelio). Durante las resiembras se continuó observando la homogeneidad colonial de los aislados.

5.2 Microscopía

La identificación por microscopía se realizó por medio de tres técnicas: método de la cinta, microcultivo y observación directa de crecimiento en caja por anverso y reverso.

En el primero, se tomó un trozo de cinta adhesiva transparente y por el lado que contiene el pegamento, se presionó ligeramente sobre el micelio del hongo, provocando que quedara pegado a la cinta, para adherirlo en un portaobjetos. Para tener un mejor contraste, en ocasiones se utilizó azul de lactofenol (Anexo 1) para teñir las muestras.

Una vez montada la cinta con el micelio en el portaobjetos, se vertió una pequeña gota de colorante sobre la cinta y se colocó un cubreobjetos. Otra forma en que se realizó es colocando primero la gota de colorante sobre el portaobjetos y después la cinta con el micelio, en esta opción ya no es necesario utilizar un cubreobjetos. Se observó con los objetivos 10x y 40x y se capturaron las fotos con una cámara digital de una ipad (MPGT2CL/A) adaptada al microscopio óptico (Olympus, CX41RF/SP-320).

La segunda técnica utilizada fue la elaboración de microcultivos con el propósito de observar de una mejor manera las estructuras de los hongos. Para lo anterior, se colocó en condiciones estériles un cuadro de medio de cultivo PDA de 1 cm x 1 cm y aproximadamente 2 mm de grosor en un portaobjetos. Se depositó un cubreobjetos sobre el cuadro de medio de cultivo. Posteriormente, con una asa micológica se tomaron esporas de cada hongo y se inocularon en el cuadro por un costado (entre el porta y cubreobjetos). Por último se colocan dos pequeñas torundas de algodón remojadas en agua en cada lado del portaobjetos brindando así la humedad necesaria para que se desarrolle el hongo. Para su incubación, cada microcultivo se colocó dentro de una caja Petri vacía, y se incubó de 2 a 3 días a temperatura ambiente. Al cuarto día se observaron al microscopio, donde se utilizaron nuevos portaobjetos con una gota de azul de lactofenol. De forma paralela, se tomó cada microcultivo y se le retiró el cubreobjeto, despegándolo del medio de cultivo, se colocó sobre el portaobjetos con colorante para observar en 40x.

Finalmente, en un microscopio de fase invertida (Nikon Eclipse TS100) se observaron los hongos sin preparación previa directamente de las cajas Petri por anverso y reverso con objetivos 10x y 60x, la identificación se realizó siguiendo las claves establecidas por Williams-Woodward (2001).

5.3 Identificación molecular

Para la identificación molecular se probaron diferentes métodos de extracción y amplificación de DNA. Algunos de ellos se usaron exclusivamente durante el curso biología molecular de hongos y otros en el laboratorio de biología molecular de la Universidad del Papaloapan. Ambos arrojaron secuencias de calidad y permitieron su identificación molecular y consisten en dos caminos metodológicos posibles. A continuación se detallan.

5.3.1 Extracción de DNA por medio del método REExtract-XNAP

La identificación molecular de 5 hongos se realizó en una estancia en el Laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas dirigido por el Dr. Roberto Garibay Orijel en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La extracción de DNA se realizó con el kit comercial REExtract-XNAP (Sigma, R4775).

Se tomó micelio de cada hongo (no más de 2 mm³) en microtubos de 200 µl con 20 µl de la solución de extracción previamente vertidos en cada uno, siguiendo las instrucciones del fabricante y dentro de la campana de flujo laminar. Las incubaciones se realizaron en un termociclador (GeneAmp PCR System 9700) con el siguiente programa: 65 °C 10 min, 95 °C 10 min y 4 °C, los tubos retiraron del termociclador y se conservaron en un refrigerador a 4 °C hasta su posterior procesamiento.

A los microtubos se les agregaron 20 µl de la solución de disolución. Se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 30 min, con un volumen final de 40 µl. Se almacenaron a -20 °C hasta su uso en PCR (sección 5.3.3)

Las muestras de ADN se identificaron igual que las muestras de hongo de donde provenían (Tabla 3).

Tabla 3 Nomenclatura utilizada para identificar las muestras de los primeros 5 hongos aislados

Muestra de hongo	Clave de identificación
Papaya H1BR1	PaH1
Papaya H2VR1	PaH2
Naranja H1BR1	Na
Piña H1NR1	PiR1
Piña H1NR3	PiR3

5.3.2 Extracción de DNA por medio del método fenol-cloroformo

La extracción de DNA de los 14 hongos restantes se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Papaloapan por el método de fenol-cloroformo.

Se recolectó el micelio de cada hongo directamente de la caja petri con una espátula y se depositó en un mortero para ser triturado con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Una vez triturado, se tomó un volumen de 200 μ l y se depositó en un tubo de 1.5 ml. Se agregaron 600 μ l de solución de lisis (Anexo1), se agitó en vortex por 15 s y se incubó por 10 min a 80 °C en un termobloque (Multi-Blok Heater Thermo Scientific). Posteriormente, se añadieron 700 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se mezcló en vortex por 15 s y se centrifugó a una velocidad de 10,000 rpm por 10 min (Heraeus Pico 21, Thermo Scientific). Se separó el sobrenadante (aprox. 400-500 μ l), se colocó en tubos nuevos y se le agregó el doble del volumen (800-1000 μ l) de etanol puro con respecto al sobrenadante y se adicionó el 10% con respecto al sobrenadante (40-50 μ L) de acetato de sodio 3 M. Se mezcló en vortex por 15 s y se incubó a -20 °C durante 2 horas.

Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 min, se eliminó el sobrenadante, se añadió 1 ml de etanol al 80%, se mezcló en vortex por 15 s y se volvió a centrifugar a 10,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min. El precipitado se resuspendió en 40 μ l de agua previamente desionizada, estéril y tratada por luz UV.

Se añadió 1 µl de la enzima RNase A (Thermo Scientific, EN-179S, 10mg/ml) y se incubó durante 30 min a 37 °C. Finalmente, se inactivó la enzima a 65 °C por 10 min. Y se almaceno el DNA a -20 °C hasta su posterior uso.

5.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa PCR con la enzima Platinum Taq DNA Polymerase, utilizando DNA extraído con el método REExtract-XNAP

El ADN genómico (gDNA) extraído de las muestras que se procesaron en la UNAM se usó como molde para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, 10966026, 1 U/µl).

Tabla 4 Secuencia de oligonucleótidos

Primer	Secuencia	Tm
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	57
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	55
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	53

Los oligonucleótidos utilizados en la PCR fueron los propuestos por Raja *et al.* 2017 (Figura 6) ITS1F e ITS1 (directos) e ITS4 (reverso) detallados en la Tabla 4, la Tm fue proporcionada por el fabricante de acuerdo a lo reportado por Breslaucer *et al.* 1986. Estos pares amplifican los dos espacios intergénicos transcritos o ITS por sus siglas en inglés, el tamaño del amplicon que generan estos oligonucleótidos es entre 550 – 600 pb Figura 6.



Figura 6 Localización de los oligonucleótidos ITS1F, ITS1 e ITS4 en la región genómica del ITS 18S para hongos (Raja *et al.*, 2017)

La mezcla de PCR se realizó de la siguiente manera:

Tabla 5 Cálculos para la elaboración de la mezcla de reacción para Platinum Taq DNA Polymerase

Reactivo	Volumen 1X (µl)
H ₂ O	18.125
10x PCR Buffer	2.5
dNTPs 10 mM	0.5
MgCl ₂ 50 mM	1.25
Primer F: ITS1F 10 µM	0.25
Primer R: ITS4 10 µM	0.25
Taq Platimun	0.125
DNA	2.0
Volumen total:	25

La mezcla de PCR para el aislamiento de las secuencias ITS se realizó como se detalla en la Tabla 5. La mezcla de reacción se elaboró dentro de la campana de flujo laminar. Una vez mezclados los reactivos, se adicionaron 23 µl de mezcla de reacción en microtubos de 200 µl. A cada microtubo se le agregaron 2 µl de ADN del hongo a identificar. En paralelo, se incluyó como control positivo la extracción de gDNA de *Agaricus bisporus* y un negativo sin molde. El programa de PCR se ejecutó en un termociclador (GeneAmp PCR System 9700) con el programa indicado en la Tabla 6.

Tabla 6 Programa de termociclador para la amplificación de ITS con PCR

Etapa	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 95°C	4 min	1
Desnaturalización 94°C	1 min	35
Alineamiento 51°C	1 min	
Extensión 72°C	1 min	
Elongación final 72°C	10 min	1

Para los casos donde no se obtengan los productos esperados, se puede realizar un cambio de la polimerasa a AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, 12346086, 5 U/ μ l). Termoestable a temperatura ambiente. Se mantuvieron los mismos oligonucleótidos utilizados en la PCR anterior.

La mezcla de reacción para la PCR se realizó como se indica en la Tabla 7.

Tabla 7 Cálculos para la elaboración de la master mix para AccuPrime Taq DNA Polymerase

Fórmula para calcular PCR Master Mix AccuPrime	
Reactivo	Volumen 1x (μ l)
H ₂ O	10.0
Primer F: ITS1 10 μ M	0.25
Primer R: ITS4 10 μ M	0.25
Taq AccuPrime	12.5
DNA	2.0
Volumen total:	25

La mezcla de reacción se elaboró dentro de la campana de flujo laminar, todos los reactivos se mantuvieron en hielo, cada reactivo se tomó y se depositó dentro de un microtubo de 1.5 ml. Al final, se mezclaron todos los reactivos y se adicionaron 23 μ l de la master mix en microtubos de 200 μ l. A cada tubo se le agregaron 2 μ l del templado en diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 para disminuir el efecto de posibles inhibidores químicos producidos por el hongo y coextraídos con el DNA. El control positivo y negativo fueron los mismos que en la sección anterior. El programa de PCR que se usó está en la Tabla 8 y se ejecutó en un termociclador (GeneAmp PCR System 9700).

Tabla 8 Programa de la PCR de gradiente

Etapas	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 95°C	4 min	1
Desnaturalización 94°C	1 min	35
Alineamiento gradiente 50, 50.8, 52.8, 55.4, 56.7, 58.8°C	1 min	
Extensión 72°C	1 min	
Elongación final 72°C	10 min	1

5.3.4 Limpieza de productos de PCR por medio del método ExoSAP-IT de las muestras de DNA extraído con el método REExtract-XNAP

La limpieza de los productos de PCR se realizó como acción preparativa de la secuenciación. En la UNAM se realizó con el kit de remoción enzimática de oligonucleótidos y dNTPs ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Affymetrix, 78201.1.ML), en una relación 1:1 de solución de PCR, por cada microlitro de ExoSAP-IT es el protocolo que establece el fabricante, pero se realizaron algunas modificaciones como se explica a continuación.

En cada microtubo de 200 μ l se agregaron 2 μ l de la master mix de limpieza y 3.5 μ l de producto de PCR. En un termociclador se realizaron las siguientes incubaciones: 37 °C durante 45 min, 80 °C durante 15 min, 4 °C tiempo indefinido.

5.3.5 Reacción en cadena de la polimerasa PCR con la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase utilizando DNA extraído por el método fenol-cloroformo

El DNA extraído de las muestras que se procesaron en la UNPA se usó como molde para PCR utilizando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, M0530L, 2000U/ml).

Los oligonucleótidos utilizados en la PCR fueron los mismos que se utilizaron en la sección 5.3.3 y la mezcla de PCR se realizó como se indica en la Tabla 9. La mezcla de reacción se elaboró dentro de la campana de flujo laminar. Una vez mezclados los reactivos, se adicionaron 19 μ l de mezcla de reacción en microtubos de 200 μ l. A cada microtubo se le agrego 1 μ l de ADN del hongo a identificar. Los controles fueron los mismos ya descritos en la sección 5.3.3.

Tabla 9 Cálculos para la elaboración de la mezcla de reacción para Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

Reactivo	Volumen 1X (µl)
H ₂ O	13.3
5X Phusion HF buffer	4
dNTPs 10 mM	0.5
Primer F: ITS1F 10 µM	0.5
Primer R: ITS4 10 µM	0.5
Phusion HF	0.2
DNA	1
Volumen total:	20

El programa de PCR se corrió en un termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) con el programa indicado en la Tabla 10.

Tabla 10 Programa de la PCR con la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

Etapas	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 98°C	5 min	1
Desnaturalización 98°C	10 s	30
Alineamiento 53°C	20 s	
Extensión 72°C	30 s	
Elongación final 72°C	5 min	1

5.4 Electroforesis con buffer TBE

Los productos de PCR de las muestras extraídas con el método REExtract-XNAP se resolvieron por medio de electroforesis en agarosa al 1% (Anexo 1). El buffer utilizado fue TBE compuesto de TRIS borato y EDTA (Anexo 1), se usó a una concentración de 1X a partir de una solución 10X (Anexo 1).

Se agregó el fluoróforo GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, 41001) a la solución tibia de agarosa fundida. La documentación de los geles se realizó en un transiluminador de UV (Ingenius Syngene Bio Imaging).

5.5 Electroforesis con buffer TAE

Los productos de PCR de las muestras extraídas con el método fenol-cloroformo se resolvieron por medio de electroforesis en agarosa al 1% (Anexo 1). El buffer utilizado fue TAE está compuesto de TRIS acetato y EDTA (Anexo 1), se usó a una concentración de 1X a partir de una solución 50X (Anexo 1).

Se añadió el fluoróforo bromuro de etidio a 0.02µl/ml en la solución tibia de agarosa fundida. La documentación de los geles se realizó en un transiluminador de UV (Ingenius Syngene Bio Imaging).

5.6 Limpieza de productos de PCR por medio del método GeneJET de las muestras de DNA extraído con el método fenol-cloroformo

La limpieza de las muestras que se secuenciaron desde la UNPA, se realizó con el kit de remoción de fragmentos de DNA extraídos de geles de agarosa GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific, K0691), utilizando una tecnología de membrana a base de sílice en forma de una columna de centrifugado.

Se localizó el fragmento de gel donde está contenido el amplicón de DNA de interés en un transiluminador UV y se cortó con un bisturí. Una vez cortada la banda de gel se introdujo en un tubo de 1.5 ml y se añadió el buffer de unión en una relación 1:1. El tubo se incubó a una temperatura entre 50-60 °C por 10 min en baño de agua y al salir de la incubación se mezcló en vortex por 10 s.

Se tomaron 800 µl de la solución y se vertieron en la columna de purificación GeneJET. Se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm y este paso se repitió hasta terminar con la solución del gel. Para finalizar, se añadieron 100 µl del buffer de unión y se centrifugó por 1 min.

Se añadieron 700 µl de buffer de lavado en cada columna de purificación y se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm dos veces. Terminados los lavados se centrifugó 1 min más para remover totalmente el buffer de lavado.

Por último, la columna de purificación se colocó en un nuevo tubo de 1.5 ml y se añadieron 50 µl de agua libre de nucleasas teniendo cuidado de sólo depositarla en la membrana de la columna y se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

5.7 Secuenciación Sanger en ambas direcciones (5´-3´ y 3´-5´) partiendo de DNA extraído con el método REExtract-XNAP

Para las muestras procesadas en el Laboratorio de Sistemática y Ecología de micorrizas de la UNAM, los productos de PCR se enviaron a secuenciar con los dos oligonucleótidos de amplificación ya mencionados, por separado. Esto permitió amplificar ambas cadenas. Los oligonucleótidos se enviaron a una concentración de 8 mM.

Las muestras se secuenciaron por método Sanger en Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM.

5.8 Secuenciación Sanger una dirección (5´-3´) partiendo de DNA extraído por el método fenol-cloroformo

Para las muestras procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la UNPA, los productos de PCR se enviaron a secuenciar con los oligonucleótidos de amplificación ITS1F e ITS4, por un solo sentido con una concentración de 100ng/µl. Los oligonucleótidos se enviaron a una concentración de 100ng/µl.

Estas muestras se secuenciaron por método Sanger en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad campus Irapuato del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav).

5.9 Edición de las secuencias

Las secuencias se recibieron como electroferogramas y se editaron *in silico* con el programa Chromas 2.6.5. (Technelysium). La limpieza consistió en observar los electroferogramas de cada secuencia para eliminar de los extremos 3´ y 5´ a las bases con baja certidumbre. Para la secuencia intermedia se seleccionaron en toda su longitud

hasta detectar la presencia de solapamientos mayores al 50% de la altura del pico original, que corresponden a un valor de calidad 30 (1 error probable en 1000; basado en el manual de operación <https://www.nwabr.org/sites/default/files/Analyzing-A-DNA-Sequence-Chromatogram.pdf>), para poder contrastar con la secuencia determinada por el software y crear la secuencia consenso que es la unión de las secuencias directas y reversas.

Con estas secuencias consenso se hicieron alineamientos con el algoritmo en línea Blastn (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Con estas secuencias se comenzó la elaboración de árboles filogenéticos.

5.10 Construcción de árboles filogenéticos

Para la construcción de los arboles filogenéticos se usó el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016), partiendo de la selección de secuencias de las especies con mayor homología con respecto de la secuencia consenso de cada hongo aislado, obtenidas de Blastn. El corte operativo utilizado para la identificación de cada especie se estableció en 98% de identidad (Lundberg *et al.*, 2012). También se buscaron secuencias del mismo género pero diferentes especies en la plataforma curada del Joint Genome Institute JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) y de artículos científicos sobre identificación molecular del género de cada hongo que se citan en cada pie de árbol. Los árboles se hicieron comenzando con el alineamiento de las secuencias por medio del método MUSCLE (Edgar, 2004), seguido de la construcción del árbol utilizando el modelo Jukes-Cantor contando con un total de 1000 bootstraps (Almanza-Álvarez *et al.*, 2017).

5.11 Identificación de genes DCL1 y DCL2 en hongos identificados y diseño de sRNAs

Para comenzar el diseño de una estrategia SIGS, se necesita reconocer el catálogo disponible de las secuencias de los genes blancos DCL1 y DCL2 de cada hongo identificado. Estas se descargaron de plataformas curadas como son los Consorcios UniProt (<https://www.uniprot.org/>) y funRNA (<http://funrna.riceblast.snu.ac.kr/index.php?a=view>; Choi *et al.*, 2014), de la misma forma

se descargaron las secuencias de las proteínas DCL1 y DCL2 de cada fruta de donde fueron aislados dichos hongos.

Para diseñar las secuencias de los sRNAs, se deben localizar las zonas sin o con menor homología entre los DCLs de los hongos y los DCLs de las frutas. Una vez obtenidas las secuencias de las proteínas DCL se analizaron *in silico*, comenzando con los alineamientos de los DCLs de los hongos con los DCLs de las frutas, en la plataforma del European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) utilizando su programa de alineación de secuencias múltiples llamado T-Coffee (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>; Notredame *et al.*, 2000).

5.12 Diseño de los sRNAs

5.12.1 Diseño de oligonucleótidos

Se realizó el diseño de varios oligonucleótidos necesarios para el proceso de unión de las dos secuencias de DCL de *Penicillium digitatum*. Para ello se usaron los alineamientos de las secuencias en nucleótidos de cada DCL descargados en la sección anterior. Con el fin de evitar que los DCL de la planta fueran blancos de SIGS, se prepararon oligonucleótidos que flanquean dos secciones de baja homología planta-hongo con base en la secuencia genómica del hongo. El diseño se elaboró de forma manual. Para el oligonucleótido Pdi1 Forw, se tomaron las primeras 25 bases, y para Pdi1 Rev se tomaron las últimas 25 bases de su secuencia, con la única diferencia que para este oligonucleótido se utilizó el reverso complementario, con el fin de que éste estuviera en una dirección 5' – 3'. Se aplicó el mismo procedimiento para Pdi2 Forw y Pdi2 Rev. En ambos casos de análisis se verificó que la secuencia no promoviera la formación de artefactos. Para el oligonucleótido de unión Rev2Compl se tomó la secuencia de Pdi1 Rev unida a la secuencia de Pdi2 Forw y como oligonucleótido de reversa se obtuvo el reverso complementario dando lugar a Rev1Compl. Para la adición del promotor T7 se utilizaron las secuencias de Pdi1 Forw y Pdi2 Rev unidas a la secuencia del promotor, para todos los casos se analizó que su T_m fuera compatible entre sí, los oligonucleótidos se observan en la Tabla 11. La T_m fue calculada por medio de la plataforma de Integrated DNA Technologies, Inc., por medio de la herramienta OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

Tabla 11 Oligonucleótidos diseñados para elaboración del ds-RNA de *P. digitatum*

Oligonucleótidos	Secuencia 5' - 3'	Tm °C
Pdi1 Forw	TGGGGATATGCTGATCCTTGAAGGC	62.4
Pdi1 Rev	CATTACAGACCGGGCATTATGCCG	60.2
Pdi2 Forw	CCATCTATCGTGCAAGCTGCGGAGC	63.8
Pdi2 Rev	CAAAGGACGTCTCGGAGTCCCAG	61.2
Rev1Compl	GCTCCGCAGCTTGCACGATAGATGGCGGCATAAAATGCCCG GTCTGTAATG	63.8
Rev2Compl	CATTACAGACCGGGCATTATGCCGCCATCTATCGTGCAA GCTGCGGAGC	60.2
T7Pdi1 Forw	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGGGATATGCTGATCCT TGAAGGCC	66.9
T7Pdi2 Rev	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAGGACGTCTCGGAG TCCCAG	67

- Secuencia del oligonucleótido Pdi1Forw
- Secuencia del oligonucleótido Pdi1Rev
- Secuencia del oligonucleótido Pdi2Forw
- Secuencia del oligonucleótido Pdi2Rev
- Secuencia del oligonucleótido Rev1Compl (Reverso complementario de Rev2Compl)
- Secuencia del promotor T7

5.12.2 Amplificación de DNA genómico de *P. digitatum*

La extracción se realizó conforme a la metodología descrita en el punto 5.3.5 por el método fenol-cloroformo, la electroforesis se llevó a cabo con buffer TAE como se describe en el punto 5.5.

5.12.3 Amplificación de la secuencia Dicer en *P. digitatum*

Se realizó una PCR con el fin de amplificar las secuencias seleccionadas de la proteína dicer DCL1 y DCL2, utilizando los dos primeros pares de oligonucleótidos previamente diseñados, para la secuencia DCL1 se utilizaron los oligonucleótidos Pdi1 Forw y Pdi1 Rev y para la secuencia DCL2 se utilizó Pdi2 Forw y Pdi2 Rev. La polimerasa utilizada para la PCR fue la Taq DNA Recombinant (Thermo Scientific, EP0402, 5U/μl). No se usó la polimerasa tipo Phusion porque no coloca adeninas en el extremo y evitaría la posterior clonación del inserto. El templado se diluyó 1:20 con el fin de no saturar la reacción. En la Tabla 12 se muestran las cantidades necesarias para la mezcla de reacción.

Tabla 12 Cálculos para la elaboración de la mezcla de reacción para Taq DNA recombinante

Reactivo	Volumen
H ₂ O	12.3
10X Taq buffer	2
dNTPs 10 mM	0.4
MgCl ₂ 25 mM	3.2
Primer F: Pdi1 y Pdi2 1 μM	0.5
Primer R: Pdi1 y Pdi2 1 μM	0.5
Taq DNA Poly	0.1
DNA	1
Volumen total:	20

La estrategia llevada a cabo para el diseño del sRNAs para *P. digitatum* se muestra en el esquema de síntesis *in vitro* de sRNAs (Figura 7).

El programa de PCR se corrió en un termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) con el programa indicado en la Tabla 13. La electroforesis se llevó a cabo con buffer TAE como se describe en el punto 5.5 en un gel de agarosa al 2% (Anexo 1).

Tabla 13 Programa en el termociclador para la PCR

Etapa	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 95°C	5 min	
Desnaturalización 95°C	30 s	30
Alineamiento 60°C	30 s	
Extensión 72°C	40 s	
Elongación final 72°C	5 min	

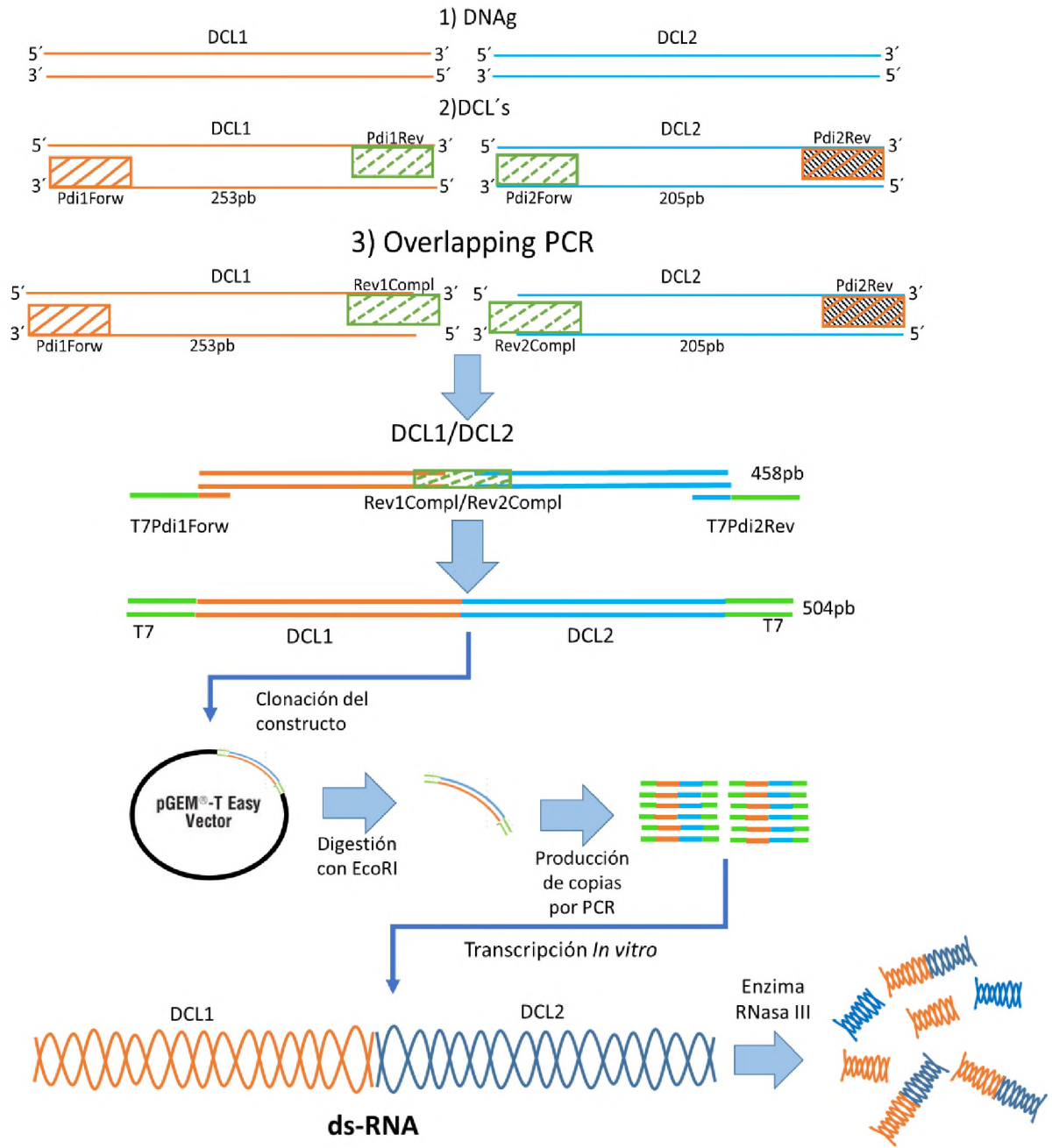


Figura 7 Esquema de síntesis *in vitro* del sRNAs para *P. digitatum*

5.12.4 Purificación de producto de PCR por el kit MinElute PCR Purification de la amplificación DCL1 y DCL2 de *P. digitatum*

Los productos de PCR DCL se purificaron de gel con el kit de remoción enzimática de oligonucleótidos y dNTPs MinElute PCR Purification (Quiagen, 28004).

Primero, se añadieron 5 volúmenes del buffer PB (buffer de unión) a la reacción de PCR terminada, la mezcla debe de presentar un color amarillo correspondiente al color del buffer PB. Se trasladó el total del volumen del tubo de PCR a una columna MinElute y se centrifugó a 17,900 g durante 1 min, se descartó el sobrenadante contenido en el tubo de recolección y se regresa a la columna.

Se añadieron 750 µl del buffer PE (buffer de lavado) a la columna y se centrifugó a 17,900 g durante 1 min, se descarta el sobrenadante contenido en el tubo de recolección y se regresa a la columna. Se volvió a centrifugar a 17,900 g durante 1 min para descartar residuos existentes de etanol. Y la columna se colocó en un nuevo tubo de 1.5 ml.

La elución se hizo con 10 µl del buffer EB (buffer del elución) añadidos directamente en la membrana de la columna, se dejó reposar durante 1 min y se centrifugó a 17,900 g durante 1 min. Este paso se repitió con el eluido otra ocasión más para aumentar el rendimiento.

5.12.5 Adaptación de oligonucleótidos complementarios y promotores T7

Cuando se obtuvieron los fragmentos de DCL1 y DCL2 por separado, se prepararon unidos en una sola molécula, y posteriormente se le adicionaron las secuencias del promotor T7 en los extremos 5' y 3'. Para posteriormente realizar ensayos de transcripción *in vitro* para su futura síntesis. La adaptación de los oligonucleótidos complementarios consistió en tomar 8 µl del producto purificado de PCR tanto de Pdi1 y Pdi2 añadiendo y mezclándolos en un tubo de 1.5 ml, obteniendo un total de 16 µl. Se incubó en un termoblock Multi-Blok Heater (Thermo Scientific) iniciando con una temperatura de 95 °C durante un tiempo de 2 min, transcurrido el tiempo indicado se dejó enfriar gradualmente hasta 24 °C, con el objetivo que se lograra el apareamiento de los oligonucleótidos complementarios (O'Malley *et al.*, 2007).

Una vez a 24 °C se retiró el tubo del termoblock y se colocó en hielo. Se preparó una mezcla de reacción para PCR excluyendo los oligonucleótidos en este primer paso como se muestra en la Tabla 14 y se usaron como templado 2 µl de los 16 µl contenidos en el tubo de 1.5 ml en una reacción de PCR en un termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems).

Tabla 14 Cálculos para la elaboración de la mezcla de reacción para Taq Recombinante

Reactivo	Volumen 1X (µl)
H ₂ O	11.3
10X Taq buffer	2
dNTPs 10 Mm	0.4
MgCl ₂ 25 Mm	3.2
Taq DNA Poly	0.1
DNA	2
Volumen total:	20
Después de la incubación de 2 min, se agregaron los oligonucleótidos, F Pdi1 y Pdi2 0.5 µl y R Pdi1 y Pdi2 0.5	

Con un programa modificado que inició a una temperatura de 37 °C, subiendo a 70 °C para que la polimerasa comience a rellenar los espacios vacíos determinados por los oligonucleótidos complementarios. Esta incubación se detuvo después de 2 min, para adicionar la mezcla de oligonucleótidos, la PCR se ejecutó primero con los oligonucleótidos Pdi1 Forw y Pdi2 Rev.

Una vez que se agregó la mezcla a los tubos, se regresaron al termociclador para comenzar con la PCR. Este programa de PCR modificado se muestra en la Tabla 15.

La electroforesis de los productos se llevó acabo con buffer TAE como se describe en el punto 5.5 en un gel de agarosa al 2%. Se purificaron los productos de PCR por medio del kit MinElute PCR Purification descrito en el apartado 5.12.4.

El producto de esta PCR se purificó de gel como se describió en el Anexo 1 y se realizó otra PCR similar con los oligonucleótidos T7Pdi1 Forw y T7 Pdi2 Rev adicionando así los promotores T7 necesarios a la secuencia.

Tabla 15 Programa para el termociclador

Etapa	Tiempo	Ciclos
Incubación 1 37°C	1 min	
Incubación 2 70°C	1 min	
Paro: Adición de los oligonucleótidos		
Comienzo: Directo en los ciclos		
Desnaturalización 95°C	30 s	30
Alineamiento 60°C	30 s	
Extensión 72°C	40 s	
Elongación final 72°C	5 min	

5.12.6 Ligación del constructo (ds-RNA) en el vector pGEM-T Easy

Para la preparación del inserto, se requirió correr todo el producto de la segunda PCR en un gel de agarosa al 2%, se localizó el fragmento de gel donde está contenido el DNA de interés en un transiluminador UV y se cortó del gel con un bisturí. La purificación se realizó por medio del kit MinElute Gel Extraction descrito en el Anexo 1.

La ligación con el vector pGEM-T easy (Promega, A1360; Anexo 1) se llevó acabo en un tubo de 200 µl conforme la mezcla de reacción que se presenta en la Tabla 16.

Tabla 16 Cálculos de la mezcla de reacción para la ligación en el vector pGEM-T Easy

Reactivo	Volumen 1X (µl)
H ₂ O nuclease-free	1
2X Rapid ligation buffer	2.5
pGEM-T Easy Vector (50ng)	0.5
PCR product	0.5
T4 DNA ligase 3 U/µl	0.5
Volumen total:	5

Se dejó incubar la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora, transcurrido el tiempo se colocó en el refrigerador a una temperatura de 4 °C durante toda la noche.

5.12.7 Transformación de células competentes de *E. coli* One Shot Top10

La transformación de células competentes se realizó siguiendo el manual del kit One Shot Top 10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, C4040-10).

Para ello, se tomó del ultra congelador a -80 °C un vial de células competentes y se colocó en hielo, ahí se dejó descongelar durante 10 min. Una vez descongeladas las células se añadieron 5 µl de la reacción de ligación del vector pGEM-T Easy en la superficie de la suspensión de células sin mezclar por pipeteo sino por suaves golpes.

El vial se incubó en hielo durante 30 min e inmediatamente se realizó un choque térmico en un termoblock a una temperatura de 42 °C por 30 s. Al terminar, el vial se regresó inmediatamente al hielo. Se añadieron 125 µl de medio S.O.C. y se incubó a 37 °C durante 1 hora con una agitación orbital de 225 rpm.

Al término de la incubación se dividió el volumen del vial en 50 µl, 100 µl y 150 µl, dichos volúmenes fueron plaqueados en cajas Petri con medio LB sólido adicionadas con ampicilina 100 µl y X-Gal 20mg/ml (Anexo 1), En este caso no es necesario la adición de IPTG como inductor de operón Lac debido a la modificación del genotipo de las células que permite la expresión del péptido alfa-LacZ desde el promotor microbiano constitutivo Lac.

Las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 37 °C durante una noche, al día siguiente las cajas se introdujeron al refrigerador a 4 °C durante 2 horas esto se hace con el propósito de diferenciar claramente a las colonias blancas de las colonias azules.

Se colectaron las colonias blancas con la punta de un palillo previamente estéril y se inoculó por estría en una nueva caja Petri, y el mismo palillo se colocó en un tubo con 5 ml de medio LB líquido adicionado con ampicilina. Los tubos se incubaron en una posición inclinada a una temperatura de 37 °C con agitación orbital de 195 rpm durante una noche.

5.12.8 Extracción del plásmido por lisis alcalina

Los cultivos obtenidos en el paso anterior se vertieron en tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 2 min para recuperar el paquete celular libre de medio LB. Esta pastilla microbiana se sometió al método de lisis alcalina (Anexo 1).

5.12.9 Digestión con la enzima de restricción EcoRI

La digestión de los plásmidos asilados se realizó siguiendo el manual de EcoRI (Promega, R601A, 12U/ μ l), la reacción se llevó a cabo en tubos de 200 μ l. En la Tabla 17 se describen los componentes de la mezcla de reacción para la digestión.

Tabla 17 Cálculos de la mezcla de reacción para la digestión con la enzima de restricción EcoRI

Reactivo	Volumen 1X (μ l)
H ₂ O nuclease-free	15.8
10X buffer RE	2
Acetylated BSA 10 μ g/ μ l	0.2
Restriction enzyme EcoRI 10 U/ μ l	1
DNA 1 μ g/ μ l	1
Volumen total:	20

Los tubos se incubaron a 37 °C durante 2 horas, al finalizar la enzima se inactivó a 65 °C por 20 min.

Una vez terminada la digestión se realizó una electroforesis donde se cargaron las muestras de las digestiones con la enzima de restricción en contraste con las extracciones de plásmido por lisis alcalina de la sección 5.12.8, en un gel de agarosa al 2%.

5.12.10 Purificación del plásmido por AMPure XP

La purificación de la extracción de plásmidos positivos con inserto se llevó a cabo mediante la solución AMPure XP (Beckman Coulter, A63881; Anexo 1).

Las muestras fueron rotuladas de acuerdo al medio de cultivo donde se hicieron crecer las clonaciones LB, acompañado del número de muestra en la digestión.

5.12.11 Secuenciación del plásmido por método Sanger en ambas direcciones (5´-3´y 3´-5´)

Las purificaciones de las extracciones de plásmido se enviaron a secuenciar, por ambos sentidos utilizando los oligonucleótidos estándar de los promotores M13FW y SP6. Se enviaron con una concentración de 100ng/μl. Estas muestras se secuenciaron por método Sanger en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad campus Irapuato del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav).

6 Resultados y discusión

6.1 Aislamiento de hongos patógenos de frutas

Se aislaron 28 hongos de frutas tropicales a través de los tres métodos de aislamiento empleados en este trabajo (Tabla 18). Inicialmente se logró aislar al 67% del total de hongos sin crecimiento de bacterias, el 33% restante presentó crecimiento de bacterias y dos aislados presentaron crecimiento de más de un solo hongo (Tabla 19). Después de subcultivos y su análisis por microscopía y morfología macroscópica, se observó que correspondieron a 14 colonias de hongos que parecen ser axénicos.

En las cajas que presentaron crecimiento de bacterias y crecimiento de más de sólo un hongo, también se recuperó este segundo aislado, dando como resultado el etiquetado de nuevos hongos. Estos resultados de aislados adicionales se resumen en la Tabla 20.

Se realizaron resiembras de todos los aislados, con el fin de propagar material biológico necesario para la identificación molecular de cada hongo y la criopreservación de los mismos.

6.2 Microscopía

Se decidió comenzar a trabajar con 5 de los 18 hongos aislados con base en el tipo de fruta del que fueron aislados y el género predicho por la morfología y microscopía. Para la selección de la fruta, se tomó en cuenta el conocimiento empírico que se tienen sobre su susceptibilidad al ataque por hongos, su producción en la zona, lo delicado de

su manejo post cosecha y el grado de infección que se observa en su puesta en anaquel. De tal manera, se seleccionaron papaya, naranja y piña.

Para la selección de los 5 hongos asilados de las frutas anteriores, se realizó la preidentificación del género por microscopía a través de las estructuras reproductivas y la morfología de las esporas e hifas. Para una mejor observación del hongo se decidió teñir su estructura, con colorante azul de lactofenol al ser ampliamente reportado para hongos (Shamly *et al.*, 2014). En la Figura 8 se presentan los resultados que se colectaron para el aislado H1BR1 de naranja como ejemplo típico de la información que se colectó para cada uno de los restantes hongos. Los resultados de esta identificación microbiológica en específico se presentan en la Tabla 21 y para el resto en el Anexo 2.

6.3 Amplificación del gen 18S a partir de ADN extraído con REExtract-XNAP

6.3.1 Extracción de DNA y amplificación de la zona ITS

Para la identificación molecular, se utilizó la zona ITS genómica conformada por las secciones ITS1, gen 5.8S y ITS2 (Figura 5), dicha zona es considerada un código de barras en hongos con múltiples reportes depositados en bases curadas y no curadas (Schoch *et al.*, 2012).

De las primeras 5 muestras seleccionadas, la PCR dio como resultado la amplificación de 3 muestras (Figura 9), no se cuantificó la cantidad de DNA extraído, solo se constató que hubiera amplificación. El control negativo no presentó ninguna amplificación y el control positivo amplificó. Los productos de PCR que sí amplificaron se mandaron a secuenciar por ambas direcciones.

Después de observar que dos muestras no amplificaron, se decidió volver a cargar otro gel para excluir algún error como mal pipeteo o carga inadecuada de la muestra. El resultado fue el mismo, no se detectaron bandas positivas (Figura 10A). Por lo cual se decidió hacer una dilución del templado a 1:10 para minimizar inhibidores de la polimerasa y realizar de nuevo la PCR. Las condiciones de la PCR fueron las mismas (Figura 10B).

Tabla 18 Concentrado de los hongos aislados de frutas tropicales y detalles de su aislamiento y etiquetado

Fruta	# Hongo	Color de Colonia	Método de Aislamiento	*Clave
Papaya	1	Blanco	Espora	H1BR1
			Fruto	H1BR2
	2	Verde	Espora	H2VR1
			Fruto	H2VR2
	3	Negro	Espora	H3NR1
			Fruto	H3NR2
	4	Blanco/Negro	Espora	H4BNR1
Fruto			H4BNR2	
5	Gris/Verde	Espora	H5GVR1	
		Fruto	H5GVR2	
Mango	1	Blanco	Espora	H1BR1
			Fruto	H1BR2
			Fruto	H1BR3
			Micelio	H1BR4
Naranja	1	Blanco	Espora	H1BR1
			Fruto	H1BR2
Melón	1	Blanco	Espora	H1BR1
			Fruto	H1BR2
	2	Blanco/Negro	Fruto	H2BNR1
3	Negro	Fruto	H3NR1	
Piña	1	Negro	Espora	H1NR1
			Fruto	H1NR2
			Micelio	H1NR3
	2	Blanco/Hoja	Espora	H2BHR1
			Hoja	H2BHR2
Plátano	1	Blanco/Verde	Espora	H1BVR1
			Fruto	H1BVR2
	2	Blanco	Espora	H2BR1

*La nomenclatura utilizada para los aislados consistió en la letra H de hongo, el número de la colonia identificada, la inicial del color de la colonia (B blanco, V verde, N negro, G gris) y R1 para aislamiento por espora, R2 aislamiento por fruto y R3 aislamiento por micelio.

Tabla 19 Cajas de hongos aislados sin presencia de bacterias y con presencia de bacterias

Fruta	# Cajas totales	# Cajas con Hongos Aislados sin Bacterias	# Cajas con Bacterias
Papaya	10	7	3 Bacterias
Mango	4	4	0
Naranja	2	0	2 Bacterias
Melón	4	4	0
Piña	5	*2	3 Bacterias
Plátano	3	2	1 Bacterias
Total	28	19	9

*Dos cajas de aislados de piña presentaron crecimiento de más de un solo hongo

Tabla 20 Hongos aislados con crecimiento de bacterias, hongos aislados con crecimiento de más de un hongo y cajas eliminadas por ausencia de hongos.

Fruta	Aislados con Bacterias	*Hongos Nuevos	2do Aislado y Clave	*Cajas Eliminadas
Papaya	H3NR1	0	H3NR1	0
	H3NR2	0	H3NR2	0
	H5GVR2	0	-	1
Mango	H1BR1	0	-	1
Naranja	H1BR1	0	H1BR1	0
	H1BR2	0	H1BR2	0
Melón	-	0	-	0
	H1NR1	0	H1NR1	0
			H1N1AR2	0
Piña	H1NR2	3	H1N2AbR2	0
			H1NRR2	0
	H1NR3	0	H1NR3	0
	H2BHR1	4	H2BHAR1	0
			H2BHAbR1	0
			H2BHNR1	0
			H2BHER1	0
H2BHR2	0	H2BHR2	0	
Plátano	H1BVR2	0	H1BVR2	0

*Número de hongos contenidos en una misma caja

+Número de cajas eliminadas por ausencia de crecimiento de hongos

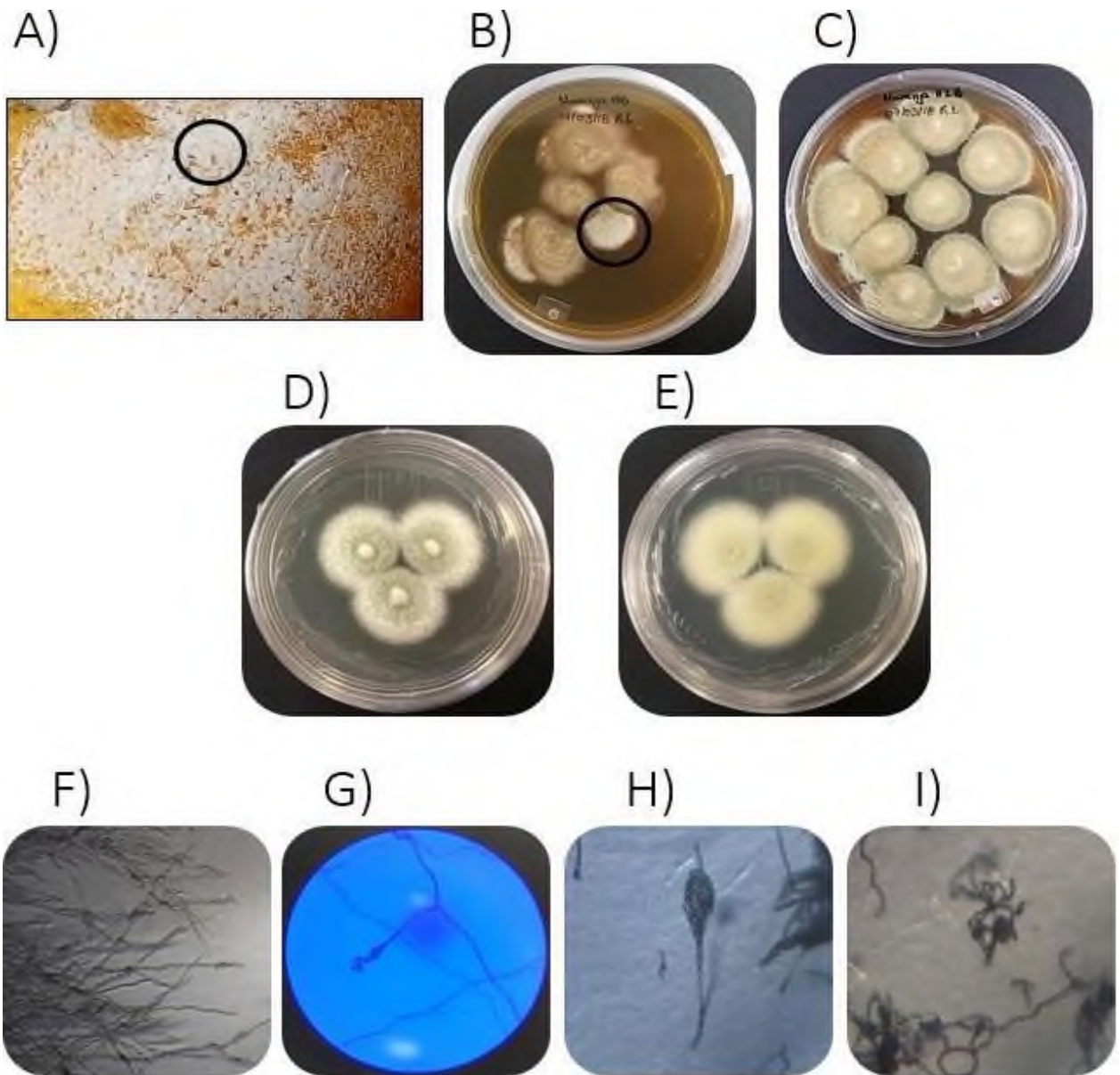


Figura 8 Aislamiento de un hongo de naranja, morfología macroscópica y microscópica del aislado H1BR1. Este aislado se identificó inicialmente como *Penicillium sp.* A) Naranja con infección de micelio blanco, el círculo indica la zona de aislamiento. B) El aislado primario del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo. I) Tipo de espora.

Tabla 21 Posibles géneros de los hongos aislados por cada fruta determinados por microscopía

Fruta	Clave del Aislado	Posible genero
Papaya	H1BR1	<i>Fusarium sp.</i> +
	H1BR2	<i>Fusarium</i> +
	H2VR1	<i>Cladosporium sp.</i> +
	H2VR2	<i>Rhizopus sp.</i>
	H3NR1	* +
	H3NR2	* +
	H4BNR1	<i>Rhizopus sp.</i>
	H4BNR2	<i>Rhizopus sp.</i> +
	H5GVR1	<i>Cladosporium sp.</i> +
Mango	H1BR2	*
	H1BR3	* +
	H1BR4	*
Naranja	H1BR1	<i>Penicillium sp.</i> +
	H1BR2	<i>Penicillium sp.</i>
Melón	H1BR1	<i>Rhizopus sp.</i> +
	H1BR2	<i>Rhizopus sp.</i>
	H2BNR1	* +
	H3NR1	<i>Rhizopus sp.</i> +
Piña	H1NR1	<i>Aspergillus sp.</i> +
	H1N1AR2	* +
	H1N2AbR2	*
	H1NRR2	*
	H1NR3	<i>Rhizopus sp.</i> +
	H2BHAR1	* +
	H2BHAbR1	* +
	H2BHNR1	* +
	H2BHER1	*
	H2BHR2	<i>Rhizopus</i>
Plátano	H1BVR1	* +
	H1BVR2	<i>Rhizopus sp.</i>
	H2BR1	* +

*No se logró identificar por microscopía

+Confirmado su género por secuenciación, ver Tabla 24

Claves de identificación establecidas por Williams-Woodward, 2001

Las muestras no amplificaron por lo que se decidió extraer de nuevo gDNA. La PCR también tuvo varias modificaciones, la primera fue que se cambió el oligonucleótido directo de ITS1F a ITS1 (esto implicó cambiar la temperatura de alineamiento del oligonucleótido de 51°C a 54°C), la segunda fue que el templado se trabajó con diluciones 1:1, 1:10 y 1:100 y la tercera consistió en aumentar el número de ciclos de 35 a 38 (Figura 10C).

Las muestras siguieron sin presentar alguna amplificación, por lo cual se evaluaron los cambios realizados hasta el momento para la PCR, que eran las diluciones del templado, el cambio de oligonucleótido y el aumento de ciclos. A raíz de esto se tomó la decisión de llevar a cabo una PCR de gradiente para probar si la temperatura de alineamiento del oligonucleótido no era la correcta y así comprobar si eso era lo que interfería para la correcta amplificación del ADN. Se trabajó con sólo una muestra para la PCR de gradiente la cual fue H1BR1 Naranja.

En la PCR de gradiente, además de evaluar las diferentes temperaturas de alineamiento del oligonucleótido, se realizaron dos cambios más, el primero fue cambiar la polimerasa ya que era el único componente que faltaba por probar y el segundo fue agregar una dilución más del templado (1:1000; Figura 11). La amplificación de la muestra fue exitosa en todas las diluciones y temperaturas, lo que significa que el cambio de la polimerasa fue un factor determinante para la amplificación de las muestras. Se analizaron las bandas separadas en el gel y se decidió trabajar con la temperatura de 50.8°C para la muestra que faltaba por amplificar. Para la última muestra se decidió utilizar las mismas diluciones del templado que se usaron para la PCR de gradiente, la muestra amplificó en todas las diluciones (Figura 12).

Se tomaron los productos de PCR de la dilución 1:10 para ambos casos, se limpiaron y se mandaron a secuenciar por ambas direcciones.

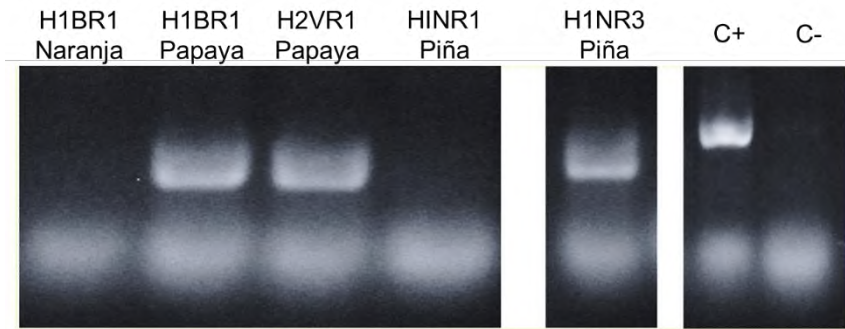


Figura 9 Productos de PCR de la amplificación de la zona ITS con los oligonucleótidos ITS1F e ITS4 en un gel de agarosa al 1%. La primera banda de arriba hacia abajo es la amplificación de la zona ITS, la segunda son los oligonucleótidos que no se lograron utilizar durante la PCR y formaron un dímero. Las condiciones de reacción fueron las de las Tablas 5 y 6.

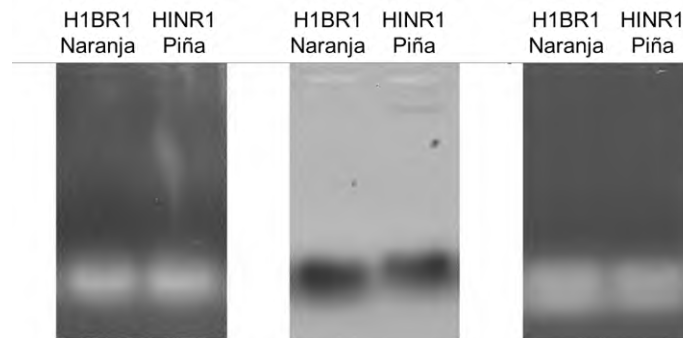


Figura 10 A) Gel de las muestras que no amplificaron en la primer PCR. B) Gel con la dilución del templado 1:10 de la segunda PCR. C) Gel a partir de nuevas extracciones de DNA con diluciones 1:1, 1:10 y 1:100, cambio de oligonucleótido de ITS1F a ITS1 y aumento de ciclos en la PCR. Todos en un gel de agarosa al 1%.

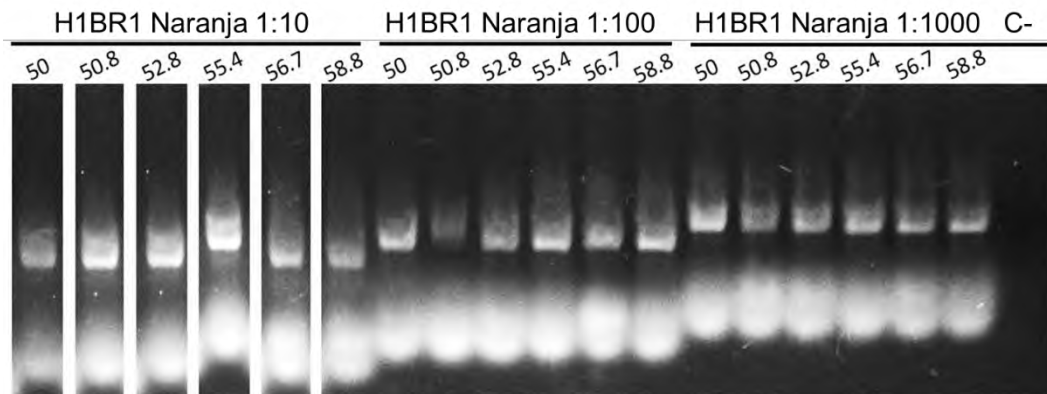


Figura 11 Productos de PCR de la amplificación de la zona ITS con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. Con diluciones del templado 1:10, 1:100, 1:1000, en un gel de agarosa al 1%. La migración de las bandas se observa diferente debido que las muestras fueron cargadas en gels diferentes. Las condiciones de reacción fueron las de las Tablas 7 y 8.

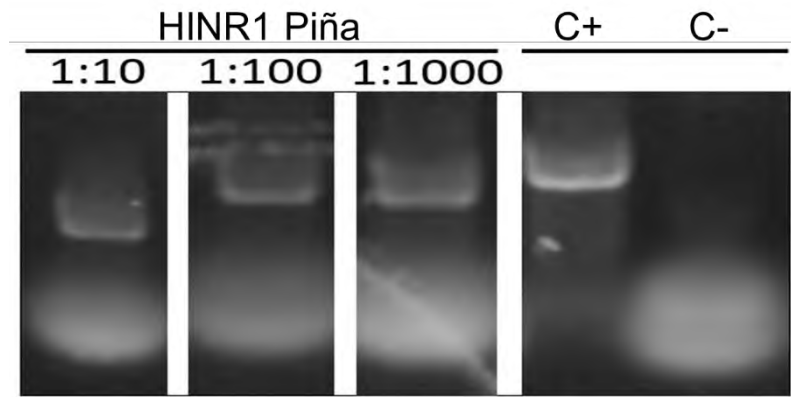


Figura 12 Productos de PCR de la amplificación de la zona ITS con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. Con diluciones del templado 1:10, 1:100, 1:1000, utilizando la temperatura de 50.8 °C resultante de la PCR de gradiente, en un gel de agarosa al 1%. La migración de las bandas se observa diferente debido que las muestras fueron cargadas en geles diferentes. Las condiciones de reacción fueron las de las Tabla 7 y 8.

6.4 Amplificación del gen 18S a partir de DNA extraído con fenol-cloroformo

6.4.1 Extracción de DNA y amplificación de la zona ITS

Los 13 hongos restantes por identificar molecularmente se trabajaron de forma diferente. La extracción del DNA se realizó por medio del protocolo fenol-cloroformo. A dichas extracciones se les realizó una electroforesis para comprobar la presencia de DNA extraído. En la Figura 13 se presentan los geles de la amplificación de la extracción de cada hongo, el gDNA se observa como una banda de alto peso molecular mayor a 10 Kb. La concentración de la extracción de gDNA se observó altamente variable, probablemente reflejando la resistencia a la extracción o la densidad celular de cada especie.

Se consideró que la extracción fue buena en la mayoría de las muestras, sólo en algunas el DNA se percibe un barrido de la muestra. Esto es común en el método fenol-cloroformo pues los solventes (principalmente etanol) pueden afectar la distribución en el gel y la efectividad del tratamiento de RNAsa. Se decidió continuar con la PCR utilizando todas las muestras pero tomando en cuenta la posibilidad de contemplar diluciones para minimizar efectos inhibitorios.

La amplificación de la zona ITS de los hongos se hizo con los oligonucleótidos ITS1F e ITS4 y se presentan en la Figura 14. Se detectó producto de la amplificación en el 50% de las muestras extraídas. Para las muestras que no amplificaron, se decidió hacer una dilución del templado a 1:50 y realizar una segunda PCR.

La dilución del DNA fue una buena opción para que las muestras amplificaran satisfactoriamente (Figura 15). Los productos de PCR se escindieron del gel y se mandaron a secuenciar en una sola dirección.

Tanto el método de extracción por kit comercial, como por fenol-cloroformo permitieron extraer gDNA amplificable por PCR. Así que se prosiguió a extraer el DNA de los hongos restantes utilizando el método de fenol-cloroformo (Figura 16).

Se continuó con la PCR correspondiente, bajo las mismas condiciones con las que se trabajó en las muestras anteriores (Figura 17).

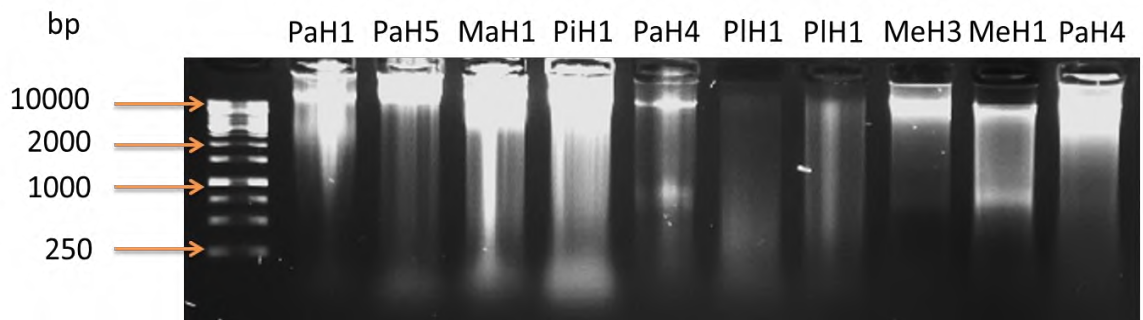


Figura 13 DNA genómico en gel de agarosa al 1% extraído por el método fenol-cloroformo.



Figura 14 Amplificación de la zona ITS utilizando los oligonucleótidos ITS1F e ITS4 bajo condiciones de las Tablas 9 y 10, en gel de agarosa al 1%.

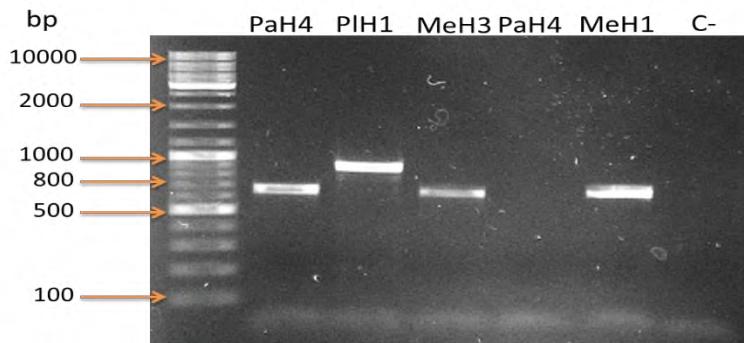


Figura 15 Amplificación de la zona ITS utilizando los oligonucleótidos ITS1F e ITS4 bajo condiciones de las Tablas 9 y 10, muestras diluidas 1:50, en gel de agarosa al 1%.

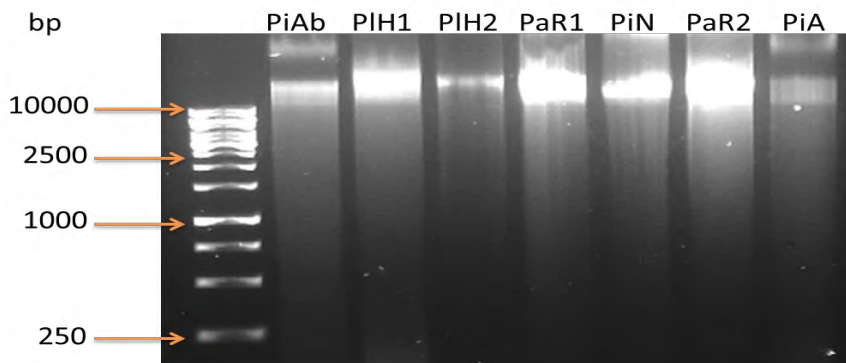


Figura 16 DNA genómico en gel de agarosa al 1% de los últimos hongos por identificar molecularmente por el método fenol-cloroformo.

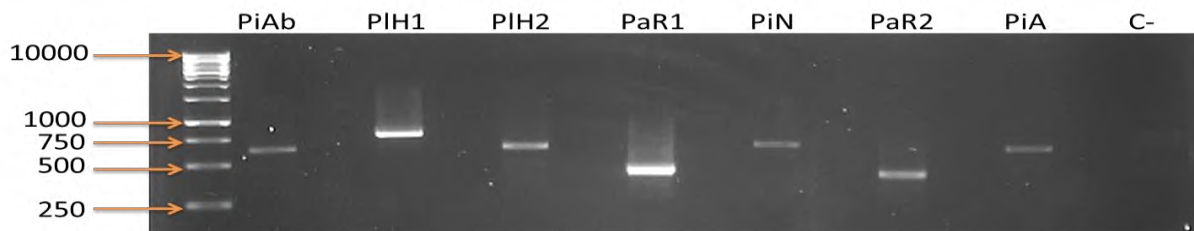


Figura 17 Amplificación de la zona ITS de los últimos hongos por identificar, utilizando los oligonucleótidos ITS1F e ITS4 bajo las condiciones de las Tablas 9 y 10, en gel de agarosa al 1%.

La amplificación de la zona ITS fue exitosa para todas las muestras, cabe mencionar que presentaron diferentes tamaños de la zona ITS (Tabla 22); esto se debe principalmente a la especie fúngica del hongo. Se limpiaron los productos de PCR con el método GeneJET y se mandaron a secuenciar por una dirección.

Del total de 31 hongos aislados individualmente no se extrajo gDNA de 18 hongos debido a que en algunos casos la morfología macroscópica y microscópica de un hongo se repetía en otro aislado de la misma fruta o se encontraba en alguna fruta diferente. En la Tabla 22 se detallan los aislados de los que se hizo PCR del ITS. Se compara la información utilizable para la elaboración de los arboles filogenéticos, que se describen en la siguiente sección.

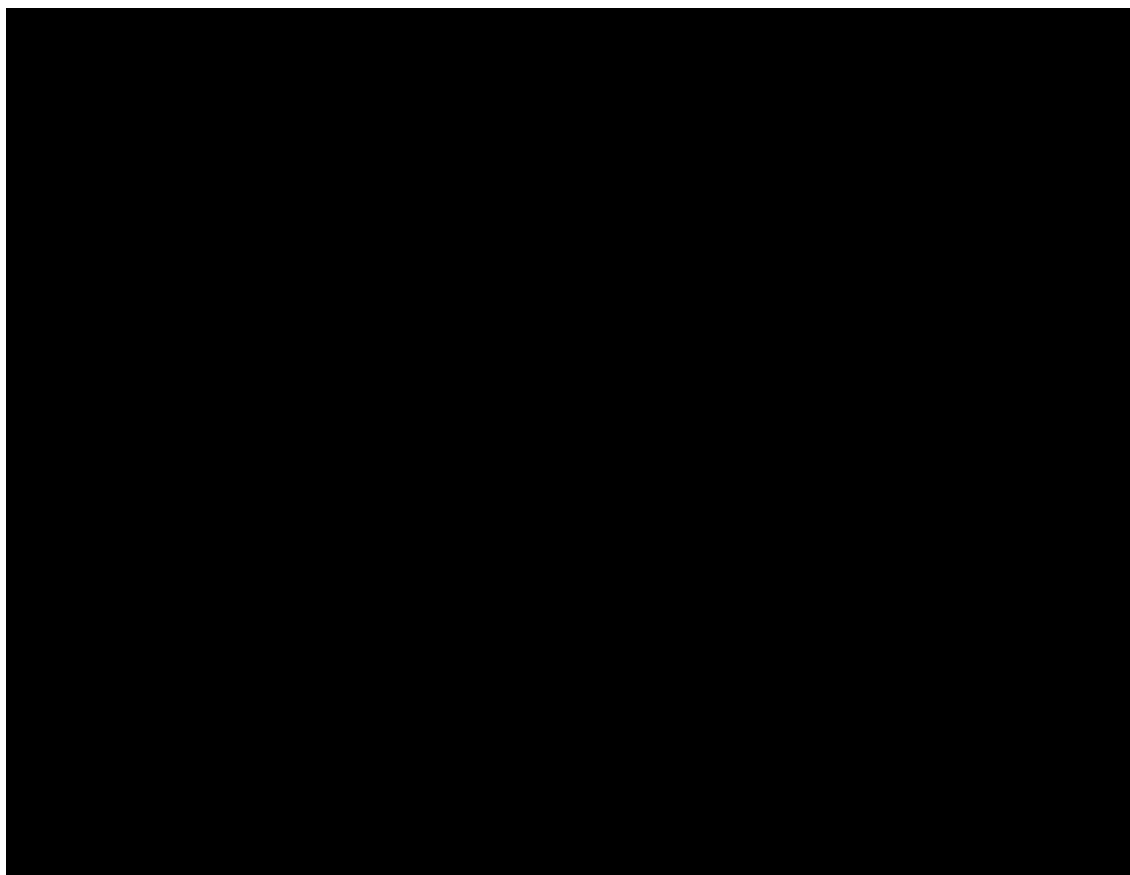
6.5 Análisis filogenético

La secuenciación para los 5 productos tratados con los métodos REExtract-XNAP y ExoSAP-IT fue buena ya que se lograron armar secuencias consenso sin errores internos. Los resultados de Blastn indicaron que en 4 de los 5 casos, los géneros identificados por microscopía fueron correctos (Tabla 23). En el caso del aislado H2VR1 que se pensó era del género *Botrytis sp*, el análisis molecular indicó que el género correcto era *Cladosporium sp*. Este resultado destaca la importancia de complementar los estudios morfológicos con confirmaciones moleculares.

Una vez obtenidas las secuencias del resto de hongos. Se comenzó la elaboración de los arboles filogenéticos con el propósito de lograr identificar género y especie. Se lograron dos tipos de resultados como se muestra en las Figuras 18 y 19, el primero (ejemplificado por *Penicillium digitatum*, HIBR1) donde se obtuvo una buena separación de género y especie con un valor de 98 de bootstrap. Al contrario, el segundo tipo (ejemplificado por *Cladosporium oxysporum*, H2VR1), en el que no se logró identificar una especie, sólo se logró identificar el clado al que pertenece dentro de su género.

Al analizar esta información y consultar la bibliografía se concluyó que la zona ITS por sí sola no es marcador molecular suficiente para la identificación de especies en algunos géneros de hongos (Tabla 22 Bensch *et. al.*, 2012).

Tabla 22 Tamaño de las secuencias de la zona ITS de los hongos para su identificación molecular y la elaboración de su árbol filogenético.



- Hongos tratados por el método REDEExtract-XNAP a los cuales no se les midió el tamaño de banda de la amplificación de la zona ITS.

Tabla 23 Comparación de los hongos pre-identificados por microscopia y los hongos identificados molecularmente

Fruta	Muestra	Hongo preidentificado	Hongo identificado molecularmente (Blastn)
Papaya	H1BR1	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium incarnatum</i>
	H2VR1	<i>Botrytis sp.</i>	<i>Cladosporium oxysporum</i>
Piña	H1NR1	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i>
	H1NR3	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
Naranja	H1BR1	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium digitatum</i>

Para lograr la información de especie en estos casos, se debe de utilizar una combinación de al menos 3 marcadores moleculares como ITS, actina y factor de elongación 1- α (Bensch *et. al* 2012).

La mayor parte de las secuencias se editaron eliminando las primeras y últimas bases de la secuenciación para solamente utilizar secuencias de alta calidad en los alineamientos.

De tal manera, se pudieron identificar 3 patosistemas hongo:planta con certeza estadística suficiente para avanzar al trabajo molecular del diseño de fungicidas dirigidos contra DCL. Adicionalmente, la importancia económica de ellos es destacable, por ejemplo, el patosistema de *Penicillium digitatum* que es el principal fitopatógeno de la naranja con pérdidas millonarias reportadas (Palou, 2014). Otro caso es el de *Lasioidiploidia pseudotheobromae* principal fitopatógeno de mango (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2016) y *Aspergillus tubingensis* que afecta a la piña (Perrone *et al.*, 2007).

El resto de los patosistemas necesita mayor inversión en la identificación molecular del hongo o bien, en la clonación y secuenciación de las secuencias blanco de interés. Este es un problema común en filogenia de hongos pues muchos clados no están claramente diferenciados en especies (Raja *et al.*, 2017) y los depósitos de secuencias digitales aún no cuentan con suficientes registros (Choi *et al.*, 2014).

Se observó que la longitud de secuencia con calidad de señal no presentó un comportamiento uniforme y esto se debe a la complejidad de cada género, la limpieza del método de extracción, el estado del secuenciador y el criterio del analistas para recuperar las secuencias, confirmando la utilidad y diversidad de estas secuencias para la identificación molecular. Una vez que se contó con la identificación de género o incluso de especie, se realizó una búsqueda en la literatura de los diferentes hongos aislados de cada fruta algún antecedente que los reporten como fitopatógenos de frutas, dando como resultado los datos de la Tabla 24.

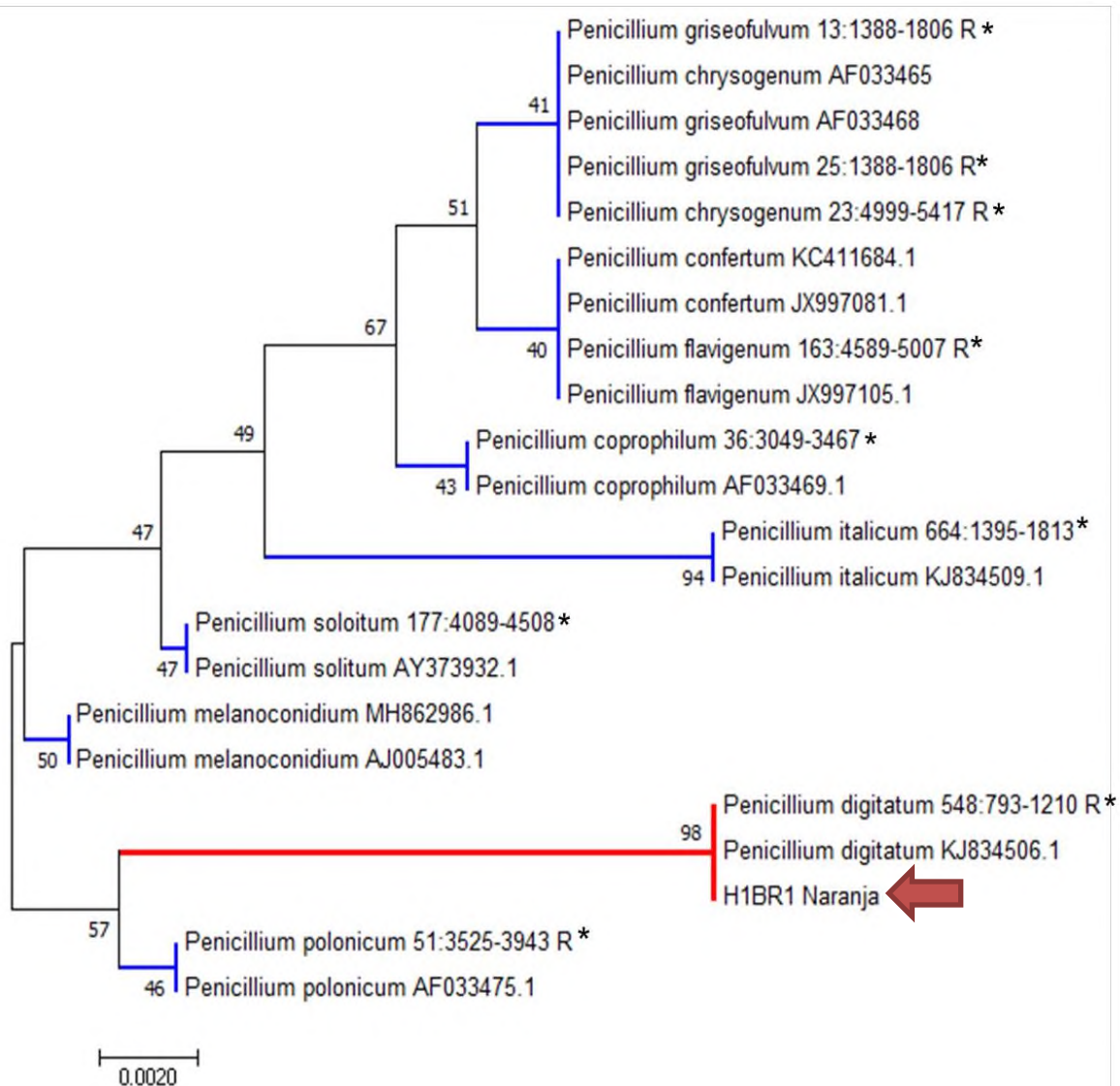


Figura 18 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Penicillium digitatum*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama =0.0403. Códigos de referencia oficial tomados de Joint Genome Institute JGI y Visagie *et. al* 2014. La flecha indica la secuencia obtenida en este trabajo.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular



Figura 19 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Cladosporium oxysporum*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama = 0.0703. Códigos de referencia oficial tomados de Zalar *et. al* 2007 y Bensch *et. al* 2012. La flecha indica la secuencia obtenida en este trabajo.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

Tabla 24 Lista de los hongos identificados molecularmente y su antecedente como fitopatógenos

FRUTA	CODIGO	GENERO	PATOLOGÍA	REFERENCIA
Papaya	H1BR1	<i>Fusarium incarnatum</i>	Fusariosis	Ploetz, 2006, Stepień <i>et. al</i> 2013
	H1BR2	<i>Fusarium incarnatum</i>	Fusariosis	Ploetz, 2006, Stepień <i>et. al</i> 2013
	H2VR1	<i>Cladosporium oxysporum</i>	-	
	H2VR2	<i>Rhizopus oryzae</i>	Podredumbre suave	Kwon <i>et. al</i> 2012
	H3NR1	<i>Geotrichum candidum</i>	Podredumbre acuosa	Thornton <i>et. al</i> 2010
	H3NR2	<i>Geotrichum candidum</i>	Podredumbre acuosa	Thornton <i>et. al</i> 2010
	H4BNR1	<i>Rhizopus oryzae</i>	Podredumbre suave	Kwon <i>et. al</i> 2012
	H4BNR2	<i>Rhizopus oryzae</i>	Podredumbre suave	Kwon <i>et. al</i> 2012
	H5GVR1	<i>Cladosporium oxysporum</i>	-	
Mango	H1BR2	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	Pudrición	Rodríguez-Gálvez <i>et. al</i> 2017, Kwon <i>et. al</i> 2017
	H1BR3	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	Pudrición	Rodríguez-Gálvez <i>et. al</i> 2017, Kwon <i>et. al</i> 2017
	H1BR4	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	Pudrición	Rodríguez-Gálvez <i>et. al</i> 2017, Kwon <i>et. al</i> 2017
Naranja	H1BR1	<i>Penicillium digitatum</i>	Moho verde	Palou, 2014, Louw <i>et. al</i> 2016.
	H1BR2	<i>Penicillium digitatum</i>	Moho verde	Palou, 2014, Louw <i>et. al</i> 2016.
Piña	H1NR1	<i>Aspergillus tubigensis</i>	Pudrición	Al-Hindi 2017
	H1N1AR2	<i>Penicillium simile</i>	-	
	H1N2AbR2	<i>Penicillium simile</i>	-	
	H1NRR2	<i>Penicillium simile</i>	-	
	H1NR3	<i>Rhizopus oryzae</i>	Podredumbre suave	Kwon <i>et. al</i> 2012
	H2BHAR1	<i>Penicillium digitatum</i>	Moho verde	Palou, 2014, Louw <i>et. al</i> 2016
	H2BHAbR1	<i>Penicillium digitatum</i>	Moho verde	Palou, 2014, Louw <i>et. al</i> 2016
	H2BHNR1	<i>Curvularia intermedia</i>	-	Kusai <i>et. al</i> 2016
Plátano	H1BVR1	<i>Anthracocestis cenchrri</i>	-	Begerow <i>et. al</i> 2014
	H1BVR2	<i>Rhizopus oryzae</i>	Podredumbre suave	Kwon <i>et. al</i> 2012
	H2BR2	<i>Penicillium adametzii</i>	Pudrición	Alwakeel, 2013
Melón	H1BR1	<i>Rhizopus oryzae</i>	Podredumbre suave	Kwon <i>et. al</i> 2012
	H1BR2	<i>Rhizopus oryzae</i>	Podredumbre suave	Kwon <i>et. al</i> 2012
	H2BNR1	<i>Geotrichum candidum</i>	Podredumbre acuosa	Thornton <i>et. al</i> 2010
	H3NR1	<i>Rhizopus oryzae</i>	Podredumbre suave	Kwon <i>et. al</i> 2012

Clave de color:

- Reporte como patógeno de frutas
- Reporte como patógeno de cereales
- No se ha encontrado reporte que sea fitopatógeno

Los resultados al momento indican que la estrategia de aislamiento otorga una muestra de hongos reportados como relevantes al diseño de estrategias para la fitoprotección en cultivos de importancia económica. Adicionalmente, proveen de la base molecular para buscar de forma específica en las bases de datos genómicas a los genes blanco DCL con los que se pretende diseñar la estrategia SIGS.

6.6 Genes blanco DCL1 y DCL2 del hongo

Una vez que se identificaron el género y especie de los hongos, se realizó un alineamiento entre las secuencias de las proteínas blanco DCL1 y DCL2 del hongo con las secuencias DCL de la fruta. De tal forma se buscaron las secuencias de DCLs fúngicas, en las bases de datos FunRNA y Uniprot, donde se observó que sólo existen reportes de dicha proteína en 3 de las 11 diferentes especies de hongos que fueron aislados e identificados.

Se encontraron tres patosistemas con suficientes antecedentes moleculares reportados (Tabla 25). El primero es el hongo de *P. digitatum* el cual se aisló de naranja y piña; el caso del patosistema con naranja es de sumo interés pues el principal responsable de pérdidas económicas en dicho cultivo (Palou, 2012, Cerrillo *et. al* 2017) y se tienen reportes de las secuencias de DCL del hongo y la fruta. El segundo caso es el de *A. tubingensis* donde hay secuencias para el hongo y de piña, única fruta de la que se aisló. El último caso *R. oryzae* podría considerarse como un hongo cosmopolita de afectación post-cosecha ya que se encontró en 4 diferentes frutas; piña, papaya, melón, plátano, sin embargo, sólo hay registros de DCL para tres de ellas, estando ausente el de plátano.

El patosistema de *P. digitatum* permite hacer directamente el diseño de un fungicida que podría funcionar en dos especies, mientras que para *A. tubingensis* sería un fungicida para un sólo cultivo. En el caso de *R. oryzae* también podría hacerse un fungicida para múltiples cultivos, sin embargo, sería necesario aislar las secuencias de plátano, que a pesar de ser un cultivo de gran importancia económica para los trópicos, no posee secuencias DCL reportadas en bases de datos.

Partiendo de estos datos, se comenzaron a realizar los alineamientos uno a uno entre los DCLs de los hongos y los DCLs de las frutas. Se encontraron las zonas con menor homología entre ellas para el diseño de los sRNAs, pues no se desea que el fungicida también inhiba al DCL vegetal (Wang, 2017). Los diferentes alineamientos presentaron una localización de alta similitud a lo largo del dominio helicasa C-terminal y el primer dominio de ribonucleasa III (Figura 20). En la Figura 21 y 22 se observa el ejemplo del patosistema *Penicillium digitatum* y *Citrus sinensis* (naranja). No obstante, en el brazo conector entre el dominio helicasa C-terminal y ribonucleasa III, se encontraron zonas potenciales para el diseño de los sRNAs (Figura 20).

Tabla 25 Reporte de las secuencias en bases de datos de la proteína DCL de los hongos y de las frutas (Los códigos de acceso se encuentran en el Anexo 4)

Hongo	# de secuencias de proteína DCL del hongo	Frutas en las que se presentó	# de secuencias de proteína DCL de la fruta
<i>Penicillium digitatum</i>	2	Naranja	4
		Piña	3
<i>Aspergillus tubingensis</i>	3	Piña	3
<i>Rhizopus oryzae</i>	1	Piña	3
		Papaya	1
		Melón	1
		Plátano	-

-No se encontró registro de la proteína DCL

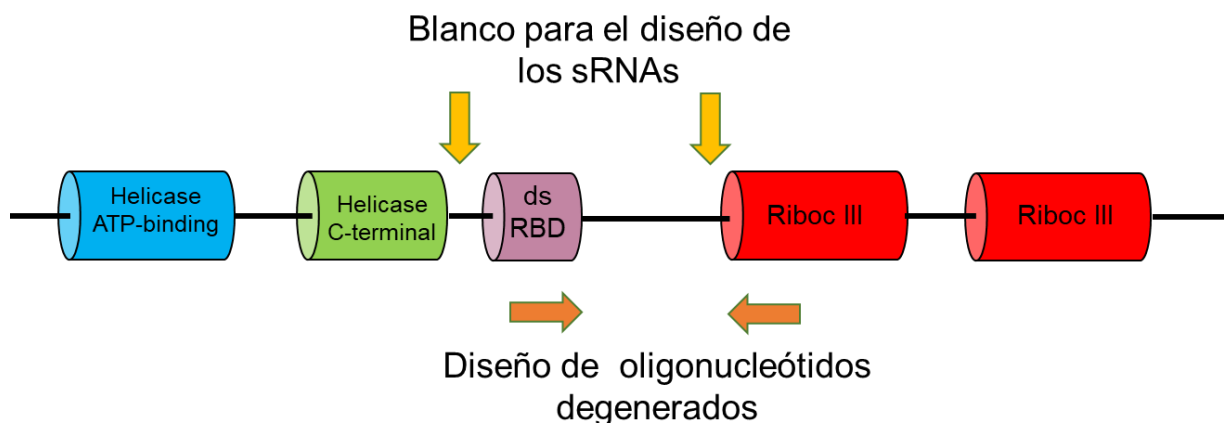


Figura 20 Esquema ilustrativo de la estructura DCL fúngica, mostrando la zona potencial para el diseño de los sRNAs y la zona para clonar y secuenciar de algunos de los hongos que no cuentan con reporte de DCL.

```

Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252  DDDSK-TFVNYFSEKYGIVLIHPGQPLLRLLKQSHNPHNLLVNFDDGGGSG
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90  PLEYS-SYADYYKQKYGVELIFKKQPLIRGRVSYCKNLLSPRFHSEEQ
Dicer2_Penicillium_digitatum_K9G6R2  IMNWSLSLKNRPKFF-NRCIWTQPVLQAEVLCLRRNFLDKMADEEK--
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3  -GSVT-TYKKHYEERYGIQLCFDREPLNRRIRIFVQNYLSKCRQQKQK-
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2  -SDSS-SHVDHLISSYGIHLKHPKQPLLRRAKPLFLRLNLLHNRKLEDSE-
      . . . : . . . : . . . : * : . . . : * *

Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252  KGSKSGMNTKPKQMHVHMPPPELLVRVD--VPTSVVKSLYLLPSVMQRLES
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90  EGEG--EEILDKTYVFLPPELCFIHP--LPGSLVRGAQRLP SIMRRVES
Dicer2_Penicillium_digitatum_K9G6R2  -----LSNSRC-VICPQPLVLT--ISKVAATCFVFP AIIIRMES
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3  -----EPSKISFELPPELCRIIMAPISLSTFYSTFFVPSIMHRLQS
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2  -----SHELEEFDDLPELCLQKIIGFSKDIGSSL LLLPSIMHRL EN
      : * : . . . . * : : * :

Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252  LMLASQLREEINCH-SRNFHIPSSLILEAL TTLGCCE-----
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90  MLLAIQLKDKIN-----YPVPASKILEAL TAASCQE-----
Dicer2_Penicillium_digitatum_K9G6R2  YLIAEEGCKLLGL-----GGIKLEFALEAL TKDSDNTEEHRSLQIHVQRG
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3  LLLAVNLKMLLDHCMQNVTIPTIKVLEAITTKKCE-----
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2  LLVAIELKHLLS-----
      : * : . . . :

```

Figura 21 Alineamiento en proteínas, entre el DCL del hongo *Penicillium digitatum* con el DCL de la fruta *Citrus sinensis* (naranja). En amarillo se resaltan las zonas con menor homología para el diseño de los sRNAs.

```

>Dicer2_Penicillium_digitatum_K9G6R2
MEPEDVTS DLSSDEAATPRLTESHRQRAQNASFTALLEEHVINTPSNSPNGEHVE
VSDAELSTARLLAKTEPGGGVLDPLLDTGSGKTLVAVLLLKHILQMELNKRAGTK
PRVAFFLVDTVTLVFQQS AVLRNLLDQKVAHF FGNLGPDLWDKQ TWDKHLEKY
MVIVCTAILNQSLNQHIRIDQINLLIFDEAHAKKEHPFARIIRDAYLKADENRPI
FGMTASPVD AKCDLAEAAVQLETLLDSRIATTSDLTLLRN FVNKPMEEVWYDKL
PPPSETNLHSTLKT KYGDM LILEGVFRFASVASTELGGWCADQVWALALADEVLP
KLEGSIGKVT DSDPRDSEKASEEIKRIQEASHLVNEYITDRAFMPSDLSPKLELLM
GKLQE QFAKSPDTCIVFTQRRNTAKVMLQLCEKLQIPNLRPEILVGV RKGDAIGM
NSTFRRQFLVLAKFRKSEVNCLFATSVAE EGLDIPDCNLVVRFDLYDTFIQYVQSR
GRARRADSVYATMVECGNRNHSMLRQEVRRAEHLMKNFCNLLPEDRKLYGDG
HDMGVLVHEENRKR TYTVTRTGAMLT YRHAIGVLARFASSLQYENEISAKVTYV
MSENYHFSCEVIMPEKSPVRRVLGCCESKSLAKQSAAFDA LLLRKRNLLEDFH
NSVYHKR L PAMRNAKLAITSKRTDQYKMR TKPSIWARQQGTIPRILYAILRILPSE
PLTRAHGSIVLLSREQITAIPTFPVFLDDDIETT VQSLCIDGCLEVAASEIEVTAFTL
AVFHDFV FHKTYKHVSEQFPYWLVPAREDIDVGMSTSLFDIIDWTALKYVQDNPKL
VWSTDMEPESLLNRFIYDDWNGKYRYFPLAVDPNLRPSDPPPSYAPCRKWSDDI
MNWSLSLSKNSRPKFFNRCIWTQPVLQAEVLCLRRNFLDKMADEEKLSNSRCVI
CPQPLVLTSTISKSV AATCFVFP AIIIRMESYLIAEEGCKLLGLGGIKLEFALEALTKD
SDNTEEHRSLQIHVQRGMGKNYERLELLGDSVLKMAT SISL FVQNPDDDEYDYH
VNRMCLICNKNL FKNATELKL YEFIRSRGFSRHMWYPPGLSLEYGRDHAKFVDSE
GKHSLSSEKTIADVCEALIGASLLSGGDDHRYDMAVKAVTVFVNSQKHTATSWKDY
ISAYSIPLYQKKAADGFEMNLAQQIFEKVGYEFKYPRLLSAFTHPSYPLTWAKVP
CYQRLEYLGDALLDMVCVEHLFHRFPTRDPQWLTEHKMAMVSNKFLGALAVKLG
LHLHLQHFSNPLMIQNSKYAEELQLAESESNGEVNYWLSTSDSPKCLPDMLEAYL
GAIFVDSSFDFTVIEAFFKRHILPFFHDMSIYDTFANRHPTT

```

Figura 22 Secuencia en proteínas del DCL del hongo *Penicillium digitatum*, resaltando las zonas para el diseño de los sRNAs. Presentadas en la Figura 19, de color rojo los dominio RNase III (984 – 1136) (1187 – 1338, de color azul el dominio Helicase ATP-binding (81 – 249), de color verde el dominio Helicase C-terminal (385 – 551) por ultimo de color morado el dominio Dicer dsRNA-binding fold (584 – 674).

Estos datos indican que se puede considerar realizar alineamientos con más de dos frutas como sería el caso de *P. digitatum* y *R. oryzae* los cuales están presentes en la frutas de naranja, piña para diseñar un fungicida para múltiples cultivos. De tal forma, se tienen dos enfoques que se le pueden dar al diseño de los sRNAs, un diseño general de sRNAs dirigidos a un número definido de hongos de diferentes géneros y especies o un solo diseño específico dirigido a un género y especie de hongo definido.

Estos resultados de alineamiento con organismos que poseen secuencias de DCL reportadas, permiten sugerir una estrategia simplificada para secuenciar zonas susceptibles a un diseño SIGS. Para los hongos que no cuentan con un reporte de la proteína DCL, la estrategia a seguir sería diseñar oligonucleótidos que amplifiquen solamente la zona entre los dominios helicasa C-terminal y primer dominio de ribonucleasa III (Figura 20) para después clonarlos y secuenciarlos para poder diseñar los sRNAs. El caso de mayor interés que presenta este estado es el de *Lasiodiploidia pseudotheobromae* con *Mangifera indica* (mango). Esta estrategia permitiría evitar la clonación del DCL completo (superior a 3000pb genómicas) y enfocarse sólo en zonas de baja identidad.

Debido a la diversidad de géneros y especies que se encontraron en este trabajo, se puede predecir que el diseño de un fungicida de RNA multiespecie podría lograrse con una inversión de secuenciación dirigida lo que implica un reto no reportado al momento, pues sólo hay publicaciones sobre fungicidas monoespecie (Koch, et al., 2016). Este último esquema es el que se siguió para el resto del trabajo.

6.7 Diseño de los sRNAs

Existen varias metodologías para diseñar construcciones genéticas que permitan la síntesis de sRNAs *in vivo* o *in vitro*. La generación *in vivo* es característica de la tecnología HIGS por medio de eventos transgénicos in planta de estructuras tipo hairpin (Weiberg *et al.*, 2014) o a través de sistemas bacterianos de biosíntesis de sRNAs a través de mutantes en las rutas de degradación de RNA (Ahn *et al.*, 2019).

Los sRNAs funcionales son de un tamaño de 21-24 nt y también se pueden generar a través de kits de transcripción *in vitro* que producen los sRNAs a partir de un RNA de

doble cadena (ds-RNA; Wang *et al.*, 2016).

En este trabajo se optó por la opción preparativa para construcciones *in vitro*. No obstante, el trabajo bioinformático aquí reportado puede ser la base para hacer trabajos *in vivo* en el futuro.

La estrategia a seguir es clonar en DNA la secuencia de un ds-RNA, que resulte de la unión de la secuencia seleccionada de menor identidad del DCL1 y DCL2 fúngicos con los DCLs de la planta. Posteriormente, hay que incorporar dos características particulares para operaciones subsecuentes, la primera es añadir los promotores T7 en cada uno de los lados del ds-RNA, ya que sin ellos la transcripción *in vitro* no se podrá llevar a cabo, y la segunda es que el tamaño mínimo del ds-RNA sea de 400 pb lo que significa un mínimo de 200 pb por cada secuencia seleccionada de los DCLs, ambas condiciones son necesarias para el buen funcionamiento del kit de procesamiento enzimático.

De los 3 diferentes patosistemas encontrados con suficiente información genética depositada, se eligió trabajar con el patosistema de *Penicillium digitatum* y naranja.

Para la producción de los ds-RNA se realizaron alineamientos, pero ahora utilizando nucleótidos de las secuencias de los DCLs fúngicos (Figura 23 y 24). La guía racional de la ejecución fue el reporte de Wang *et al.*, 2016 para ds-RNA diseñados contra los hongos *Botrytis cinerea* y *Verticillium dahliae*.

En la Figura 21 se puede apreciar el alineamiento entre la secuencia blanco *P. digitatum* y las secuencias de naranja, localizándose entre los dominios Helicase ATP-binding y Helicase C-terminal. En esta tesis se observó que, la estructura del DCL1 de *P. digitatum* es muy similar a la estructura del DCL1 de *B. cinerea* exceptuando que *P. digitatum* cuenta con un dominio extra llamado DRBM. Esto no significa un problema ya que este dominio extra se encuentra casi al final de la proteína (Figura 25). En el caso del DCL2 de *P. digitatum* se decidió utilizar el diseño aplicado a *V. dahliae*, debido a que la estructura también carece de los dos dominios de helicasa. Así, la secuencia blanco seleccionada se estableció entre el dominio Dicer dsRNA-binding fold y el primer dominio de RNase III como se muestra en la Figura 26.

Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252	ATCAA-AGTTTTGTGGT--TCGGA-TTT-----AA---AAGG----	Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252	CG-AAGATTTGTATT--G-CCTCGATGAGCTGGTCTCATTA-TGTGCTT
Dicer1_Penicillium_digitatum_K9G6R2	ACCT---G---CATAGTACCTGAAAC-----A----AAGTATGG	Dicer1_Penicillium_digitatum_K9G6R2	CTGGAGG-GCAGCATC-----GGCAA----AGTCACCGATTCTGATC
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90	AGCTGCAAGCTTGTGGT--CCCTT-CATGAACAATTAAGCAAAATG---	Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90	TG-AGGGTATCAATTATGCTCTTGGTGAACCTGGGTCAGTGG-TGTGCTT
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3	CGATG-AGATTCCACAT----GC-TTT-----GT---ATAC----	Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3	CA-ACCTTGTATTATT--G-TTAAAGTAGCTGGTGTGG-TTGGCAT
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2	ATCA--A---TATGGT--CCTGT-TAT-----A----AAGC----	Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2	AT-AGTATGAAATTTT---GTTTGGAAAACTTGGAGCTCTGT-GGAGCTC
Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548	ATCAA-AGTTTTGTGGT--TCGGA-TTT-----AA---AAGG----	Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548	CG-AAGATTTGTATT--G-CCTCGATGAGCTGGTCTCATTA-TGTGCTT
	* * *		* * *
Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252	GAAAT-----TG--GAAG-T-C----TCATGG-TCTAAGTT----TGAT	Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252	ATGAGGCT-GTTAAA-ATCTGCCTAGAG-----AAAGTCTGA-AAG
Dicer1_Penicillium_digitatum_K9G6R2	GGATA-----TG-----C----TGATCC-TTGAAGGC----GTAT	Dicer1_Penicillium_digitatum_K9G6R2	CTCGGGAT-TCTGAA-AAG-GCCTCGGA-----GGAGATCAACGAA
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90	GAAGTGGCTGTTGAAGAAGCTGCTCAATCAAGC-TCTAGGAGGAGCAAAAT	Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90	ACAAGTA-GC-ACA-ATCTTTTTGACAGCCTTCCAAAATGATGA-GAG
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3	CCACT-----TA--G-----C----TGATGA-ACTGGCAA----TGAT	Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3	TGAAAGCT-GCAGAG-ACC-----ATAT-----CATGCTATGA-AAG
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2	ACACT-----TCTA---GCT-C----CTATGTGACTTGTAG---T----	Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2	TGCATGCTAGT-TACATTCT--TTGAGTG-----GCGAC-GAG
Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548	GAAAT-----TG--GAAG-T-C----TCATGG-TCTAAGTT----TGAT	Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548	ATGAGGCT-GTTAAA-ATCTGCCTAGAG-----AAAGTCTGA-AAG
	* * *		* * *
Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252	GCTTCATTAT-----CAA-AGTTGCAAGGGTACAGCTAAAT---GTT	Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252	CCCAAG--AGGAGTGTGAAATTTATAGACAGAGTT--CACTG--CACT-
Dicer1_Penicillium_digitatum_K9G6R2	-TTCGATTTG-----CATCGGTTGCAAGC-ACAGAATTAGGTGGTGGT	Dicer1_Penicillium_digitatum_K9G6R2	TCCAAG--AAGCCAGCCA-TCTTGTCAAC-GAATA--CATT--CAGA-
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90	GGCAATTTATGGGAGCTAG-AGATGCTGGGGCCAAAGGAAGAGCT---GCG	Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90	GGCAAACTACCAGCTGATGCAAGTCCAGGAATCCTACCT--CACT-
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3	-----AGAAT-----TAA-AGCATACTGATCATTGGAAAAAT---TGG	Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3	TGACTT--TTTTGCTGGGAACAATTGGATGGGTT--TGTTGAGACAATC
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2	-----G-----A-GCA--ACTTGCA-----GAGATAAAC---GTG	Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2	ACCAT--GAGGAATGAGTAAAT-AGAAGCAGAAGGAA--AT-----A-
Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548	GCTTCATTAT-----CAA-AGTTGCAAGGGTACAGCTAAAT---GTT	Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548	CCCAAG--AGGAGTGTGAAATTTATAGACAGAGTT--CACTG--CACT-
	* * *		* * *
Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252	ACAAAGACATGGATG---ATAAACACAAGACACT-ACGGAAGCAGTTATC	Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252	-GTAATAT-TTCTT-----GAGGAAGTATTAC--A-----TGTAAT
Dicer1_Penicillium_digitatum_K9G6R2	GCGCAGACCAGG--T---ATGGGCTCTG-GCTCTGGCCGACGAAGTG--C	Dicer1_Penicillium_digitatum_K9G6R2	-CCGGGCAT-TTATGCC-----GAGT-GATCTCAG--T-----CCCAAA
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90	CCAAGTTTATGGTGTATCTGAAAGAACAAGAAAGT-GACGAGCTGCTAAT	Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90	-AAAGTTGTCTCTTTTACAAATGCAATAGTA--GAAGGTGCTGATC
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3	--ATCTGAATGAAGC---TCAAGCGGAA-TTAAT-AAGGAAGAAAGTATC	Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3	ATTA AAAAG-TCCGTG-----TCAGATCATCTC--A-----GGCATT
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2	AGCAGTACAT----ATC---AGCAC---TTAGT--AGGAAGCTGC---A	Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2	-CCAT-TGATGACTCTT-----ATGTAGATTTGCATCCCA--GGCTC
Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548	ACAAAGACATGGATG---ATAAACACAAGACACT-ACGGAAGCAGTTATC	Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548	-GTAATAT-TTCTT-----GAGGAAGTATTAC--A-----TGTAAT
	* * *		* * *
Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252	TGATTACCA-----TG	Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252	TGATTACCA-----TG
Dicer1_Penicillium_digitatum_K9G6R2	TG---CCCA-----AG	Dicer1_Penicillium_digitatum_K9G6R2	TG---CCCA-----AG
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90	TTAATACAA-----AAGT	Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90	TTAATACAA-----AAGT
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3	AAAAATAAA-----TT	Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DVW3	AAAAATAAA-----TT
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2	TGATCATCAAAGTCTTCGCAACACAAGCAGCTCAACCGATTGCATG	Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2	TGATCATCAAAGTCTTCGCAACACAAGCAGCTCAACCGATTGCATG
Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548	TGATTACCA-----TG	Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548	TGATTACCA-----TG
	*		*

Figura 23 Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de la región seleccionada entre dominio Helicase ATP-binding y Helicase C-terminal de las secuencias fúngicas de *P. digitatum* (DCL1) y vegetales de *C. sinensis* de sus proteínas Dicer, marcado en amarillo la secuencia seleccionada para la producción del ds-RNA.

```

Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252 -----AAGG--GGG-----TTG-----ATGAATGGGAT
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90 GAGACCGGGGCAGGGAAGACGCTAATAGCTGTTCTTCATTAGAAAT
Dicer2_Penicillium_digitatum_K9FEN6 -----TCC-----AT
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DWN3 -----ATGG--GAG-----TTG-----ACTTCTGGGAT
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2 ---TCAAAG--CGC-----TTG-----AAG-----AG
Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548 -----AAGG--GGG-----TTG-----ATGAATGGGAT
*

Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252 TCACAGTG-CT-----GGCAAA--AAGAAATTA-----
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90 CTGCAATG-ATTTGCAAAGGCAAAACAAGAAATGCTTGCTGCTTTTG
Dicer2_Penicillium_digitatum_K9FEN6 CTATCGTG-CA-----AGCTGC-----
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DWN3 GGTGCTAC-AT-----GGAAGG--AAGAAATGAG-----
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2 CCATGTGACT-----GGGAAA--AAGAAATCGA-----
Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548 TCACAGTG-CT-----GGCAAA--AAGAAATTA-----
*

Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252 -----TA-AG-----AATGATG-----
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90 GTTCCATAAGTCCACTGGTGTATCAGCAAGCTGAAGTATTCTGTGAGCA
Dicer2_Penicillium_digitatum_K9FEN6 -----G-----GAGC-----
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DWN3 -----CA-AA-----CAGGAGGT-----
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2 -----CC-AA-----TATGAGGT-----
Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548 -----TA-AG-----AATGATG-----
*

Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252 -----ACTGGTTATG-----ACCC-----CTCAAATTC-C
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90 AACCGGTTACGTGGTGGGCCATTATTGTGGTGAATGGGGCAAGATTT-C
Dicer2_Penicillium_digitatum_K9FEN6 -A---GTATG-----ACCC-----TT-A-----
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DWN3 -----ACTGTGATG-----ACAC-----CTCAGATTTT-G
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2 -TCTTGTATG-----ATCC-----CTCAAATACTAC
Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548 -----ACTGGTTATG-----ACCC-----CTCAAATTC-C
*

Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252 TTGGATGCCTTGAGGA-A-----GG-----
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90 TTGGATGCTCAAAGGT--GGCAGCGTGAGTTTGACACAAACAGGTTTA
Dicer2_Penicillium_digitatum_K9FEN6 -TGTAGACCTTGACAA-A-----GG-----
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DWN3 CTTGATGGCTTGAGGCTCA-----GC-----
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2 TTTATGTTTATATCA--C-----CG-----
Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548 TTGGATGCCTTGAGGA-A-----GG-----

Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252 -----C-----ATTC--TTGA---GTCT-AG-----AT-----
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90 GTGATGACAGCTCAAATCTGTTGAACATTCTGAGGCACAGCATAATTA
Dicer2_Penicillium_digitatum_K9FEN6 -----C-----T-G-----
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DWN3 -----T-----ATTT--TAA-----ACT-AA-----AC-----
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2 -----G-----TTTTA--TCAA-----GAT-GG-----AG-----
Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548 -----C-----ATTC--TTGA---GTCT-AG-----AT-----
*

Dicer1_Citrus_sinensis_A0A067G252 ATTGT--ATGCT-----TCATTG-TGATAGTAGTGCATCATGC--
Dicer2_Citrus_sinensis_A0A067HF90 AATGG--AAGCAATCAATCTCCTTA-TTCTTGATGAGTGCATCATGC--
Dicer2_Penicillium_digitatum_K9FEN6 -----GGCT-----TC--G-GGTCAAGTG--TGCC-----
Dicer3_Citrus_sinensis_A0A067DWN3 ATGATCAAGGTT-----TTA-A-TACTTGATGAATGCCATCATGC--
Dicer4_Citrus_sinensis_A0A067F7B2 -CTAA--TTGCT-----CTTTGATCTCGATGAGTGCATCATGCCTC
Dicer5_Citrus_sinensis_A0A067G548 ATTGT--ATGCT-----TCATTG-TGATAGTAGTGCATCATGC--
*

```

Figura 24 Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de la región seleccionada entre dominio ds RBD y Rinonucleasa III de las secuencias fúngicas de *P. digitatum* (DCL2) y vegetales de *C. sinensis* de sus proteínas Dicer, marcado en amarillo la secuencia seleccionada para la producción del ds-RNA.

Dicer 1 (1372aa) (4119nt)

RNase III (984 – 1136) (1187 – 1338) (Rojo)

Helicase ATP-binding (81 – 249) (Azul)

Helicase C-terminal (385 – 551) (Verde)

Dicer dsRNA-binding fold (584 – 674) (Morado)

>Dicer1_Penicillium_digitatum_K9G6R2
 MEPEDVTSLSSDEAATPRLTESHROAQNASTFALLEEHVINTPSNPNGEHVE
 VSDAELSTARLLAKTEPGGGVLDPLDTSGGKTLVAVLLKHILQMLNKRAGHTK
 PRVAFVDTVTLVFQQSAVLRNLDQKVAHFFGNLGPDLWDKQTDWKHLEKY
 MVVCTAEILNQSLLNGHIRDQNLIFDEAHAKKEHPFARIIRDAYLKADJENRPR
 FGMATSPVDAKCDLAEAAVQLTLLDSRIATSDTLRNFNKPMVEVWYDKL
 PPPSEKTLHSTLTKYGDMLILEGVFRFASVASTELGGWCADQVWALADEVLP
 KLEGGISGKVTSDSPDSEKASEEIKRIQEAHLVNEYTDRAFMPSDLSPKLELLM
 GKLEQFAKSPDKVFTQRRNTAKWMLQLCEKQIPNLRPEILVGVYRKGDAIGM
 NSTFRQFLVAKFRKSEVNCIFATSVAEGLDIPDCNLVRFDLVDTFIQVYQSR
 GRARRADSVYATMVECGNRNHSMLRQEVVRAEHLMKFCNLLPEDRKLVDG
 HDMGVLVHEENKRYTYVTRTGAMLYRHAIGVLAARFASLQYNEISAKVTYV
 MSENESFCEVMEKSPVRRVLCGCESSKSLAKQSAADFAGLLRKRNLDFH
 VYVYHRLPAMRNAKLAITSKRTDQYKMRTPKPSIWARQQGTPIRILYAILRIPSE
 PLTRAHGSVLLSREQIATPFVFLDDDDIETTVQSLDGGCEVASEEIVTAFPL
 AVFHDVFKTYKHVSEQFPYMLVPAREDDIVGMSTSLFDIWDVETALKYVQDNPFL
 VWSTDMEPESLLNRFYDQWNGKRYRFPYLDVPLNRPSPDPPSPYAPCRKWSDDI
 MNWLSLKNRPFKFRNCIWTQVLOAELVCLRRNFLDKMADEEKLSNRCVI
 CPQPLVLSISKVAATCFVPAITRMESYLAEEGCKLLGGIKLEALEALTKD
 SDNTEEHRSLQIHVQRGMKRYERLELLGDSVLMATSIISLVQNPDDDEYDHY
 VNRMLCNKLNLFKNATELKLVEFIRSRGFSRHMMWYPPGLSLEYGRDHAKFVDS
 GKHSLSKTIADVCEALIGASLLSGDDHRYDMAVKATVFNVSQKHTATSMKDY
 ISAYSIPLYQKKAADGFEMNLAQQIFKVGVEFKYRLLRSATHPSPYPLTWAKVP
 CYQRLEYLGDALLDMVCEHLFRFPTRDPQWLLTEHKMAMVSNKFLGALAVKLG
 LHLHQHFNPLMIQNSKYAEELQLAESSENGEVNWLSTSDSPKCLPDMLEAYL
 GAIFVDSDFTVIEAFFRKHILPFFHDMISYDTFANRHPTT

Dicer 1 (1968aa) (5,907nt)

RNase III (1500 – 1611) (1662 – 1825) (Rojo)

Helicase ATP-binding (518 – 701) (Azul)

Helicase C-terminal (853 – 1021) (Verde)

Dicer dsRNA-binding fold (1054 – 1144) (Morado)

DRBM (1856 – 1927) (Rosado)

>Botrytis_cinerea_DCL1_A0A384JZT2
 METNRNQQTRKGVTPSAEEDLLSDFDVIIVAVPPTILSSVAPYTSRDKIPASGN
 GDAIADVSSGYLKQATVSSHSAQVRSSNGQDAKSSPSSDKLDFVGPPL
 GDEPFKFNKSYFRDSSLFAGQPTFNGLSSLVIVTAKPLLEASLVEDESLSR
 SSPDLQIGTPKQNLKPEEREKAKTLQIHASKNSSSFAFLSNLFPSSSLPRTTG
 GLSNRASSMENSRTLDPKLKVINNHQGEQFOEASRTGIPQADTFDKSSLAK
 TADMDSLSPVSHHADVLAATVYAGHSAIAAQNAAGSSKMPGPEAFLLAEKDEAGS
 PVVLSGANQIPSGNISQLDPSLENHSPVTPINKVPTFALSRTTDDVFAEL
 RRLPHQAIQSQIDIKTSSCVDSYNTNDEILDNNGSNOKDLHVVEKDEKEEEE
 DMNQAIPIKRISARKQNAAFVFLKEATLKPTEKTSHANDEAIQSTRWLDGA
 EKQHIESPRDYGLELFEKAKKONIAVLDTSGSGKTFIAVLLLRWIDQELDRIGKP
 HRVSVFLVDSVTLHQHQHSLNRNLIQPTDMICGLMGTDLSHHIWKRRLDTNM
 VIVCTAEILRQCLHFSFVTMAQINLLIFDEAHAKKDHYPYARIKDFYRNDTEKDIAL
 PKIFGMTASPVARDNRVYKAAEELEGLLHSDICTAEDPSLLQYSIKGKPETLAYYD
 PLGPKFNTPLYLOMLPLLNKDNPIFRKPFVFGTEASRTLGSWCVQDQIWTFCLEEE
 SKLQARTEQAHKKRVPLEPLEKREKQLEQAKSIVENHTFEPHPFASRLDD
 FTKVHYSNLLSTKVALLSILKDRFORPTNDKCVFKERYTARLLASLSTPEAG
 TPLKAAPLVGTTSASAGEMHITFRSQTLTMHFRNGKINQLIATSVAAEEGLDIPD
 CNLWVAFRLNTVIQISRGRARHINSYHMVESHNEEQIRTIKELKHEKMLK
 LFASALPEDRKLGNFNMDYFLRKRGRHRYVPVNSDAKLYRMSLTVLSAFVD
 SLPRAPESLVRDYYVTVTDKQFICEAILPEEAPIRGAIGRPAATTKQVAKCSAAFET
 LILHQYQINDYLLSTFKRSAHMMRNALAVDGGKQOEAYDMQTKPTLWSSKGG
 QGIVFTVLSLSPDNLDRASQPLGLTRSPDLPEFLVHFGAGRNPSCTCVPL
 ASSITLKNKLDQVMFTLCLFDQVFSKAYKSDPDSMPYFLVPLNCLNAVDWKSQ
 NPMSHDWEVYQDFENKQADKWEHPKWLKPDYDFKDFDTPDFDGSRLK
 WSVGITKEYPLDPPVNTAPRKGARKNSNIMESYCSLWAKARAKRTFDEEQP
 VIEATYLSLRNLLDEFDGGELLETKKCFIILEPLKVSPLPTVAVAMAYLLPAIHRVE
 SYLALAEATLLHDIRPDLALEAVTKDSNSGHEGEEQTFGRGMGNVYERLEF
 LGDCFLKMGTSISLGLNPDSEFRYHVDVDMCLCNKLNLFNTALKLELHYKVRSA
 FNRRAVYVEGPELLRGKTATAPNTHLGDKSVADYVCEAMGAALLSHHESKMD
 NAVRAVTEVNSDHNNAVWSDYVYKLYEKPWQATATAAQIDMARQVEMKHP
 YHFKHPRLLRSAFIHPAYLFIYEQIPYQRLEFLGSLDLMACVNFLLHNNHTRQDP
 QWLTEHKMAIVSNQFLGALCVKLGFKHLLTLDSSQVKMIADYSSDINEALIQAKT
 DAKRVGKVEDDYARDYVIAVRQPKCLPDIVEAFIGAIFVDSYDYGEVEKFFEM
 HIRWYFEDMGYDTYANKHPTTFLNFKMNGCEDWAPVSKVEVPGEDGRKNVY
 VCGVHIHNKVVSTATAESMRYARYGAARNALRLEGMVSVREFRDEYGCSCGSDV
 VDEEGNIEFVEREDGMEGIGMGY



Figura 25 Comparación de la estructura entre los DCL 1 fúngicos de *B. cinerea* y *P. digitatum*, resaltando en color amarillo la zona utilizada para el diseño de los ds-RNA de *B. cinerea*, con base a esa zona se presenta de color amarillo la zona seleccionada en *P. digitatum* para el diseño de su ds-RNA.

Dicer 1 (1563aa) (4725nt)

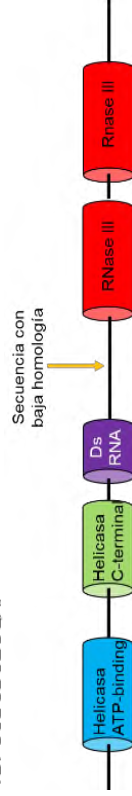
RNase III (1072 – 1221) (1272 – 1431) (Rojo)

Helicase ATP-binding (154 – 336) (Azul)

Helicase C-terminal (477 – 638) (Verde)

Dicer dsRNA-binding fold (669 – 758) (Morado)

```
>Verticillium_dahliae_DCL1_G2WQ29
MTTDELSVGLDATGISILADGPNISSTSTTGKEDGYLCINRFTQNTATTQDN
QSRSDDEDCGSHDEADEDSDERQYSMTPEPHKITEKRRADHAAAFHDWLQ
SNSEIAQSTPQAGNLNHTSTALMVRSENRKIENPREYQIELFERAKRNIAIV
LPTGSGKTLAALLRHTEQETADRAAGPKRIAFFLVEKVALALQQHVAVLECNL
EFPIDRVCGDMVRSDWIKESWMMKRWDMMVMVCTAAILQQCLARSFIRMDQNIL
LVFDEAHAKGNHPYARIKIYYITPEDKERRPKIFGMITASVPVDALTDVKIAAAGLE
GLLHSEIATIEEDSVFKIQIKEVVEQDCKYPALPEPFTTNLHKKIQEQVRYKNF
AKALNSLMSSSLGWSVDRFWQIFLTEETLARLAAQADNIFADRAEKERVA
IEEVRNIIKHQFLPTIKTLQDLSSKVLCLLGOLELRFSAPTHKGIIFVEKRNAMIL
AHLLSLPGIGPLYLKPAAALVGNPSDMSPLAMISYKEQVMITTKFRRRGEYNCLLATS
AEEGDIADCNIVIRFDLFSNVIQIQSGRARHLNSEYICMAELNGKXHTRAKIQG
VLSNFASSLQWNETLSPSYMVSIGSEYICEVQLPSKSPILSVSGTLQKNKAEAR
CSAAFEMCKLKGFFISSHLQPTFTRKLPAMRNARLAISSKKRERYNMRVKPEV
WSRRGPASSLTLVLRTPGALNRPSQPLALLTREALPELPGVPLFFGNCGRSI
AEVSWAKPMHLEVRDLSRFTLRIFKDFVSKYDQVADLPYFLAPAAHDHS
HEFSPNEDPGSLIDWSHLLSTKEVEYLPWIDEDHSPFYQSKFVIDPYTGSRKLFL
RGIRTLKPTLDVDPGPEPTFRLWKEVHEITKEYSISLWAKSRARAGEWLDTQ
PVVEAELVSRRLNDEFADSKHEGSRVCYVILQIQLTLPVWEVAMAYNFPPIH
RIESNIALDACRMLNLRVRPDALAEAMTKDSSNSEEHDQEKIDFQAGMGNNEY
RLEFLGDCFLKMATIALTRIPDSNEFECHVERMLLINCQNLFNVALKKNLQEVIR
SKQFDRRSWYPQGLKQKAGKAQAGNSHSLADKSIADVCEAIIIGASYLSYTDDEG
NFDMAVRVAVVRNKNHDMKSYEDYYKAFKMPWQAAEPQAVQMEASLQIKE
QMGYEFKSPALLRSFAFKHPSYPRQFESVPNYQRLEFLGDALLDMVCVDFLRFK
PDADPQWLTEHKMAMVSNHFLGSLSVELGFYRRVLFHNSIMANQIKDYDALTH
ARQEAEAQAQISGTSRDYMLNWKHPKFLSDVWEAYIGAIFVDSGYDYGGQVAF
FEKHIRPFADMALYDSFASSHPVTLARMMQQDFGCQDWRLLYSELPPSCEDG
GAAAITETEVCIGFMVHGRILLHAKSSGRYAKVGAAKRAVEKLMGLGNDKVEFR
TDFGCDDCCEGQAI
```



Dicer 2 (796aa) (2391nt)

RNase III (340 – 470) (509 – 692) (Rojo)

Dicer dsRNA-binding fold (1 – 73) (Morado)

```
>Dicer2_Penicillium_digitatum_K9FEN6
MFSFQNSVGLLLGTVLPNSVHPTVRRRTNGKAWWRTERAARKETAFOAYKALH
SYGLVNDNLLPLTRKPELRFSDQTTLPSSIVQAAEQYDYPYVDLAQGWASGQLCQT
RLKICNSGVSDEDLAISILPRLTPMHPPIPLYWDSSETS FELQDFDPQISTFETPEILD
QMRRTALYLQAPSSRQRGDRDFVALFIPDISHEYLGEWLTVEGKEPALEVYS
RNPNTPPMGIVRDQSKFSEPRMFKMIAPSQVTKASPIEVECSSLPRRRNLLQKR
ALNVAEDGEADAPKSYVLPVAVACVIDKLPKQGLGFLFISAILDRLEASLVAHRLN
DTILKGVGIQNIHVITASAPIAQAATNYQRFEFFGDSVLKFTVSCQLFFRNTNWH
EGLYSESRDKLQNTRLAHAALDIGIDCFILTSRFTPRKWAAPLRINKLEASTAKRS
ISTKVLADVESLIGAAVYDGGIRKAQACLHRLPEIDLTFTEISPLTPPSKGASSLI
NIHRLAGLIGYTFKDPALLTEALTHASCEYDTSQSYQRLEFLGDVLDMMWMAVI
AAHPVEMDQGPMTLLKHSWVANLLAFFCMELCAPDEPTHPQFANGEINFPVPH
QQGQIHLWRFLRSHGPNVKSAREACLERHHGLRDEIRDALEHGSQYPWELFARLR
ADKFLSDIVESVLGAIFIDCGGNLDVCRAFVERIGLVWYIRRVADGWNVWHPRNTA
QNMVKGAGTLVFKRRKRVESGGMATYRCSAVNQTEIALVEGCASAEAEVKVAN
WIEHLTHPIGST
```



Figura 26 Comparación de la estructura entre los DCL 1 fúngicos de *V. dahliae* y *P. digitatum*, resaltando en color amarillo la zona utilizada para el diseño do del ds-RNA de *V. dahliae*, con base a esa zona se presenta de color amarillo la zona seleccionada en *P. digitatum* para el diseño de su ds-RNA.

Una vez obtenido el análisis de secuencias, se procedió a su ensamblado en el laboratorio. El primer paso del proceso para la unión de DCL1 y DCL2 de *P. digitatum* fue la extracción de ADN genómico por medio del método Fenol-cloroformo (Figura 27).

El siguiente paso fue la amplificación de la secuencia de la proteína Dicer utilizando los dos primeros pares de oligonucleótidos Pdi1 y Pdi2 diseñados anteriormente (Tabla 11), un par por cada secuencia de la proteína como se muestra en a Figura 28. Se observa que las bandas presentes en el gel corresponden a los tamaños de las secuencias seleccionadas para cada DCL (Figura 29).

Los productos de PCR se recuperaron del gel en un volumen mínimo de elución y su concentración permitió continuar con su fusión (Pdi1: 48 ng/μl y Pd2: 60.1 ng/μl).

Para ello se prosiguió a la adaptación de los oligonucleótidos complementarios y a su hibridación para lograr el reconocimiento de secuencias complementarias en uno de sus extremos. Posteriormente se realizó la PCR para amplificar el producto fusionado de las secuencias DCL1 y DCL2. Los resultados de esta PCR mostraron una mezcla 2:1 de bandas correspondientes a las moléculas por separado (DCL1= 253 pb y DCL2= 205 pb) y unidas (DCL 1 y 2= 458 pb, siendo estas últimas las deseadas (Figura 30).

Se aislaron las bandas de 500 pb y se usaron como molde en otra PCR para fusionarlas a los promotores T7. Esta PCR produjo el aumento en 504 pb de los productos fusionados. Por lo que se optó por cortar del gel estos productos, purificarlos y clonarlos en un vector para selección blanco/azul y transformar bacterias competentes de *E. coli*. Este procedimiento permitió obtener la concentración requerida de la construcción para la secuenciación y al mismo tiempo poder preservar establemente la secuencia de DNA que generará los ds-RNA de *P. digitatum*.

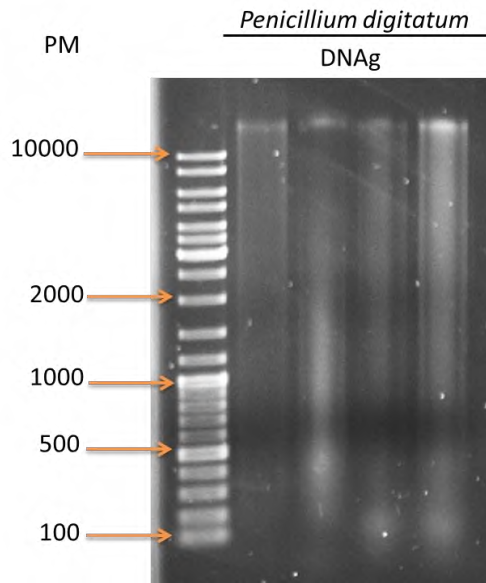


Figura 27 DNA genómico de *P. digitatum* extraído por el método fenol-cloroformo en gel de agarosa al 1%.

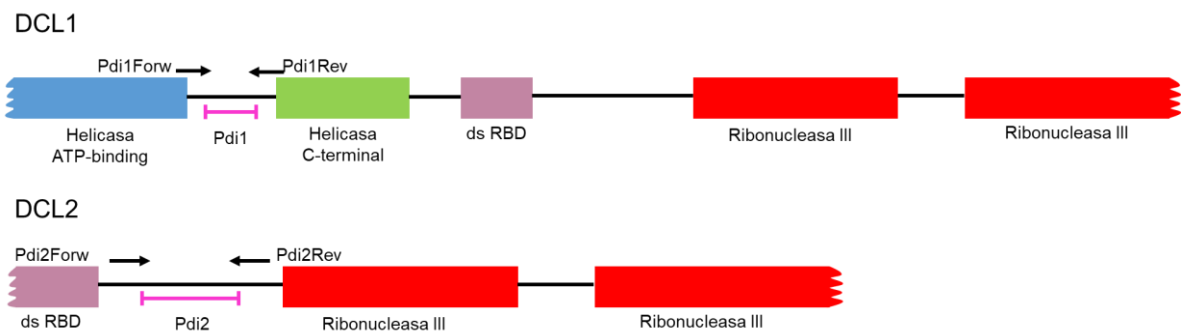


Figura 28 Localización de los oligonucleótidos diseñados para amplificar las secuencias de nucleótidos para DCL 1 Pdi1Forw, Pdi1Rev y para DCL 2 Pdi2Forw, Pdi2Rev., de *P. digitatum*. Los números de acceso se encuentran en el Anexo 4.

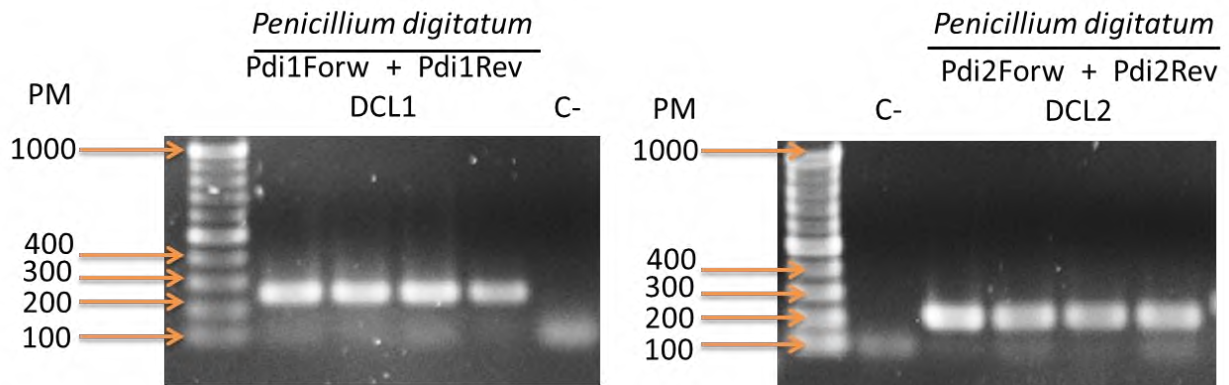


Figura 29 Amplificación de la secuencia seleccionada para DCL1 (Pdi1 =253pb) y DCL 2 (Pdi2 =205pb) de *P. digitatum* bajo las condiciones de las Tablas 12 y 13.

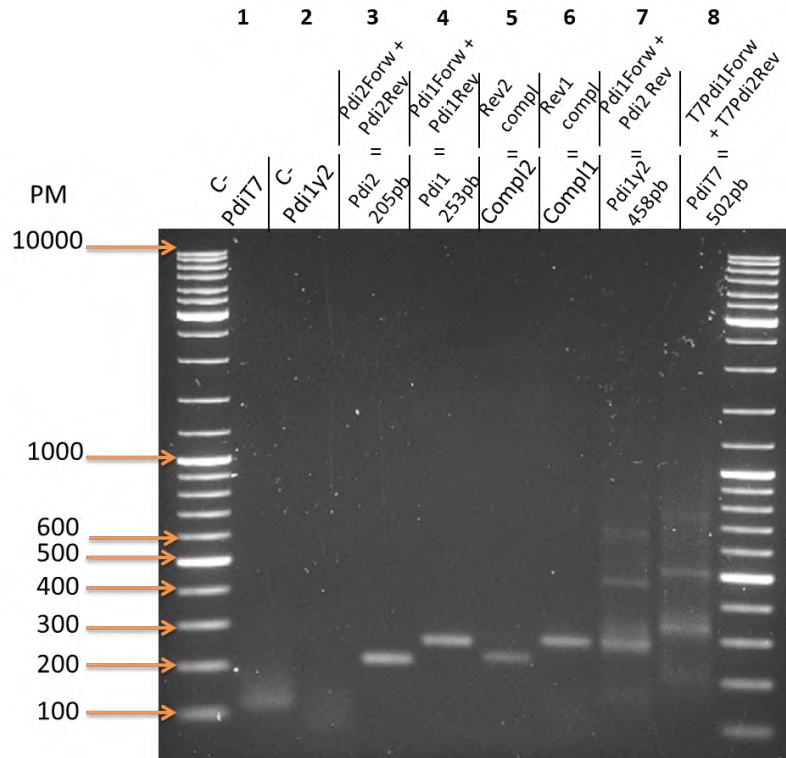


Figura 30 Amplificación de la secuencia: Pdi1 (253pb) carril 4, Pdi 2 (205pb) carril 3, adición de oligonucleótidos complementarios a Pdi 1 carril 6 y Pdi 2 carril 5, unión de las dos secuencias Pdi1 y Pdi2 (458pb) carril 7, secuencias Pdi1 y 2 con los promotores T7 carril 8, por ultimo carril 1 y 2 controles negativos de las amplificaciones de Pdi1 y Pdi2 (458pb) y la secuencias Pdi1 y 2 con promotores T7.

La transformación permitió la recuperación de 31 colonias blancas que se sembraron en medio líquido para proceder a la extracción del plásmido y verificar la presencia del inserto (Figura 31).

El plásmido extraído de las colonias blancas mediante lisis alcalina fue digerido con la enzima EcoRI. De acuerdo al mapa del vector (Anexo 1), esta enzima permite liberar el inserto del plásmido que se espera de 504 pb.

La electroforesis de las digestiones con EcoRI (Di) y las extracciones de plásmido sin digerir (PI) de cada una de 24 transformantes, indicó que el 45.4% tuvieron un plásmido vacío, un 40.9% contuvieron artefactos de bajo peso molecular y un 13.6% tuvieron un inserto del tamaño esperado (Figura 32). Se decidió elegir 3 muestras para mandar a secuenciar y fueron etiquetadas como LB6, LB15 y LB20. La muestra 6 y 20 tuvieron el tamaño esperado del inserto de interés mientras que la 15 se encontró un tamaño menor al esperado.

Las secuencias recibidas se analizaron por medio de Blastn de forma general y fragmentada (Figura 33), con el fin de encontrar si algunas de ellas contenía la construcción fusionada de DCL1 y DCL 2 de *P. digitatum*. La secuencia identificada como 6 contenía 100% de identidad con el constructo diseñado (Figura 34). Las secuencias restantes 15 y 20 contenidas en el anexo 5 solo contenían fragmentos parciales del constructo. Este resultado indicó que la estrategia de tres PCRs en serie fue exitosa y permitió construir una molécula de DNA de la cual se podrá generar dsRNAs para el patosistema *P. digitatum*-naranja. La colonia 6 se propagó y se almaceno en criogenia.

Este tipo de construcciones ya se han desarrollado y aplicado para la fitoprotección de fresa, uva, tomate, pétalos de rosa, hojas de lechuga y en defensa contra el contra el hongo *B. cinérea* (Wang et al., 2016). También, ya se han probado diversas coadyuvantes para aumentar la protección como, nanopartículas, liposomas y vesículas artificiales para los sRNAs que promueven su funcionabilidad, tiempo de acción y adherencia en la fruta. También se han probado en plantas enteras como en la fitoprotección de la cebada contra el hongo *Fusarium graminearum* con resultados prometedores de hasta 95% de reducción de la patogenicidad del hongo (Koch et al., 2016).



Figura 31 Cajas Petri con medio LB sólido (ampicilina 100 μ l, X-Gal 20mg/ml) inoculadas con volúmenes de 50, 100 y 150 μ l de células transformadas One Shot Top10 *E. coli*. Se observa en blanco las colonias transformadas (señaladas con un círculo) y en azul las no transformadas.

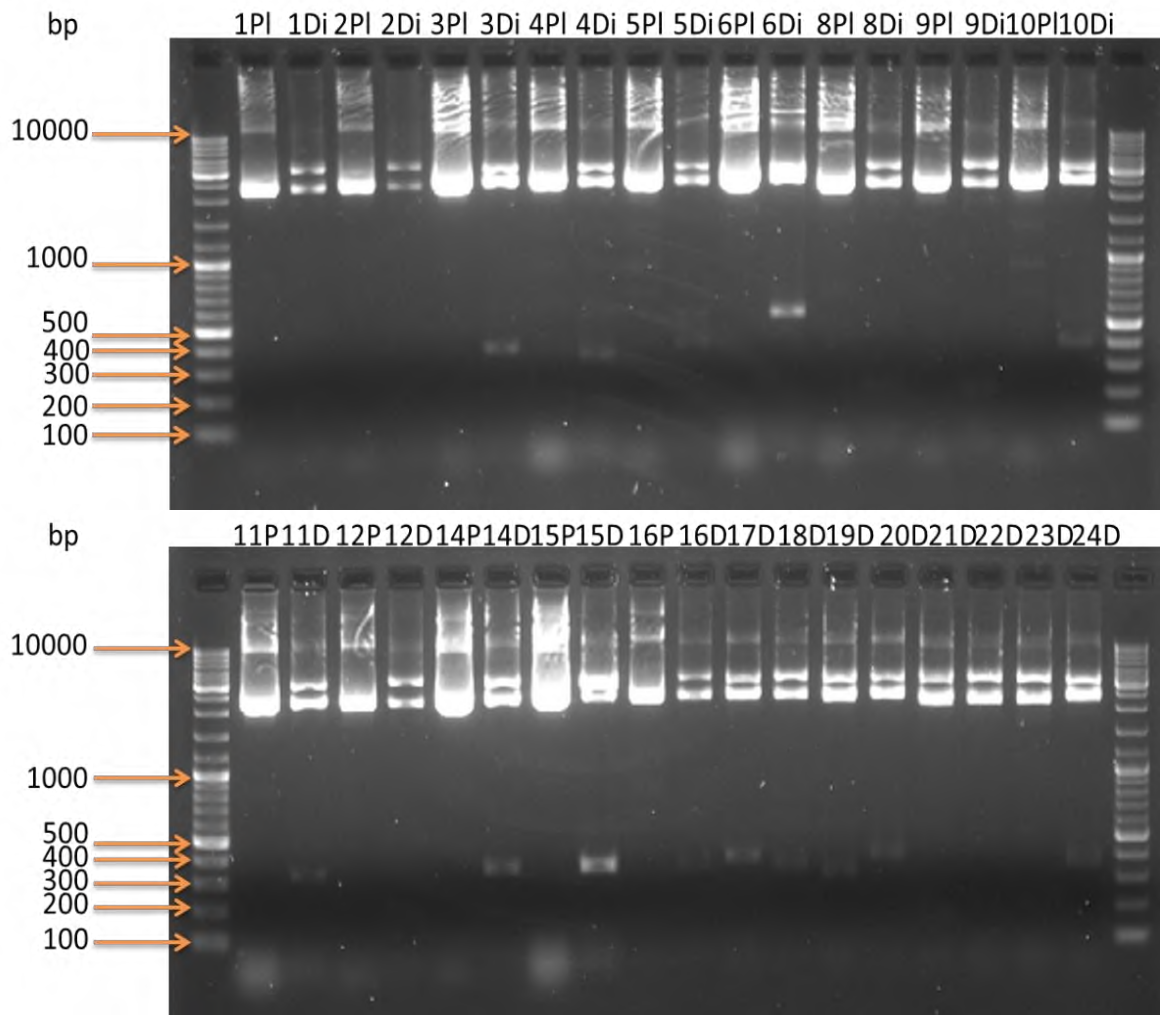


Figura 32 Amplificación del inserto (ds-RNA de *P. digitatum*) dentro del plásmido pGEM-T Easy, por medio de la digestión con la enzima de restricción EcoRI.

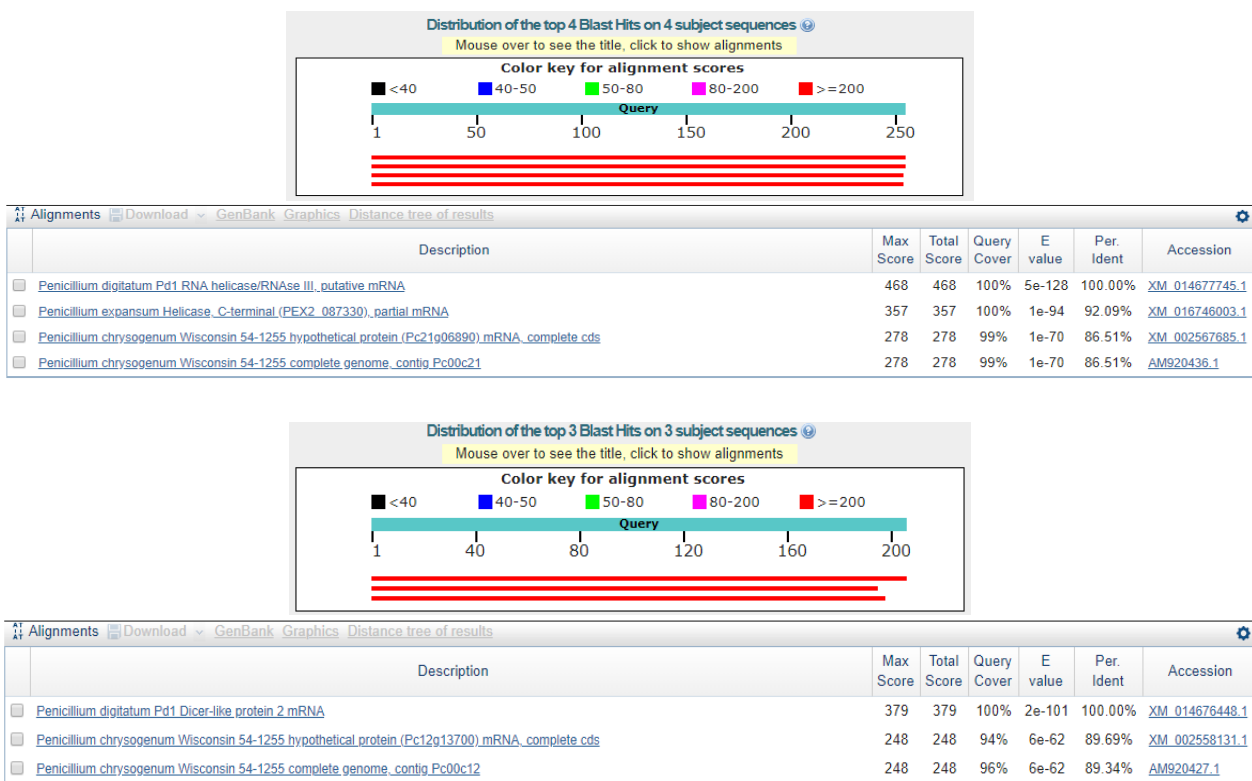


Figura 33 Blastn de las secuencias DCL 1 y DCL 2 del diseño de sRNAs para *P. digitatum*, con 100% de identidad con las secuencias originales los DCLs de *P. digitatum*

```

>M13/Forward_LB6
TCGCATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATGGGGA
TATGCTGATCCTTGAAGGCGTATTTGATTTGCATCGGTTGCAAGCACAGAATTAGGTGGTTGGTGCGCAG
ACCAGGTATGGGCTCTGGCTCTGGCGGACGAAGTGTGCCAAGCTGGAGGGCAGCATCGGCAAAGTCAC
CGATTCTGATCCTCGGGATTCTGAAAAGGCCTCGGAGGAGATCAAACGAATCCAAGAAGCCAGCCATCTTG
TCAACGAATACATTACAGACCGGGCATTATGCGCCCATCTATCGTGCAAGCTGCGGAGCAGTATGACCCTT
ATGTAGACCTTGACAAGGCTGGGCTTCGGGTCAGCTGTGCCAAACACGCTTGAAGATATGCAGCAATGGG
TCTGTAGATGAAGATCTGGCCATCAGCATAATTTGCCAAGATTGACTCCGATGCCACACCCATTCTCTCT
ACTGGGACTCCGAGACGTCCTTTGTCTCCCTATAGTGAGTCGATTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCC

>SP6/Revers_LB6
TATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTGTATTAAATACGACTCACTATAGGGAGACAAAGGAC
GTCTCGGAGTCCAGTAGAGAGGAATGGGGTGTGGCATCGGAGTCAATCTTGGCAAAATTATGCTGATGG
CCAGATCTTCATCTACAGACCCATTGCTGCATATCTCAAGCGTGTGGCACAGCTGACCCGAAGCCAGC
CTTGTCAGGTTCTACATAAGGGTCATACTGCTCCGAGCTTGACGATAGATGGCGGCATAAATGCCGG
TCTGTAATGTATTCGTTGACAAGATGGCTGGCTTCTGGATTCTGTTGATCTCCTCCGAGGCCTTTTCAGAA
CCCGAGGATCAGAATCGGTGACTTTGCCGATGCTGCCCTCCAGCTTGGGCAGCACTTCTGTCAGAGCC
AGAGCCCATACCTGGTCTGCGCACCAACCACCTAATCTGTGCTTGAACCGATGCAAATCGAAATACGCCT
TCAAGGATCAGCATATCCCAATCTCCCTATAGTGAGTCGATTAATCGAATTCGCGGCCGCCATGGCGG

```

Figura 34 Secuencia en ambos sentidos del inserto de *P. digitatum* contenido en la muestra LB6. De color verde los promotores T7, de color amarillo la secuencia DCL1, de color azul la secuencia DCL2.

7 Conclusiones

La diversidad de hongos aislados permitió recuperar a 12 fitopatógenos post-cosecha que son económicamente importantes para las frutas tropicales de la Cuenca del Papaloapan.

La estrategia experimental microbiológica y molecular, permitió la identificación de patosistemas susceptibles de usarse en un diseño dirigido de sRNAs contra DCLs en un marco tecnológico tipo SIGS. De los tres identificados, el caso de *Penicillium digitatum* con *Citrus sinensis* (naranja) es el de mayor interés por su efecto en las pérdidas postcosecha y con mayor sustento a nivel de información genética.

Aunque se encontraron otros patosistemas, se observó que necesitan procesos adicionales de investigación, como amplificar y secuenciar los DCLs fúngicos y/o vegetales, ambas consecuencias de la falta de reportes en las bases de datos. Por ejemplo el patosistema *Lasioidiploidia pseudotheobromae* con *Mangifera indica* (mango).

El análisis de los dominios de las proteínas DCL de hongo y planta y su alineamiento permitió encontrar secuencias de baja identidad entre el dominio Helicasa ATP-binding y Helicasa C-terminal así como entre los dominios ds RBD y Rinonuclease III.

Finalmente, la estrategia de construcción de una quimera de DNA entre los fragmentos de DCL1 y DCL2 mediante tres PCR secuenciales, permitió obtenerla fusionada al promotor T7 y con una identidad de bases perfecta. La secuencia de la quimera de DNA tienen las características de secuencias capaces de generar ds-RNA *in vitro*.

8 Perspectivas

La diversidad de hongos que se documentó es amplia, pero contrasta con la falta de reportes en bases de datos de la proteína DCL para la mayor parte de los hongos identificados. Esto se debe a la poca información molecular depositada sobre hongos micromicetos, lo que indica la necesidad de ampliar trabajos de investigación en estos organismos, abriendo posibilidades de un mejor aprovechamiento de la tecnología SIGS y su traslado a un esquema económicamente viable.

El alcance de la continuación de esta investigación tiene un gran potencial por explotar para estudiar otros patosistemas de importancia. Se recomienda que el siguiente de analizar sea *Lasiodiplodia pseudotheobromae* con *Mangifera indica* (mango).

Con la quimera de DNA, que será base para la síntesis de sRNA contra *P. digitatum*, se deberá realizar transcripción *in vitro* y poner a prueba el producto para observar su capacidad de reducir o inhibir la infección del hongo, *in vitro* e *in vivo*. Se deberán estandarizar varios parámetros, como su vida media y concentraciones efectivas.

Una vez que se cumpla lo anterior, es necesario mejorar la técnica SIGS para obtener mejores resultados, e incorporar tratamientos de protección físicos para los sRNA de interferencia, por ejemplo, liposomas o nanopartículas de diferentes materiales, y así mejorar la entrega de los sRNAs al organismo blanco y maximizar la vida útil de los sRNAs.

El propósito final deberá ser escalar esos conocimientos, protegerlos legalmente y crear productos que combatan las problemáticas de producción de alimentos, en este caso, la creación de un producto sustentable, un biofungicida con muchas ventajas. Es probable incluso trasladar esta nueva tecnología a otros organismos como insectos o animales.

9 Bibliografía

Abe, A., K. Asano, and T. Sone. 2010. "A Molecular Phylogeny-Based Taxonomy of the Genus *Rhizopus*." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 74 (7): 1325-1331. doi:10.1271/bbb.90718.

Al-Hindi, R. R. 2013. "Cell Wall Degrading Enzymes of Fruit Spoilage Fungi." *Life Science Journal* 10 (3): 2456-2463.

Almanza-Álvarez, J., R. Garibay-Orijel, R. Salgado-Garciglia, S. P. Fernández-Pavía, P. Lappe-Oliveras, E. Arellano-Torres, and I. Ávila-Díaz. 2017. "Identification and Control of Pathogenic Fungi in Neotropical Valued Orchids (*Laelia* Spp.)." *Tropical Plant Pathology* 42 (5): 339-351. doi:10.1007/s40858-017-0171-3.

AMIFAC, La inocuidad, el reto "Sin plaguicidas, 40% de la cosecha estaría en riesgo". Mexico D.F., El Economista, 2013.

Alves, A., P. W. Crous, A. Correia, and A. J. L. Phillips. 2008. "Morphological and Molecular Data Reveal Cryptic Speciation in *Lasiodiplodia* Theobromae." *Fungal Diversity* 28: 1-13.

Alwakeel, S. S. 2013. "Molecular Identification of Isolated Fungi from Stored Apples in Riyadh, Saudi Arabia." *Saudi Journal of Biological Sciences* 20 (4): 311-317. doi:10.1016/j.sjbs.2013.05.002.

Begerow, D., A. M. Schäfer, R. Kellner, A. Yurkov, M. Kemler, F. Oberwinkler, and R. Bauer. 2014. "Ustilaginomycotina." In *Systematics and Evolution: Part A: Second Edition*, 295-329. doi:10.1007/978-3-642-55318-9.

Bensch, K., U. Braun, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2012. "The Genus *Cladosporium*." *Studies in Mycology* 72: 1-401. doi:10.3114/sim0003.

Breslauer, K. J., R. Frank, H. Blocker, and L. A. Marky. 1986. "Predicting DNA Duplex Stability from the Base Sequence." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (11): 3746-3750. doi:10.1073/pnas.83.11.3746.

Cerrillo, J. L., A. E. Palomares, F. Rey, S. Valencia, L. Palou, and M. B. Pérez-Gago. 2017. "Ag-Zeolites as Fungicidal Material: Control of Citrus Green Mold Caused by *Penicillium Digitatum*." *Microporous and Mesoporous Materials* 254: 69-76. doi:10.1016/j.micromeso.2017.03.036.

Choi, J., K. -T Kim, J. Jeon, J. Wu, H. Song, F. O. Asiegbu, and Y. -H Lee. 2014. "FunRNA: A Fungi-Centered Genomics Platform for Genes Encoding Key Components of RNAi." *BMC Genomics* 15. doi:10.1186/1471-2164-15-S9-S14.

COFEPRIS, La inocuidad, el reto "Sin plaguicidas, 40% de la cosecha estaría en riesgo". Mexico D.F., El Economista. 2013.

da Cunha, K. C., D. A. Sutton, A. W. Fothergill, J. Gené, J. Cano, H. Madrid, S. de Hoog,

P. W. Crous, and J. Guarro. 2013. "In Vitro Antifungal Susceptibility and Molecular Identity of 99 Clinical Isolates of the Opportunistic Fungal Genus *Curvularia*." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 76 (2): 168-174. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.034.

Damalas, C. A. and I. G. Eleftherohorinos. 2011. "Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8 (5): 1402-1419. doi:10.3390/ijerph8051402.

Dannaoui, E., P. Schwarz, M. Slany, J. Loeffler, A. T. Jorde, M. Cuenca-Estrella, P. M. Hauser, et al. 2010. "Molecular Detection and Identification of Zygomycetes Species from Paraffin-Embedded Tissues in a Murine Model of Disseminated Zygomycosis: A Collaborative European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG) Evaluation." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (6): 2043-2046. doi:10.1128/JCM.02319-09.

Edgar, R. C. 2004. "MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput." *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792-1797. doi:10.1093/nar/gkh340.

EPA, What are Biopesticides?, <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/what-are-biopesticides>, 2016.

FAO, <http://faostat3.fao.org/download/R/RP/E.>, 2013.

FAO, Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas, 2014.

Gan, Y. and R. -C Yang. 2011. "Advanced Statistical Tools and their Applications to Agricultural Research: An Introduction." *Canadian Journal of Plant Science* 91 (4): 599-601. doi:10.4141/cjps11505.

García Hernández, J., J. B. Leyva Morales, I. E. Martínez Rodríguez, M. I. Hernández Ochoa, M. L. Aldana Madrid, A. E. Rojas García, M. Betancourt Lozano, N. E. Perez Herrera, and J. H. Perera Rios. 2018. "Current Status of Research on Pesticides in Mexico." *Revista Internacional De Contaminacion Ambiental* 34 (Special Issue 1): 29-60. doi:10.20937/RICA.2018.34.esp01.03.

Groenewald, M., T. Coutinho, M. T. Smith, and J. P. van der Walt. 2012. "Species Reassignment of *Geotrichum Bryndzae*, *Geotrichum Phurueaensis*, *Geotrichum Silvicola* and *Geotrichum Vulgare* Based on Phylogenetic Analyses and Mating Compatibility." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62 (12): 3072-3080. doi:10.1099/ijs.0.038984-0.

Huang, C. -Y, H. Wang, P. Hu, R. Hamby, and H. Jin. 2019. "Small RNAs – Big Players in Plant-Microbe Interactions." *Cell Host and Microbe* 26 (2): 173-182. doi:10.1016/j.chom.2019.07.021.

INEGI, <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/oax/territorio/default.aspx?tema%3Dme%26e%3D20>. Mexico, 2015.

Katiyar-Agarwal, S. and H. Jin. 2010. Role of Small RNAs in Host-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 48. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114457.

Khoury, C. K., H. A. Achicanoy, A. D. Bjorkman, C. Navarro-Racines, L. Guarino, X. Flores-Palacios, J. M. M. Engels, et al. 2016. "Origins of Food Crops Connect Countries Worldwide." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283 (1832): 1-9. doi:10.1098/rspb.2016.0792.

Kim, H., H. Shimura, and C. Masuta. 2019. "Advancing Toward Commercial Application of RNA Silencing-Based Strategies to Protect Plants from Viral Diseases." *Journal of General Plant Pathology* 85 (5): 321-328. doi:10.1007/s10327-019-00865-7.

Klosterman, S. J., Z. K. Atallah, G. E. Vallad, and K. V. Subbarao. 2009. Diversity, Pathogenicity, and Management of *Verticillium* Species. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 47. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081748.

Knip, M., M. E. Constantin, and H. Thordal-Christensen. 2014. "Trans-Kingdom Cross-Talk: Small RNAs on the Move." *PLoS Genetics* 10 (9). doi:10.1371/journal.pgen.1004602.

Koch, A., D. Biedenkopf, A. Furch, L. Weber, O. Rossbach, E. Abdellatef, L. Linicus, 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). doi:10.1371/journal.ppat.1005901.

Koike, S. T. (2016). *El Moho Gris, o Pudrición de Fresa*. Comisión de la Fresa de California Guia, Publicación 13.

Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870-1874. doi:10.1093/molbev/msw054.

Kusai, N. A., M. Mior Zakuan Azmi, S. Zulkifly, M. T. Yusof, and N. A. I. Mohd Zainudin. 2016. "Morphological and Molecular Characterization of *Curvularia* and Related Species Associated with Leaf Spot Disease of Rice in Peninsular Malaysia." *Rendiconti Lincei* 27 (2): 205-214. doi:10.1007/s12210-015-0458-6.

Kwon, J. -H, O. Choi, B. Kang, Y. Lee, J. Park, D. -W Kang, I. Han, and J. Kim. 2017. "Identification of *Lasiodiplodia Pseudotheobromae* Causing Mango Dieback in Korea." *Canadian Journal of Plant Pathology* 39 (2): 241-245. doi:10.1080/07060661.2017.1329231.

Kwon, J. -H, J. -S Ryu, T. T. P. Chi, S. -S Shen, and O. Choi. 2012. "Soft Rot of *Rhizopus Oryzae* as a Postharvest Pathogen of Banana Fruit in Korea." *Mycobiology* 40 (3): 214-216. doi:10.5941/MYCO.2012.40.3.214.

Li, G., F. Liu, J. Li, Q. Liu, and S. Chen. 2016. "Characterization of *Botryosphaeria Dothidea* and *Lasiodiplodia Pseudotheobromae* from English Walnut in China." *Journal of Phytopathology* 164 (5): 348-353. doi:10.1111/jph.12422.

Louw, J. P. and L. Korsten. 2016. "Postharvest Decay of Nectarine and Plum Caused by *Penicillium* Spp." *European Journal of Plant Pathology* 146 (4): 779-791. doi:10.1007/s10658-016-0956-0.

Lundberg, D. S., S. L. Lebeis, S. H. Paredes, S. Yourstone, J. Gehring, J. L. Dangl, and S. G. Tringe. 2012. "Defining the Core *Arabidopsis Thaliana* Root Microbiome." *Nature* 488 (7409): 86-90. doi:10.1038/nature11237.

McGrath Margaret Tuttle, What are Fungicides? American Phytopathological Society, <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Pages/fungicidesSpanish.aspx>, 2004

Manamgoda, D. S., A. Y. Rossman, L. A. Castlebury, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2015. "A Taxonomic and Phylogenetic Re-Appraisal of the Genus *Curvularia* (Pleosporaceae): Human and Plant Pathogens." *Phytotaxa* 212 (3): 175-198. doi:10.11646/phytotaxa.212.3.1.

Mitter, N., E. A. Worrall, K. E. Robinson, P. Li, R. G. Jain, C. Taochy, S. J. Fletcher, B. J. Carroll, G. Q. Lu, and Z. P. Xu. 2017. "Clay Nanosheets for Topical Delivery of RNAi for Sustained Protection Against Plant Viruses." *Nature Plants* 3. doi:10.1038/nplants.2016.207.

Notredame, C., D. G. Higgins, and J. Heringa. 2000. "T-Coffee: A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment." *Journal of Molecular Biology* 302 (1): 205-217. doi:10.1006/jmbi.2000.4042.

Nunes, C. C. and R. A. Dean. 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.

OEC, https://atlas.media.mit.edu/en/visualize/tree_map/hs92/export/mex/all/show/2016/, Estados Unidos de America EUA: Instituto Tecnológico de Massachusetts MIT, 2016.

O'Malley, R. C., J. M. Alonso, C. J. Kim, T. J. Leisse, and J. R. Ecker. 2007. "An Adapter Ligation-Mediated Pcr Method for High-Throughput Mapping of t-Dna Inserts in the *Arabidopsis* Genome." *Nature Protocols* 2 (11): 2910-2917. doi:10.1038/nprot.2007.425.

ONU, Prespectivas Demograficas Mundiales, <https://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html>, 2015.

Palou, L. 2014. "*Penicillium Digitatum*, *Penicillium Italicum* (Green Mold, Blue Mold)." In *Postharvest Decay: Control Strategies*, 45-102. doi:10.1016/B978-0-12-411552-1.00002-8. <https://www2.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84942694086&doi=10.1016%2fB978-0-12-411552-1.00002-8&partnerID=40&md5=cddafc6c771da48ccbcf240962590f20>.

Perrone, G., A. Susca, G. Cozzi, K. Ehrlich, J. Varga, J. C. Frisvad, M. Meijer, P. Noonim, W. Mahakamchanakul, and R. A. Samson. 2007. "Biodiversity of *Aspergillus* Species in

some Important Agricultural Products." *Studies in Mycology* 59: 53-66. doi:10.3114/sim.2007.59.07.

Piątek, M., M. Lutz, and N. S. Yorou. 2015. "A Molecular Phylogenetic Framework for Anthracocystis (Ustilaginales), Including Five New Combinations (Inter Alia for the Asexual Pseudozyma Flocculosa), and Description of Anthracocystis Grodzinskae Sp. Nov." *Mycological Progress* 14 (10). doi:10.1007/s11557-015-1114-3.

Ploetz, R. C. 2006. "Fusarium-Induced Diseases of Tropical, Perennial Crops." *Phytopathology* 96 (6): 648-652. doi:10.1094/PHYTO-96-0648.

Raja, H. A., A. N. Miller, C. J. Pearce, and N. H. Oberlies. 2017. "Fungal Identification using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community." *Journal of Natural Products* 80 (3): 756-770. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01085.

Rodríguez-Gálvez, E., P. Guerrero, C. Barradas, P. W. Crous, and A. Alves. 2017. "Phylogeny and Pathogenicity of Lasiodiplodia Species Associated with Dieback of Mango in Peru." *Fungal Biology* 121 (4): 452-465. doi:10.1016/j.funbio.2016.06.004.

Rosado, A. W. C., A. R. Machado, F. C. O. Freire, and O. L. Pereira. 2016. "Phylogeny, Identification, and Pathogenicity of Lasiodiplodia Associated with Postharvest Stem-End Rot of Coconut in Brazil." *Plant Disease* 100 (3): 561-568. doi:10.1094/PDIS-03-15-0242-RE.

SAGARPA, Atlas Agroalimentario, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP, https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018, Mexico D.F., 2018.

SAGARPA, Atlas Agroalimentario, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP, https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016, Mexico D.F., 2016.

SAGARPA, Atlas Agroalimentario, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP, https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018, Mexico D.F., 2018

SAGARPA & FAO, Gaceta Comisión de Agricultura y Ganadería, 2016.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Acciones y Programas; http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/. Mexico, 2017.

Samson, R. A., C. M. Visagie, J. Houbraken, S. -B Hong, V. Hubka, C. H. W. Klaassen, G. Perrone, et al. 2014. "Phylogeny, Identification and Nomenclature of the Genus *Aspergillus*." *Studies in Mycology* 78 (1): 141-173. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004.

Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen, et al. 2012. "Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (16): 6241-6246.

doi:10.1073/pnas.1117018109.

Shamly, V., A. Kali, S. Srirangaraj, and S. Umadevi. 2014. "Comparison of Microscopic Morphology of Fungi using Lactophenol Cotton Blue, Iodine Glycerol and Congo Red Formaldehyde Staining." *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 8 (7): DL01-DL02. doi:10.7860/JCDR/2014/8521.4535.

Stepień, Ł., G. Koczyk, and A. Waśkiewicz. 2013. "Diversity of *Fusarium* Species and Mycotoxins Contaminating Pineapple." *Journal of Applied Genetics* 54 (3): 367-380. doi:10.1007/s13353-013-0146-0.

Thornton, C. R., D. C. Slaughter, and R. M. Davis. 2010. "Detection of the Sour-Rot Pathogen *Geotrichum Candidum* in Tomato Fruit and Juice by using a Highly Specific Monoclonal Antibody-Based ELISA." *International Journal of Food Microbiology* 143 (3): 166-172. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.012.

Visagie, C. M., J. Houbraken, J. C. Frisvad, S. -B Hong, C. H. W. Klaassen, G. Perrone, K. A. Seifert, J. Varga, T. Yaguchi, and R. A. Samson. 2014. "Identification and Nomenclature of the Genus *Penicillium*." *Studies in Mycology* 78 (1): 343-371. doi:10.1016/j.simyco.2014.09.001.

Wang, M., N. Thomas, and H. Jin. 2017. "Cross-Kingdom RNA Trafficking and Environmental RNAi for Powerful Innovative Pre- and Post-Harvest Plant Protection." *Current Opinion in Plant Biology* 38: 133-141. doi:10.1016/j.pbi.2017.05.003.

Wang, M., A. Weiberg, F. -M Lin, B. P. H. J. Thomma, H. -D Huang, and H. Jin. 2016. "Bidirectional Cross-Kingdom RNAi and Fungal Uptake of External RNAs Confer Plant Protection." *Nature Plants* 2 (10). doi:10.1038/nplants.2016.151.

Wang, Q. -M, D. Begerow, M. Groenewald, X. -Z Liu, B. Theelen, F. -Y Bai, and T. Boekhout. 2015. "Multigene Phylogeny and Taxonomic Revision of Yeasts and Related Fungi in the Ustilaginomycotina." *Studies in Mycology* 81: 55-83. doi:10.1016/j.simyco.2015.10.004.

Watanabe, M., T. Yonezawa, K. -I Lee, S. Kumagai, Y. Sugita-Konishi, K. Goto, and Y. Hara-Kudo. 2011. "Molecular Phylogeny of the Higher and Lower Taxonomy of the *Fusarium* Genus and Differences in the Evolutionary Histories of Multiple Genes." *BMC Evolutionary Biology* 11 (1). doi:10.1186/1471-2148-11-322.

Weiberg, A. and H. Jin. 2015. "Small RNAs-the Secret Agents in the Plant-Pathogen Interactions." *Current Opinion in Plant Biology* 26: 87-94. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.033.

Weiberg, A., M. Wang, M. Bellinger, and H. Jin. 2014. Small RNAs: A New Paradigm in Plant-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 52. doi:10.1146/annurev-phyto-102313-045933.

Weiberg, A., M. Wang, F. -M Lin, H. Zhao, Z. Zhang, I. Kaloshian, H. -D Huang, and H. Jin. 2013. "Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways." *Science* 342 (6154): 118-123. doi:10.1126/science.1239705.

Williams-Woodward, J., 2001. "Simplified Fungi Identification Key." The University of Georgia College of Agriculture and the U.S. Department of Agriculture cooperating.

Williamson, B., B. Tudzynski, P. Tudzynski, and J. A. L. Van Kan. 2007. "Botrytis Cinerea: The Cause of Grey Mould Disease." *Molecular Plant Pathology* 8 (5): 561-580. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x.

Zalar, P., G. S. De Hoog, H. -J Schroers, P. W. Crous, J. Z. Groenewald, and N. Gunde-Cimerman. 2007. "Phylogeny and Ecology of the Ubiquitous Saprobe *Cladosporium Sphaerospermum*, with Descriptions of Seven New Species from Hypersaline Environments." *Studies in Mycology* 58: 157-183. doi:10.3114/sim.2007.58.06.

Zotti, M., E. A. dos Santos, D. Cagliari, O. Christiaens, C. N. T. Taning, and G. Smaghe. 2018. "RNA Interference Technology in Crop Protection Against Arthropod Pests, Pathogens and Nematodes." *Pest Management Science* 74 (6): 1239-1250. doi:10.1002/ps.4813.

Anexo 1 Preparación de Reactivos y Soluciones

1. Azul de Lactofenol

Fenol	0.1 gr
Ácido Láctico	8 ml
Glicerol (glicerina)	20 ml
Agua Destilada	10 ml
Azul de Algodón (azul de anilina)	0.5 gr

Calentar el agua destilada aproximadamente 40°C, agregar los reactivos en el orden como se enlistaron. Mezclar suavemente con una varilla de vidrio, dejar enfriar y conservar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

2. Solución de Lisis

En un tubo falcón de 14ml se mezclan 0.5ml de Tris 50mM pH 7.5, 1ml de EDTA 50mM pH 8, 3ml de SDS 3%, 0.1ml de mercaptoethanol y 5.4ml de agua desionizada, se agita suavemente.

3. Buffer TBE 10X

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

4. Buffer TAE 50X

Disolver 121gr de Tris, 50ml de EDTA 0.5 M y 22.55gr de ácido bórico en agua desionizada, se afora a 500ML y se verifica el pH a 8.0. Para preparar 100ml de TAE 1X se toman 2ml de TAE 50X y se mezcla con 98ml de agua desionizada.

5. Gel de agarosa 1%

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

6. Gel de agarosa 2%

En un matraz de 250ml mezclar 100ml de buffer TBE/TAE 1X y 2gr de agarosa, la mezcla se debe calentar en microondas durante varios segundos hasta que se observe una consistencia transparente y sin grumos.

7. Solución I

En un tubo falcón de 14ml se agregan 1432.5µl de agua desionizada seguido de la adición de **30µl** de EDTA, disolver muy bien y por ultimo añadir 37.5µl de Tris HCl. Almacenar a 4°C.

8. Solución II

En un tubo falcón de 14ml se agregan 2340µl de agua desionizada seguido de la adición de 60µl de NaOH 10 Normal y por ultimo añadir 600µl de SDS. Almacenar a 4°C.

9. Solución III

En un tubo falcón de 14ml se agregan 570µl de agua desionizada seguido de la adición de 1200µl de acetato de potasio 5 Molar, disolver muy bien y posteriormente añadir 230µl de ácido acético glacial. Almacenar a 4°C.

10. Medio de cultivo LB solido

Extracto de levadura	1 gr
Peptona de caseína	2 gr
NaCl	2 gr
Agua destilada	200 ml
Agar bacteriológico	6 gr

Colocar el matraz con agua en agitación e ir agregando la levadura, la peptona y NaCl, una vez disueltos en el agua ajustar el pH a 7 con la solución de hidróxido de sodio 1M, una vez ajustado el pH se agregan el agar bacteriológico, disolver bien y esterilizar el medio. Para finalizar atemperar el matraz y agregar el antibiótico ampicilina en una relación 1:100, por cada 100µl de medio de cultivo un 1µl de antibiótico.

11. Purificación de producto de PCR por el kit MinElute Gel Extraction

La limpieza de las muestras que se secuenciaron, se realizó con el kit de remoción de fragmentos de DNA extraídos de geles de agarosa MinElute Gel Extraction (Quiagen, #28604).

Se localizó el fragmento de gel donde está contenido el DNA de interés en un transiluminador UV y se cortó con extremo cuidado apoyándose de un bisturí. Una vez cortada la banda de gel se introdujo en un tubo de 1.5ml previamente pesado, una vez que la banda de gel este dentro del tubo de 1.5ml se vuelve a pesar para conocer el peso en mg del gel esto es muy importante por dos razones la primera es que por cada volumen de gel se deben de añadir 6 volúmenes del buffer QG (esto se debe a que el gel es al 2% si fuera menor solo se añaden 3 volúmenes) y la segunda es por la columna solo soporta un peso máximo de 400mg.

Se incuba a 50°C durante 10min, teniendo intervalos de 2-3min en los cuales se mezclara en vortex ayudando así a disolver mejor el gel, el color de la mezcla debe de ser de un color amarillo igual al color del buffer QG.

Transcurrido el tiempo de la incubación se prosigue a añadir isopropanol un volumen igual que el volumen del gel. La mezcla se traslada a una columna MinElute y se centrifuga a 17,900 g durante 1min, se descarta el sobrenadante contenido en el tubo de recolección y se regresa a la columna.

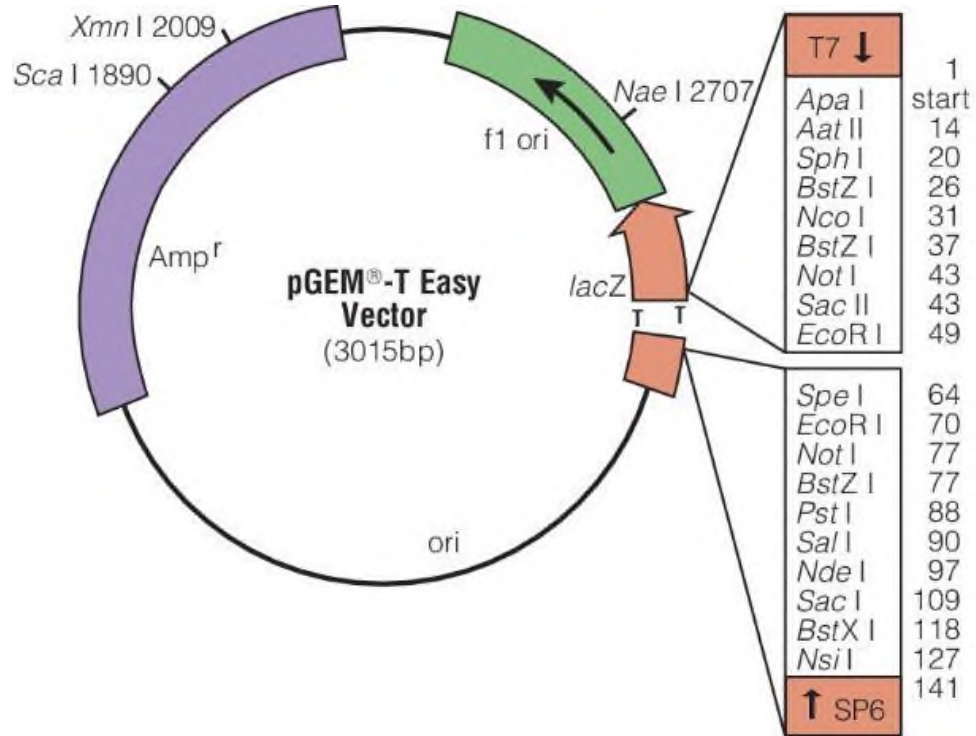
Se añaden 500µl de buffer QG en la columna y se centrifuga a 17,900 g durante 1min, se descarta el sobrenadante contenido en el tubo de recolección y se regresa a la columna.

Se adicionan 750µl de buffer PE en la columna y se deja reposar durante 3min, se centrifuga a 17,900 g durante 1min, se descarta el sobrenadante contenido en el tubo de recolección y se regresa a la columna. Se vuelve a centrifugar a 17,900 g durante 1min para descartar residuos existentes de etanol. Se descarta el sobrenadante contenido en el tubo de recolección y la columna es transportada a un tubo de 1.5ml.

Se eluye con 10µl del buffer EB añadidos directamente en la membrana de la columna,

se deba reposar durante 1min y se centrifuga a 17,900 g durante 1min.

12. Plásmido pGEM-T easy, clonación por PCR con selección azul / blanco y fácil extracción de inserción



13. Extracción del plásmido por lisis alcalina

En el tubo de 1.5ml se observa una pastilla a la cual se le agregan 100µl de solución I (Anexo 1.7) y se homogeniza hasta disolver dicha pastilla.

Posteriormente se añadió 200µl de solución II (Anexo 1.8) y se mezcló por inversión 10 veces, por último se adiciono 150µl de solución III (Anexo 1.9) y se mezcló por inversión 10 veces. Se centrifugo a 20,000 g durante 5min a una temperatura de 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1.5ml.

Al sobrenadante recuperado se le agregó 1ml de Fenol-Cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1) y se mezcló por inversión 10 veces, una vez mezclado se centrifugó a 20,000 g durante 5min a una temperatura de 4°C. La fase acuosa se extrajo por pipeteo y se depositó en un tubo nuevo de 1.5ml al cual se le agregó 1ml de etanol puro, se mezcló

en vortex a una velocidad media y se incubó a -20°C por 2 horas. Al termino se centrifugó a 20,000 g durante 15min a una temperatura de 4°C con el fin de precipitar la pastilla de DNA plasmídico, el líquido excedente se desechó por decantación y se añadió 1ml de etano al 70% como solución de lavado, se mezcló en vortex a una velocidad media y se centrifugo a 20,000 g durante 10min a una temperatura de 4°C . La solución de lavado se descartó por decantación y se dejó evaporar el remanente de etanol, vigilando que no se seque totalmente la pastilla.

La pastilla se resuspendió en $30\mu\text{l}$ de agua libre de nucleasas seguidamente se añadió $1\mu\text{l}$ de la enzima RNase A (Thermo Scientific, EN-179S, 10mg/ml) para degradar el RNA presente en la muestra, se incubo a 37°C por 30min pasado el tiempo se colocó en hielo.

14. Purificación del plásmido por AMPure XP

Antes de comenzar la purificación, la solución AMPure se agito para homogenizar el contenido de los beads, seguidamente se toman $36\mu\text{l}$ de la solución y se depositó en un tubo de 1.5ml.

Se tomarón $20\mu\text{l}$ de la extracción de plásmido y se agregan al tubo de 1.5ml que contiene la solución AMPure, se mezcló por pipeteo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5min.

Después de la incubación se tomó el tubo y se colocó en el magneto por aproximadamente 2min esto con el fin esperar a que se aclare la mezcla, después se desechó el sobrenadante por pipeteo teniendo cuidado de no retirar los beads, todo esto sin retirar el tubo del magneto. Seguidamente se agregó $200\mu\text{l}$ de etanol al 70% y se incubo por 30s, se retiró y desecho el sobrenadante por pipeteo teniendo cuidado de no retirar los beads, sin retirar el tubo del magneto. Se realizó un segundo lavado y al final se dejaron secar los beads por unos minutos.

Se retiró el tubo del magneto y se eluyo con $20\mu\text{l}$ de agua libre de nucleasas se mezcló por pipeteo aproximadamente 10 veces y se incubo por 2min. Para finalizar el tubo se colocó de nuevo en el magneto y se esperó que la mezcla se aclarara por último se colecto el sobrenadante y se traspasó a un tubo nuevo de 1.5ml.

Anexo 2 Morfología macroscópica y microscópica de los hongos aislados

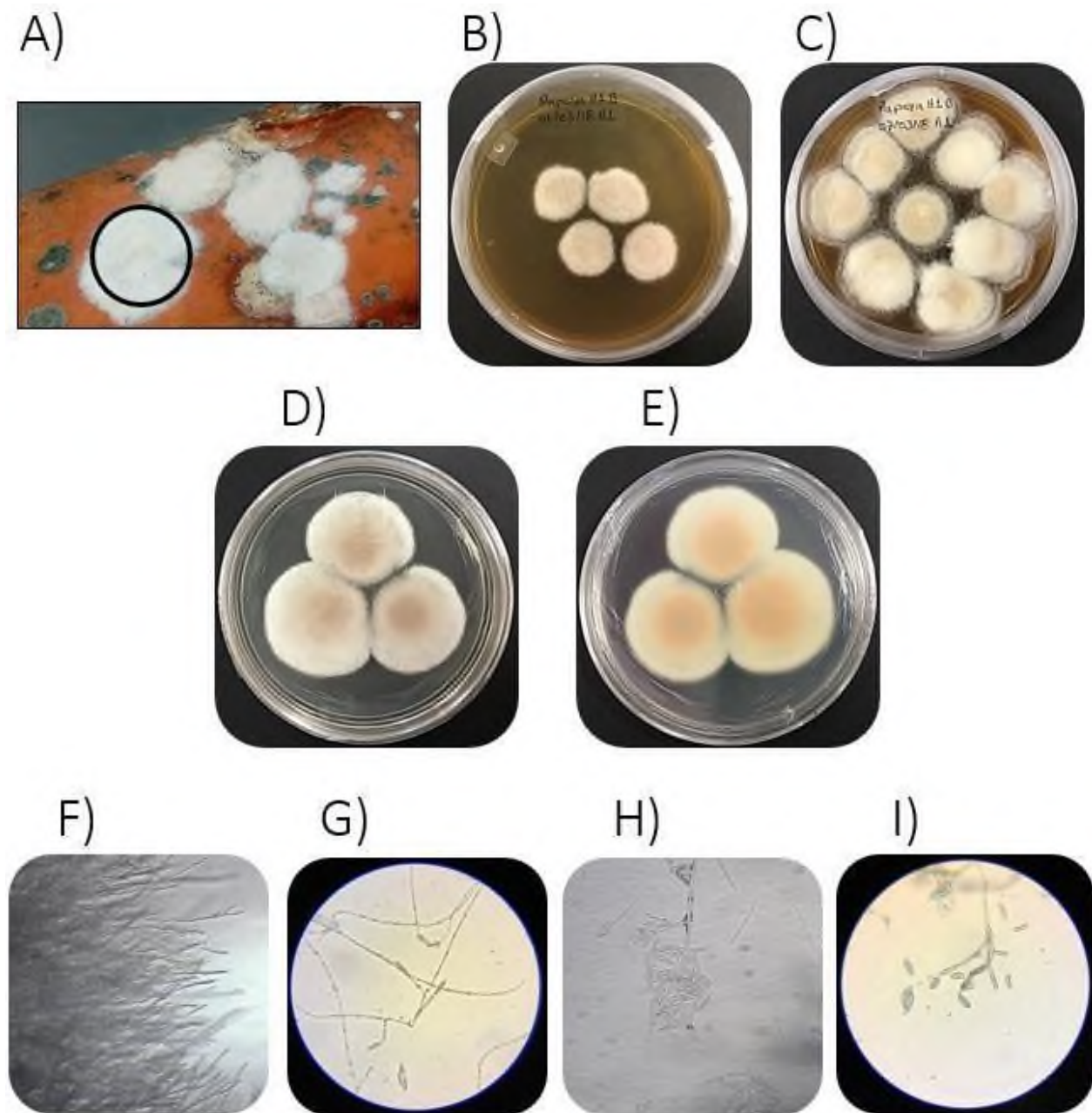


Figura 2.1 Muestra H1BR1 A) Fruta de papaya de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo. I) Tipo de espora.

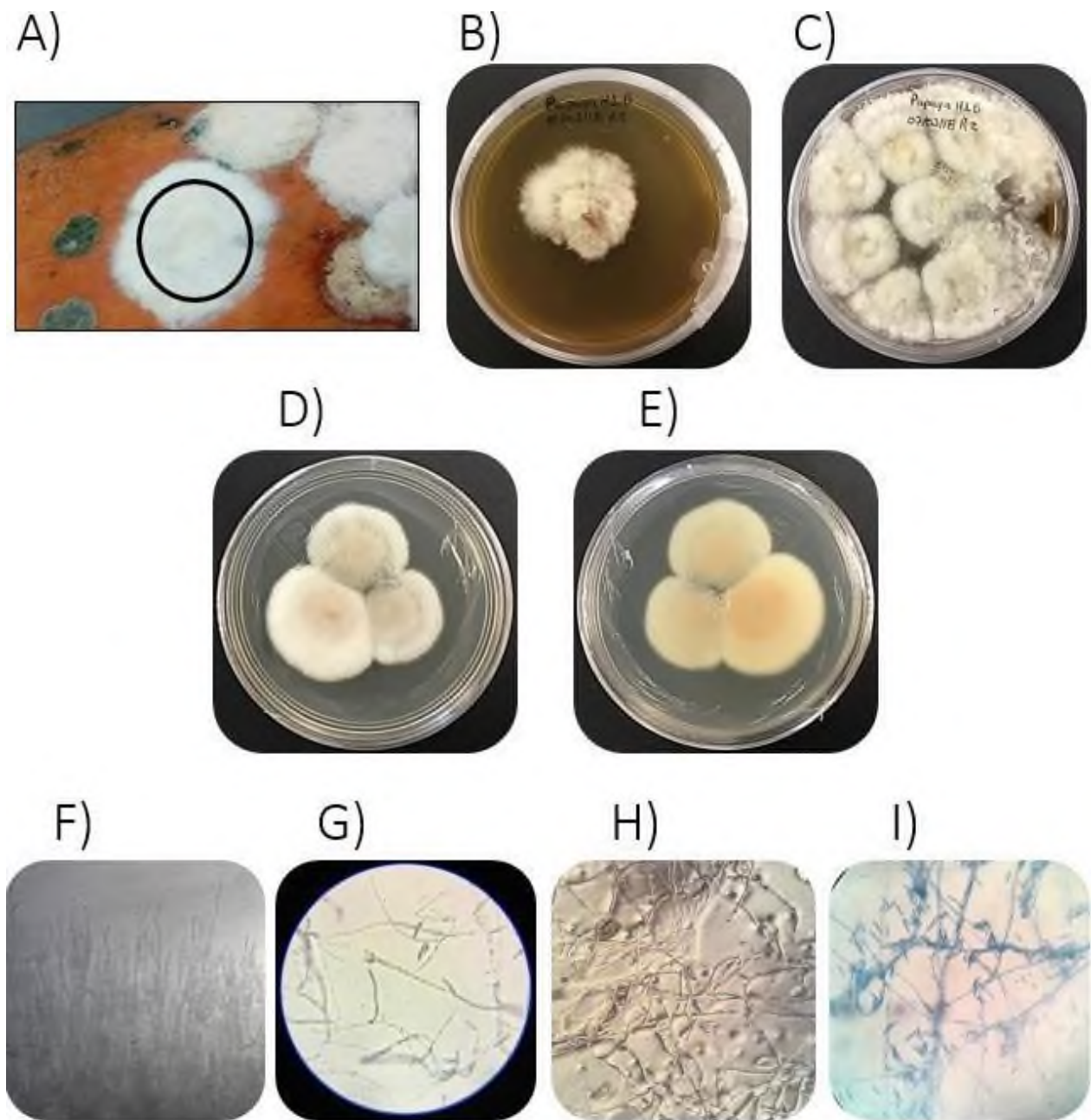


Figura 2.2 Muestra H1BR2 A) Fruta de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo. I) Tipo de espora.

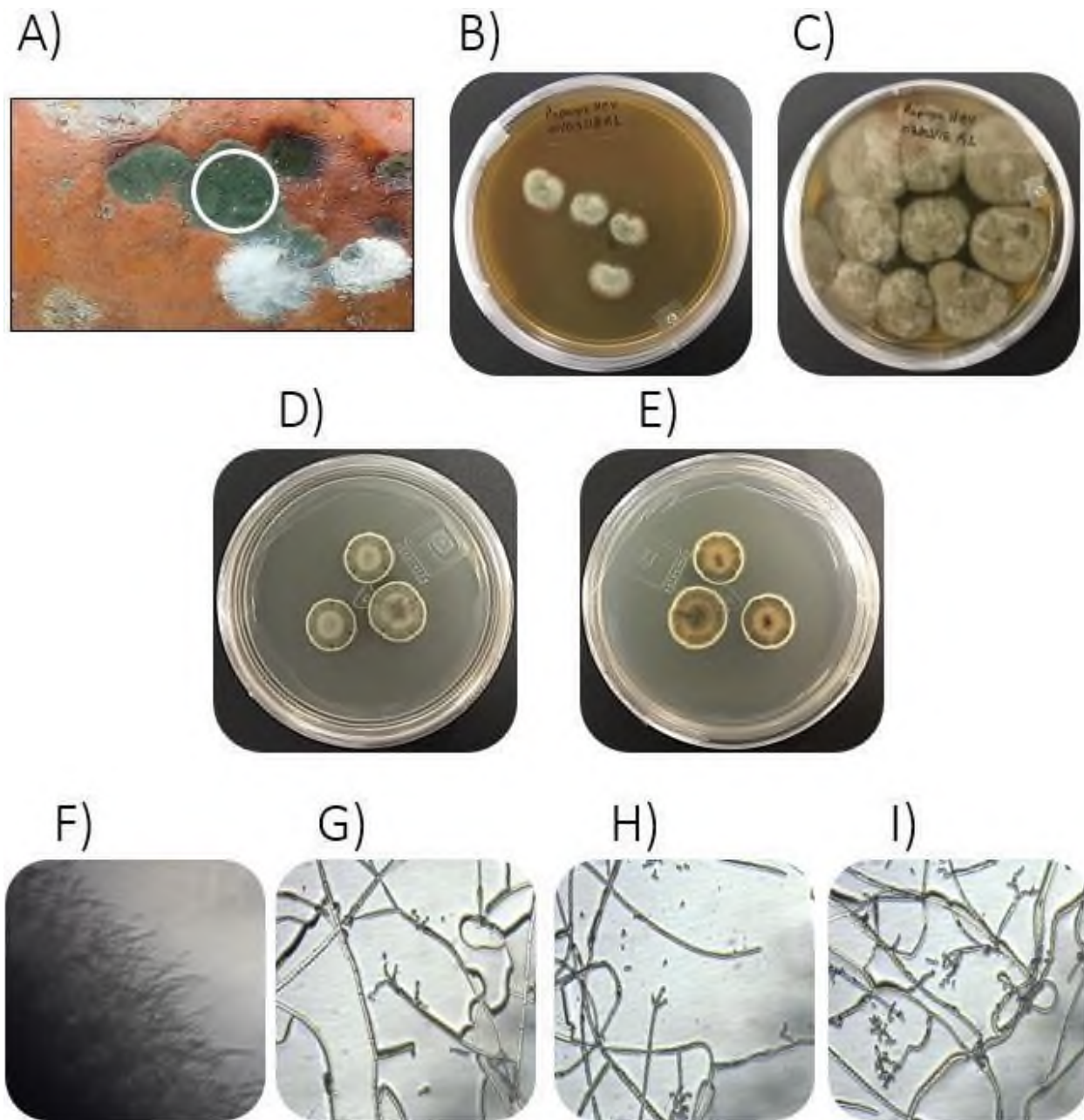


Figura 2.3 Muestra H2VR1) Fruta de papaya de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo. I) Tipo de espora.

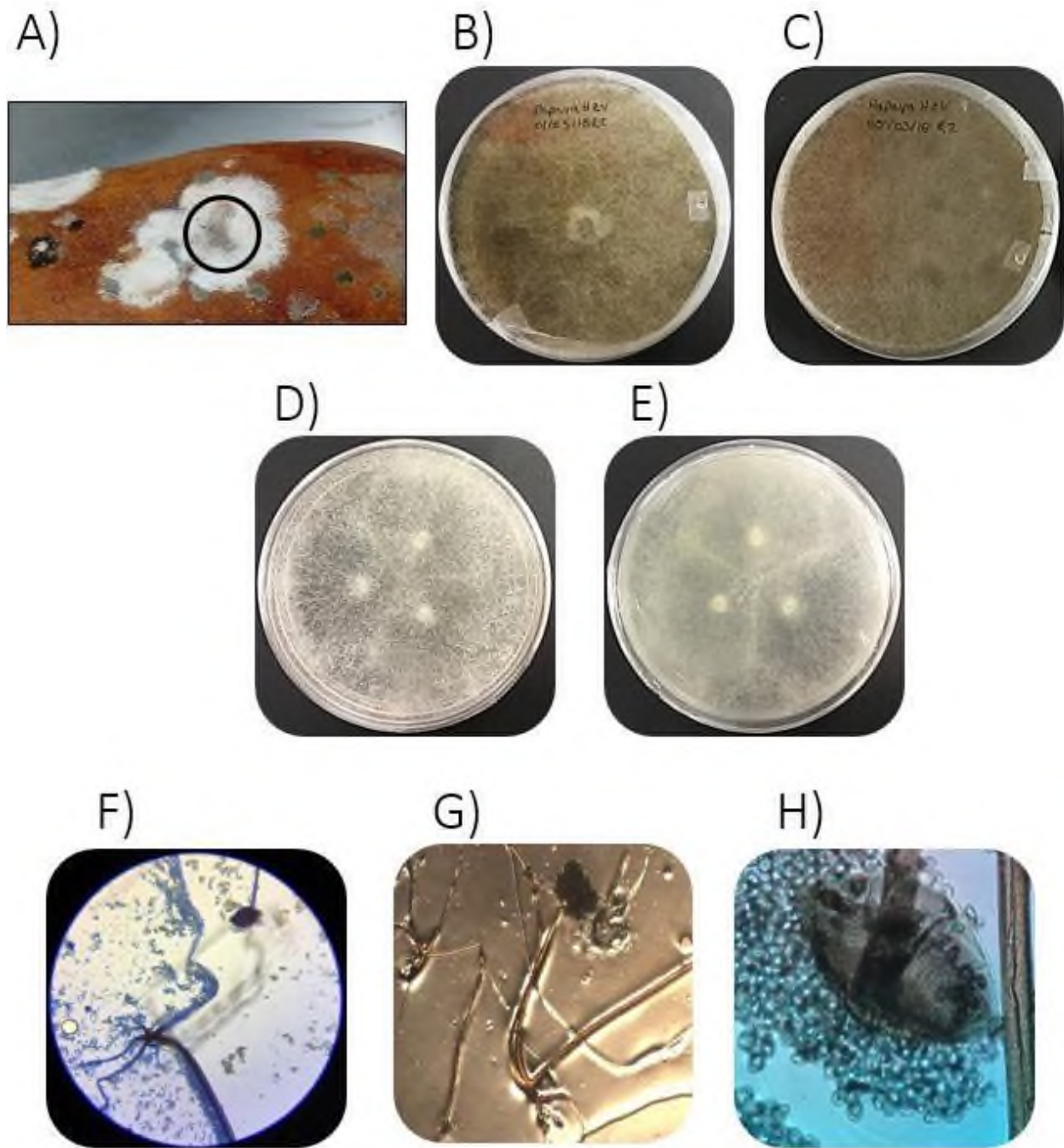


Figura 2.4 Muestra H2VR2 A) Fruta de papaya de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo.

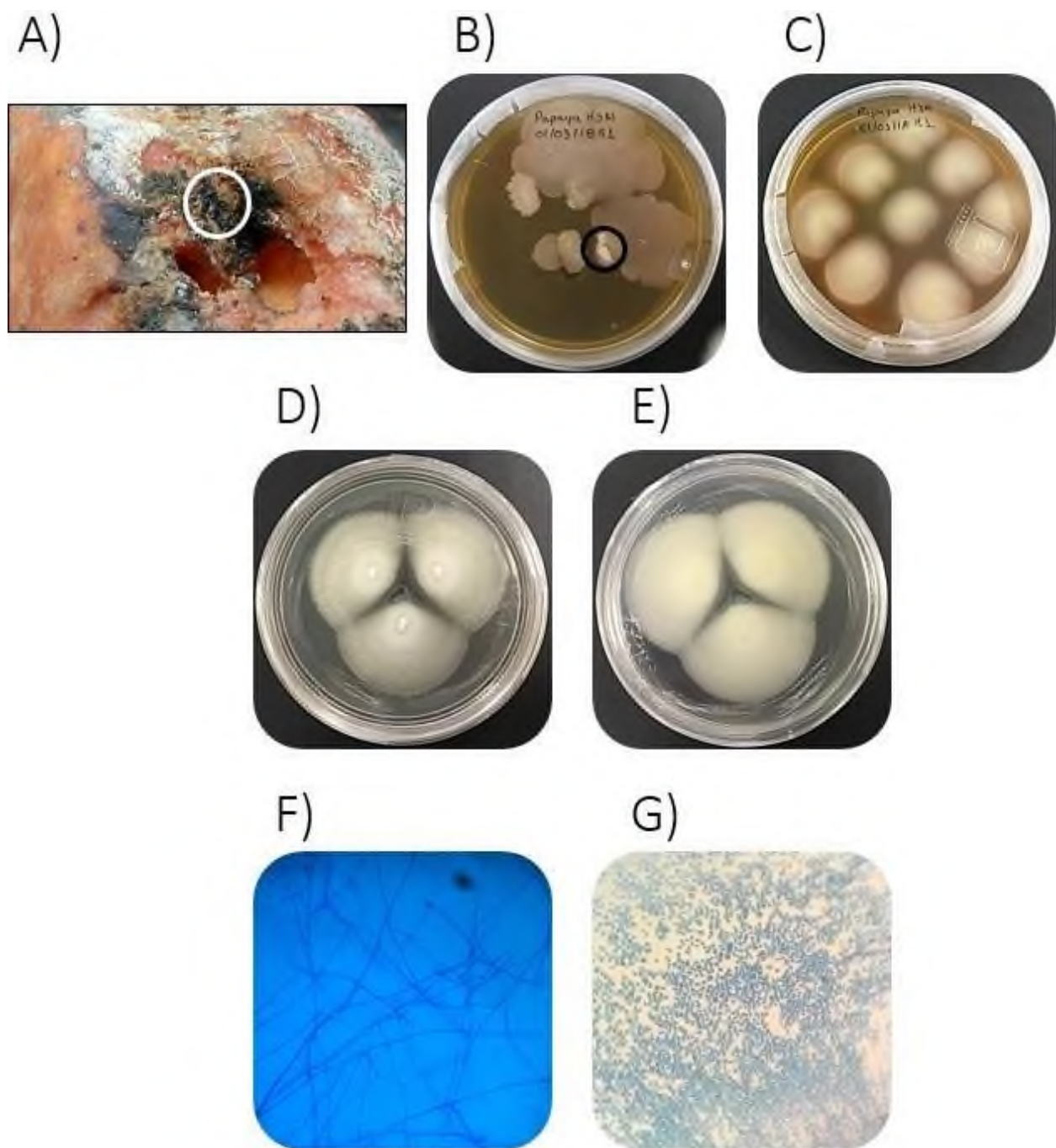


Figura 2.5 Muestra H3NR1 A) Fruta de papaya de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa.

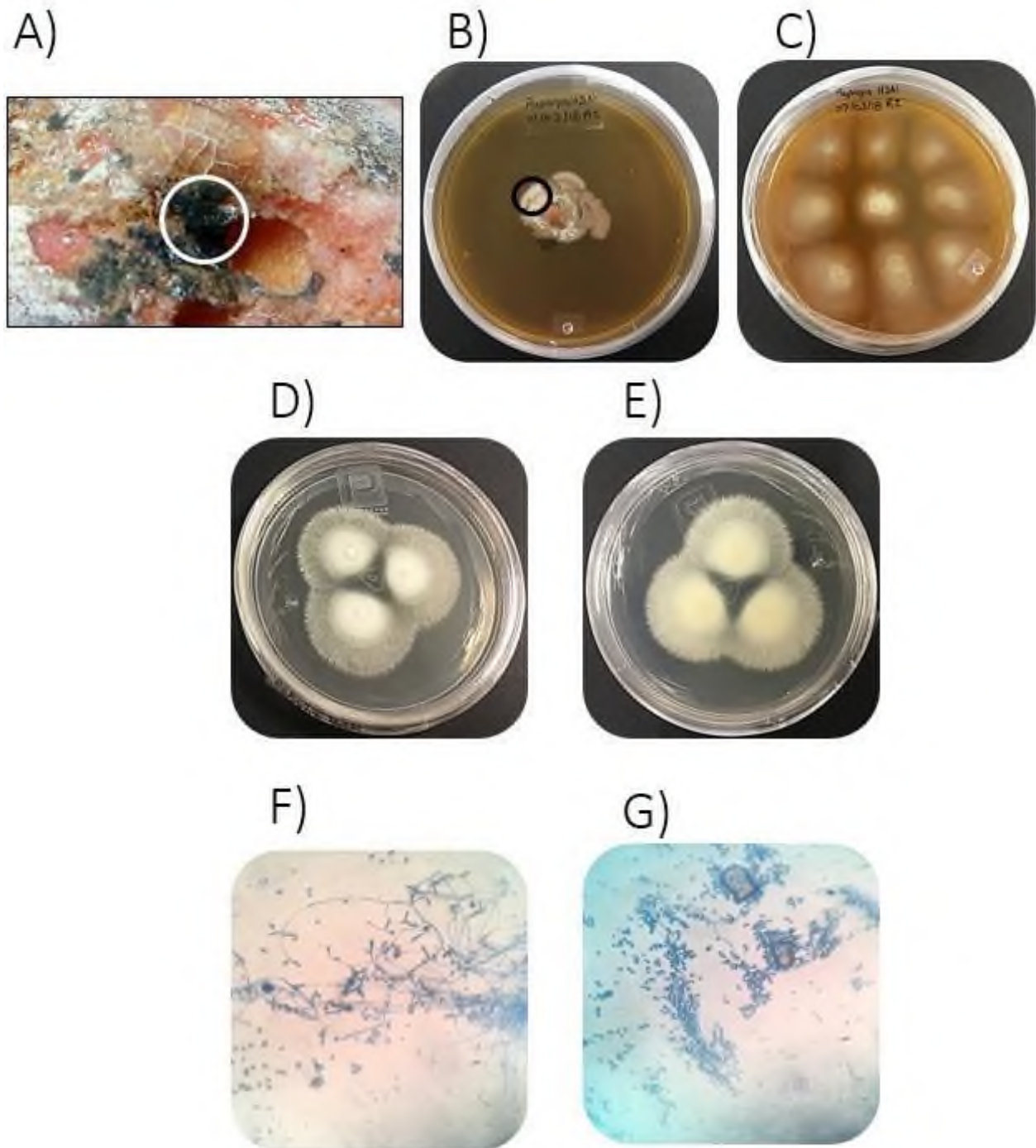


Figura 2.6 Muestra H3NR2 A) Fruta de papaya de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa.

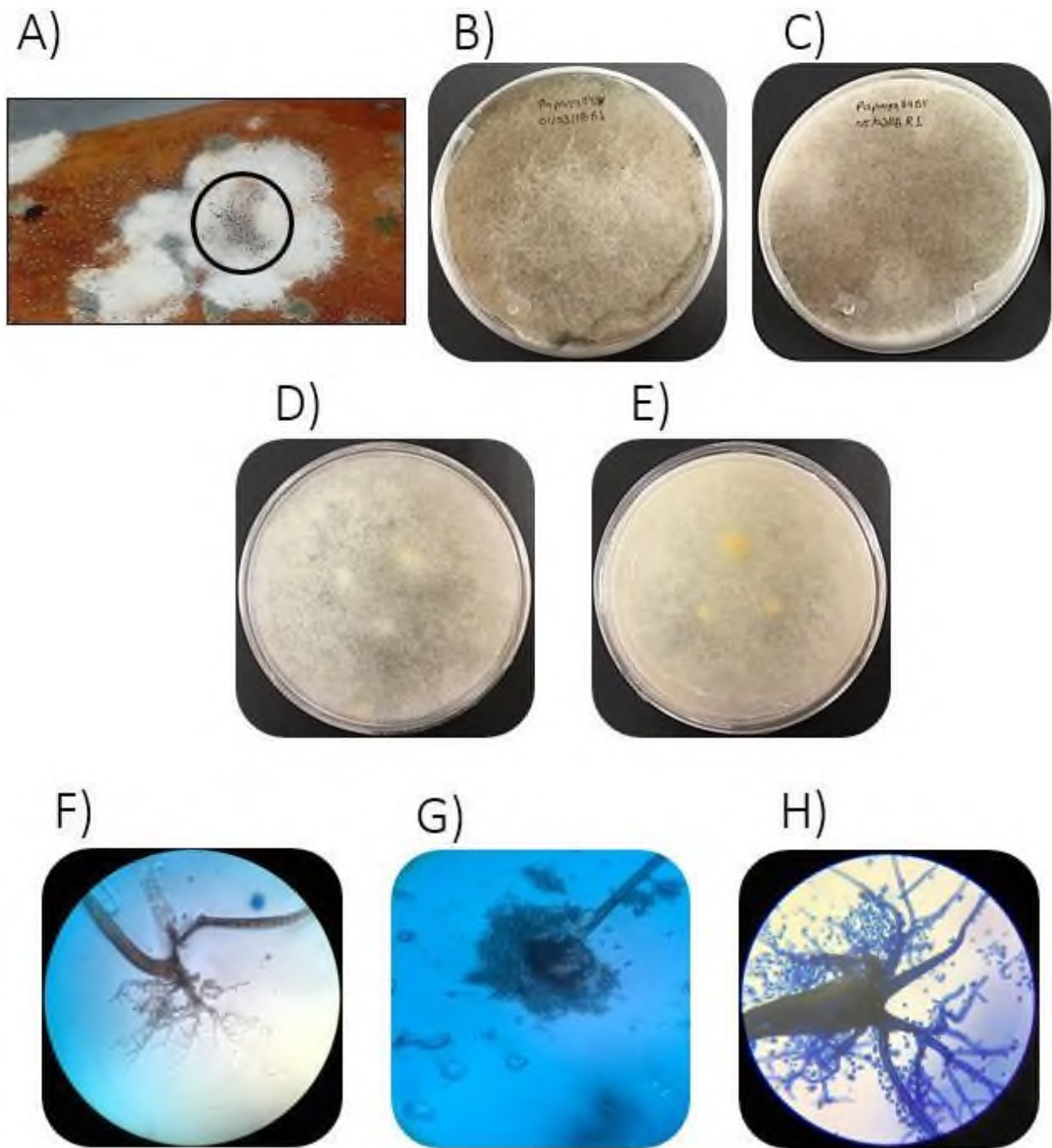


Figura 2.7 Muestra H4BNR1 A) Fruta de papaya de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo.

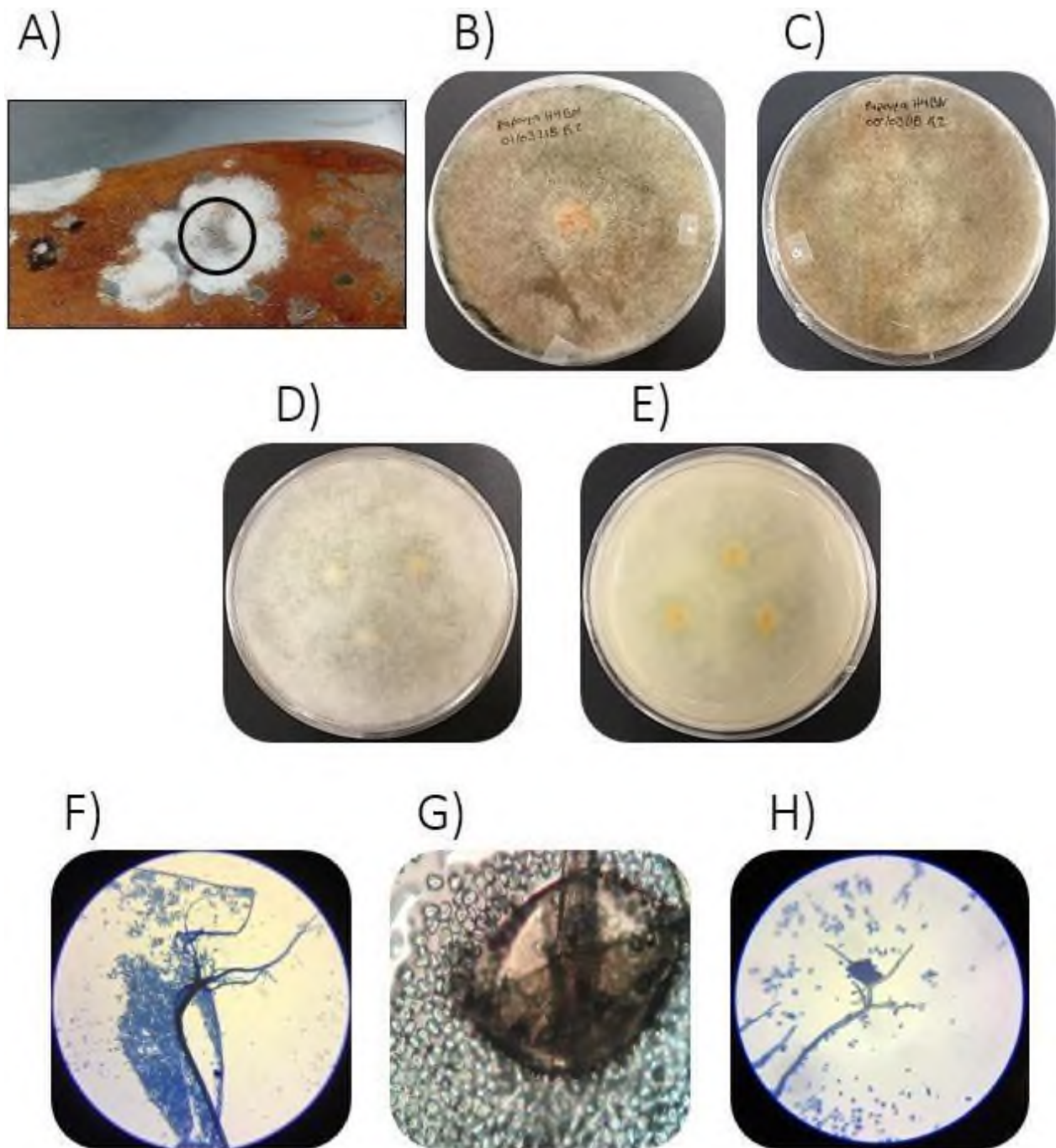


Figura 2.8 Muestra H4BNR2A) Fruta de papaya de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo.

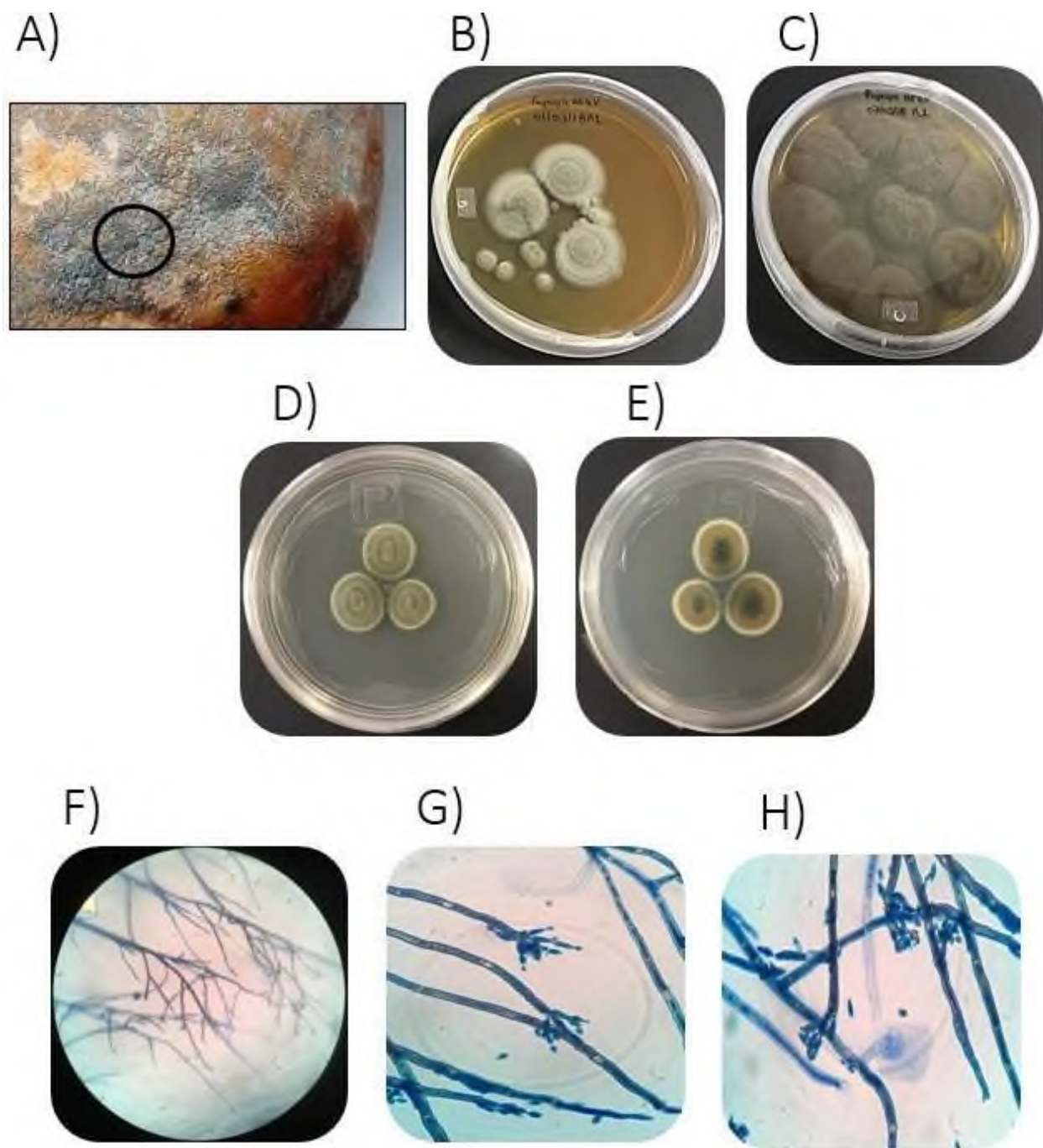


Figura 2.9 Muestra H5GVR1 A) Fruta de papaya de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo.

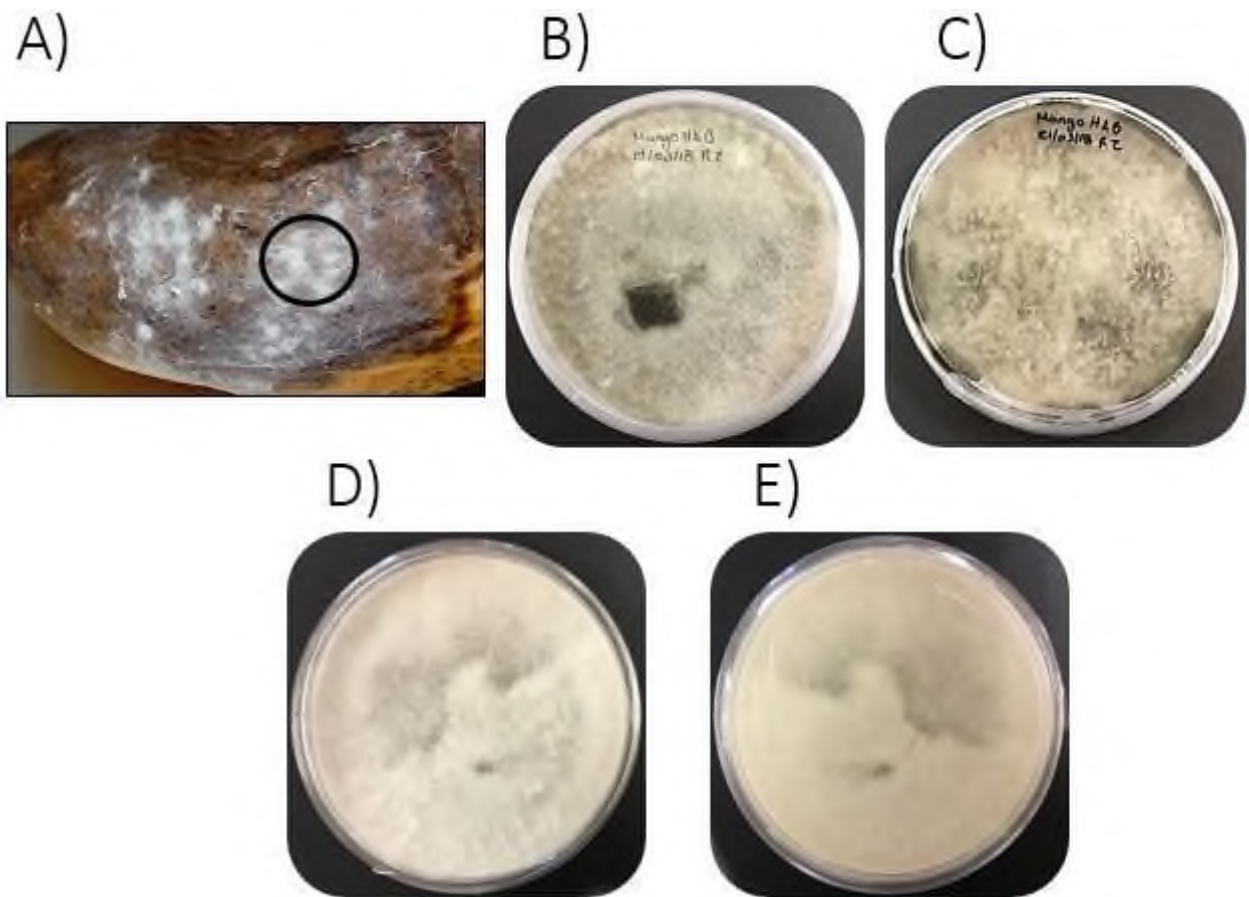


Figura 2.10 Muestra H1BR2 A) Fruta de mango de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

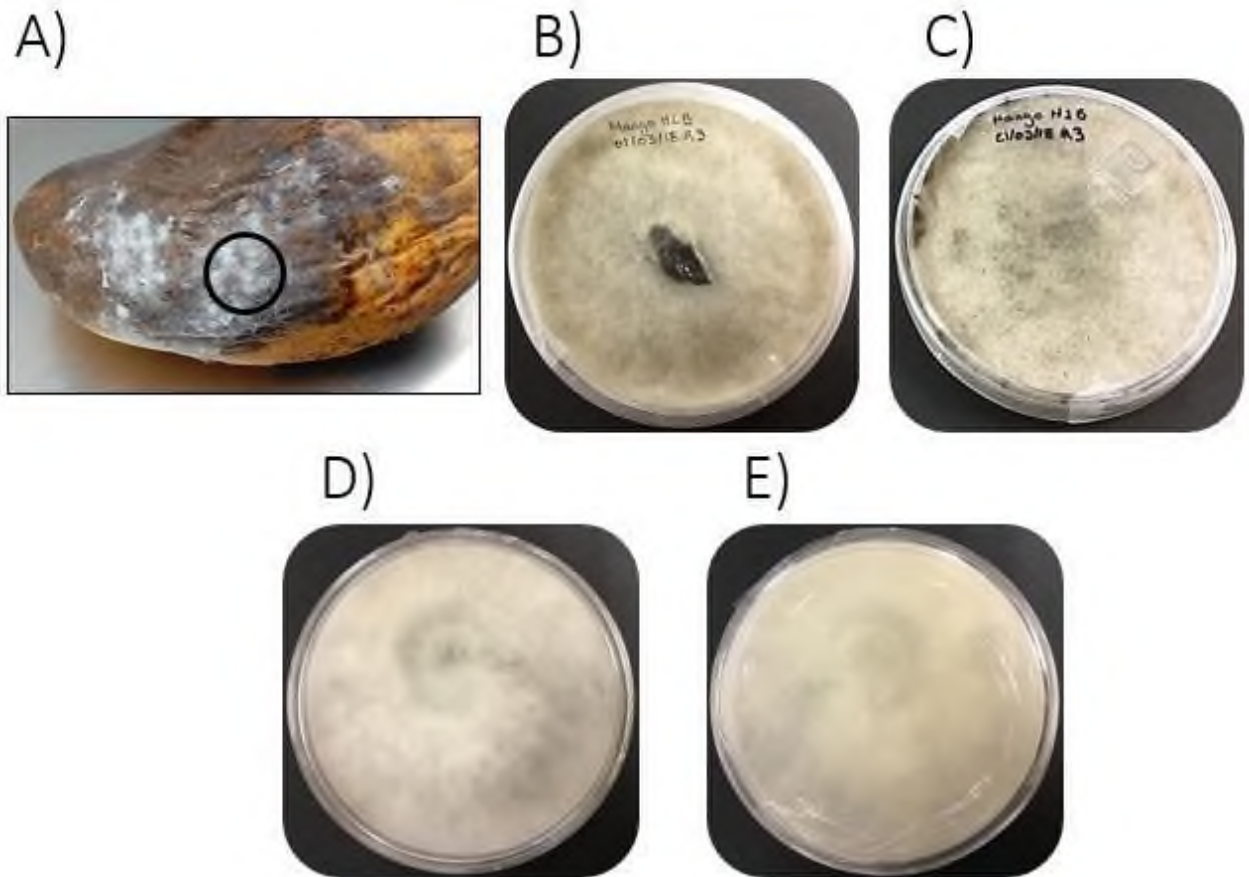


Figura 2.11 Muestra H1BR3 A) Fruta de mango de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

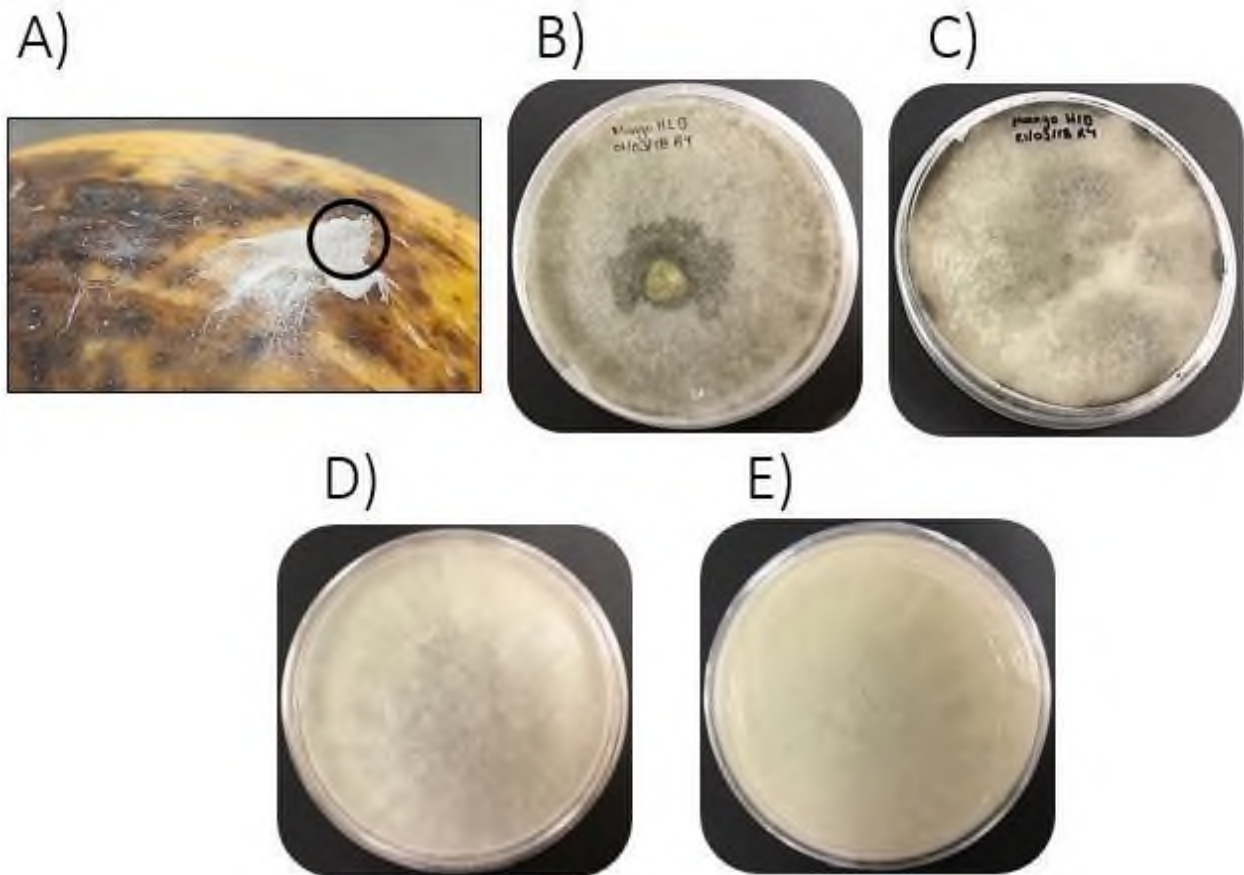


Figura 2.12 Muestra H1BR4 A) Fruta de mango de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

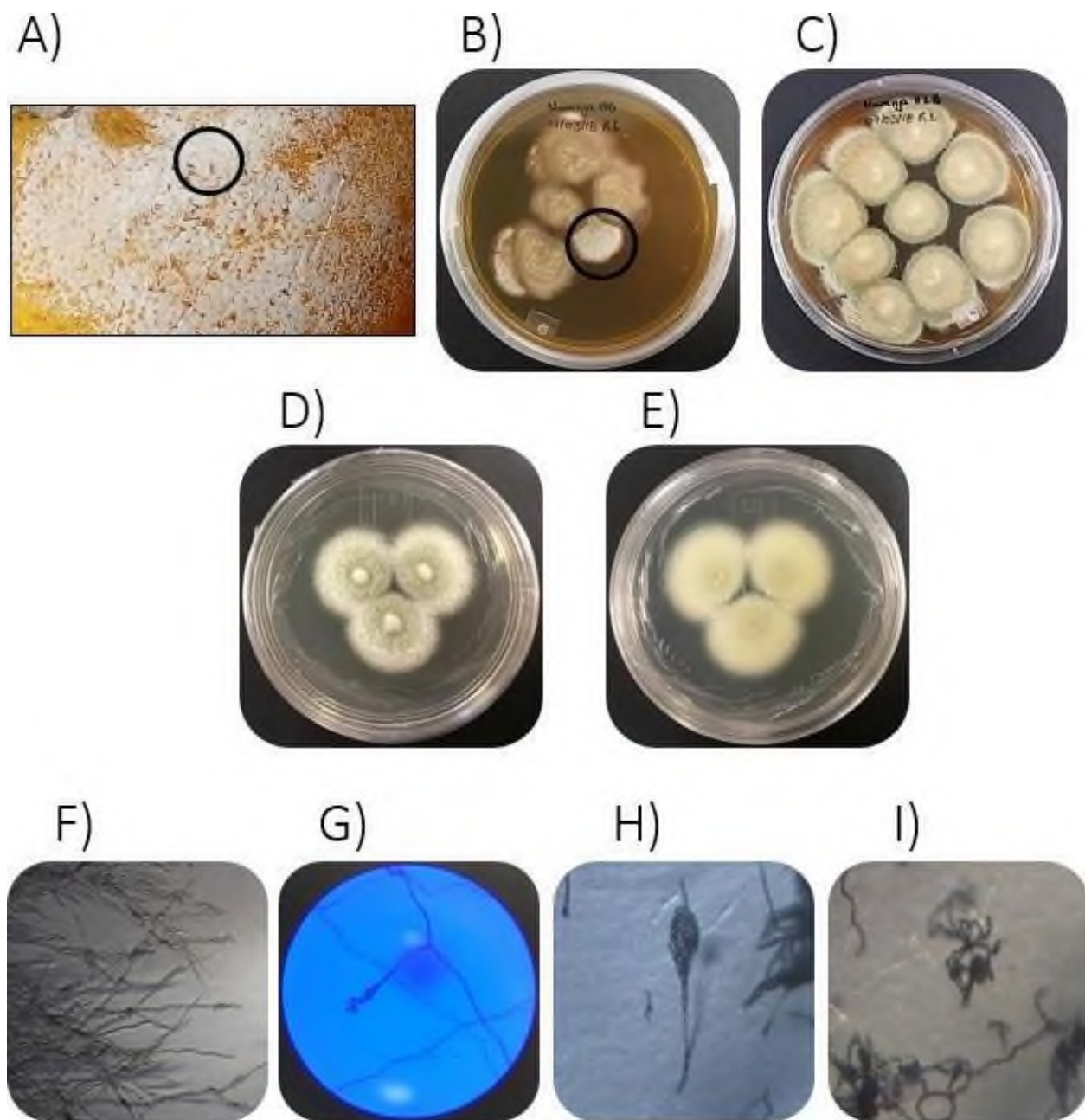


Figura 2.13 Muestra H1BR1 A) Fruta de naranja de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo. I) Tipo de espóra.

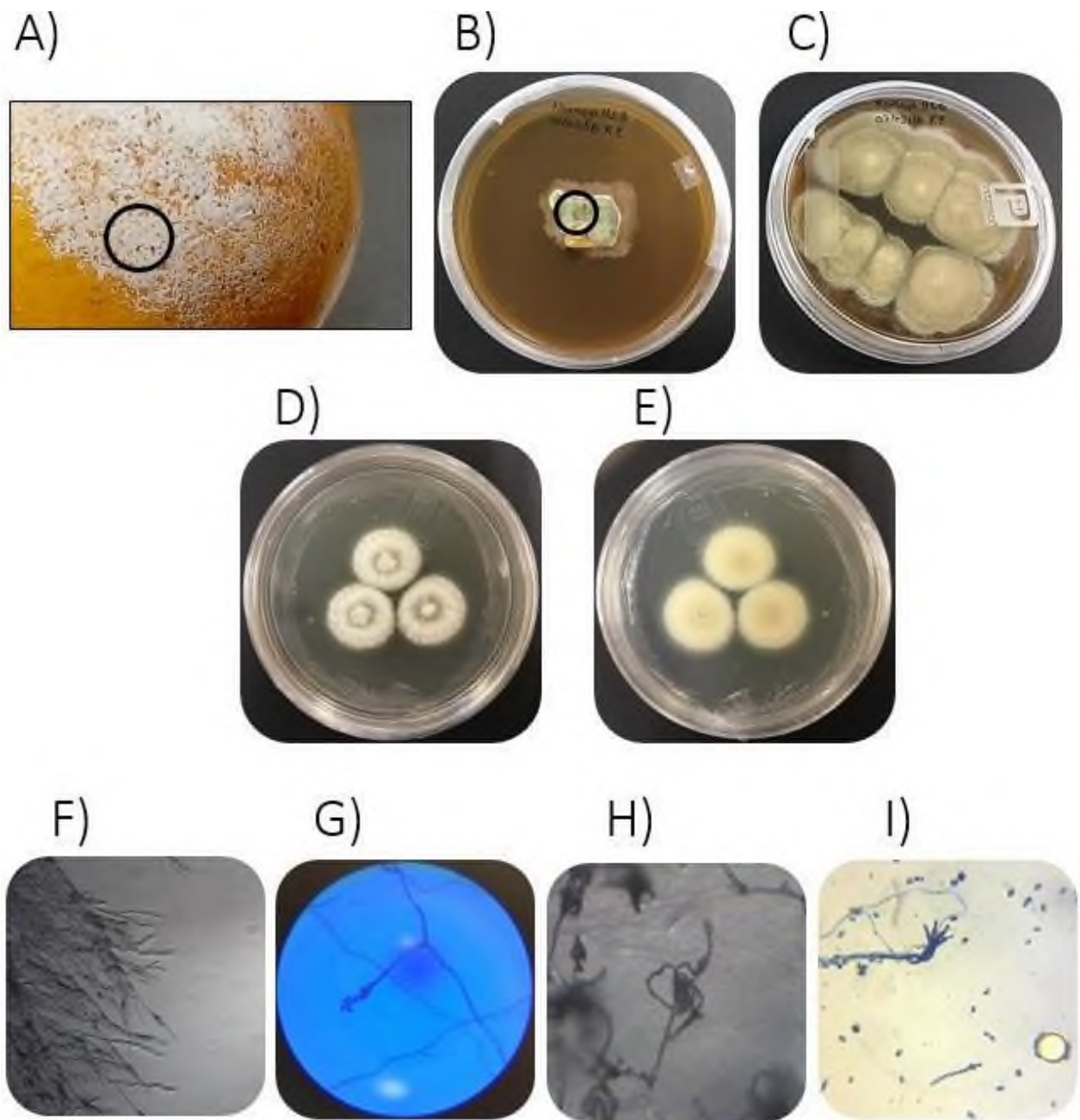


Figura 2.14 Muestra H1BR2 A) Fruta de naranja de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo. I) Tipo de espora.

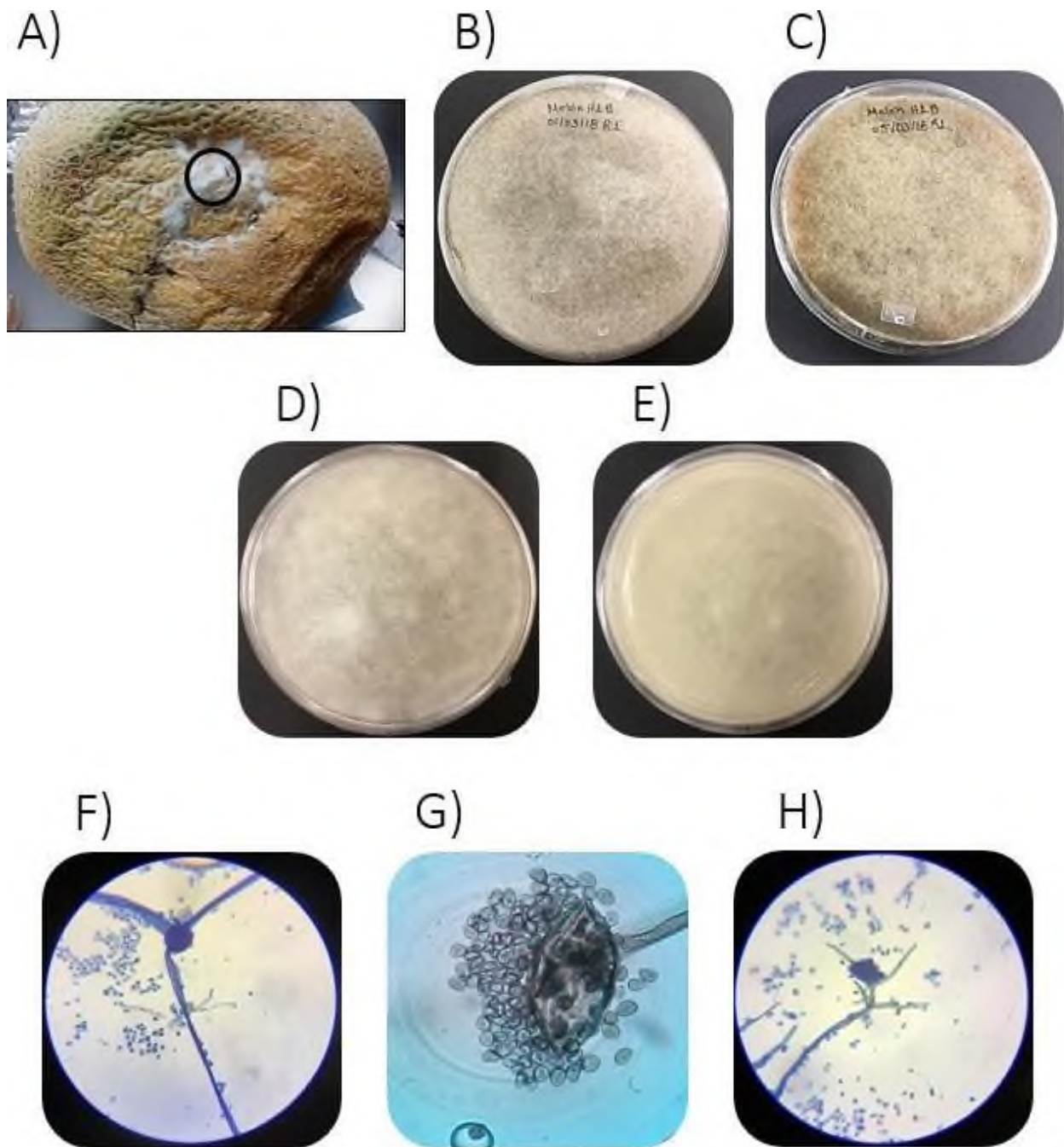


Figura 2.15 Muestra H1BR1 A) Fruta de melón de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo.

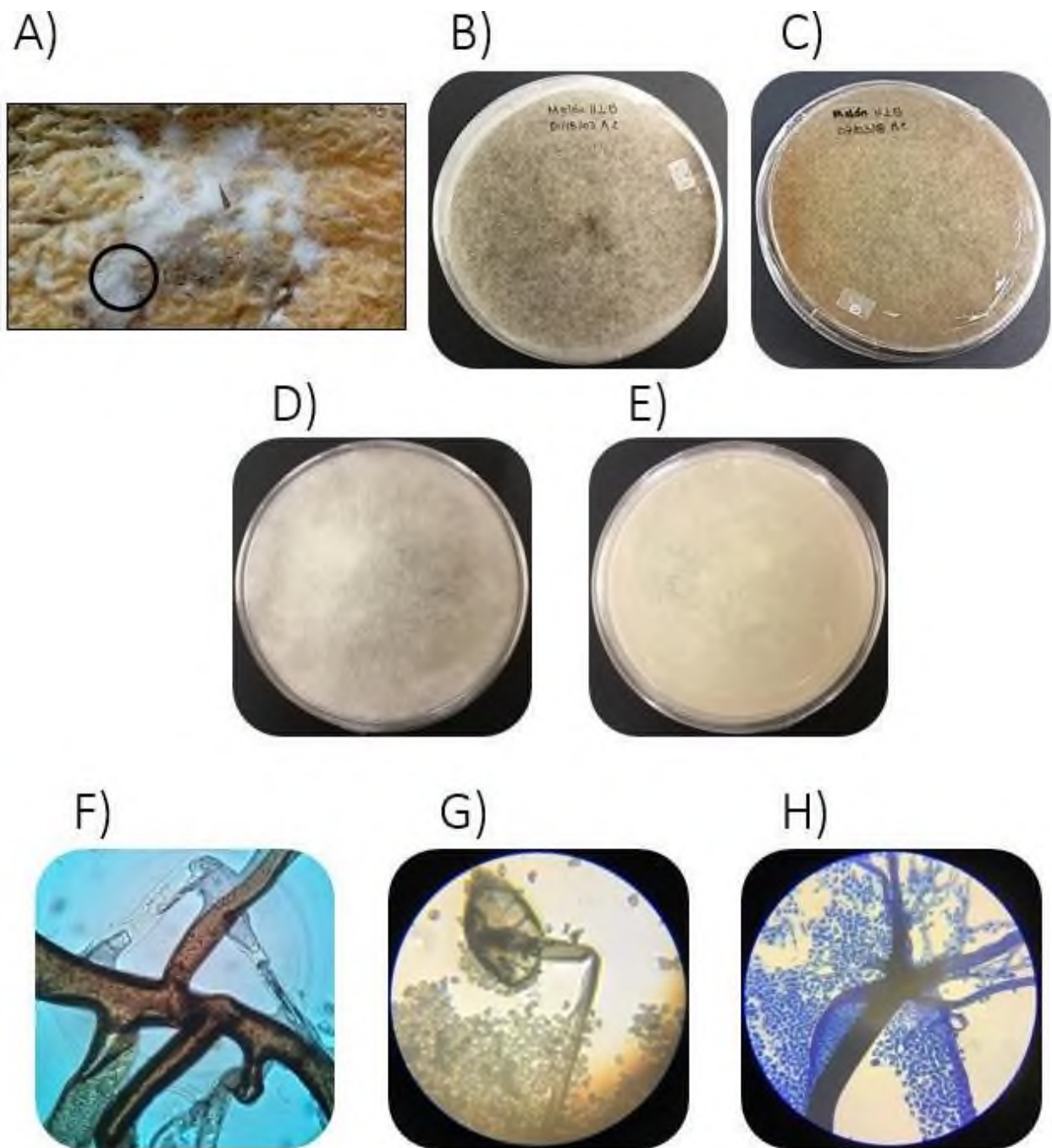


Figura 2.16 Muestra H1BR2 A) Fruta de melón de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas de hongo.

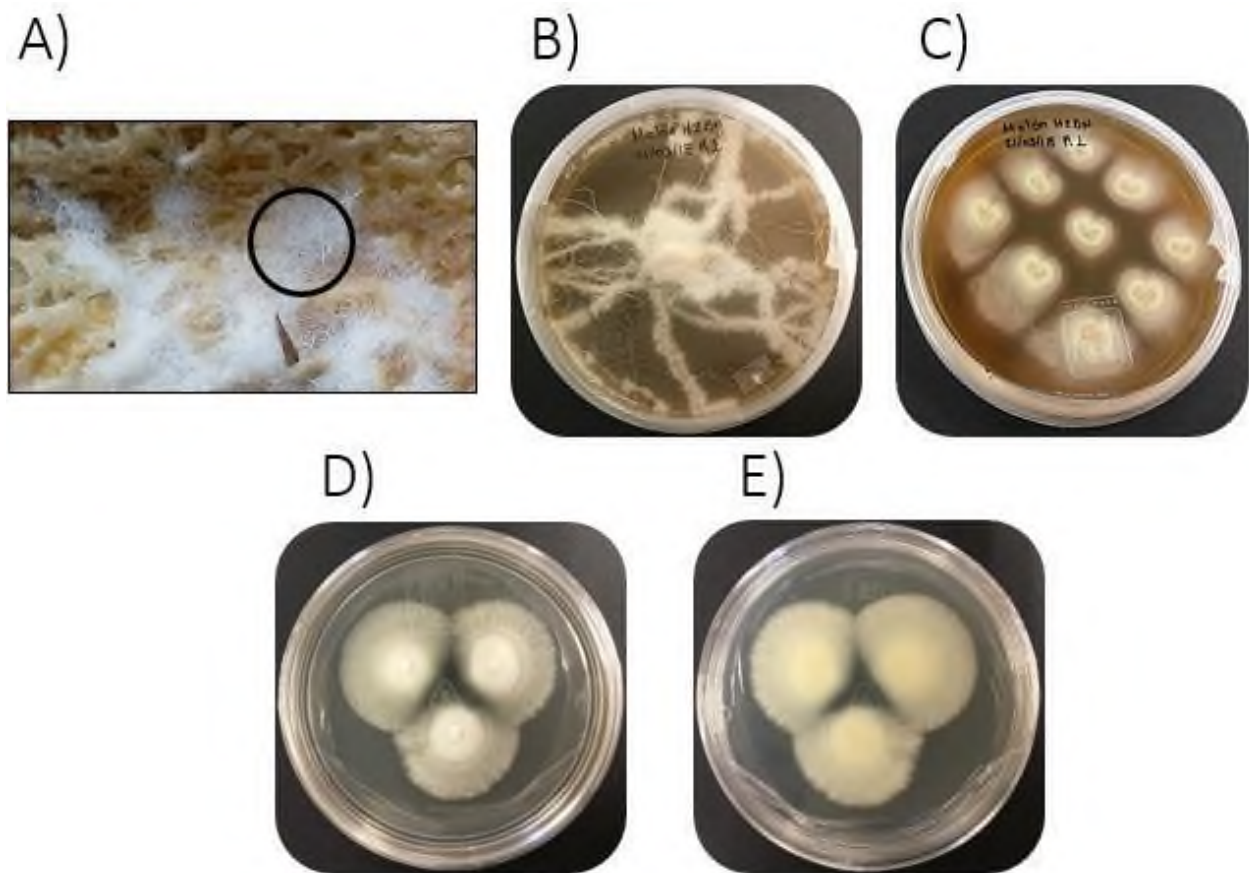


Figura 2.17 Muestra H2BNR1 A) Fruta de melón de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

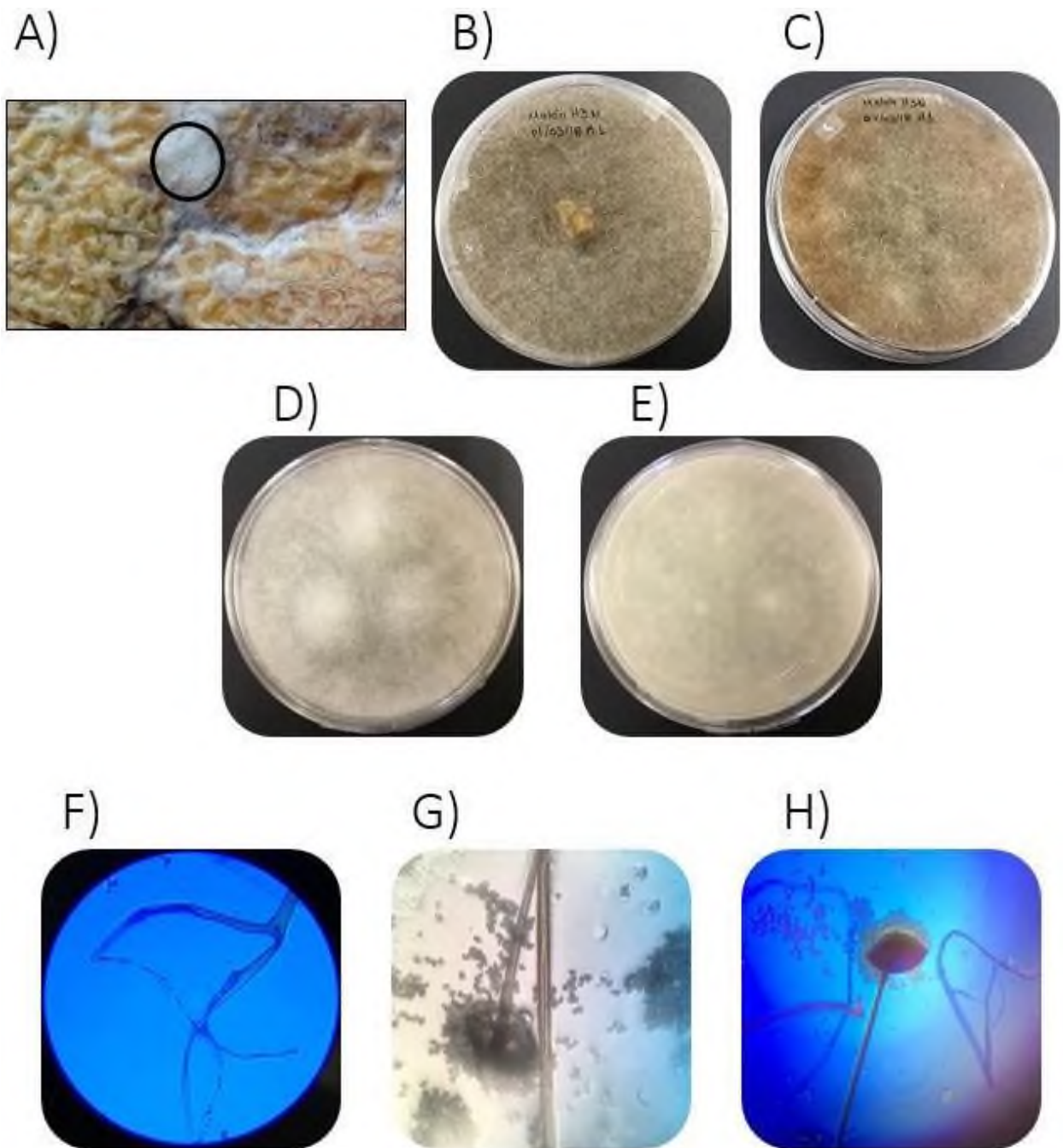


Figura 2.18 Muestra H3NR1 A) Fruta de melón de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo.

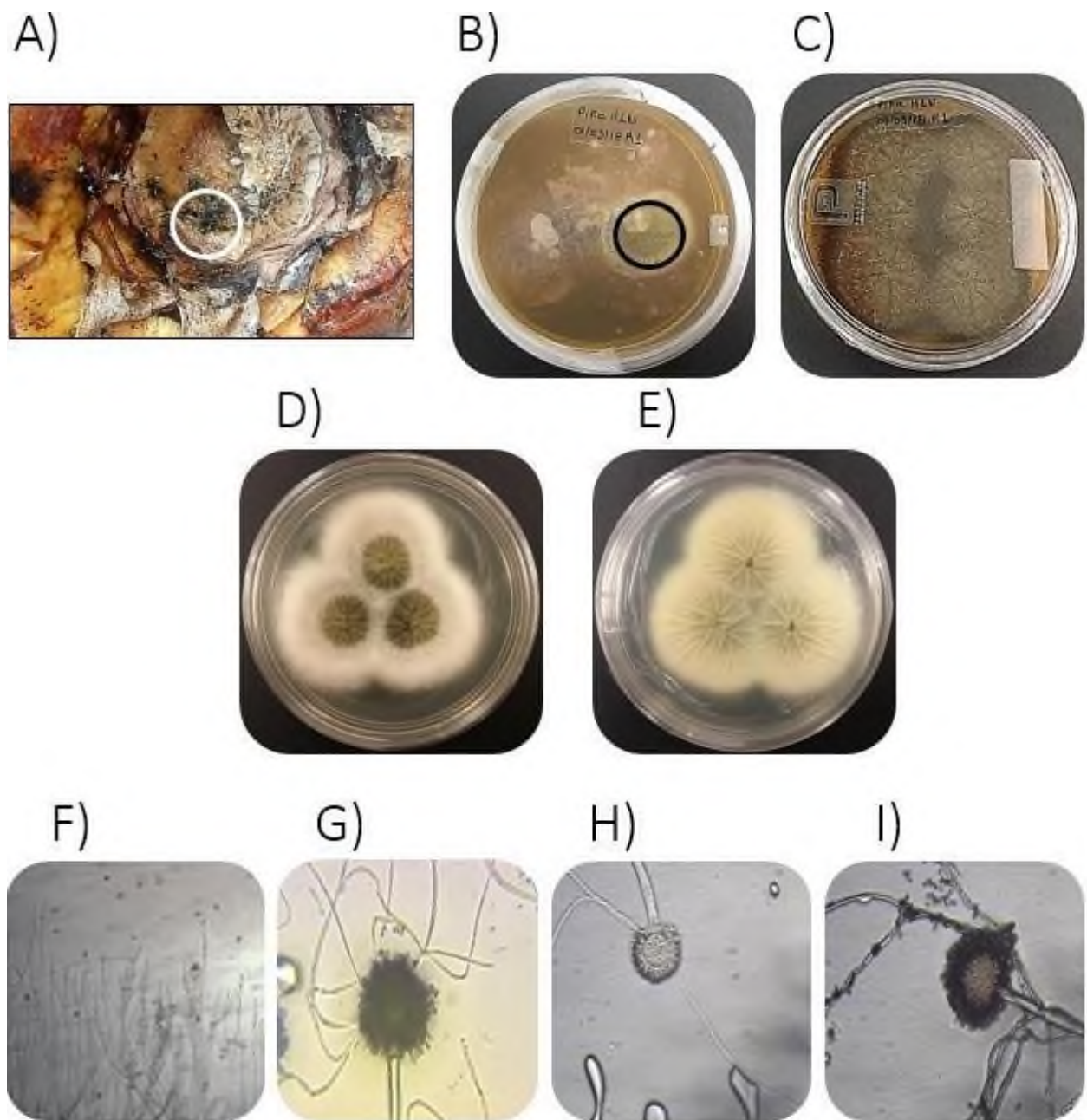


Figura 2.19 Muestra H1NR1 A) Fruta de piña de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri. F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo. I) Tipo de espora.

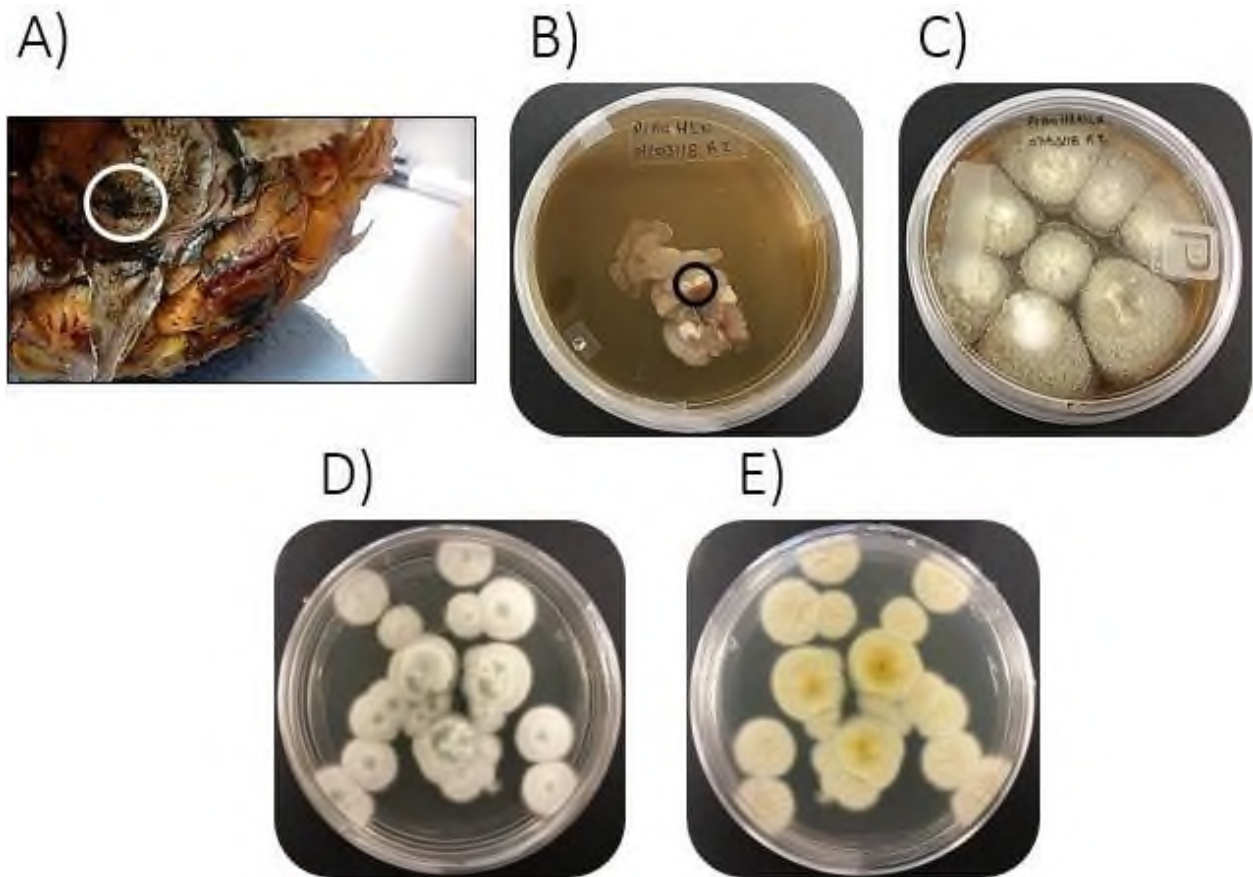


Figura 2.20 Muestra H1N1AR2 A) Fruta de piña de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

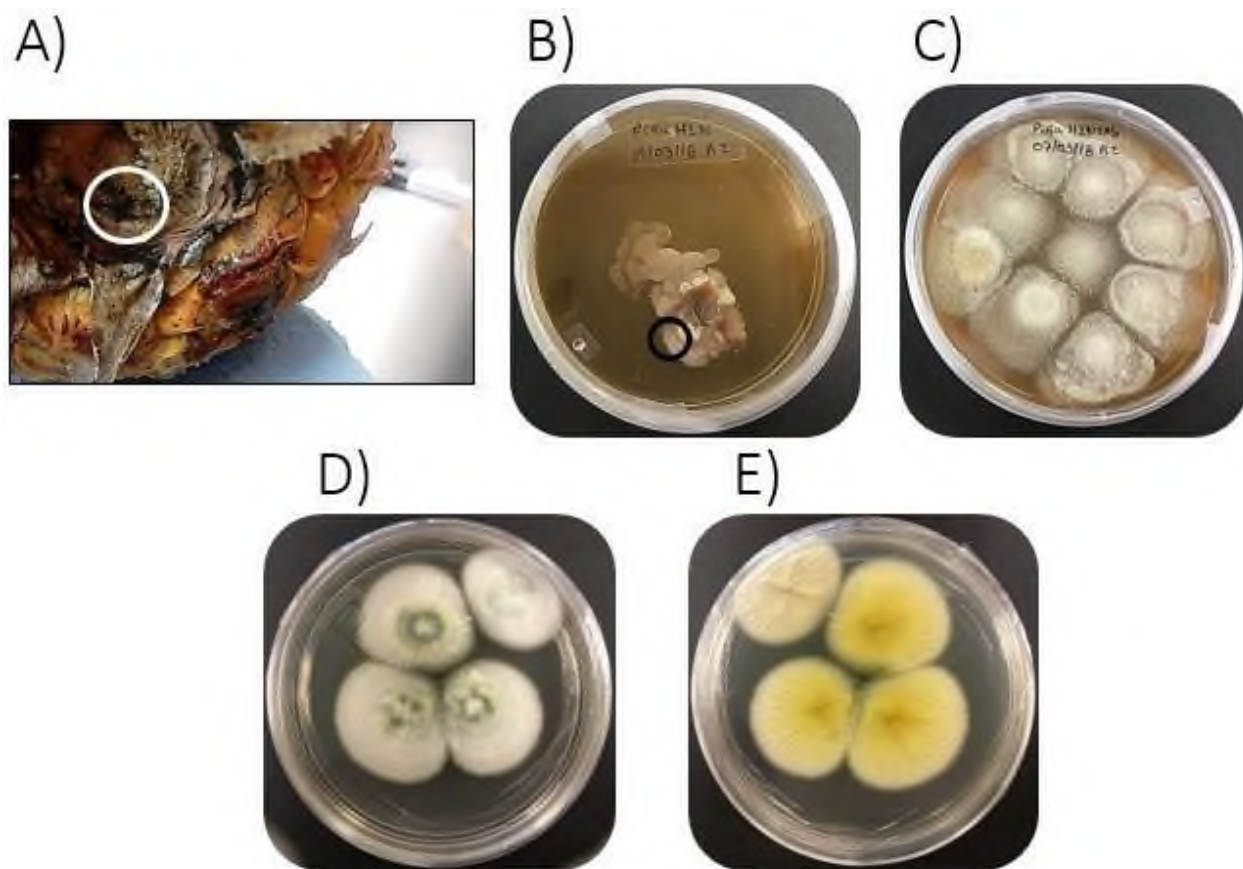


Figura 2.21 Muestra H1N2AbR2 A) Fruta de piña de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

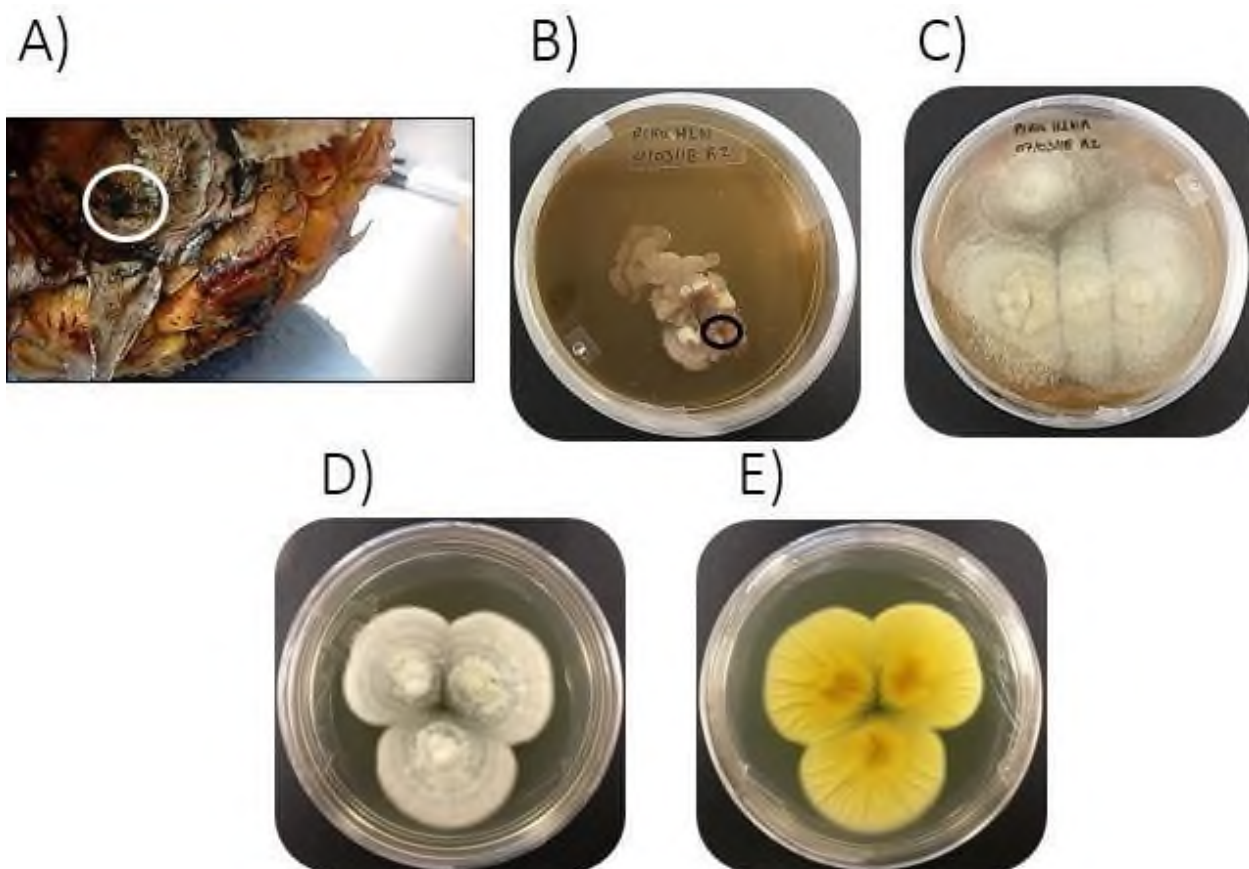


Figura 2.22 Muestra H1NRR2 A) Fruta de piña de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

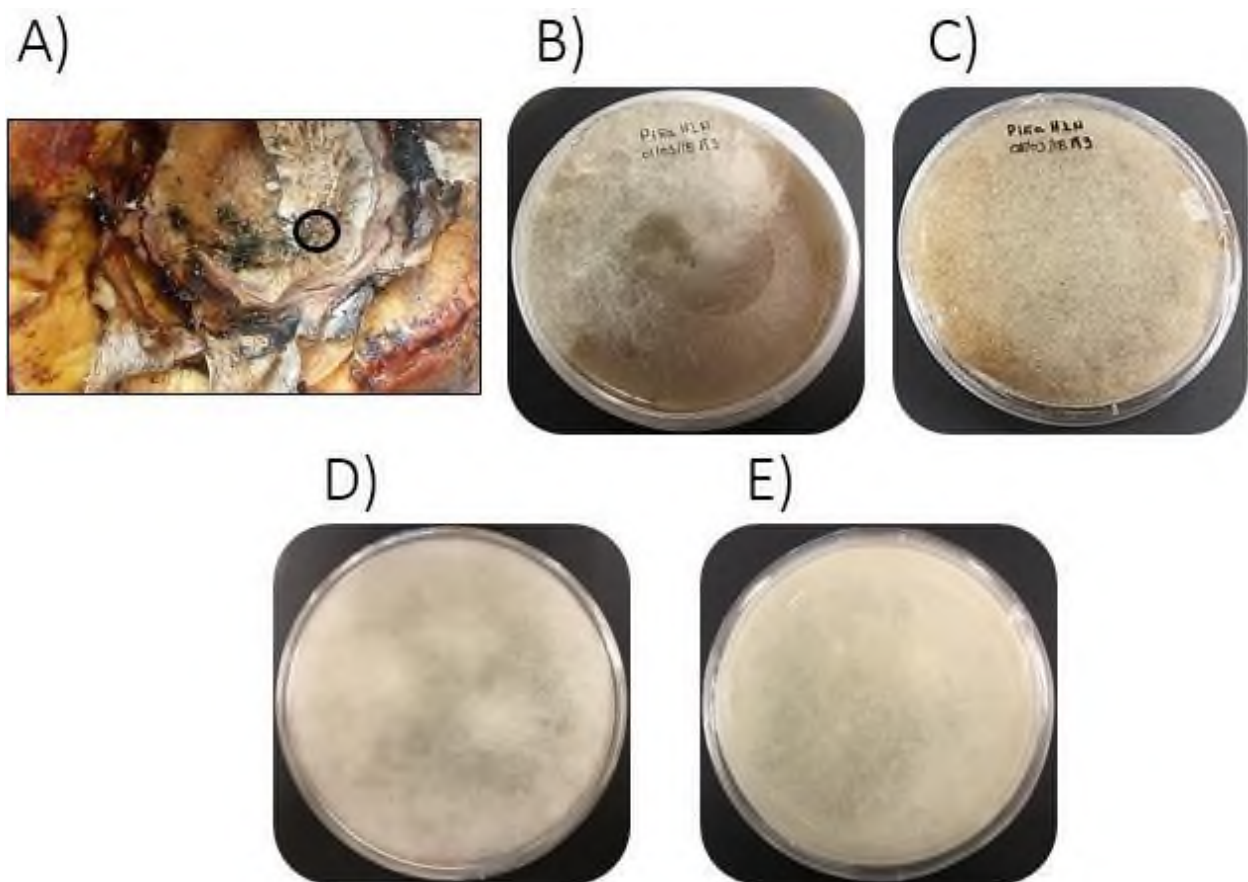


Figura 2.23 Muestra H1NR3 A) Fruta de piña de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

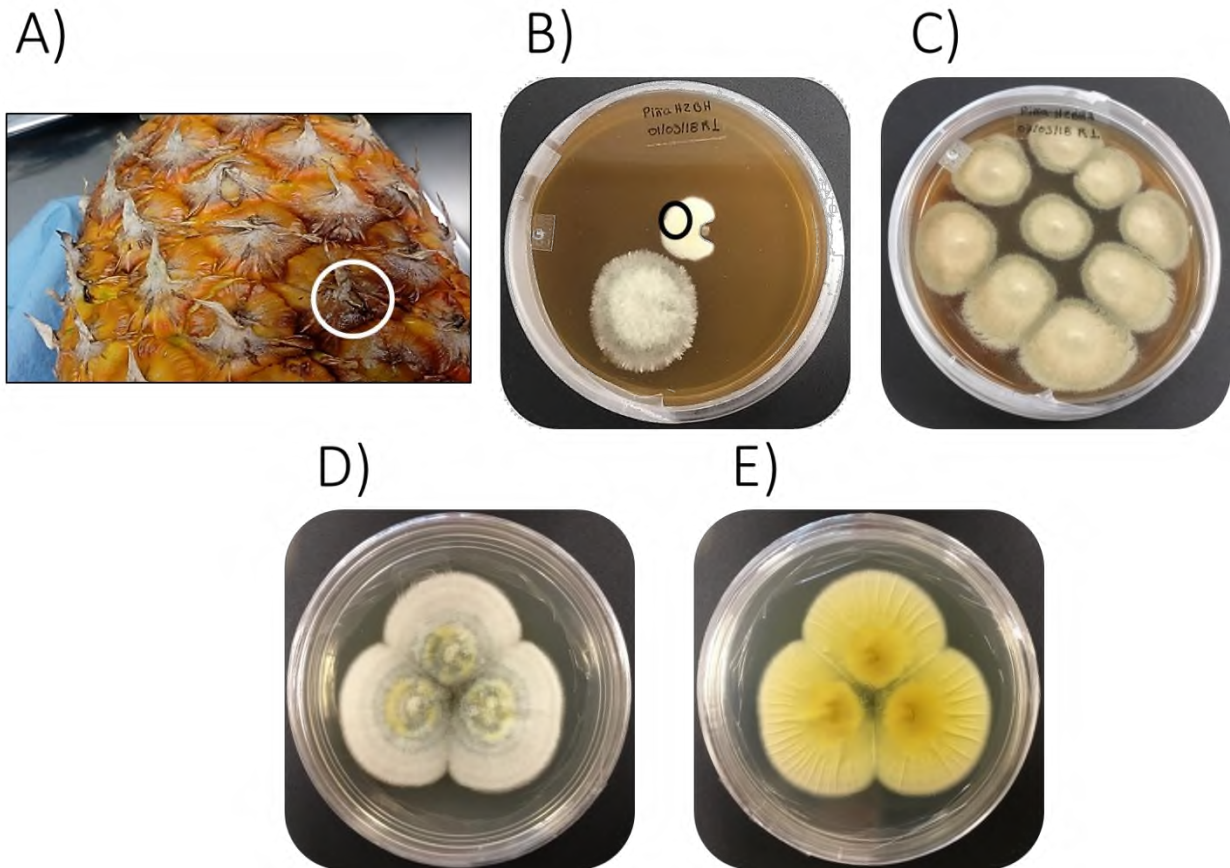


Figura 2.24 Muestra H2BHAR1 A) Fruta de piña de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

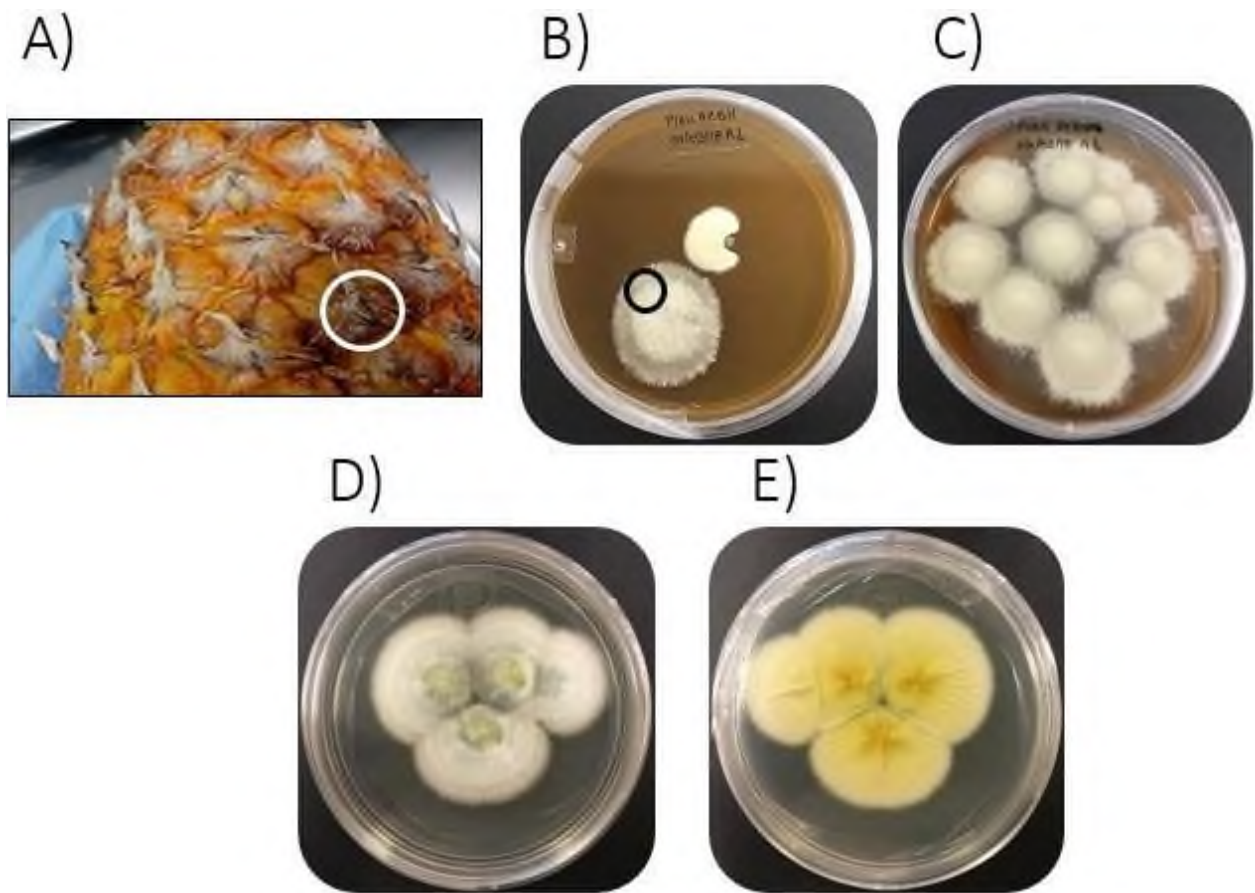


Figura 2.25 Muestra H2BHAbR1 A) Fruta de piña de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

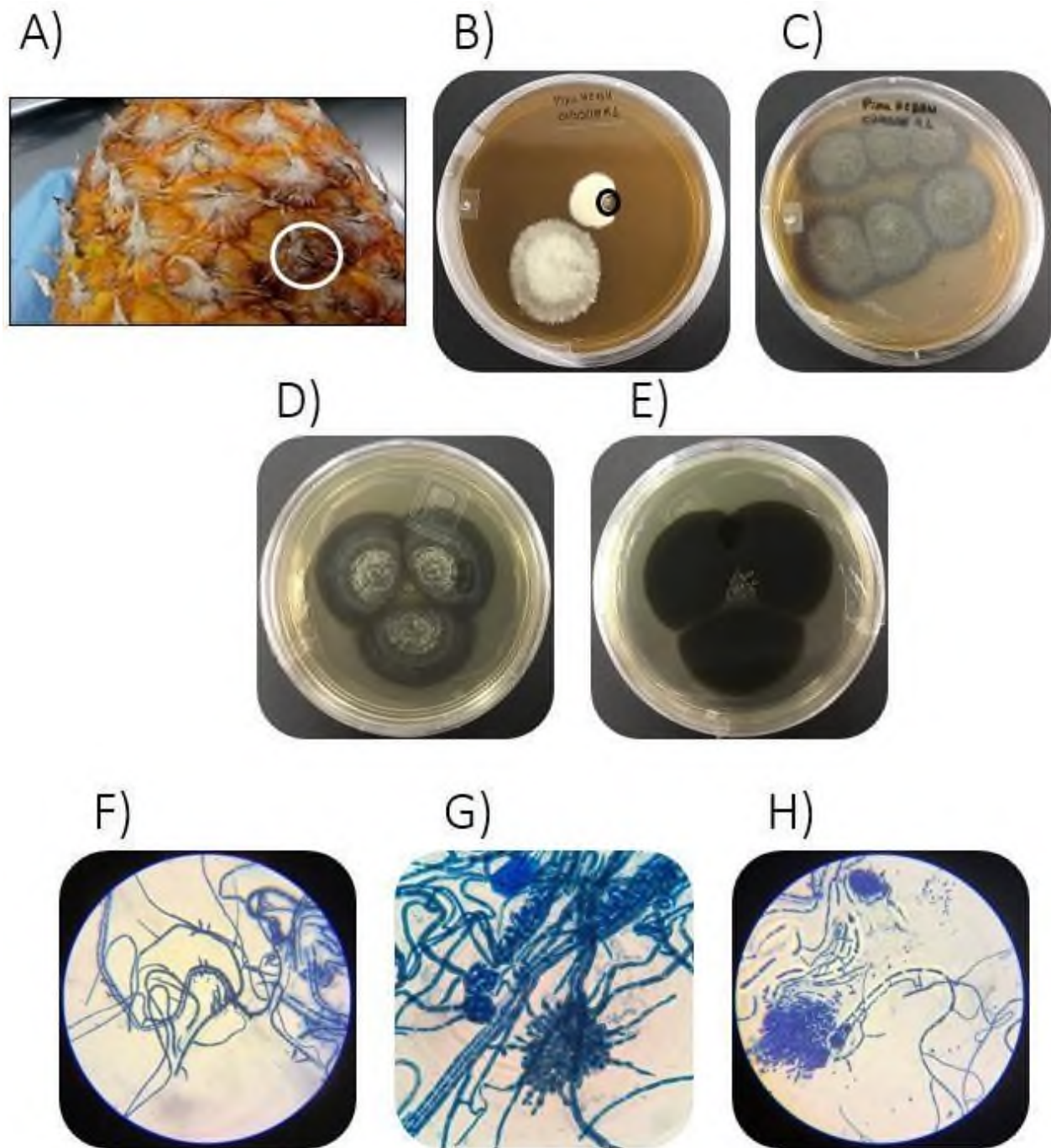


Figura 2.26 Muestra H2BHNR1 A) Fruta de piña de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo.

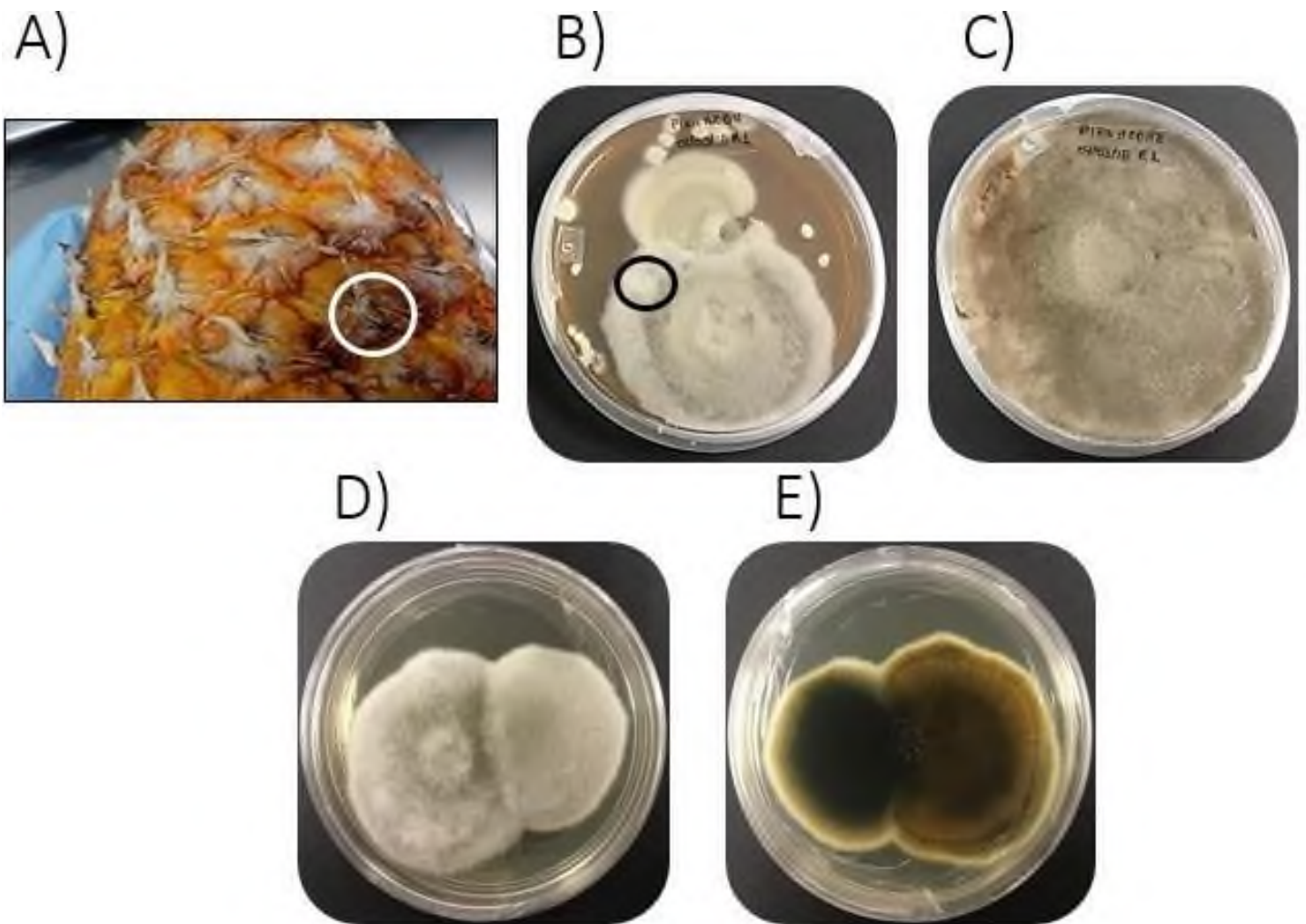


Figura 2.27 Muestra H2BHER1 A) Fruta de piña de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

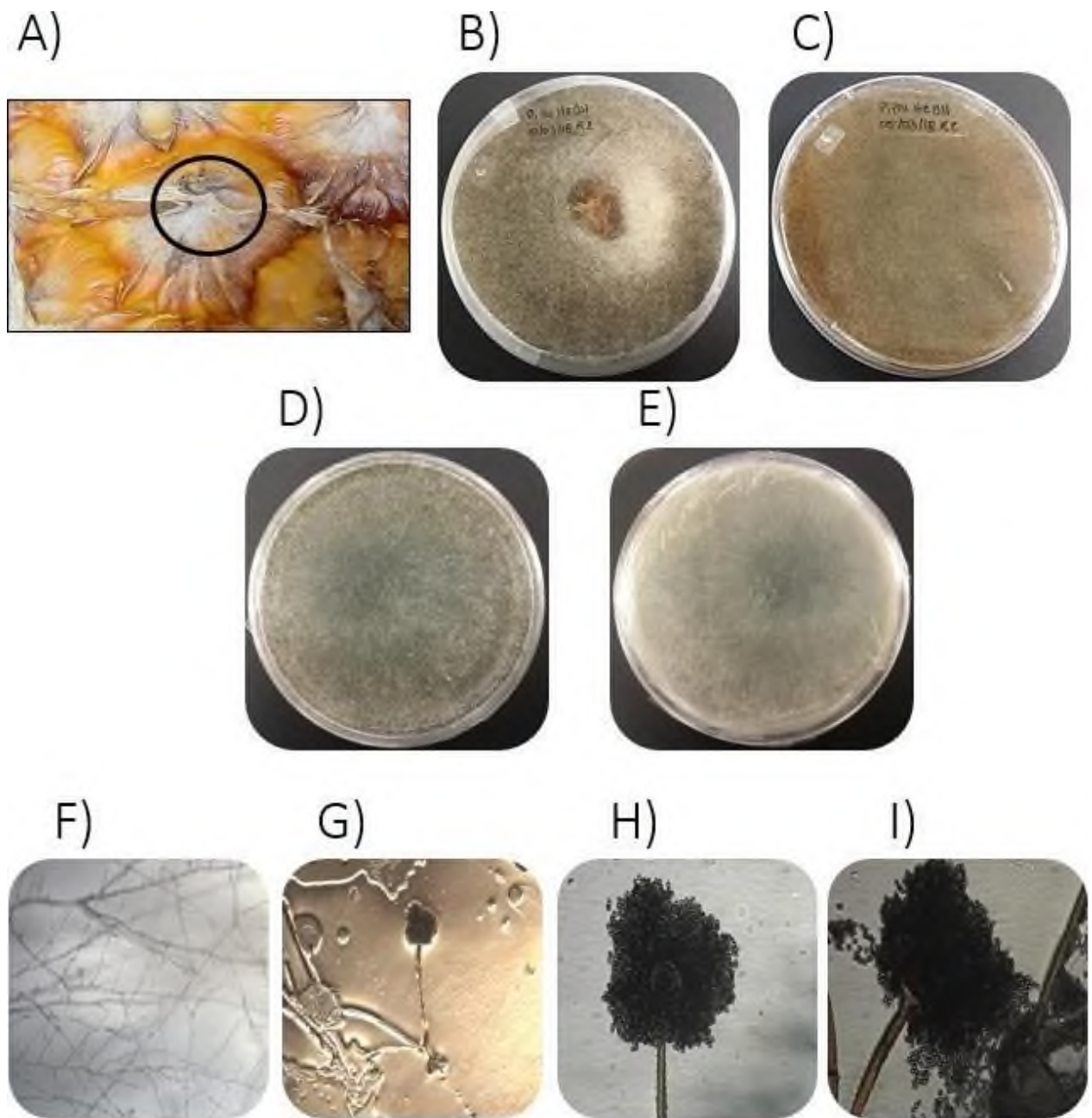


Figura 2.28 Muestra H2BHR2 A) Fruta de piña de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri, F) Perfil del hongo aislado. G) Estructura de la hifa. H) Estructura reproductivas del hongo. I) Tipo de espora.

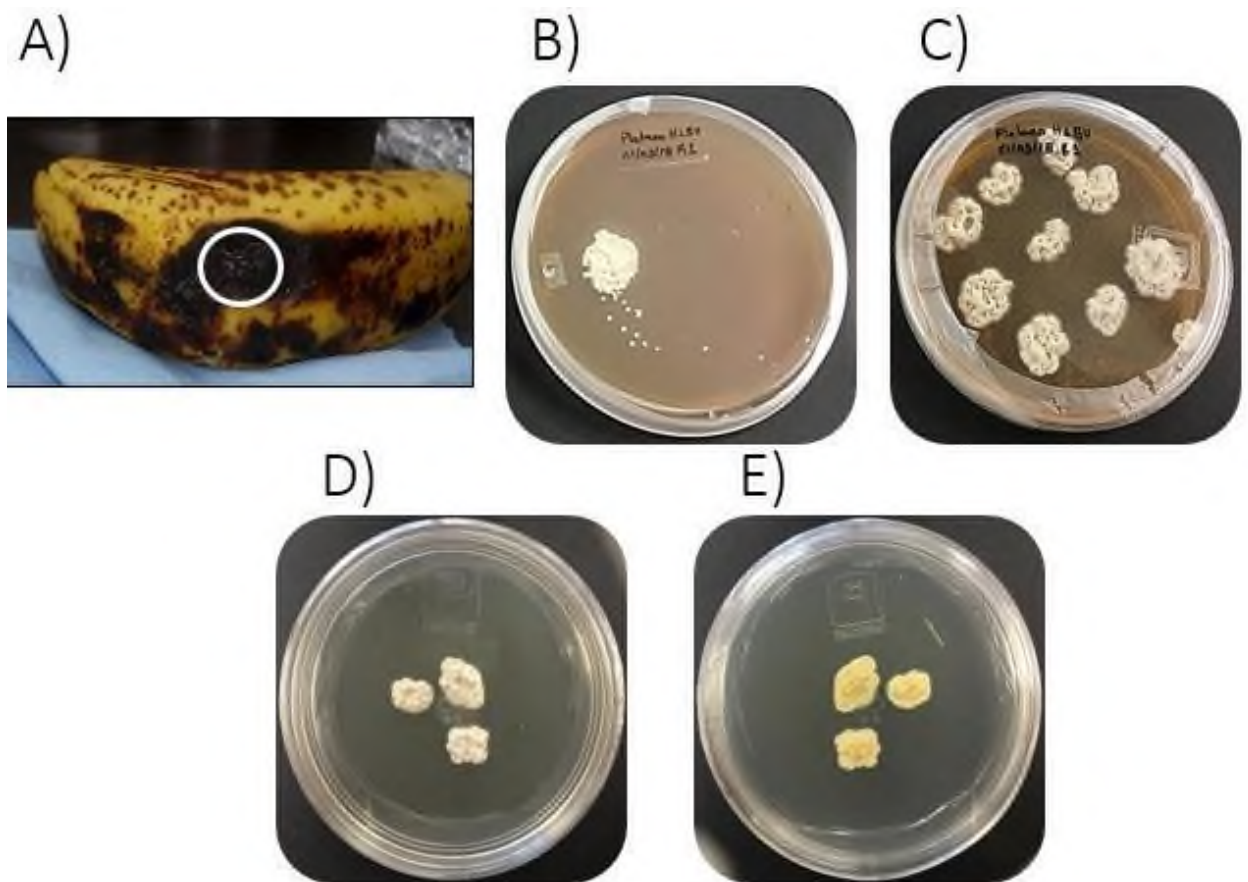


Figura 2.29 Muestra H1BVR1 A) Fruta de plátano de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

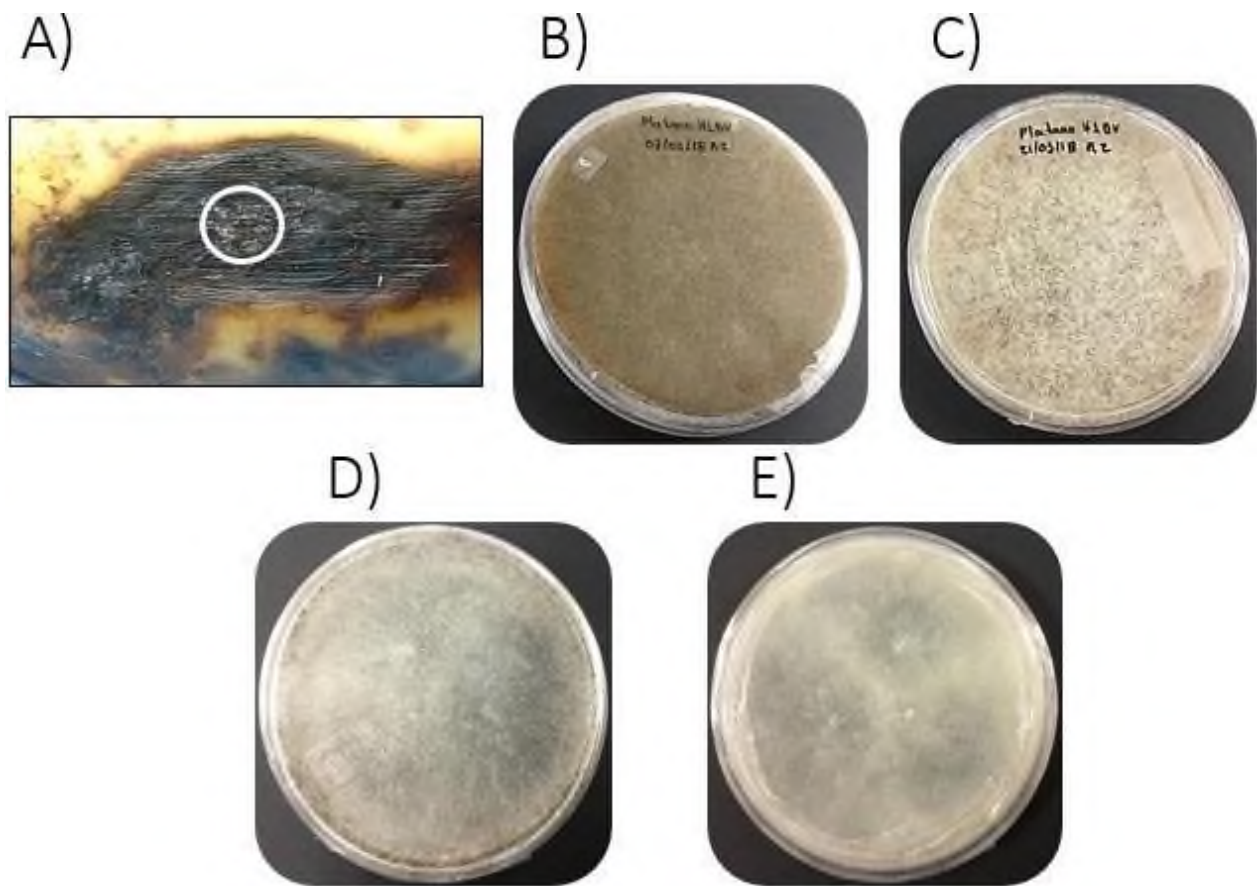


Figura 2.30 Muestra H1BVR2 A) Fruta de plátano de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

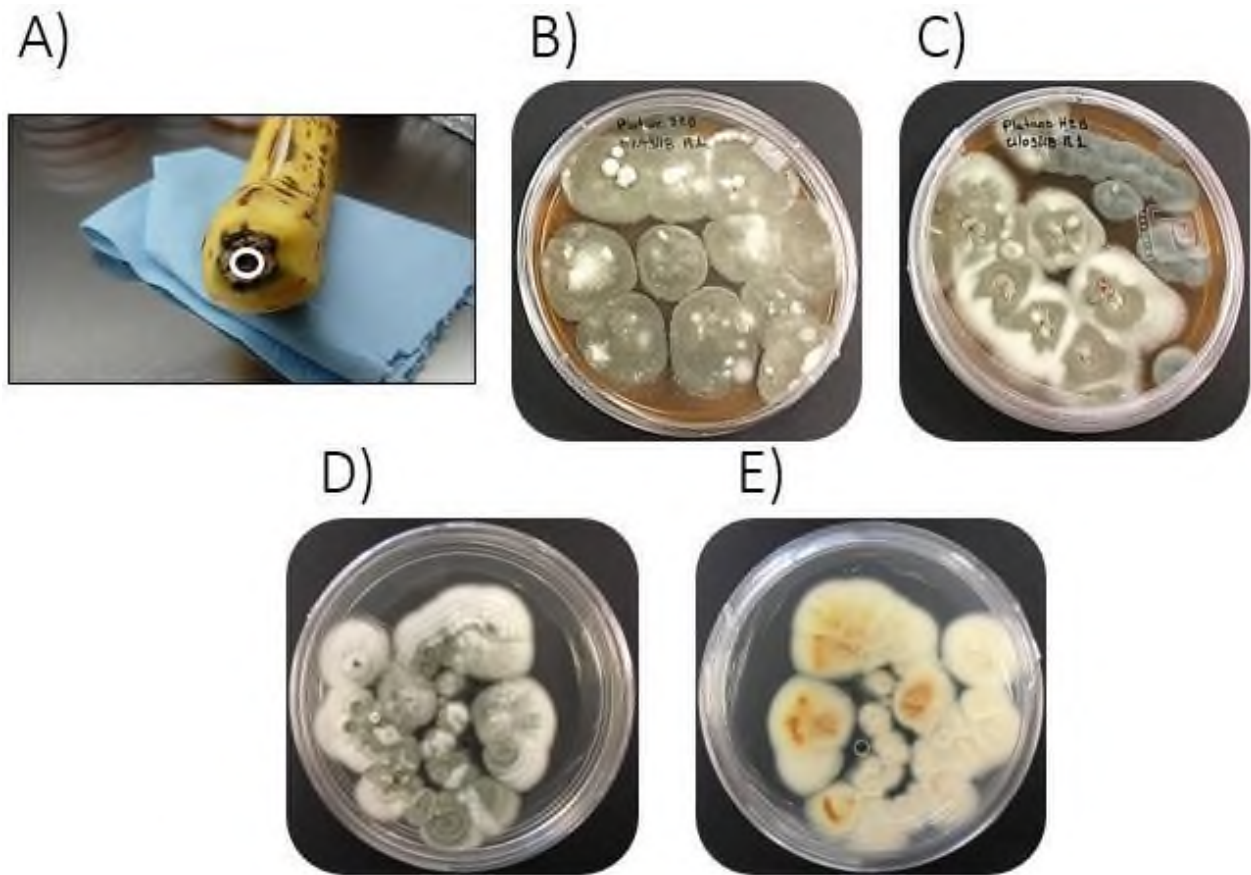


Figura 2.31 Muestra H2BR1 A) Fruta de plátano de donde se aisló el hongo. B) El aislado del hongo. C) La primera resiembra. D) Anverso de la caja Petri. E) Reverso de la caja Petri.

Anexo 3 Arboles filogenéticos

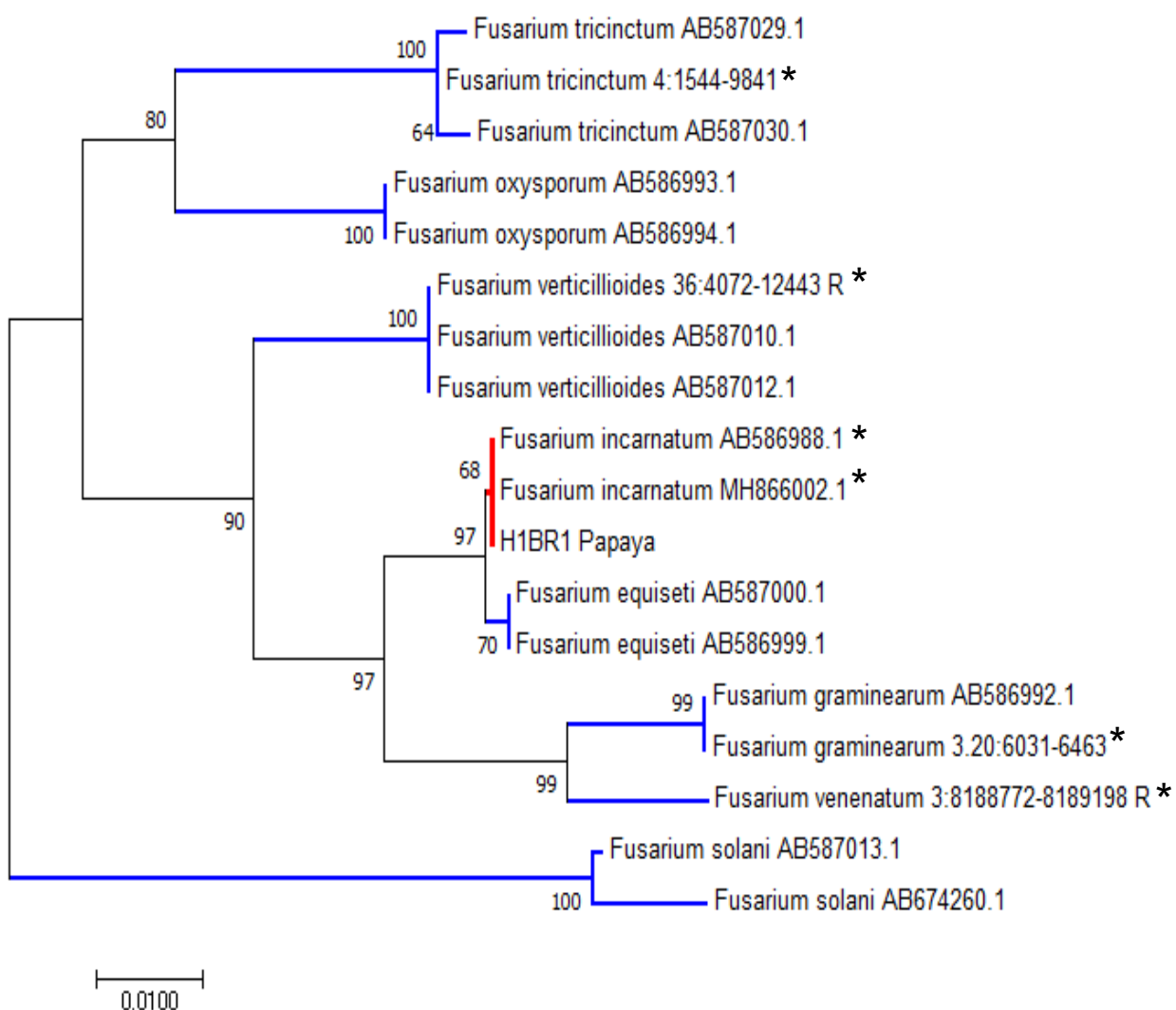


Figura 3.1 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Fusarium incarnatum*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama =0.2319. Códigos de referencia oficial tomados de Joint Genome Institute JGI y Watanabe *et. al* 2011.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

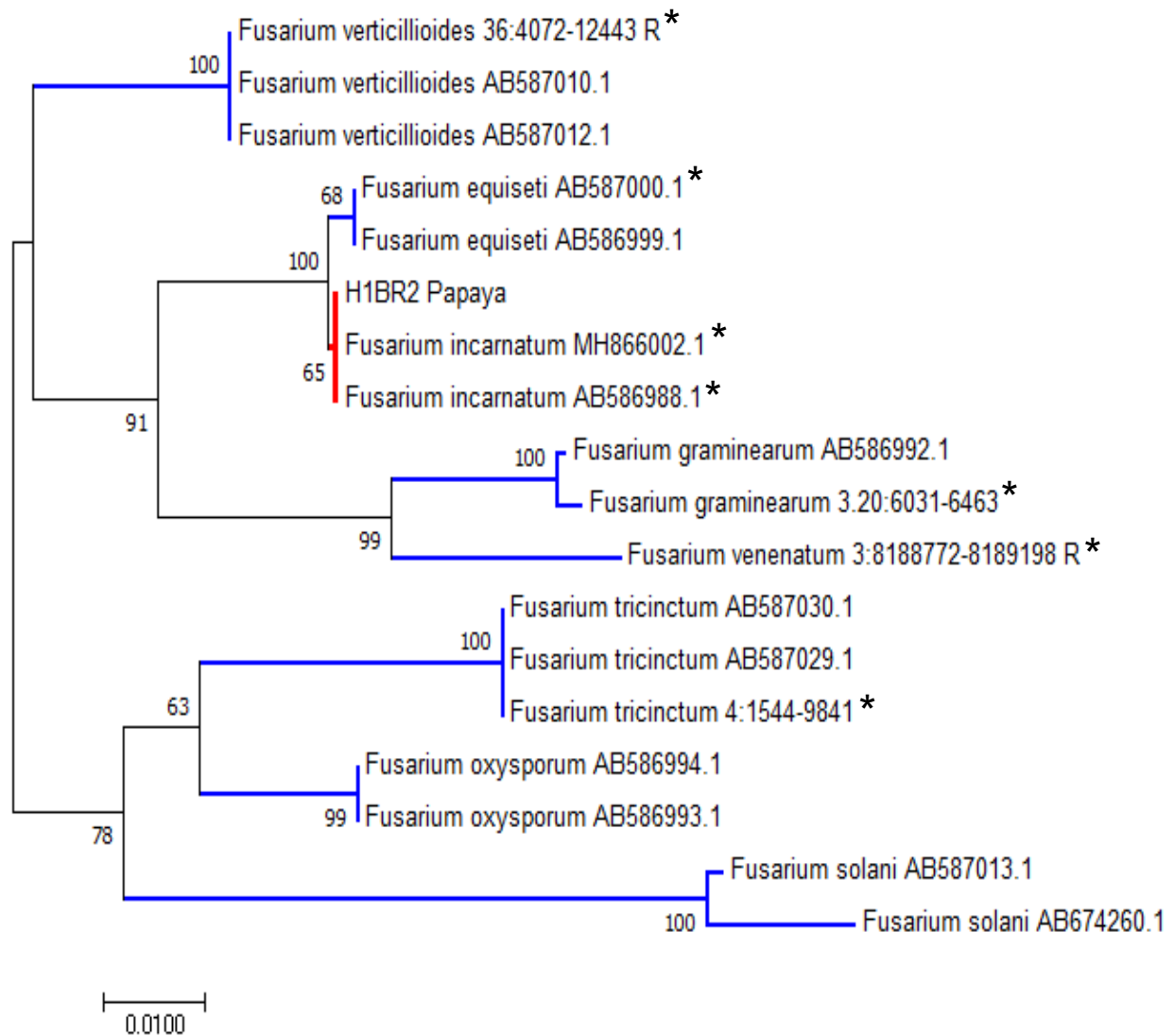


Figura 3.2 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Fusarium incarnatum*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama =0.2537. Códigos de referencia oficial tomados de Joint Genome Institute JGI y Watanabe *et. al* 2011.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular



Figura 3.3 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Cladosporium oxysporum*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama = 0.0703. Códigos de referencia oficial tomados de Zalar *et. al* 2007 y Bensch *et. al* 2012.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

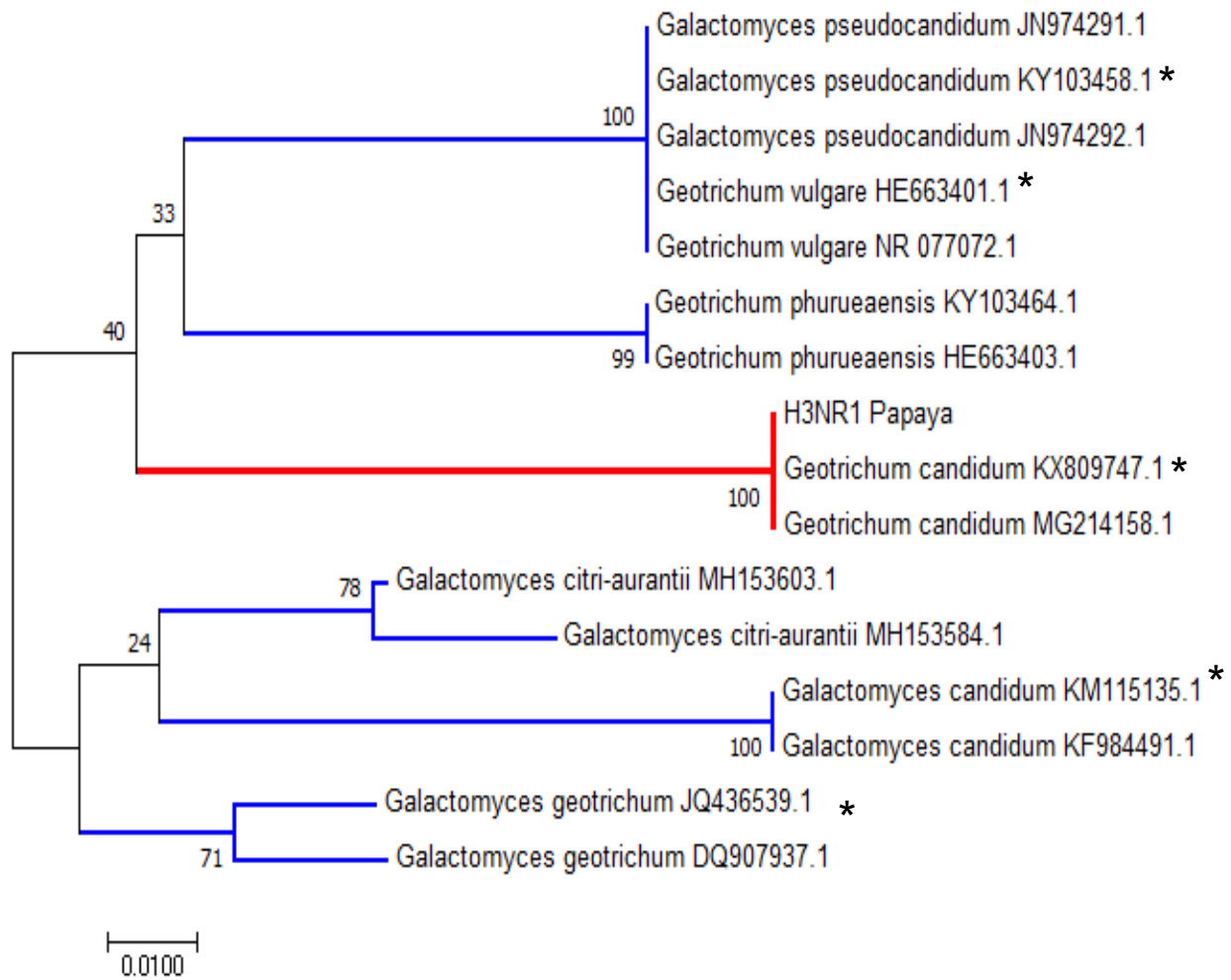
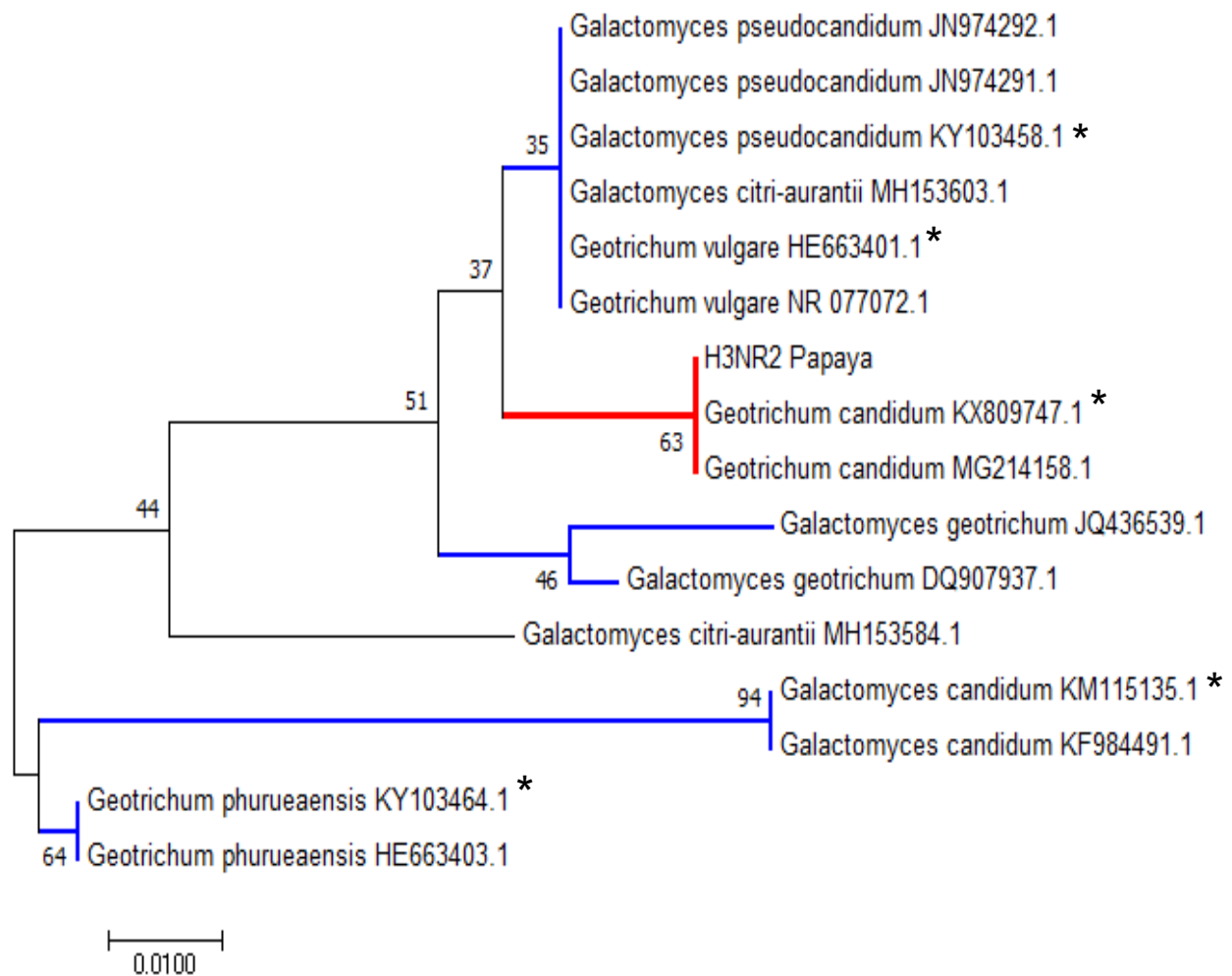


Figura 3.4 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Geotrichum candidum*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama =0.3756. Códigos de referencia oficial tomados de Groenewald *et. al* 2012.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular



Grafica 3.5 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Geotrichum candidum*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama =0.1995. Códigos de referencia oficial tomados de Groenewald *et. al* 2012.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular



Figura 3.6 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Rhizopus oryzae*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama =0.3308. Códigos de referencia oficial tomados de Dannaoui *et. al* 2010 y Abe *et al.*, 2010.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular



Figura 3.7 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Cladosporium oxysporum*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama = 0.0629. Códigos de referencia oficial tomados de Zalar *et. al* 2007 y Bensch *et. al* 2012.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

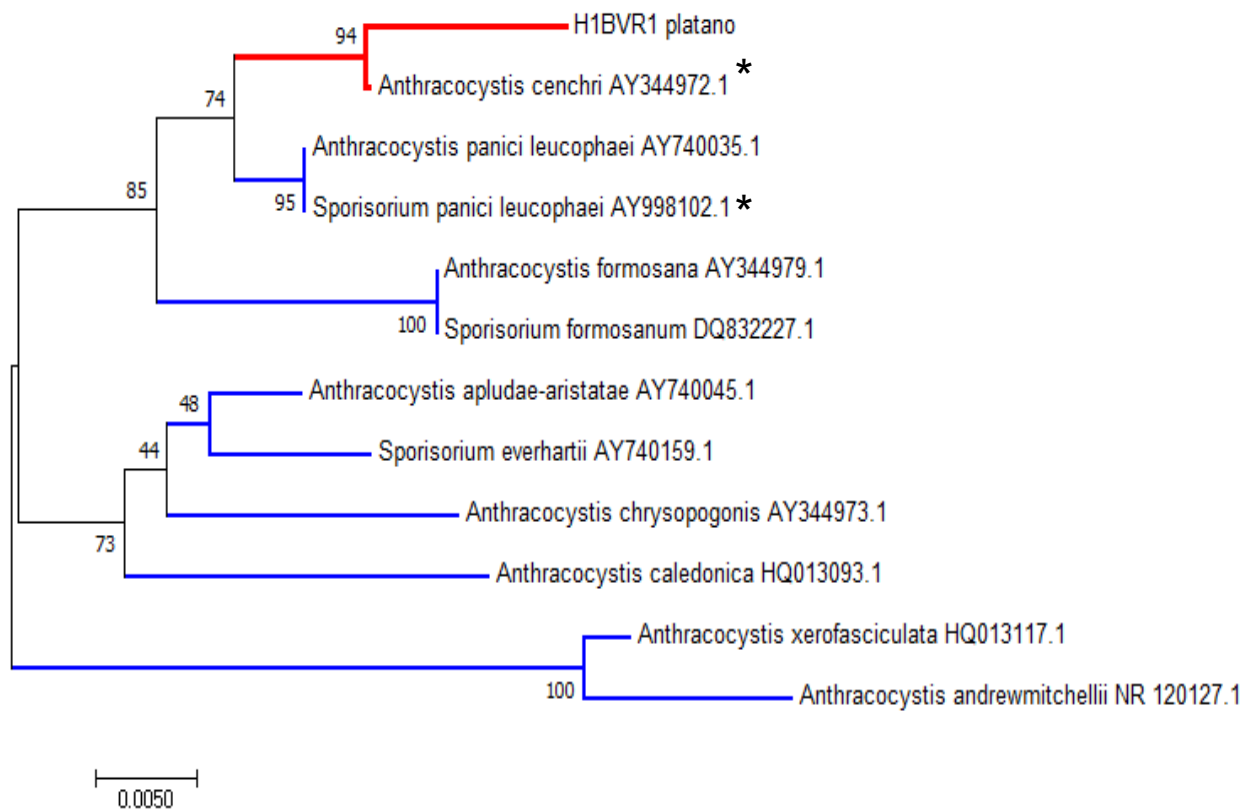


Figura 3.8 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Anthracocystis cenchri*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama = 0.1407. Códigos de referencia oficial tomados de Wang *et. al* 2015 y Piątek *et. al* 2015.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

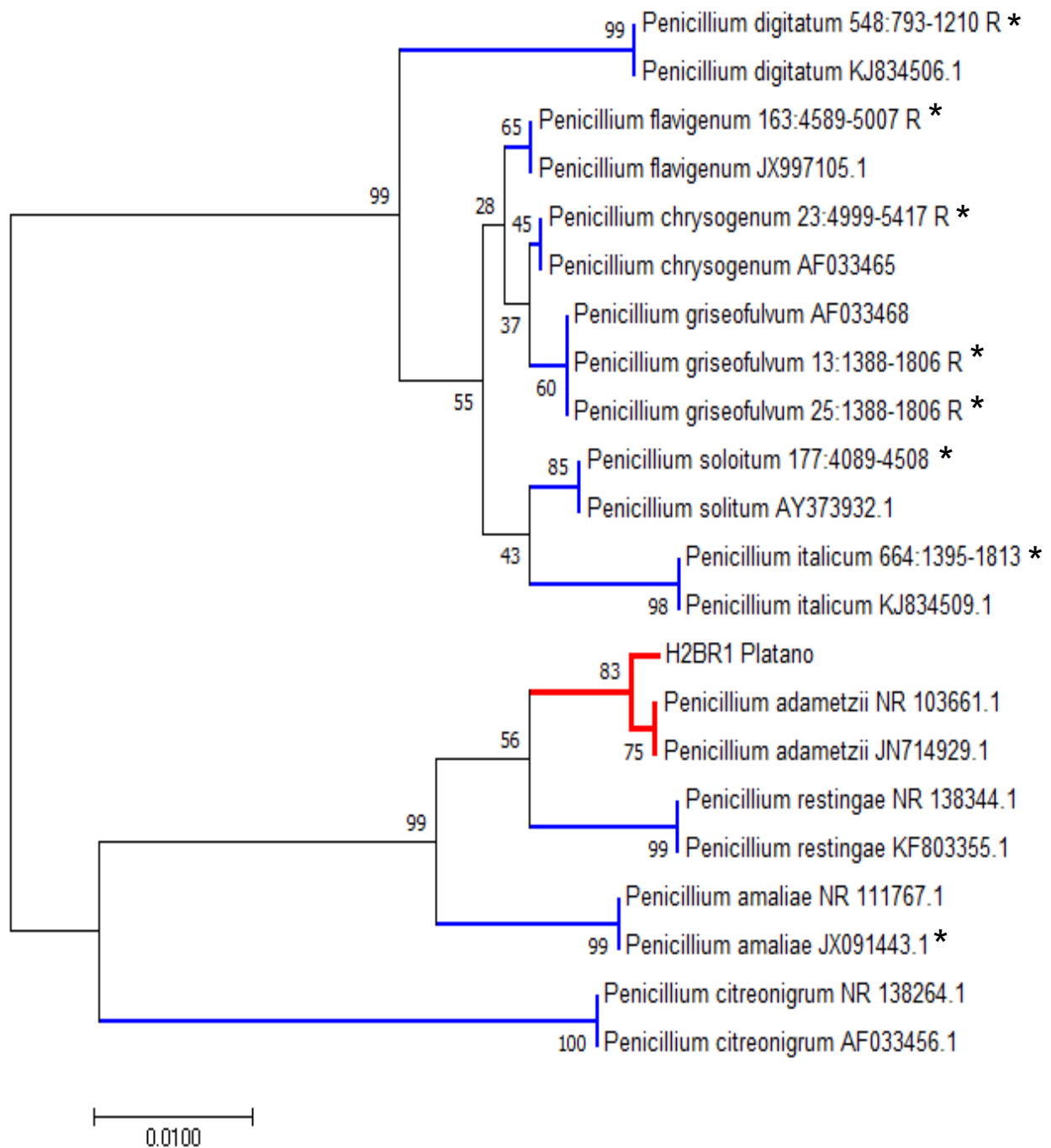


Figura 3.9 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Penicillium adametzii*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama = 0.1627. Códigos de referencia oficial tomados de Joint Genome Institute JGI y Visagie *et. al* 2014.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

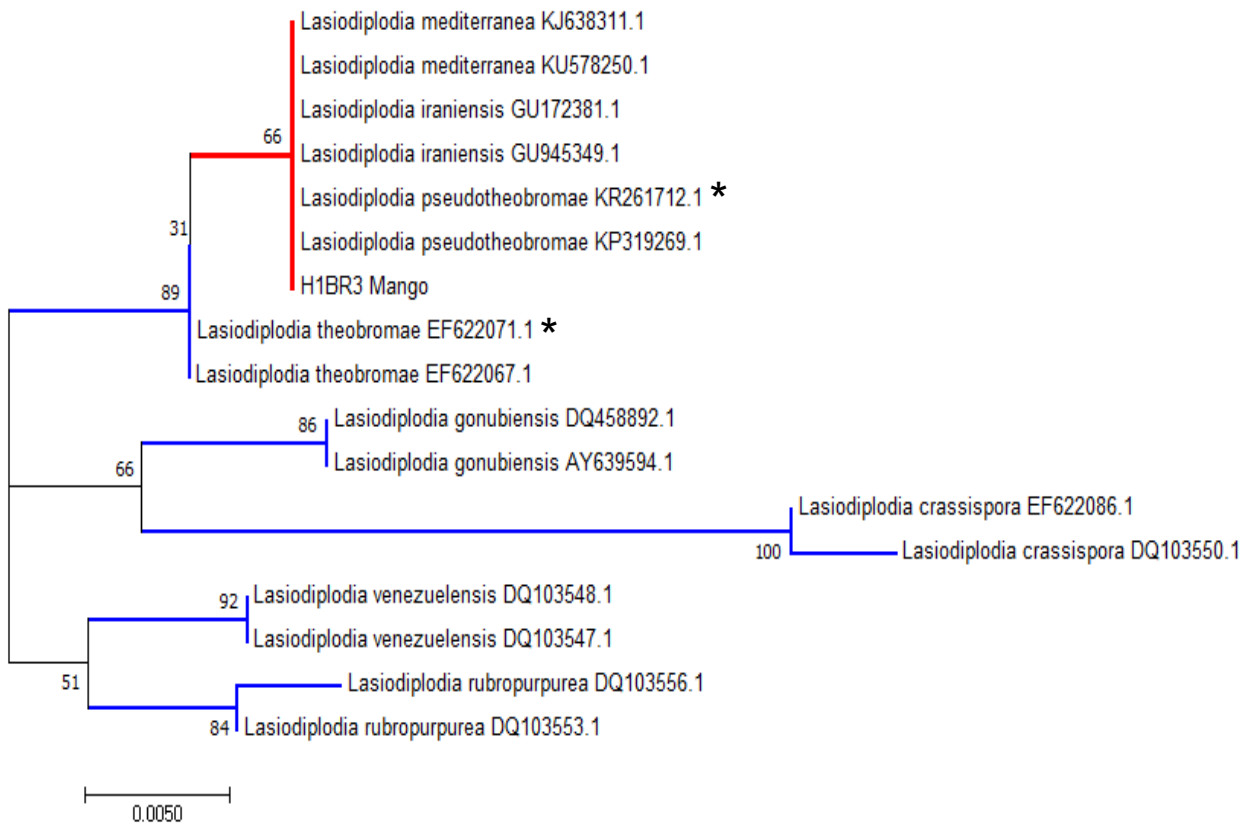


Figura 3.10 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama =0.0637. Códigos de referencia oficial tomados de Rodríguez-Galvez *et. al* 2016, Alves *et. al* 2008, Li *et. al* 2016 y Rosado *et. al* 2015. * Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

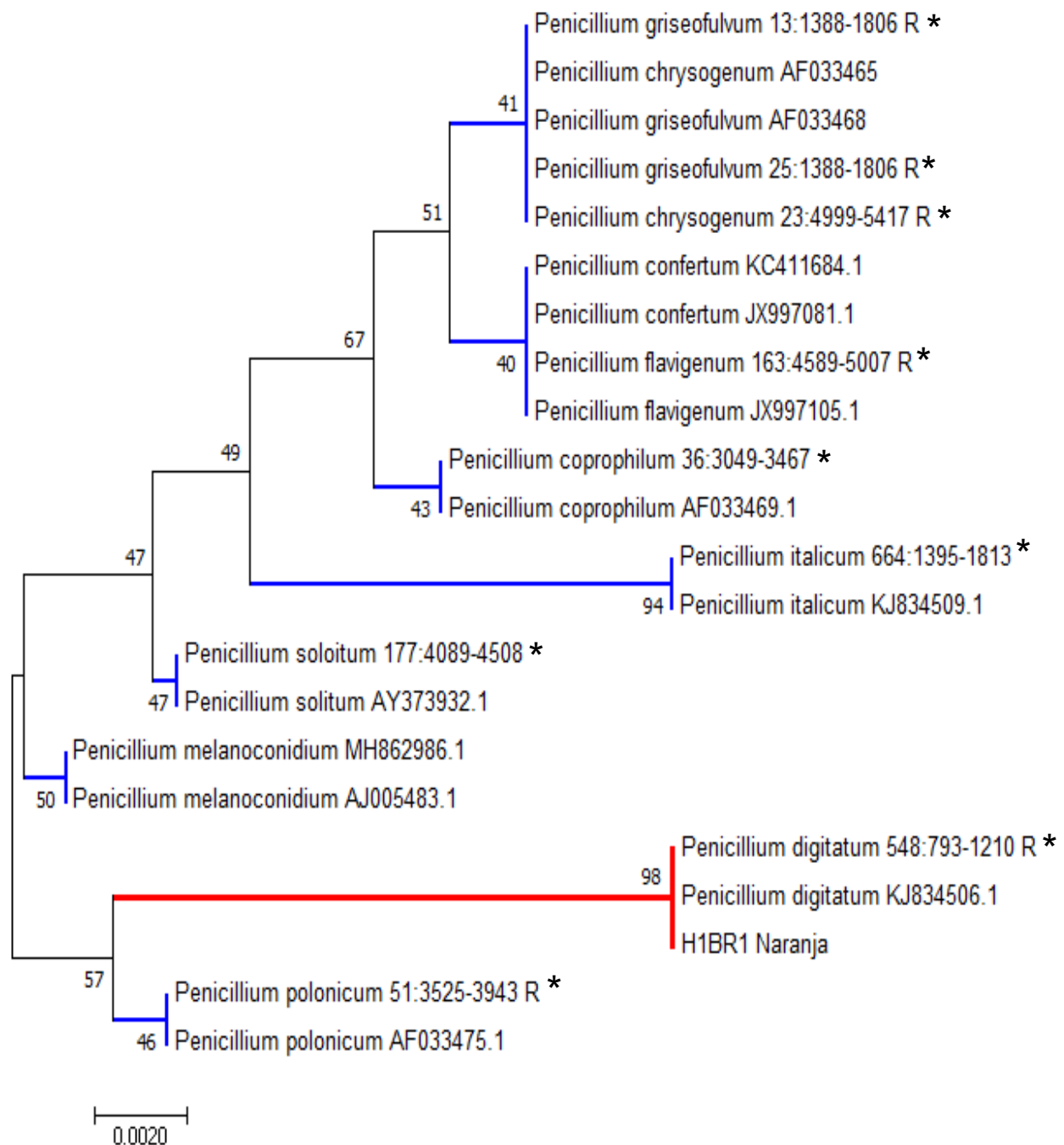


Figura 3.11 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Penicillium digitatum*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama =0.04037. Códigos de referencia oficial tomados de Joint Genome Institute JGI y Visagie *et. al* 2014.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

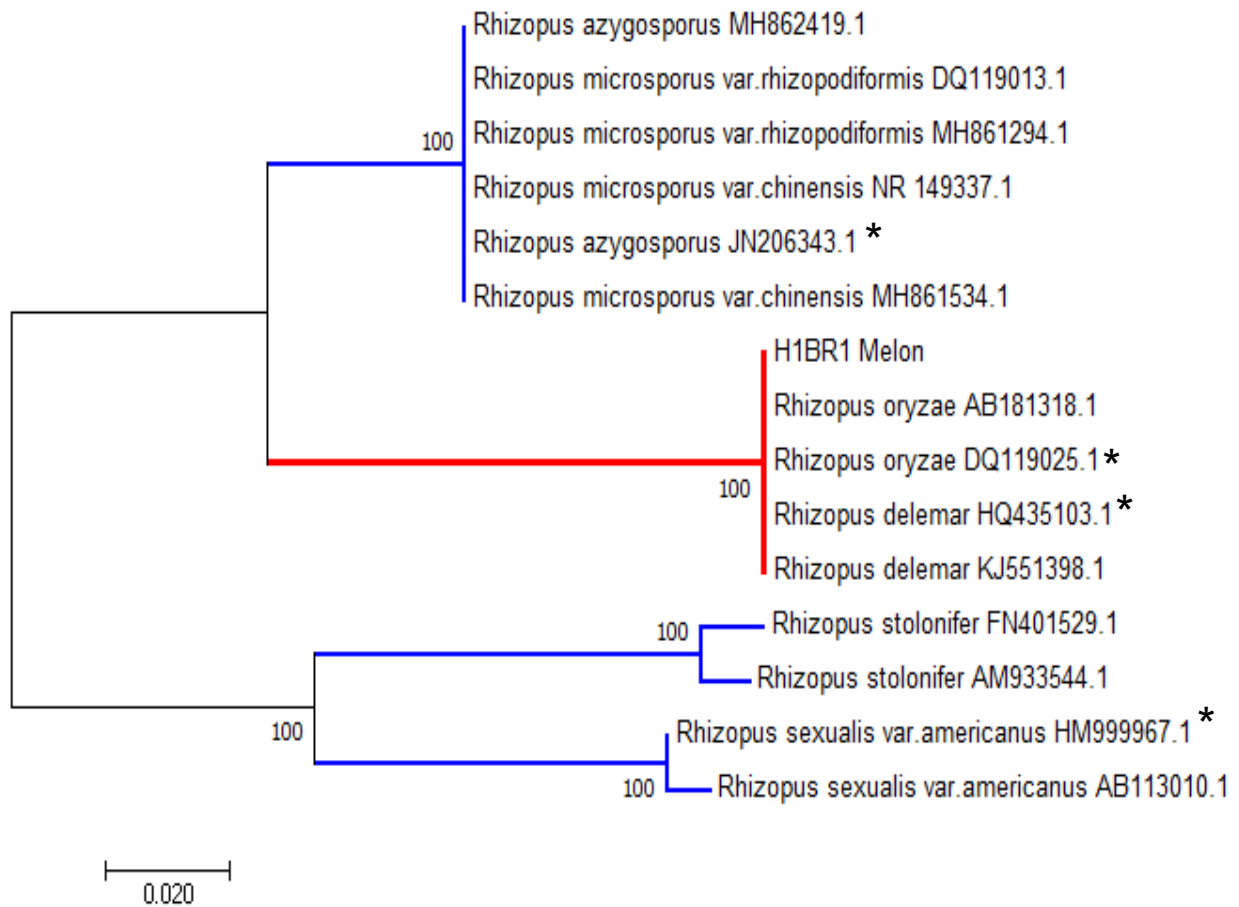


Figura 3.12 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Rhizopus oryzae*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama =0.3464. Códigos de referencia oficial tomados de Dannaoui *et. al* 2010 y Abe *et al.*, 2010.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

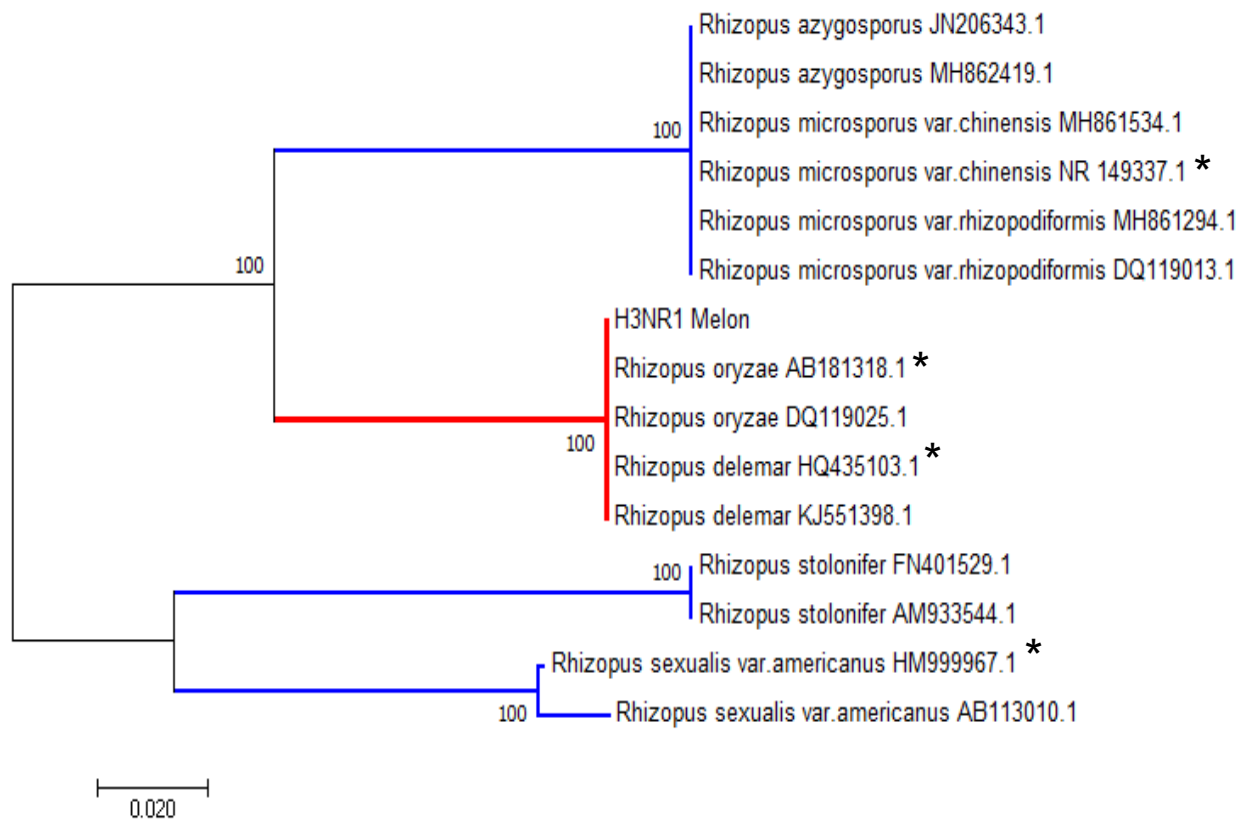


Figura 3.13 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Rhizopus oryzae*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama =0.3831. Códigos de referencia oficial tomados de Dannaoui *et al* 2010 y Abe *et al.*, 2010.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

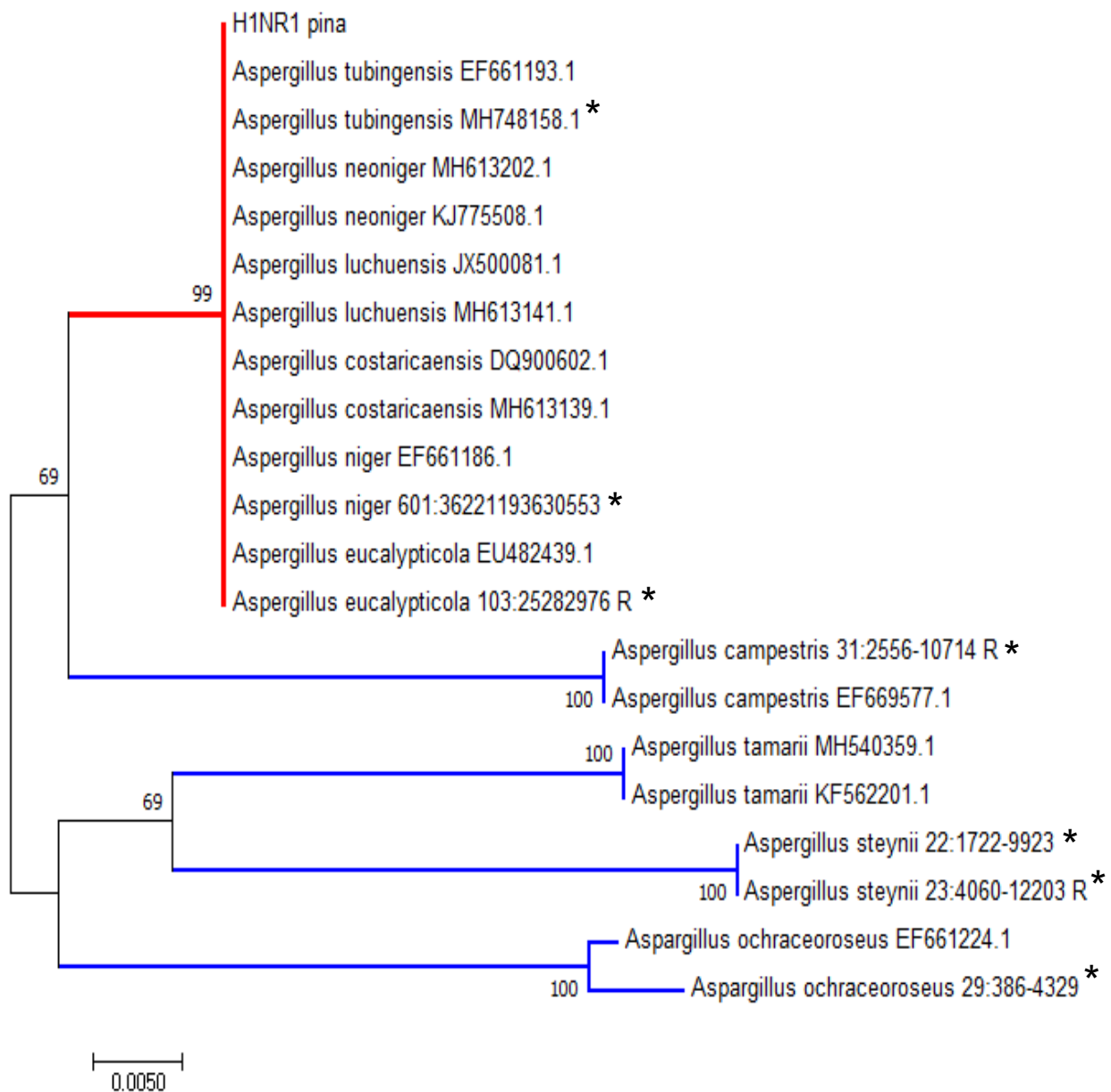


Figura 3.14 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Aspergillus tubingensis*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama =0.1435. Códigos de referencia oficial tomados de Joint Genome Institute JGI y Samson *et. al* 2014.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

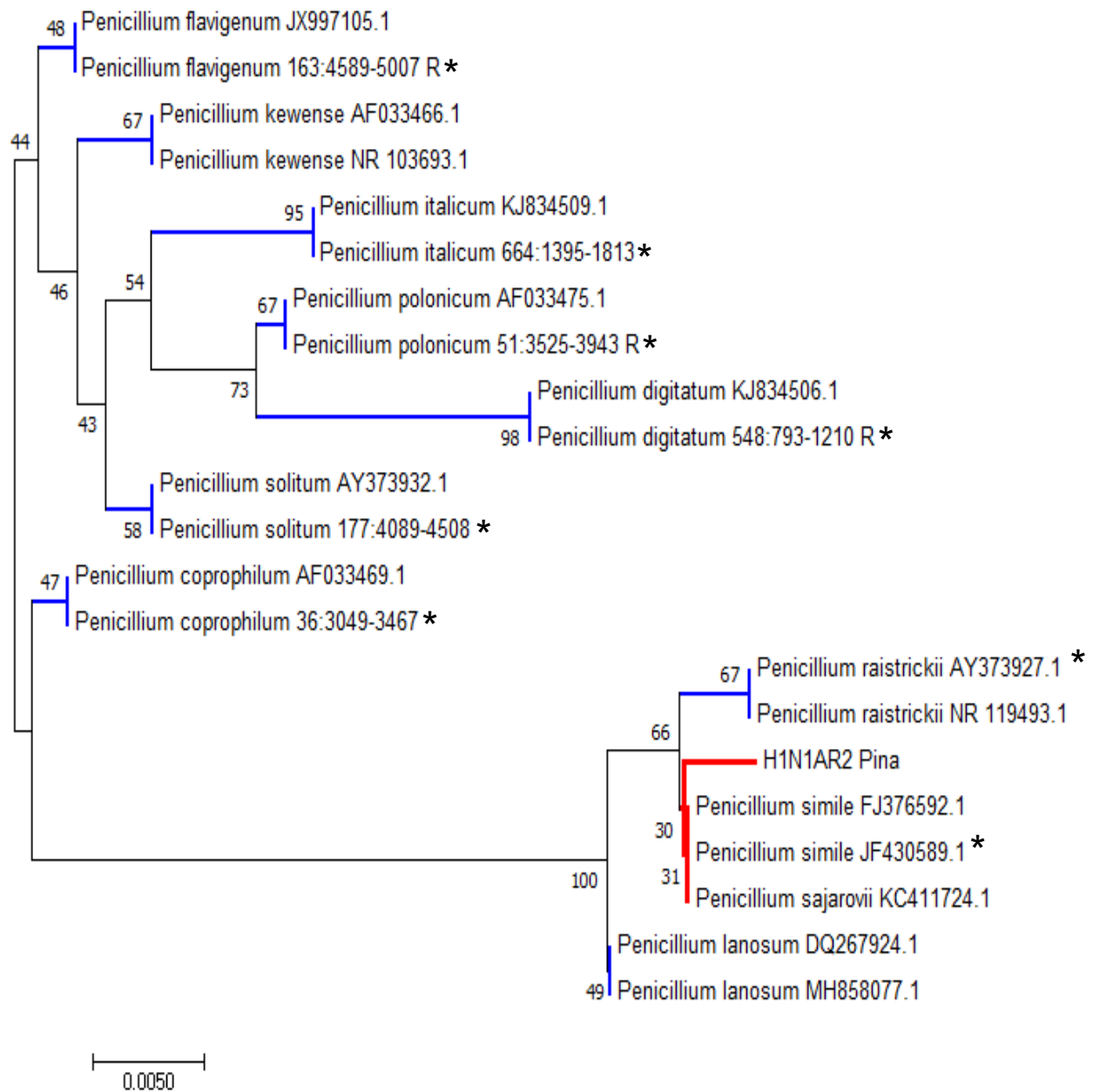


Figura 3.15 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Penicillium simile*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama = 0.0764. Códigos de referencia oficial tomados de Joint Genome Institute JGI y Visagie *et. al* 2014.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

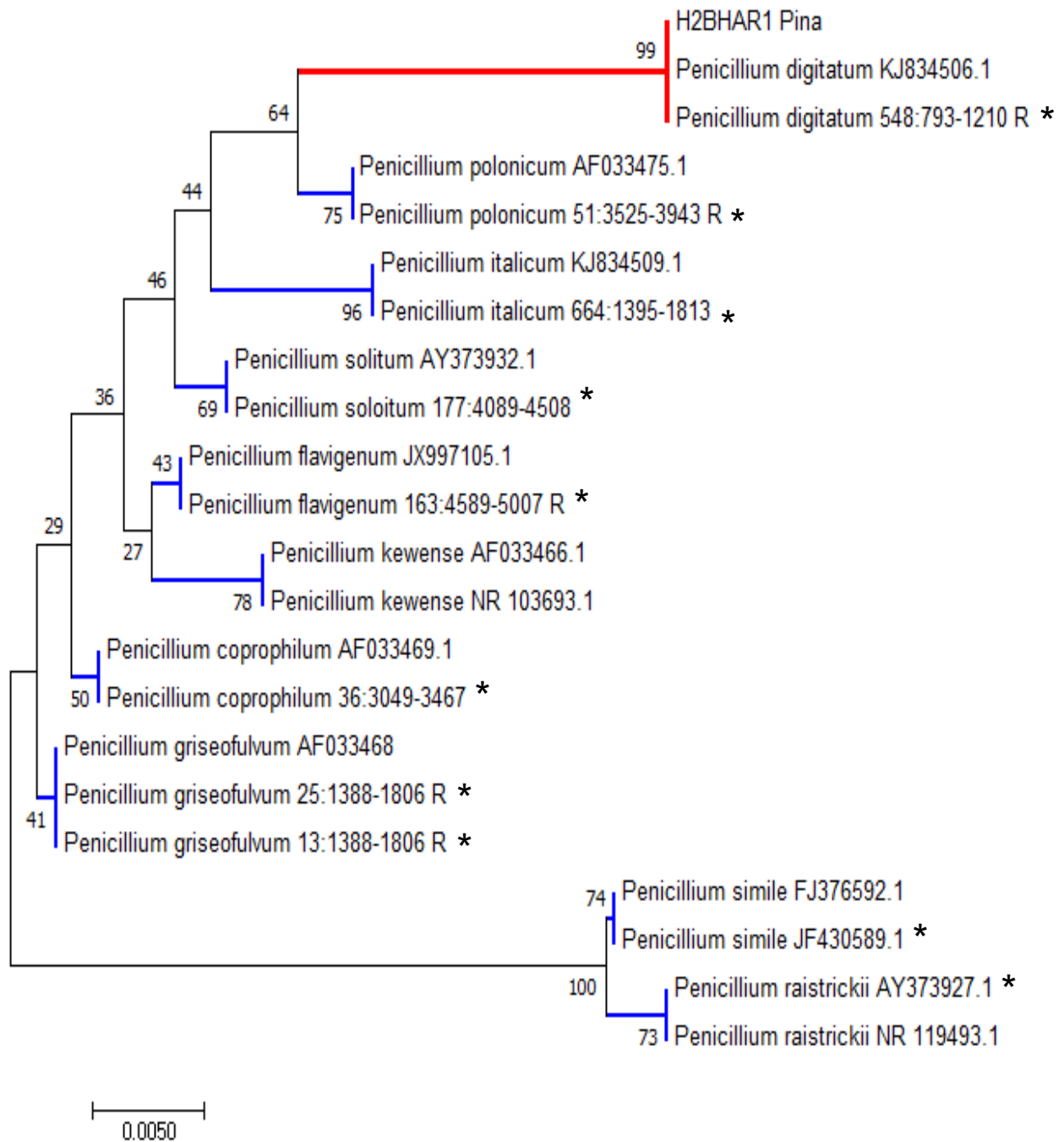


Figura 3.16 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Penicillium digitatum*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama = 0.0800. Códigos de referencia oficial tomados de Joint Genome Institute JGI y Visagie *et. al* 2014.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

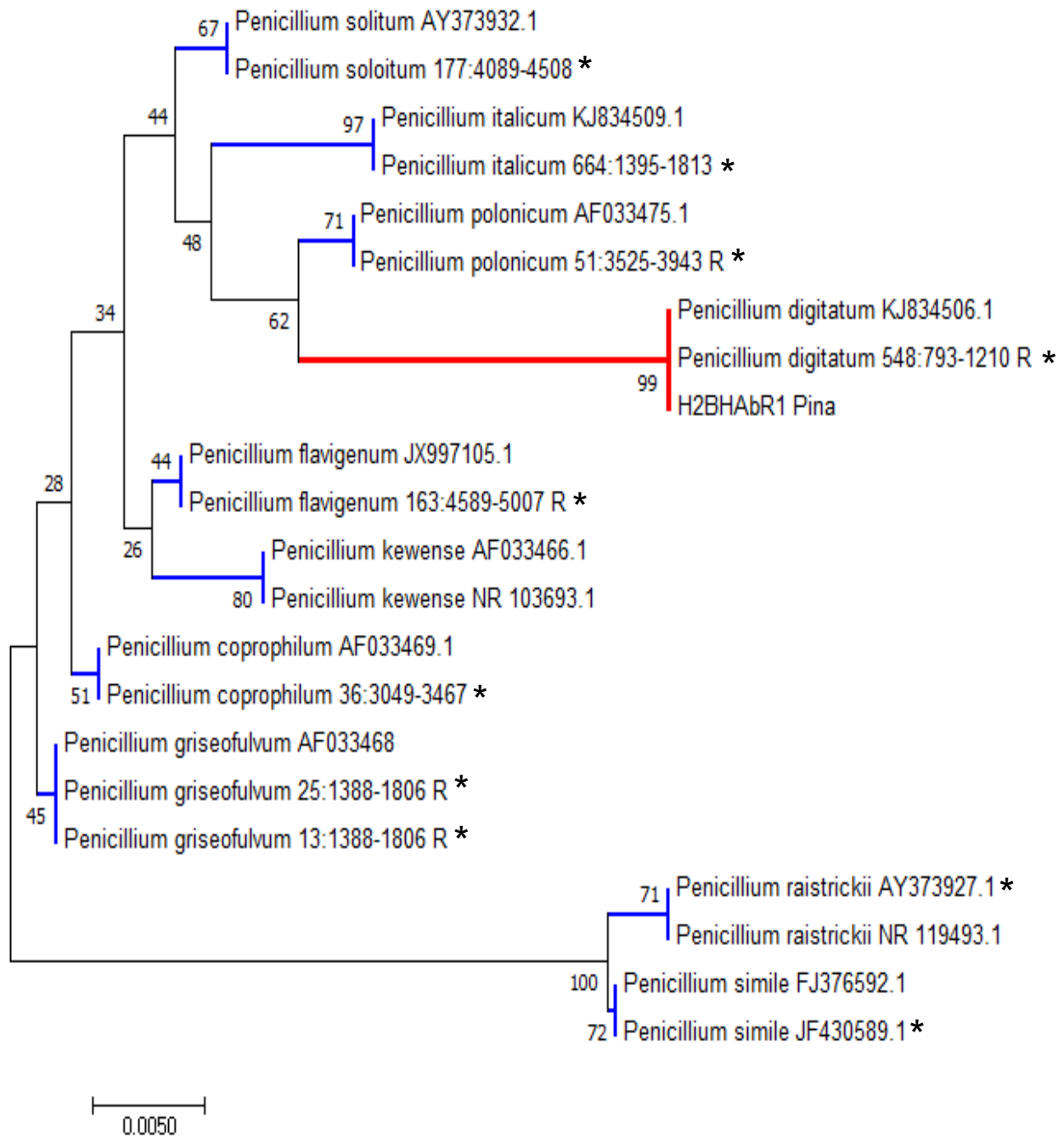


Figura 3.17 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Penicillium digitatum*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama = 0.0803. Códigos de referencia oficial tomados de Joint Genome Institute JGI y Visagie *et. al* 2014.

* Principales secuencias oficiales para la identificación molecular

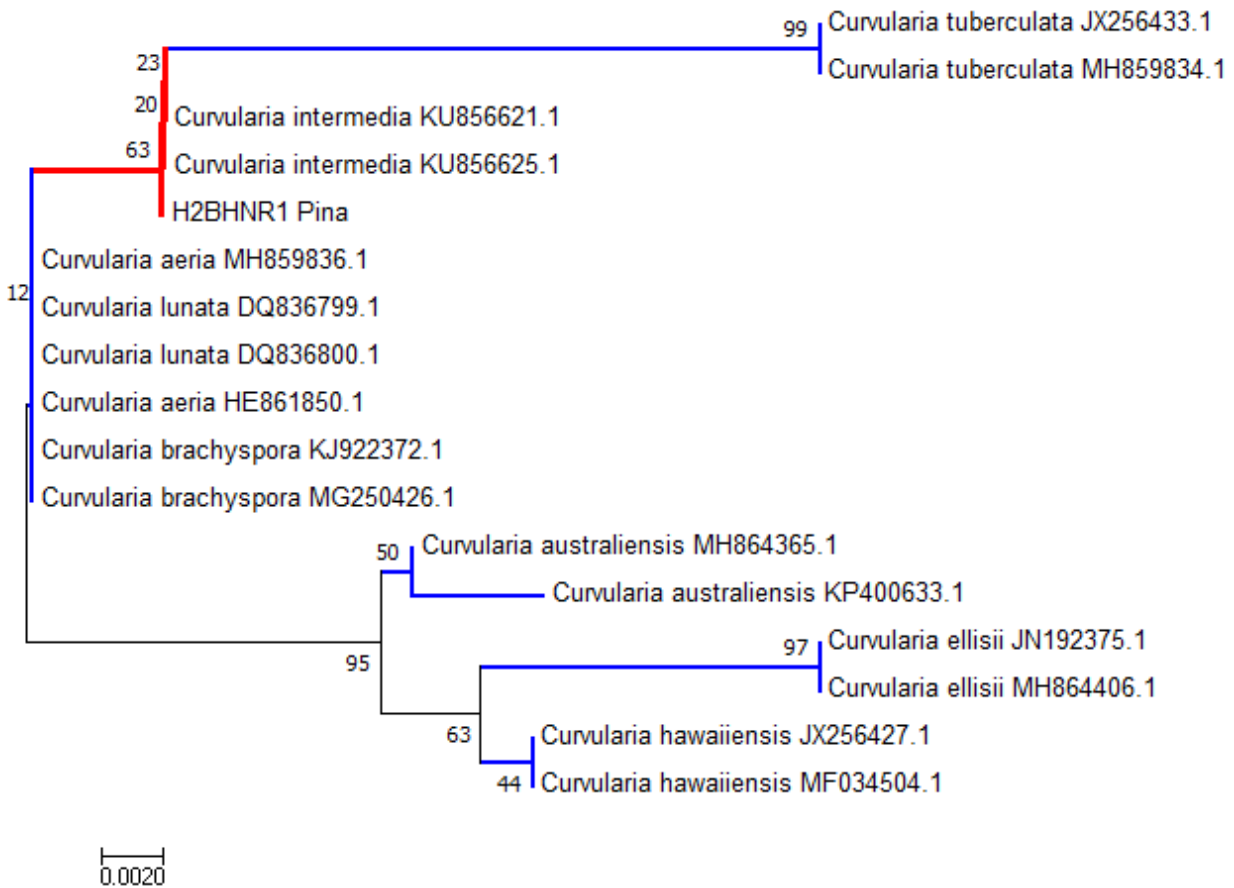


Figura 3.18 Árbol filogenético de las secuencias ITS 18S del hongo identificado como *Curvularia intermedia*. La reconstrucción filogenética se realizó por el método Neighbor-Joining, la prueba de filogenia por el método de bootstrap (1000) y usando el método de sustitución de Jukes-Cantor. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 con una longitud de rama =0.0586. Códigos de referencia oficial tomados de Manamgoda *et. al* 2015 y da Cunha *et. al* 2013.

Anexo 4 Secuencia de la proteína DCL en aminoácidos y nucleótidos las regiones en amarillo son las zonas potenciales para el diseño de los sRNAs

Penicillium digitatum

Taxonomía

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Subfilo: Pezizomycotina

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: *Penicillium*

Especie: *P. digitatum*

Dicer 1 (796aa) (2391nt)

RNase III (340 – 470) (509 – 692) (Rojo)

Dicer dsRNA-binding fold (1 – 73) (Morado)

>Dicer1_ *Penicillium digitatum*_K9FEN6

MFSFQENSVGLLLGTVTLPSNVHPTVRRRTNGKAWWRTERAARKETAFAQYKALHSYG
LVNDNLLPLTRKPELRFSDQTTLPISIVQAAEQYDPYVDLAQGWASGQLCQTRLKICSN
GSVDEDLAISIIPLRTPMPHPIPLYWDS ETSFELQFD PQISTFETTPEILDQMRRITALYL
QAPSSRQRGDDDRDFVAL FIPDIS HEYLGEWLTVYEGKEPALEVYSRNPNTPPMGIVRD
QSKFSEPRMFNKWIAPSQVTKASPIEVECSSLPRRRNLQKRALNVAEDGEADAPKKS
YVLPVAVACVIDKLPKQGLFGLFISAILDRLEASLVAHRLNDTILKG VGIQNIDHVIT AISAP
IAQASTNYQRFEFFGDSVLKFTVSCQLFFRNTNWHEGYLSESRDKLVQNTRLAHAALD
IGIDCFILTSRFTPRKWAAPLIRNKLEASTAKRSISTKVLADVVESLIGAAAYVDGGIRKAQ
ACLHRFLPEIDLFTTEISPLTLPPSKGASSLINHHRLAGLIGYTFKDPALLTEALTHASCE
YDTSTQSYQRLEFLGDAVLDMVMAVIAAHPVEMDQGPMTLLKHSVVNANLLAFFCM
ELCAPDEPTHVPQFANGEINFVPHQQQIHLWRFLRSHGPNVKSAREACLERHHGLRD
EIRDALEHGSQYPWELFARLRADKFLSDIVESVLGAIFIDCGGNLDVCRAFVERIGLVW
YIRRVIADGVNVVHPRNTAQNMVKGAGTLVFKRKRVESGGMATYRCSAVVNQTEIALV
EGCASAEAEVKVANVVIEHLTLHPGST

>Dicer1_ *Penicillium digitatum*_K9FEN6

ATGTTTTCTTCCAAGAAAACAGCGTGGGATTGCTTTTGGGCACGGTCACATTACC
AAATTCAGTGCACCCGACGGTTCGACGAACAAACGGGAAGGCCTGGTGGCGGAC
AGAACGAGCAGCCAGGAAAGAGACTGCATTTCAAGCCTACAAGGCCTTGCATTG
TATGGTTTGGTTAACGATAACCTCTTGCCACTGACACGAAAACCAGAGTTGAGATT
TTCAGACCAGACAACTCTCCATCTATCGTGCAAGCTGCGGAGCAGTATGACCCTT
ATGTAGACCTTGACAAGGCTGGGCTTCGGGTCAGCTGTGCCAAACA CGCTTGAA
GATATGCAGCAATGGGTCTGTAGATGAAGATCTGGCCATCAGCATAATTTTGCCAA

GATTGACTCCGATGCCACACCCATTCTCTCTACTGGGACTCCGAGACGTCCTTT
GAACTCCAATTTGATCCTCAAATTTCAACCTTTGAGACAACACCCGAGATACTGGAT
CAAATGAGAAGGATCACAGCTCTCTATTTGCAGGCTCCCAGTTCGCGCCAGCGGG
GAGACGACCGCGACTTTGTGGCCCTCTTCATTCCCGATATTTCCGACGAATACCTG
GGAGAATGGCTTACGGTGTATGAAGGAAAAGAGCCTGCGCTGGAGGTCTACTCGA
GGAACCCAAACACCCCGCCTATGGGTATTGTCCGTGATCAGTCCAAATTCAGCGA
GCCACGGATGTTCAACAAATGGATTGCTCCGTCCCAGGTAACAAAGGCGTCGCCT
ATTGAAGTGGAATGCTCATCGCTTCTCGTCGCCGAAATCTCCTTCAGAAACGAGC
CTTGAATGTCGCCGAAGATGGAGAGGCAGACGCGCCAAAGAAGTCATACGTCCTA
CCTGCTGTAGCTTGCGTATCGACAAGCTTCCAGCAAAACAGGGTCTCTTTGGACT
TTTTATCTCTGCTATTTTGGACCGACTAGAGGCATCTTTGGTGGCACATCGGCTGA
ACGACACCATTTTCAAAGGAGTCGGGAATTCAAAACATCGACCATGTCATCACGGCC
ATCAGTGCGCCATTGCACAGGCCAGTACAACTATCAAAGATTTCGAGTTTTTTGG
TGACTIONTCTTAAATTCACCGTTAGTTGCCAGCTCTTTTTCCGGAACACCAACTG
GCACGAGGGGTACCTCTCGGAGAGCCGTGACAAGCTTGTCCAGAACACTCGCCTT
GCTCACGCAGCTCTCGATATAGGCATTGACTGCTTTATCCTAACGAGCCGATTAC
CCCGCGCAAATGGGCTGCCCGTTGATACGGAACAAATTGGAAGCATCGACCGCC
AAGAGGAGCATATCAACCAAGTCTGCGCAGATGTTGTAGAATCCCTCATTGGCG
CAGCTTATGTAGACGGTGAATCCGCAAAGCGCAGGCCTGTCTCCATCGCTTCTT
GCCGGAGATCGATCTTTTACGACTGAAATCTCACCCCTCACCTGCCACCAAGTA
AAGGGGCGAGCAGTTAATCAACCACCACCGGTTGGCCGGTCTGATTGGATACAC
TTTCAAAGACCCTGCCCTTCTAACAGAGGCGTTAACCCACGCATCCTGTGAGTACG
ACACATCAACACAGTCTACCAACGCCTCGAGTTTCTCGGCGATGCCGTCTCGA
CATGGTTGTCATGGCAGTGATCGCAGCCCACCCCGTAGAAATGGACCAGGGACCA
ATGACATTGCTCAAACATTCGGTCGTCAACGCAAACCTCCTCGCCTTCTTTTGCAT
GGAGCTATGCGCCCCCGACGAACCTACCCACGTCCCACAGTTCGCCAATGGCGA
GATCAACTTTGTCCCACACCAGGGCCAGATCCACTTATGGCGATTCTCCGCTCTC
ATGGTCCTAATGTAAATCCGCCCGGGAAGCCTGTCTCGAGCGGCACCATGGTCT
CCGTGATGAGATCCGCGATGCCCTGGAACACGGAAGCCAGTATCCGTGGGAGTT
GTTCCGCCGTCTGCGTGCGGATAAGTTCCTGTCCGATATTGTGCGAGAGTGTTCTTG
GAGCGATCTTCATCGACTGTGGGGGCAATTTGGATGTGTGTCGTGCATTCGTTGA
GCGTATCGGTCTGGTGTGGTACATCCGACGTGTCATTGCGGATGGGGTTAATGTC
GTCCATCCGCGGAATACCGCGCAGAACATGGTGAAGGGAGCGGGCACCTTGGTC
TTAAGAGAAAGAGAGTTGAGTCTGGGGGTATGGCTACGTATCGGTGCTCGGCGG
TGGTCAATCAGACTGAGATCGCGTTGGTGGAGGGTTGTGCGTCCGCCGAAGAGG
CTGAGGTCAAGGTTGCTAATGTCGTCATTGAGCACTTGACCTTGACCCCGATAGGT
TCTACATGA

Dicer 2 (1372aa) (4119nt)

RNase III (984 – 1136) (1187 – 1338) (Rojo)

Helicase ATP-binding (81 – 249) (Azul)

Helicase C-terminal (385 – 551) (Verde)

Dicer dsRNA-binding fold (584 – 674) (Morado)

>Dicer2_ Penicillium_digitatum_K9G6R2

MEPEDVTSDDLSSDEAATPRLTESHRQRAQNASFTALLEEHVINTPSNSPNNGEHVEVSD
AELSTARLLAKTEPGGGVLDPLLDGTGSGKTLVAVLLLKHILQMELNKRAGTKPRVAFF
LVDTVTLVFQQSAVLRNLDQKVAHFFGNLGPDLWDKQTDKHLKYMVIVCTAEILN
QSLNNGHIRIDQINLLIFDEAHHAKKEHPFARIIRDAYLKADIENRPRIFGMTASPVDAKC
DLAEAAVQLETLLDSRIATTSDLTLLRNRFVNKPMEEVWVYDKLPPPSETNLHSTLKT
KYGDMLILEGVFRFASVASTELGGWCADQVWALALADEVLPKLEGSIGKVTDS DPRDSEK
ASEEIKRIQEASHLVNEYITDRAFMPSDLSPKLELLMGKLQEQFAKSPDTCIVFTQRRN
TAKVMLQLCEKLQIPNLRPEILVGVKGD AIGMNSTFRRQFLVLAKFRKSEVNCLFATS
VAEEGLDIPDCNLVVRFDLYDTFIQYVQSRGRARRADSVYATMVECGNRNHSMRLQE
VRRAEHLMKNFCNLLPEDRKLYGDGHDMGVLVHEENRKRITYTVTRTGAMLYRHAIG
VLARFASSLQYENEISAKVTYVVMSENEFSCEVIMPEKSPVRRVLGCCESKKSLAKQ
SAAFDACLLLRKRNLDEHFNSVYHKRLPAMRNAKLAITSKRTDQYKMRTKPSIWARQ
QGTIPIRLYAILIRLIPSEPLTRAHGSIVLLSREQITAIPTFPVFLDDDIETTQSLCIDGCLE
VASEELEIVTAFTLAVFHDVFHKTYKHVSEQFPYWLVPAREDIDVGMSTSLFDIIDWTAL
KYVQDNPKLVWSTDMEPESLLNRFIYDDWNGKYRYFPLAVDPNLRPSDPPPSYAPCR
KWSDDIMNWSLSLSKNSRPKFFNRCIWTQPVLQAEELVCLRRNFLDKMADEEKLSNSR
CVICPQPLVLSTISKSV AATCFVFPAITRMESYLIAEEGCKLLGLGGIKLEFALEALTKDS
DNTEEHRSLQIHVQRGMGKNYERLELLGDSVLKMATSI SLFVQNPDDDEYDYHVNRM
CLICNKNLFKNATELKL YEFIRSRGFSRHMWYPPGLSLEYGRDHAKFVDSEGGKHSLS
KTIADVCEALIGASLLSGGDDHRYDMAVKA VTFVNSQKHTATSWKDYISAYSIPLYQK
KAADGFEMNLAQQIFEKVG YEFKYPRLLSAFTHP SYPLTWAKVPCYQRLEYLGDALL
DMVCVEHLFHRFPTRDPQWLTEHKMAMVSNKFLGALAVKLGLHLHLQHFSNPLMIQN
SKYAEELQLAESESNGEVNYWLSTSDSPKCLPDMLEAYLGAIFVDSSFDFTVIEAFFKR
HILPFFHDMMSIYDTFANRHPTT

>Dicer2_ Penicillium_digitatum_K9G6R2

ATGGAGCCCGAAGACGTGACCTCAGATCTATCTAGCGATGAAGCTGCGACCCAC
GGCTCACGGAGTCTCACCGACAAAGAGCTCAGAATGCTTCTTTCACTGCACTGCTT
GAAGAGCATGTTATCAACACGCCGAGCAATAGTCCCAATGGGGAACATGTGAAG
TATCTGATGCGGAAGTGTCAACTGCTCGTTTGCTCGCAAAGACAGAACCCGGGGG
TGGAGTCCTGGACCCTCTTCTTGACACAGGGTCTGGAAAGACTCTAGTGGCTGTG
CTTTTGCTCAAGCACATTCTCAAATGGAACCTAACAAACGTGCACATGGCACAAA
ACCTCGCGTTGCCTTCTTTCTGGTGGACTGTAACTTGGTCTTTCAACAGTCTG
CAGTATTGCGGAACAATCTCGACCAAAAAGTCGCTCATTCTTTTCGGCAATCTTGGG
CCTGACCTTTGGGACAAACAGACGTGGGACAAACATCTTGAAAAGTACATGGTGAT
TGTATGCACGGCAGAGATCTTGAACCAGTCTCTACTGAATGGCCACATAAGGATTG
ACCAGATTAATCTTCTGATCTTCGACGAAGCCCACCATGCCAAAAAGGAGCATCCG
TTTGCTCGTATTATCCGAGACGCCTATCTAAAAGCAGATATTGAAAATCGGCCAAG
GATTTTCGGGATGACTGCTTCCCCCGTTGATGCTAAGTGTGACTTAGCTGAAGCAG

CAGTCCAACCTCGAGACTCTTTA GATAGTCGCATTGCAACAACATCTGATCTTACCC
TCCTGCGAAATTTTGTGAACAAGCCAATGGAGGTAGAATGGGTCTACGACAAGCTT
CCTCCGCCGTCTGAGACCAACCTGCATAGTACCCTGAAAACAAAGTATGGGGATAT
GCTGATCCTTGAAGGCGTATTTTCGATTTGCATCGGTTGCAAGCACAGAATTAGGTG
GTTGGTGCGCAGACCAGGTATGGGCTCTGGCTCTGGCGGACGAAGTGCTGCCCA
AGCTGGAGGGCAGCATCGGCAAAGTCACCGATTCTGATCCTCGGGATTCTGAAAA
GGCCTCGGAGGAGATCAAACGAATCCAAGAAGCCAGCCATCTTGTCAACGAATAC
ATTACAGACCGGGCATTATGCCGAGTGATCTCAGTCCCAAACCTCGAGCTTTTGAT
GGGAAAGCTGCAAGAACAGTTTTCGGAAGTCGCCAGATACCAAATGCATTGTGTTCA
CGCAACGGCGCAATACCGCTAAAGTAATGTTACAACCTATGCGAAAAGCTGCAAATT
CCAAACCTCCGTCTGAGATCTTGGTCGGTGTTCGCAAAGGAGATGCCATAGGAA
TGAATTCCACATTTTCGTCGGCAGTTTCTGGTTTTGGCCAAGTTCGAAAAAGTGAA
GTTAACTGCTTGTGTTGCAACATCGGTCGCAGAGGAAGGTCTTGACATCCCAGACTG
TAACCTGGTGGTTAGATTTCGATCTGTATGACACTTTTATCCAATATGTCCAAGCCG
AGGCCGTGCCAGACGCGCCGACTCAGTGTACGCGACCATGGTTGAATGTGGTAAT
CGTAACCACAGCATGAGACTACAGGAAGTCCGAAGAGCAGAGCATCTCATGAAGA
ATTTCTGTAACCTGCTGCCGGAGGATCGAAAATTGTACGGAGACGGTCACGATATG
GGAGTGCTCGTGCATGAGGAAAATCGGAAGAGAACATACACCGTCACGAGGACAG
GCGCCATGTTGACCTATCGCCATGCGATTGGTGTACTGGCACGGTTTGCCAGCTC
GTTGCAATACGAAAATGAGATTTTCGGCCAAGGTTACATACGTTGTCATGTCAGAAA
ATGAATCATTACAGCTGTGAGGTAATCATGCCGGAGAAGTCGCCTGTGCGAAGAGT
GCTTGGATGTTGCGAATCAAAGAAATCACTCGCTAAGCAATCCGCTGCTTTTGATG
CATGCCTTCTGCTTCGCAAAAAGAAATCTACTGGACGAGCACTTCAACTCTGTCTAC
CACAAACGCCTGCCAGCGATGCGCAATGCCAAATTGGCCATTACTTCAAAAAGGA
CTGACCAGTACAAGATGCGTACCAAGCCTTCAATATGGGCTAGGCAGCAGGGAAC
CATTCCAATACGGCTTTACGCAATACTCATTCTCATTCCATCCGAGCCTTTGAC
CCGAGCTCACGGGAGTATCGTCTTGCTATCACGAGAGCAAATTACAGCAATACCG
ACTTTTCCTGTCTTCTTGGATGACGATATCGAGACTACTGTCCAGTCTTTGTGTATT
GATGGGTGCCCTTGAGGTTGCTTCCGAAGAGCTAGAAATTGTGACCGCATTTACGCT
TGCTGTCTTTTCATGATGTTTTTACAAGACTTACAAGCACGTCTCGGAACAGTTTCC
GTAAGGCTTGTACCTGCTCGTGAAGATATCGACGTTGGAATGTCAACAAGTCTCT
TTGACATAATTGATTGGACTGCTTTGAAATACGTTCAAGATAACCCCAAACCTTGTGT
GGTCTACTGATATGGAGCCGGAGTCATTACTGAATCGATTCTACGATGACTGG
AATGAAAGTATCGATACTTCCCGCTTGCTGTAGACCCCAATCTACGTCCTTCAGA
CCCACCCCATCTTATGCACCATGTGCGAAAGTGGTCAGACGATATCATGAATTGGT
CATTGAGTTTGAAGCAAAAATTCACGTCCAAAATTCTTCAACCGATGTATCTGGACTC
AGCCGGTCTTACAGGCA GAGTTGGTCTGCCCTTCGGCGG AACTTTCTTGACAAAAT
GGCCGACGAAGAAAACTATCCAACCTCGAGATGCGTATTTTGTCTCAACCATTTGG
TCTTGTCCACGATTTCTAAGTCGGTG GCCGCGACGTGTTTTGTCTT CCAGCAATT
ATCACACGAATGGAGTCATATCTGATCGCC GAGGAGGGATGCAAATTG TTGGGTC
TTGGTGGTATTAAGCTCGAATTTGCCCTGGAAGCCCTACCAAGGATTCAGACAAC
ACCGAAGAGCATCGGAGCCTACAGATTCACGTTTCAGCGAGGAATGGGAAAAAATT
ACGAGCGGCTTGAATTGCTAGGGGATTCTGTTCTCAAGATGGCAACATCGATTTCCG
CTCTTTGTTCAAAATCCCGACGATGATGAATACGACTATCACGTTAACAGAATGTGT
CTCATCTGCAACAAGAACCTTTTTAAAAACGCAACTGAACTAAAGCTTTATGAGTTC
ATACGTAGTCGTGGGTTTTCTCGGCATATGTGGTATCCCCAGGTCTTTTCGCTTGA
GTATGGTCGGGACCACGCCAAATTTGTTGATAGTGAAGGCAAGCACTCCTTATCCG
AGAAGACTATAGCGGATGTCTGCGAGGCATTAATAGGAGCATCGTTGCTCTCAGG

AGGC GACGATCATCGTTATGACATGGCCGTCAAAGCTGTGACCGTCTTCGTCAATA
GCCAGAAACACACCGCAACCTCATGGAAAGACTACATCTCTGCATACTCTATTCCC
TTGTACCAAAAAGAAGGCGGCCGATGGGTTTGAATGAACTTGGCTCAGCAGATCTT
CGAGAAAGTAGGCTACGAGTTCAAGTATCCTCGTCTTCTGCGGTCAGCGTTCACG
CATCCGTCTTATCCATTGACATGGGCCAAGGTCCCTTGCTACCAAAGGCTCGAGTA
CTTGGGTGATGCACTCCTGGACATGGTGTGCGTGGAGCACTTGTTTCATCGGTTTC
CCACTCGAGATCCGCAGTGGTTGACTGAACACAAGATGGCCATGGTCTCCAACAA
GTTTCTCGGTGCTTTGGCTGTAAACTAGGGCTTCATCTTCATCTTCAGCATTTCAG
CAATCCTCTCATGATTCAAAACAGCAAATACGCGGAAGAGCTTCAGCTTGCAGAGA
GCGAAAGCAATGGAGAGGTAAACTATTGGCTTTCGACGTCAGATTCTCCAAAGTGT
CTTCCCGACATGCTTGAGGCTTATCTCGGTGCCATATTTGTGGATTCTAGTTTCGA
CTTCACAGTGATTGAGGCCTTTTTCAAGAGACATATCCTGCCGTTCTTTCACGACAT
GTCAATCTATGACACGTTTGCAAATAGGCATCCAACAACCTAA

Aspergillus tubingensis

Taxonomía

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Subfilo: Pezizomycotina

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: Aspergillus

Sección: Nigri

Especie: Aspergillus tubingensis

Dicer 1 (1528aa) (5105nt)

IPR000999 (31.00): Ribonuclease III (1024~1224)(1241~1368)(1369~1432) (Rojo)

IPR001650 (31.00): Helicase, C-terminal (440~610) (Verde)

IPR005034 (31.00): Dicer double-stranded RNA-binding fold (643~733) (Morado)

IPR006935 (31.00): UvrABC complex, subunit B (118~289)

IPR013444 (31.00): Helicase Cas3, CRISPR-associated, Anaes-subtype(117~148)

IPR014001 (31.00): DEAD-like helicase (114~323) (Azul)

>Dicer1_ Aspergillus_tubingensis_estExt_Genewise1Plus.C_1_t20068

MPPAHASNMGVNSDLHGPDQNLQVETIKGRAVMTEDILQEDDRSSDESNDNEHEDQ
IIAGVSQQRITQNAKFKDLLAQRADSGPIHDAKVTHDLPNAQLSTAHLIAKQDLGIGTLD
PREYQLELFEAKAQNTIAVLDTGSGKTLIAVLLLKHTLEKELNDRAEGKQHRIAFFLVD
SVTLAYQQAALVLRNLDQSVGHFFGAMGTDLWWSKSVWEQHFQKNMVIVCTAEILNQC
LLNSYVKMSQINLLIFDEAHHTKKDHPYARIRESYLEEDPSKRPRIFGMTASPIDTKGDI
VDEATRLEKLLDSRIATTSNMSLLRQVVRRPVERVWSFNRLEQPFATSLYKQLEDVRF
DMACLEGIFRFAWQASSELGRWCSDRARALADDVLPKLEGNVRKTANSETSSDV
PESAYKEILRITEASEIVKGYEFSSPEAFGQLSPKVQVLRRELVHYFGRPTETKCIVFTQ
KRYTALILSELFQTLNVPFLRPGVLIGVRSGLAGMNITFRQQFISLVKFRGTGEINCLFAT
SVAEEGLDIPDCNLVVRFDLYQTLIQYVQSRGRARHFNSTYASMVERGNLDHEQRLL
VQDAEKMMQNFCTRLPEDRLLYGIDHDLDTVLQKDEGNRTFKIKSTGAKLTYHSATL

ARYASSLQYEKEISAQVTVVLPINGAFVCEVILPEKSPIRGLTGSPAMKKSIAKRSAAF
DTCLLLRKNKLLDDHFNSIYHRRLPAMRNAKLAITSKRTSEYDMISKPSLWGRKQGMA
PKELYGTVITFLPSSQLSHEARPLLLFTRERLPHFPQFIFLD**DDIETTIL**TTPLENQILLS
EEEVDALTVFTLRVFRDVFHKTVDNEPEKMAYWLAPVRVQSSYIPSFDPQRILDWESL
NYVRDNDSIPFSTEIRPESLVDLFDVDAWDGRCRFFTVGIEESLTPSSPPPPFVARRRH
MTDIMNYCSSLSK**NSRAKF**LSTCHWDQPVLRAEL**VRLRR**NLL**DRMTDTE**REVETRCFI
CLEPLKVSIPAATAFSCLAFP**AISRIDAYLISLQGCESLNFTVKLDLAEAF**TKDSDNTE
EHRAQQIHVQRGMGRNYERLEFLGDCFLKMATSIALFTQNPDDDEFDYHVNRMCLIC
NKNLFNAAVKKEIYKYIRSRGFSRHTWYPEGLKLLQGDHSRKATTESKHALAEKTIAD
VCEALIGASLLSGGPEHRFDMAVKAVTTLVNSPSHMAERWKDYISLYTIPKYQRRAAD
GAEIHLCRKVEEKLSYRFRYPTLLGSAFTHPSYPSAWAKVPCYQRLEFLGDSLIDMVC
VEDLFARYPDRDPQWLTEHKMAMVSNKFLGALAVKLGHLHLYFSAPLQSQITQYAE
EIQTAEGESEGAVDYWTVTKDPPKCLPDMVEAYVGAVFVDSDFNFEVIEKFFRDHIKP
FFEDMAIYDSFANKHPTTFLYNRLTNEFGCTNYCLKAGEMPSIDGAPAGVLAIVHDV
VIAEGTASSGRYAKVKASERALAVLDELSSAAFQRKYRCDCRESGLARPDIGTAI

>Dicer1_Aspergillus_tubingensis_estExt_Genewise1Plus.C_1_t20068

CCTGGATGAAGCATCTCGTTGCTTGATAGCTTCCATAACTACCAGCACTTAATAGG
TCTTCACCTAATAGCTGTCACACACATCAACCCTGACCAACTAACAGGGGTGAAAG
CAATAGCCGGTCTCCATCTTTGCTGTTTGTCTCCGTTTGTGACACGACCACCGGC
TGCCAGTGACTGCTCCCGGTGACATATTCACATATTCTTTAACTTATCATCTTCACT
TACTGCTTTTGAAGGGAGACACAGTATCCTCGCATCTTCGATTATTGATTCAGCATT
GAGCAGTTTTCTGCTTCAGAACTAACCGTAGGATAAGACCACAATGCCACCAGCTC
ACGCTTCCAATATGGGAGTAAATTCCGATCTTCATGGGCCTGATCAGAACCTACCC
GTGGAAACAATAAAAGGGCGCGCCGTGACGATGACTGAGGATATACTACAGGAAG
ATGACAGATCATCGGATGAATCCGACAATGACGAGCACGAAGACCAGATCATAGC
AGGAGTTTACAGCAACGTATTACCCAGAACGCAAAGTTCAAAGACCTTCTTGCAC
AGCGTGCTGATTGAGGCCCATCCATGACGCTAAAGTCACCCATGACCTGCCAAA
TGCTCAGCTTTCCACTGCGCACTTGATAGCGAAACAAGACCTTGAATTGGTACGC
TGGATCCAAGAGAGTATCAATTGGAATATTTGAGAGAGCGAAAGCGCAGAATAACA
ATTGCTGTACTTGACACGGGCTCTGGGAAGACTTTGATTGCAGTGTTGCTACTTAA
ACATACACTGGAAAAGGAACTGAATGATCGCGCGGAGGGGAAGCAACATCGAATA
GCCTTTTTCTTGTGGATAGCGTTACACTCGCATAACCAACAGGCCGCGGTACTACG
CAATAACTTGATCAGAGTGTGGGCATTTCTTTGGAGCTATGGGAAGTACCTGT
GGAGCAAAGTGTCTGGGAGCAGCACTTCCAAAAGAACATGGTGATCGTCTGTAC
AGCGGAGATTTTAAACCAGTGCCTGCTCAACTCCTACGT**CAAGATGAGCCAAATTA**
ACCTCCTAATATTCGATGAAGCGCACCATACAAAGAAAGATCATCCCTATGCACGC
ATTATACGTGAATCTTACCTCGAAGAAGACCCCTCAAAGCGTCCACGAATATTTGG
AATGACTGCATCACCCATTGACACAAAAGGTGATATAGTCGATGAAGCTAC**GAGAC**
TTGAGAAGTTGCTTGACAGTAGGATAGCTACGACTTCCAACATGCTCACTTCTACGG
CAGGTGGTCAGGCGTCCGGTGGAGAGAGTATGGT**CCTTCAACAGGTTGGAGCAA**
CCGTTTGCTACTAGCCTATATAAGCAGCTTGAAGATCGTTTTGGAGACATGGCGTG
CTTGGAGGGTATATTCAGATTTGCTTGGCAGGCCAGCTCTGAGCTAGGCCGATGG
TGTTGAGATCGAGCATGGGCGCGTGCTTTAGCAGATGATGTATTGCCAAGCTCG
AAGGTAATGTTGTAAGACGGCAAACCTCTGAAACATCATCTGATGTGCCGAAAGT
GCTTACAAAGAGATCTTGCGGATAACGGAAGCCAGTGAGATAGTGAAGGGCTATG
AATTCAGCAGTCCTGAGGCTTTTGGCCAGCTTAGCCCCAAAGTGCAAGTCCTTCGG
GAAGAGCTTGTCCACTATTTTGGACGACCGACGGAGACAAAATGCATTGTTTTAC

GCAGAAGCGCTACACAGCTTTGATTCTGTCTGAACTTTTTCAAACCCTGAATGTTCC
CTTCCTTCGGCCTGGTGTGCTTATTGGTGTCCGGTCTGGGGATTTAGCAGGAATG
AACATAACGTTCCGCCAGCAGTTTATTCCTTGGTCAAGTTCAGGACCGGCGAGAT
CAATTGCTTGTTGCTACATCAGTTGCTGAAGAGGGTCTGGATATTCCTGATTGTA
ATCTGGTCGTTAGGTTTGATCTTTATCAAACGTTGATCCAATACGTGCAAAGCCGT
GGGCGGGCGAGGCATTTCAATTCAACGTATGCGAGTATGGTCGAAAGAGGAAACC
TGGATCATGAGCAGAGGCTACTTGAGGTTCAAGATGCTGAAAAATGATGCAAAC
TTTTGCAGAACCCTCCCCGAGGATAGGCTACTATATGGCATTGACCACGATCTTGA
TACAGTGTTACAGAAAGACGAGGGCAACAGGACTTTCAAATCAAATCTACAGGTG
CTAAGCTAACCTATCATTACGCAACGGCGATACTTGCTCGGTACGCTAGTTCTTTG
CAATACGAAAAGGAAATTCGGCCCAAGTAACATATGTAGTGCTTCCTATCAACGG
TGCCTTTGTTTGCAGAGTTATTCTACCGGAAAAGTCACCTATCCGAGGCCTCACAG
GAAGCCCAGCAATGAAGAAGTCCAT**TGCGAAGCGCTCTGCGGCCTTTGA**TACATG
TCTTTACTTTCGGAAGAACAAGTTGCTCGATGACCATTTCAATTCATATACCATCG
TCGCCTTCCGGCAATGCGAAACGCGAAACTTGCAATAACATCGAAGCGCACCCAGC
GAGTATGACATGATATCGAAGCCATCTCTATGGGGCCGGAAACAAGGAATGGCCC
CCAAAGAACTTTATGGCACCGTTATCACGTTCTTGCCCTCCAGTCAACTATCGCAC
GAGGCCAGACCTTTGCTATTGTTACACGAGAGAGACTGCCACACTTTCCACAGTT
TCCCATCTTCCTCGATGACGACATAGAGACTACAATACTCACGACTCCCTTGAAA
ATCAGATTCTACTTTCAGAAGAGGAAGTTGATGCCCTCACAGTGTTTACTCTTCGTG
TTTTTCGTGACGTGTTCCACAAGAC**TACGACAACGAGCCCGA**AAAGATGGCTTAC
TGGCTAGCCCCGTAAGGGTTCAAAGCTCATA**ATCCCGTCATT**CGAACCAAGGC
A**GATCCTTGACTGGGAGAGCCT**CAACTACGTGCGCGATAACGATAGCATTCCATTC
TCTACGGAGATACGCCAGAGACTTGTTGATCTCTTTGTGTTGATGCCTGGGA
TGG**AAGATGCCGATTTTT**CACAGTAGGAATCGAGGAAAGTCTGACTCCCTCTTCTC
CTCCACCACCCTTTGTAGCCCGGCGCAGACACATGACCGATATTATGAATTACTGC
TCGAGCCTCTCCAAGAACTCCAGGGCTAAATTCTTGTCGACTTGTCACTGGGACCA
ACCTGTCTTAAGGGCAGAGCTCGTACGACTCCGCAGGAACCTTTTAGACAGAATG
ACAGACACCGAGAGAGAAGTTGAAACGAGGTGCTTCATTTGTCTTGAGCCTTTGAA
AGTATCTGCTATCCCTGCAGCTACAGCATTCTCCTGTCTCGCATTCCAGCAATCA
TCTCTAGAATTGATGCATACCTAATCTCTCTCCAAGGCTGCGAAAGCCTAAACTTCA
CCGTCAAGCTGGACCTCGCCCTTGAAGCATTACAAAAGACTCCGATAATACCGA
GGAGCACCGAGCTCAGCAGATACATGTCCAACGAGGAATGGGAAGAAATTATGAG
CGATTGGAATTCCTCGGAGACTGTTTCTGAAGATGGCTACCTCGATTGCTCTCTT
CACACAAAACCCAGACGATGATGAGTTTGACTATCACGTAACCCG**GATGTGTCTCA**
TTTGCAACAAGAACCTCTTTAATGCAGCCGTA
AAAAAGGAGATCTATAAGTATATTC
GTAGTCGAGGATTTTCGAGACATACATGGTATCCAGAGGGTCTGAAGTTACTACAA
GGTAAAGACCACAGTAGAAAGGCAACCACGGAGAGCAAGCATGCCCTTGCAGAGA
AAACAATTGCAGATGTTTGCGAAGCTTTGATAGGGGCGTCTCTGCTTTCCGGTGGT
CCTGAACATCGATTGACATGGCTGTCAAGGCAGTGACTACTCTGGTGAACAGTC
CCAGTCACATGGCTGAGCGATGGAAGGACTACATTTCTTTATATACGATAACCGAAG
TATCAGCGCCGAGCGGCGGATGGTGCCGAGATACACCTTTGTCGAAAGGT**CGAAG**
AGAAGCTGAGCTACCGCTTCCGTTACCCGAC**GCTTCTTGATCAGCTTTCACTCAT**
CCTTCGTATCCATCTGCATGGGCTAAAGTGCCCTGCTATCAGCGCTTGGAGTTTCT
TGGTGATTCACTGATCGATATGGTGTGCGTGGAAGACTTGTTTGCAGGTATCCTG
ACCGAGACCC**CCAGTGGCTCACAGAACACAAAATGGCCATGGTATCCAACAAGTT**
TCTGGGTGCTTTAGCCGTGAAATTGGGGCTCCATACGCATCTAAAATACTTTAGCG
CTCCGTTGCAATCTCAGATCACTCAGTACGCCGAAGAAATCCAGACAGCAGAGGG

CGAGAGTGAGGGCGCGGTGGACTATTGGACTGTGACAAAAGACCCTCCTAAGTGT
TTGCCCCGACATGGTTGAAGCGTATGTAGGTGCAGTTTTTCGTGCGACTCCGATTTCAA
CTTCGAGGTCATTGAGAAGTTCTTCCGGGATCACATCAAACCATTTTTTCGAGGACA
TGGCAATTTATGACAGCTTCGCAAATAAGCACCCCTACGACTTTCTTGTACAATCGAC
TGAATAATGAATTCGGCTGCACGAACTATTGTCTGAAAGCTGGTGAGATGCCAGC
ATTGATGGGGCCCCGGCTGGGGTTTTAGCGGCCGTGATCGTGCATGATGTTGTCA
TTGCCGAAGGTACAGCATCATCTGGTCGCTATGCTAAAGTTAAGGCCAGTGAGAG
GGCACTCGCAGTGCTGGACGAGCTATCGTCAGCAGCTTTCCAGAGAAAATATCGC
TGTGATTGTCGAGAGTCAGGAGACTTGGCAAGACCCGACATTGGAACGGCTATCT
GAAGGAAATTGGGACTAGGAGCTTAGTACATGCGGTGAAACAGCCTGGGTAATTA
GCAGATGAAATGGTAGGTGCGTGAAGCAACATGTAAGGGGGCCATGAAAT
TGTGCTAGCGGCAGTTTTTATATCATTGAAATATTCATTTTCCCTCTGTCTTCAAAT
GTTGTGCCAGAATACTAGTAGATGCCAAG

Dicer 2 (1375aa) (4472nt)

IPR000999 (31.00): Ribonuclease III (901~1070) (1083~1294) (Rojo)

IPR001650 (31.00): Helicase, C-terminal (355~525) (Verde)

IPR005034 (31.00): Dicer double-stranded RNA-binding fold (548~642) (Morado)

IPR006474 (31.00): Helicase Cas3, CRISPR-associated, core (39~67) (145~154)

IPR011545 (31.00): DNA/RNA helicase, DEAD/DEAH box type, N-terminal (26~196)

IPR014001 (31.00): DEAD-like helicase (19~223) (Azul)

>Dicer2_Aspergillus_tubingensis_estExt_fgenesh1_pg.C_4_t20139

MASSTDYHADSTPGPTTNMELRIREYQLEMLNESLKRNVIVVMPGTGTGKTQVAILRILA
DIDKGDSDKFWLLCPTVALSEQHTHTIRNRVPSMWCRGFTSRDQVEYWKEKKIWDN
ALLGIKIAVSTYQVLYDALSHGFVKLSQISLLIFDEAHHCKRDHVANKIMQDHYHKMHQS
GAQNLPKILGLTASPILSDLSSLETVESNLGSICKTPRQYYAQLLQFTNRPLILPRLPSYTI
PNCTVKAPILEKLCGILFSENEVPSSSKMKSKQLKHIRRFIQTSESINQELGIWAATEYV
RKSIMHFKESMRMGAEKTNISNSGKDFAMEILTKLGKQLQDCIPAMQREDVSPMCLCLL
DELSKAYREGFCGLVFVTQRATVLALKWLIENHPLTSHLFTCGTFIGMSTTQYSKTELG
NLHDIRNQTETLEKFRQGSINLIITDALEEGIDIPACNTVLNFNSQLSLKSFIQRRGRAR
RENSQFIIIMEDESGPMYKQLEMEEIELVSKLQNAERRQIPANELDFDEYERISLSLHV
DRTGAQLIMREAVGYLYHLC SKLPAQPYSNKPLFSYERNNYGRFRAVVRLPSNLDPS
LQSFSSSRNWSRRKYAREDAALEAYKALYQAGLVNDYLVPTQVSDHLDGNTILRSHYS
IQNQLDPWQDIAHLWKLDSQLYLHKLRIIRPEEDEIHIHMIFPYQLDTTVHIPLFIDYCTTY
TAILTPGHPITTNVPLCQQVTNLIFQSVYRDHCSRKNIDYAFLLVPGLEEPKLIIEFLERY
GSVSLTELLNQEATPSALGLLRSHTKPSRPLLVEPWVEGECVLSDDLSSSFTAKVKYM
TSRRNFLSQGNLAARKSKRCEPRIGFEANVKGMSVRDFVVDKLP SMFAQVALLTPSIIH
EVEVYIIAQNLREQELSLRSVTPWQRDLDLAIAIRPTSIEHRATFRSLAFIGDALIKYLFARQ
LFLHHLLHEGLLSSLKQRNLS DAGLAYAIYQSGLGKFLISKHLNGKRWAPPLVSRIKSS
SNEARQRSIGATLADMTKAVVGA AFIDGGLNQAACASVMFPKLTWNASSLHDGT
YSKTRPANAVAPTAIVDMEELLGYTFTDKSLAVESMTHPSCTGLVQTTSYRRLSFLGAS
VLEWIVVSYLHRHAQVMNPKRMQSLKSAFTNNTFLTVAITFHQVRERNHIYVDDEHK
VHQNVKTC SIRLWDFLRLHSDALSTELTNFVQVSSEEVD AIKHELWERRFYPWVRLSA
LGDMRVLSDIIQSTFGAVFIDSQATLTSCNALAEKLGILPLLEHFISHQITTDHPKDILQAIL
RGRKLSYQISVDKEHPGTLRCSALADSS EIASVEGHMND DVIKMLAAETA VRLLRKGFA
LSETS

>Dicer2_AspERGillus_tubingensis_estExt_fgenesh1_pg.C_4_t20139

GCAAGCTACTACATACTTTTAGGGTATCTCTCTTAGTTGAGTCACAAGGAACACACT
ATTACTTTTTCTCGAATCCCAGAATGGCCTCATCTACCGATTACCATGCAGACAGTA
CGCCGGGACCGACAATAATATGGAGCTTAGAATCAGAGAGTATCAATTGGAGAT
GTTGAACGAGAGTTTCAAACGTAATGTTATCGTTGTGATGCCAACAGGTAAGTGGGA
AAACGCAAGTAGCCATATTACGGATTCTGGCGGACATAGACAAAGGAGACTCAGAT
AAGTTCGTATGGCTACTTTGTCCCACAGTTGCTTTATCTGAGCAGCATAACACATA
ATACGAAACCGTGTTCCCTTCTATGTGGTGCAGAGGGTTCACCAGTAGAGATCAGGT
GGAATATTGGAAAGAGAAGAAAATATGGGATAATGCCTTGTGGGAATAAAGATTG
CAGTTTCAACATATCAGGTTCTATATGACGCACTATCCCATGGTTTTGTTAAACTGA
GCCAAATTTCTTTACTCATATTCGATGAAGCCCACCATTGTAAGGGGATCACGTTG
CGAACAAAGATAATGCAGGACCATTACCATAAGATGCACCAAAGTGGTGCGCAGAAT
CTACCGAAGATACTTGGTCTGACTGCTTCTCCCATTTTATCCGACTTGTATCTTTG
GAGACCGTGGAAAGCAACCTGGGCAGTATATGCAAGACCCCTCGCCAATACTACG
CGCAACTCCTGCAATTCACAAACCGGCCACTTATATTGCCGCGCCTACCTTCTTAT
ACGATTCCGAAGTGCAGTGTCAAGGCACCAA**TACTGGAAAAGTTATGTGGTATTTT**
GTTCTCTGAAAATGAAGTACCAAGTTCATCGAAGATGAAGAGCA**AGCAACTCAAAC**
ATATCAGACGCTTCATACAGACTTCGGAAAGCATTAAACCAGGAGCTTGGGATTTGG
GCCGCGACAGAGTACGTGCGAAAATCGATCATGCATTTCAAAGAAAGCATGCGAA
TGGGCGCTGAGAAGACAAATATCTCCAATAGTGGGAAAGACTTCGCCATGGAAATT
CTTACTAAATTGGGCAAATTGCAGGACTGCATCCCGGCAATGCAACGAGAAGATGT
GTCACCAATGTGCCTGTGCCTATTGGATGAGCTTTCAAAGGCATACAGAGAAGGAT
TCTGCGGTCTGGTGTTCGTTACGCAGCGAGCGACTGTACTTGCATTGAAATGGCT
GATAGAGAACCATCCACTTACGAGCCACCTATTTACTTGTGGGACATTCATTGGTA
TGTCAACGACACAATACAGCAAACAGAGCTCGGAAATCTCCATGACATCCGAAAT
CAGACTGAAACGCTAGAGAAGTTCCGGCAAGGCTCTATAAACCTAATCATAACGAC
CGATGCTCTGGAAGAAGGCATTGATATACCGGCATGCAATACAGTGCTAAACTTCA
ACAGTCAGCTATCCTTGAATCCTTCATTAGCGACGGGGCGTGCACGAAGGGA
GAACTCCAGTTTATTATCATTATGGAAGATGAAAGCGGCCCAATGTACTTGAAC
AACTCGAGATGGAGGAA**TAGAGCTAGTTTCAAAT**TGCAGAATGCCGAGCGAAG
GCAAATACCAGCTAACGAGCTGGACTTCGACGAGTACGAGAGGATTTGCTTTCC
CTTCACGTTGACAGGACCGGAGCGCAGCTGATAATGCGGGAAGCGGTGCGCTATT
TGTATCATCTTTGTTCAAAGCTACCTGCCAGCCGTATGTCAGCAACAAGCCCCTG
TTTTCTTACGAGCGCAATAACTACGGCCGATTCAGGGCGGTAGTCAGATTGCCGA
GCAACCTCGACCCTTCCCTTCAGTCATTTTCTAGCTCAAGAAATTGGTCCAGACGC
AAGTATGCGAGGGAGGACGCAGCATTAGAAGCATATAAAGCGCTTACCAGGCTG
GCC**TTGTTAACGATTACTTAG**TTCCGACACAGGTCTCAGACCATTTGGATGGGAAT
ACCATATTACGGTCCCACTACAGTATTCAGAACCAGCTGGATCCTTGGCAGGATAT
TGCTCATCTATGGAACTTGACAGTCAGCTGTATCTTCAAACACTACGAATCATAAG
ACCAGAAGAGGACGAAATCCACATACATATGATTTTTCCATATCAGCTTG**ACACAAC**
AGTTCACATTCCTCTTTTTCATTGATTATTGCACAACCTATACGGCCATTCTCACACC
GGGGCATCCAATCACTACAAATGTTCCACTTTGCCAGCAAGTGACAAACCTGATCT
TCCAGTCGGTTTACCGAGACCATTGTTCTCGCAAGAACATAGACTATGCGTTCCTT
CTTGTCCCAGGACTGGAAGAACCGAAGCTGATTGAGTTCCTTGAGAGGTATTCTG
GATCAGTCAGCCTGACTGAGCTTCTGAATCAGGAAGCTACGCCGAGTGCGCTTGG
ACTGCTTCGCAGTCATACGAAACCCAGTCGACCACTTTTGGTTGAGCCTTGGGTAG
AAGGAGAGTGCGTCTTATCAGATGATTTGTCCATTTGTCCTTACGGCCAAAGTG

AAATACATGACTAGTCGCCGGAACCTTTCTCTCTCAAGGAAATCTAGCTGCTAGGAA
ATCAAACGCTGTGAGCCCAGGATAGGCTTTGAAGCTAATGTGAAAGGCATGTCTG
TGCGAGATTTCTTTGTTGATAAGCTACCTTCCATGTTTGCCAGGTCGCCCTCCTTA
CACCAAGCATAATCCACGAGGTGGAGGTATATATCATAGCGCAAATTTGCGACAG
GAACTATCGTTACGATCAGTCACGCCCTGGCAACGACTTGATTTATTGGCCATTGC
TATCAGGCCTACAAGTATTGAGCATCGAGCCACCTTCCGCTCATTAGCCTTCATTG
GCGATGCACTCATCAAGTATCTCTTCGCAAGGCAATTATTTCTGCACCATCATTTGT
TGCACGAAGGTCTCCTGTCCTCTTTGAAGCAGAGGAATCTGTCTGATGCGGGTCTT
GCATATGCTATATATCAATCTGGCCTTGGGAAATTCCTCATAAGCAAACATCTCAAC
GGGAAACGATGGGCGCCACCGCTTGTGTGAGGATTAATCCTCCAGCAATGAAG
CCAGGCAGCGATCCATCGGTGCGGCTACGCTGGCTGATATGACGAAAGCAGTTGT
TGGGGCTGCCTTCATAGATGGTGGACTGAACCAGGCTGCTGCATGCGCATCAGTC
ATGTTTCCCAAACCTCAAGACTTGAATGCATCATCTCTGCATGATGGTACTTATTCC
AAAACAAGACCGGCAAATGCAGTTGCTCCAACAGCAATAGTCGATATGGAAGAACT
CCTTGGATATACTTTACGGACAAATCCCTGGCTGTAGAAAGTATGACACATCCAT
CTTGCACTGGTCTTGTGCAAACAACATCTTATCGGCGTCTCTCATTCTCGGAGCC
AGCGTGCTAGAATGGATTGTTGTGAGCTATCTACATCGACATGCACAAGTGATGAA
TCCAAAAAGGATGCAGTCCTTGAAGTCCGCGTTCACAAACAACACATTTCTGACCT
TTGTGGCAATAACATTCCACCAAGTAAGGGAGCGAAATCATATATATGTTGATGAT
GAACACAAGGTCCATCAAATGTGAAGACATGCTCGATTAGGCTCTGGGATTTTCT
TCGCTTGCATAGCGATGCCTTATCCACTGAGTTAACAAACTTTGTTCAAGTGTCATC
TGAGGAGGTGGATGCTATCAAACATGAACTATGGGAGCGGCGATTTTACCCATGG
GTGCGGCTGAGCGCACTTGGGGACATGCGAGTGTTGTCTGATATCATTAGAGCA
CTTTTGGTGTCTTTATCGATTCTCAAGCAACCCTAACATCCTGCAATGCTCTGG
CAGAAAACTCGGAATTCTGCCGCTTTTGGAGCATTTCAATTTCCCATCAAATCACTA
CAGACCATCCAAAAGACATTCTACAAGCCATCCTTCGAGGACGCAAACCTCTTTAT
CAGATCTCTGTTGACAAAGAACATCCCGGGACACTGCGGTGTTCTGCACTGGCTG
ATTCCTCGGAGATCGCCTCAGTGGAAGGCCATATGAATGATGATGTAATCAAGATG
CTGGCAGCTGAAACGGCCGTTCTGTCTCCTGCGCAAGGGGTTTGTCTTTATCCGAGA
CATCGTGAGCATATTTCTAACCCTCCAATCCTCATGCAACACGCGAGGACCTATA
TAACTTATGCTAAAGTTTTTTGTACGAGGAGGCCGTTTGGAGGCGTTTAAGGA
GATGTTTTCTTAGACGCTTCATCGACACTGCATGGATAATTCTATAGCACAGACTTC
TCAATTCCGTGGCTATTCAAAGGGTTCTGTGTCTGTTATTGCCGTGGTTGACTAGC
TAGATGAGAACTCGACGATACATAATAGATTAATTATAAATCAAATTTAC

Dicer 3 (1394aa) (4182nt)

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

>Dicer3_Aspergillus_tubingensis_gm1.9345_g

MTAAATVLPAGENAPAYRPRS~~YQVEMFEAS~~LNKIIVTMGTGSGKTHIALLRIMKELES
NPHKLIWFLTPTVALCLQQFKFISDNIPAVRARTLTSLDKVELWTEQPIWDAILKEMQVV
VSTHAVLADAMSHGFVKITQLGLMIFDEAHHCMMRRHPANKIMQDFYHPALERHGAEAV
PKILGLTASPVVRSNKQELLKIESNLDAVCKTPRTHRSEL~~MTHTHR~~PYL~~QQILFT~~PVLLD
DLQAGSRTLKALVNAWTSMR~~LEDDPY~~IKKLRKSPLDGRALQKVLES~~GKTYCNDQLKRF~~
~~ATRS~~LHIFRELGEWAADYFIYASVEQLKTRADNSVDSMGWTD~~EEKAYLLDIV~~SKLPTPN
LDLTPSDPDRIPISPKFRS~~LLEFLDAKGE~~PNFSGLVFAKQRATVSVMEKLLSIHPVTKHR
FRCASFV~~GWSSGG~~SKDVLGELLDARMQRDTLSEFRTGQKNLIATDVLEEGIDISACS
VVCYDKPPNLKSFVQRRGRARHRKSTYAIMFSTDD~~ESSALSKWEDLEQAMIEAYEDD~~
~~ERRLREAWALEAINEE~~~~VVERLE~~VPSTAVLTADTAV~~AHLNHFC~~AVLPRQPYASNEPEFS
YEKDDADLLRGTVTL~~PSCVHPEV~~RRIQGGQRWWQTERAARKEAAFQAYKRLYEFGLLS
DHLLPFKRNLELKETD~~HVNLPALVEVS~~~~EQYDPWVDW~~ACSWSSPDV~~HQTQIAIKH~~NGD
SHMCIRLTSP~~SLPPIEPMTL~~FWDSETTYTLAFDKPKRMK~~GIAADSIENMRLATALYLHA~~
ASSRQLRPEQDFVTLFGPDLSDLELAEWLKKHAG~~DEPALEVYSR~~KDFPTI~~MGIVRDRL~~
RYNEPMVFKRWVVS~~GQDDTPIVELE~~CDAFPKRRNLLHRQTLAAKQLDTEIPDIS~~SKIRLI~~
~~LA~~ENCTI~~DKLPYAETIFGRFISVIL~~DRLEATLVATRLCETILRDLEFSSIRHVITAITAPSAQ
SLTNYQRYEFFGDSVLKFTVSCQLFFQHPNWHEGYLSEGRDEIVQNSRLARAALDAG
LDAFIMNKFTTPRKWTAPLISEKISLTPKQRTISTKVLADVVEALIGASYIDGGFAAAHACI
HRFLPEVNLEHIDRTTTTTAPSTPEGTTNHTLNDDHLMTHIGYTFTHKSLLVESLTHPSC
QFDTTTTQSYQRLEFLGDAVLDMAIMSTLLSHPHEIPQGGQMTKIKHAVVNANLLAFFCME
FALTEKRSTVQITPSGTASLNPSSVDHKVELWRFMRYQGAHLQTARDAALSRLASLRK
SIIHGLQHSPSYPWKYLSQLNADKFFSDIIESILGAIFIDSHGNLAECEKFLERLGLLWYL
RRILKDEVDVMHPRNIAQQMAKGEIRFEVVRVVNGDGTAGTAGGEDDGATYRCAVTM
AGVEGVAVLVEGCLTSEEAEITAERA VEILVGRGV

>Dicer3_Aspergillus_tubingensis_gm1.9345_g

ATGACAGCTGCTGCGACTGTACTTCCCGCCGGCGAGAATGCGCCCGCATAACCGC
CCGCGCAGCTACCAGGTGGAGATGTTTGAGGCGAGTTTAAAGGAGAATATCATTG
TCACGATGGGA~~ACTGGCAGTGGGAAA~~ACTCACATCGCTTTGCTGCGAATCATGAA
GGAGCTGGAGAGTAATCCGCACAAGTTAATCTGGTTCTTAACACCCACTGTGCGCC
TATGTCTGCAACAATTCAAATTCATCTCCGACAATATCCCCGCCGTCCGGGCCCGG
ACCCTCACCAGTCTAGACAAGGTCGAGCTCTGGACTGAGCAACCCATCTGGGATG
CGATCCTGAAGGAGATGCAGGTGGTGGTGTCCACGCATGCGGTTCTTGCCGATGC
GATGAGCCATGGGTTCTGCAAGATCACCCAGCTGGGTCTGATGATTTTCGATGAA
GCCCATCATTGCATGCGACGCCACCCTGCCAATAAGATCATGCAGGACTTTTATCA
CCCTGCGCTGGAAAGGCATGGCGCGGAAGCTGTGCCCAAGATTCTGGGCCTCAC
GGCTAGTCCCGTGGTGAGATCAAATAAACAGGAGCTACTGAAGATTGAGTCAAATC
TTGATGCCGTGTGCAAGACACCACGGACTCATCGGTTCAGAGCTT~~ATGACGCATAC~~

CCATCGGCCATATTTGCAGCAGATCTTGTTCAACC

CCGGTGCTGCTCGACGATCTG
CAGGCTGGAAGCAGGACTTTGAAAGCTCTTGTGAACGCATGGACATCTATGAGAC
TCGAGGATGATCCGTACATCAAGAAATTGAGAAAGAGCCCTCTTGACGGAAGGGC
GTTACAGAAAGTCCTCGAGTCCGGGAAGACTTACTGTAACGATCAGCTGAAAAGAT
TTGCGACTAGAAGC

TTACACATTTTCAGAGAGCTTGGTGAATGGGCTGCCGACTAC
TTCATATACGCTTCTGTGCGAGCAGCTCAAACGAGAGCCGATAATTCAGTGGATAG
CATGGGCTGGACCGACGAGGAGAAGGCATATCTATTAGATATCGTC

TCCAAGCTA
CCGACCCCAAATCTCGATCTCACTCCTTCCGACCCGGATAGAATACCTATTTCAACC
AAAATTCCGATCCCTACTGGAATTCTTGGATGCAAAGGGAGAGCCCAACTTCTCCG
GTCTAGTATTTGCTAAACAGAGGGCTACAGTGAGTGTAATGGAAAAGCTACTGTCT
ATTCATCCTGTAACGAAACATCGTTTTCGATGCGCCTCCTTCGTGCGGCTGGTCCGG
CGGAGGTAGCAAAGACGTTCTGGGTGAGCTCCTTGACGCCCGTATGCAGCGCGAT
ACACTGAGCGAGTTCGGACCGGCCAGAAGAACTTGATTATTGCGACGGATGTGC
TGGAGGAGGGCATTGACATTAGCGCCTGCAGCGTGGTAGTCTGCTATGATAAGCC
ACCAAATTGAAATCGTTCGTACAGAGACGAGGTCGTGCGCGGCACAGGAAATCC
ACTTATGCCATCATGTTTTCTACAGATGATGAATCTTCTGCACTGAGCAAGTGGGA
GGACCTGGAACAGGCCATGATTGAAGCGTACGAGGATGACGAAAGGCGACTGCG
CGAGGCTTGGGCCCTGGAGGCTATCAACGAAGAA

GTGGTGGAAAGGCTTGAGGT
GCCATCTACTGGTGCTGTCTTGACGGCAGACACCGCTGTTGCACATCTCAACCATT
TCTGTGCAGTCTGCCGCGCCAACCGTATGCGAGTAATGAGCCTGAATTTTCATAT
GAGAAGGATGATGCAGATCTATTGAGAGGTACTGTACATTGCCGTCTGCGTCC
ATCCCGAAGTCCGCGTATTCAGGGCCAGCGATGGTGGCAGACCGAGCGAGCAG
CTCGGAAAGAAGCAGCCTTTCAAGCCTACAAACGGCTCTACGAGTTTGGTCTTCTG
AGCGATCATCTACTTCCATTCAAAGGAATTTAGAGCTAAAAGAGACCGATCATGTT
AACCTGCCAGCCCTTGTGGAAGTATCGGAACAGTACGATCCATGGGTGATTTGGG
CTTGTTCTGGTTCATCCCCTGATGTCCATCAAACGCAAATTGCTATAAAGCACAAAT
GGGACTCTCACATGTGTATCAGGTTGACCAGCCCAACGAGTCTACCA

CCGATTG
AACCGATGACC

TTATTCTGGGACAGCGAGACAACCTATACGTTGGCGTTCGACAAA
CCGAAGCGAATGAAAGGGATCGCCGCTGACAGCATTGAAAATATGAGACTAGCAA
CCGCGCTATACCTCCACGCTGCAAGCTCTAGACAACCTGAGACCCGAACAAGACTT
TGTTACTCTGTTTGGGCCCGACCTTTCCGACCTTGAGTTGGCAGAATGGCTTAAGA
AGCACGCTGGAGACGAGCCTGCTCTAGAGGTCTACTCTCGCAAGGACTTTCTCTAC
GATAATGGGCATTGTGCGGGACCGC

TTACGCTACAATGAGCCCATGGTGTTCAAA
CGGTGGGTTGTGTCCGGACAAGATGACACACCCATAGTCGAGCTCGAATGCGACG
CCTTCCCAAAGCGACGAAATCTTTTGCACCGGCAAACATTAGCTGCTAAGCAACTT
GATACTGAAATCCCTGATATCTCCTCAAAGATCCGTCTTATTCTTGCGGAAAACCTGC
ACC

ATAGACAAACTTCCCTATGCCGAAACCATCTTCGGCCGCTTCATATCAGTTATA
CTGGATAGACTAGAAGCCACATTGGTTGCGACTAGACTATGCGAGACCATCCTCC
GCGATCTTGAATTCTCCAGCATTTCGTATGTCATCACGGCCATCACCGCGCCCAG
CGCGCAATCACTGACCAACTACCAGCGATACGAGTTCTTCGGCGACTCGGTCTC
AAATTCACCGTCTCATGCCAACTCTTCTTCCAGCACCCCAACTGGCACGAAGGCTA
CCTCTCCGAAGGACGAGACGAGATCGTCCAAAACCTCCCGTCTCGCCCGAGCGGC
CCTCGACGCCGGCCTCGACGCCTTCATCATGAACAAGACGTTCACTCCCCGCAA
TGGACCGCCCCCTCATCTCCGAAAAGATCAGCCTACCCCAAAACAACGAACAA
TATCCACCAAAGTCCTCGCCGACGTAGTCGAAGCCCTAATCGGAGCCTCCTACAT
CGACGGCGGCTTCGCCGCGCCACGCCTGCATCCACCGCTTCTCCCCGAAGT
GAACCTCGAGCACATCGACCGCACCACCACAGCCCCCTCAACCCAGAAAGG
CACCACCAACCACACCCTAAACGACGACCACCTAATGACACACATCGGCTACACCT

TCACACACAAATCCCTCCTCGTCTGAATCCCTCACCCACCCATCCTGCCAATTCGAC
ACCACCACCCAATCCTACCAACGACTCGAATTCCTCGGCGACGCCGTCTCGACA
TGGCCATCATGTGACCCCTCCTCTCCACCCGACGAAATCCCCAAGGCCAAAT
GACCAAGATAAAGCACGCCGTCGTGAACGCCAACCTCCTCGCCTTCTTCTGCATG
GAATTCGCCCTCACTGAAAAACGCTCCACCGTACAAATCACCCCCTCGGGAACCG
CCTCCCTCAACCCCTCATCCGTCGACCACAAAGTCGAACTCTGGCGCTTCATGCG
CTACCAAGGCGCCCATCTCCAAACAGCCCGAGACGCAGCCTTATCCCGCCACGCC
TCGCTCCGCAATCCATCATCCACGGCCTGCAACACTCCCCGTACATACCCTGGA
AATACCTCTCCAGCTCAACGCGGATAAATTCTTCTCCGATATCATCGAGAGTATC
CTGGGCGCTATATTCATCGATTGCGATGGGAATCTGGCCGAGTGTGAGAAGTTTCT
GGAACGGTTGGGGCTGTTGTGGTATTTGAGGAGGATTCTGAAGGATGAGGTGGAT
GTTATGCATCCGAGGAATATTGCGCAGCAGATGGCGAAGGGGGAGATTAGGTTTG
AGGTGGTGAGGGTGGTGAATGGGGATGGTACTGCTGGTACTGCTGGTGGGGAGG
ATGATGGGGCGACGTATCGGTGTGCGGTGACGATGGCAGGCGTGGAGGGCGTG
GCTGTTCTTGTGGAGGGGTGTTTGACTAGTGAGGAGGCGGAGATTACGGCGGCG
GAGAGGGCTGTGGAGATTCTTGTGGGGAGGGGGGTGTAG

Rhizopus oryzae

Taxonomía

Reino: Fungi
Orden: Mucorales
Familia: Mucoraceae
Género: Rhizopus
Especie: R. oryzae

Dicer 1 (1239aa) (3720nt)

IPR000999 (31.00): Ribonuclease III (951~1135) (754~921) (Rojo)
IPR001650 (31.00): Helicase, C-terminal (58~223) (Verde)
IPR005034 (31.00): Dicer double-stranded RNA-binding fold (263~353) (Morado)

>Dicer1_ Rhizopus_oryzae_RO3G_15434

MLTDLERRITNQTQDLDKDALIDEDLALKETHELIDTIECPRNPNVDDIQTTFSPKIAKLIQL
LGFIVNNMGQFCGIIFVERRHTAIALQKLIESLDTLDKIKCGILIGHGTADEGDVQMTFKE
QNKVIQKFRSGELNFLIATNVAEEGLDIQPCNFVIRFDFFHTLIAYIQSRGRARCIDSKYVI
MIEDNNLNQIGTLDEFRLMEEAMKSFCQALPAERNVANRFSLSMEGYESDNEYDSDE
DYLESAAIIDMDTGATITKQNAVPLIHRYCSSLPSDFSFCVLKPIFEHIAAGEGYKCILTLPSN
AAIQKVESPFVRSKDLAKALVALQACSELKRLDALDRHLLPRNIKKEILGEMAPQYDEN
GYIIGSRRRHGLYEKRTPKFWEREIEEEEVIDIEDNADLLKATQMIKKTTHDDQEVPVDA
EATKIETNAEQGTSLSNGLIEKNIQKTSNNNPNGEHQDVEKIKETEEVKDTEVEEIEDA
EEELGEGPFSCWFTILEVLMPDGKFEGRNYRRMCLVTKKPFIELPQLKLFHKNQPFVV
NLRVIKTELVLKCECILLSDYMMSLMKELMNKDYHCPVVDIPYYIVPLIKNCEQAKFED
LSADELKNMVDWDQVNAFKERTNKPLILSEMSDPSDFIIDNSDYSLRYLITDVRYDMN
PQSAVPSGFDIREAGYPTFIDYRDLGDKFVIHDYEQPMIEVERLKRGMDFLHPGGNM
PARSKGPARTWVV PQFCTQYFVNASVYIAMLMIPSIMTRIDSLLLCYDSRARYDLPITDE
YMLEAYTMPASMEMDYERLETLGDSLKFIATIRLYINFPFSNEGELHHLRIRVVCNRA
LYRAAKRLKFYRYVTSQAFNRRHWRPPHFTSTADNADTMESLKKHKLSDKTLADIVEA

SLGAAYLSSGLEGLHTAIQMQUIPF~~DIQIEKWSDFNVAFEESRKAVPPRAEVLKALRMLDL~~
PKIQVLVDREFNKPLLVEALTHASLPNSTSPCYQRLEFLGDAILDFLVIRYLYTKYPDA
EPGQITTLKDSCVNNHVLGIICLNGLHKHIIHYSGLVRAINTLEEEVQELKDTGKAVG
EYWADMNIPKVLSDVVESMLGAVFVDAKFDLSPCAALFDKWFVPIFDANVTPELVRIHP
MRKLLTDLQAFGCEGFMLRNHSTGESGPTSQKCVIFLHDKSLACGADWNIKVARRRA
AEKASQRLEDEPGLLESVCNCRISYIKRGLLPEKETKNIDEDSDTNLS

>Dicer1_ Rhizopus_oryzae_RO3G_15434

ATGCTGACTGACCTTGAAAGACGGATTACTAATCAAACACAAGATTTGGATAAAGAT
GCTTTGATCGATGAAGATTTGGCACTCAAGGAAACGCACGAGTTGATTGATACCAT
TGAATGTCCTCGTAATCCTAACGTAGATGATATACAACTTTCTCACCCAAGATCGC
TAAACTGATCCAACACTTGGCTTTATTGTGAATAACATGGGGCAATTTTGTGGTAT
TATTTTCGTTGAACGAAGACATACAGCAATTGCTCTTCAGAAGCTGATCGAGTCATT
GGACACACTCGATAAGATCAAGTGCAGCATCTTGATTGGTCACGGCACAGCAGAT
GAAGGCGACGTACAGATGACCTTTAAGAACAACAAAGTGATTCAAAAATTGAG
ATCGGGAGAATTGAATTTTCTTATTGCTACTAATGTCGCTGAAGAAGGTTTGGATAT
CCAACCTTGTAACCTTTGTTATTAGATTTGATTTCTTTCATACGCTAATTGCCTATATT
CAGTCAAGAGGAAGAGCTCGATGTATCGATTCAAATATGTGATCATGATTGAAGA
CAATAATTTGAATCAAATTGGCACCTTGGATGAATTTAGAATGTTGGAAGAGGCGAT
GAAGAGCTTTTGCCAAGCTTTGCCTGCTGAAAGAAACGTAGCTAATAGGTTCTCGC
TAAGCATGGAAGGATACGAATCTGATAATGAATACGACTCTGATGAAGACTATTTG
GAAAGTGCCATCATAGATATGGACACTGGAGCGACAATCACAAAGCAAATGCAGT
ACCACTTATTCACAGATACTGTAGTTCGCTTCCGTCTGATAGTTTTTGTGTTTTGAA
GCCAATCTTTGAACACATCGCTGCAGGAGAGGGCTACAAGTGTATATTGACATTAC
CAAGTAATGCTGCTATTCAAAGGTAGAATCTCCTTTTGTTCGCTCCAAAGATTTGG
CTAAAGCGCTCGTTGCACTACAAGCATGTTCTGAATTAAGCGATTGGATGCTCTG
GACAGACATCTGCTGCCACGTAACATCAAAAAGAAATCTTGGGTGAGATGGCTCC
TCAATACGATGAGAATGGCTATATAATTGGTAGTAGACGTCGTCATGGATTATATGA
AAAGAGAACACCAAAGTTTTGGGAAAGGGAAATAGAAGAAGAAGAAGTCATTGACA
TTGAGGATAATGCGGATTTATTGAAGGCAACTCAAATGATCAAGAAAACACATGAT
GATCAAGAGGTGCCACCTGTAGACGCAGAGGCCACTAAAATAGAAACAAATGCTG
AGCAAGGCACATCTCTTTCGAATGGCTTAATCGAGAAGAATATTCAAAAACCTCAA
ATAATAACGTTCCAAATGGTGAACACCAAGATGTGAGAAAATTAAGAAACTGAG
GAGGTCAAAGACACCGAGGTTGAAGAAATTGAAGATGCCGAGGAAGAATTGGGTG
AAGGGCCTTTCTCTTGCTGGTTCACTATCCTGGAGGTCCTTATGCCAGATGGTAAA
TTCGAAGGCAGAACTATCGTCGTATGTGTCTTGTTACCAAAAAGCCTTTTATCGAG
CTTCCACAGTTGAAGCTATTCCACAAGAATCAACCGTTTGTGTTAACTTGCCTGTC
ATTAAGACCGAATTGGTATTGGATAAAGAGTGTATCCTGCTTCTTTCGGACTATATG
ATGAGTCTGATGAAAGAATTGATGAACAAAAGATTACCACTGCCCTGTAGTTGATATC
CCTTACTATATTGTTCCCTGATCAAAAACCTGCGAGCAAGCCAAGTTTGAAGATCTC
TCTGCTGATGAACTAAAAAATATGGTGGACTGGGATCAGGTTAATGCCTTCAAGGA
ACGTACGAACAAACCGTTGATTTTGTCTGAAATGAGCGATCCTTCTGATTTTATTAT
TATTGACAACCTCTGACTACTCTCTTCGATATTTAATAACAGATGTTTCGATATGACAT
GAATCCTCAAAGTGCAGTCCCTTCAGGCTTCGACATTGCGGAAGCCGGATATCCTA
CATTTATAGACTATTATCGTGATCTTGGCGATAAATTTGTCATCCACGACTACGAGC
AGCCGATGATAGAAGTGGAACGACTTAAAAGAGGAATGGACTTTTTCATCCAGGC
GGTAACATGCCCGCTCGGTCAAAGGGCCTGCACGTAAGGTTGGTCTCAAT
TCTGTACCAATACTTTGTAATGCTAGTGTTTATATAGCCATGTTGATGATACCT

CAATAATGACACGAATTGATTCACCTTTACTCTGCTATGATTCACGTGCAAGATACG
ATTTGCCATTACTGATGAATATATGCTTGAAGCATATACTATGCCCTCCGCAAGTA
TGGAGATGGACTATGAAAGATTAGAAACACTTGGAGACTCTTTATTGAAATTCATTG
CTACTATTCGTTTATATATCAATTTCCCTTTCAGTAATGAAGGTGAACTTCACCATTT
ACGTATTCGTGTTGTTTGTAAATAGAGCTCTTTACAGAGCTGCAAAGCGTCTAAAATT
TTACCGTTATGTGACCAGTCAAGCATTTAATCGTCGGCACTGGCGTCCACCTCACT
TCACAAGTACTGCAGATAATGCAGATACAATGGAGAGTCTCAAGAAACACAAATTA
TCTGACAAGACATTGGCTGATATTGTAGAAGCATCGCTTGGTGCAGCTTATTTAAG
CAGTGGACTCGAAGGCTGTCTTCATACTGCCATTCAAATGCAAATTCCTTTTGATCA
AATCGAGAAGTGGTCCGATTTTAACGTAGCCTTTGAAGAATCTCGAAAAGCAGTTC
CTCCTCGCGCTGAAGTCAAAGCGCTTCGTATGTTAGACTTACCAAAGATTCAGGTA
CTTGATAGATCGAGAGTTCAATAAGCCTTTATTAGTTGTAGAAGCCCTGACGCATGC
AAGTTTACCTAATTCAACCTCACCATGTTATCAACGCCTTGAATTTCTGGGTGATGC
CATTTTGGATTTCTTGGTTATTTCGATACCTGTATACTAAATACCCTGATGCCGAACC
TGGTCAAATTACTACCTTAAAAGATTTCATGCGTCAATAATCATGTGCTAGGCATTAT
CTGTTTAAACAACGGTCTTCACAAGCACATTATACATTATTCTGGAAAACCTTGTTAG
AGCCATCAATACACTGGAAGAAGAAGTCCAAGAATTAAGGACACTGGTAAAGCAG
TGGGTGAATATTGGGCTGATATGAATATACCCAAAGTTTTGTCCGATGTGGTTGAA
AGTATGCTGGGTGCAGTGTTTGTGATGCCAAATTTGACTTGTACCCTGTGCAGC
ATTGTTTGACAAGTGGTTTGTGCCTATTTTCGATGCAAACGTTACACCAGAACTTGT
TCGTATTCATCCTATGCGTAAATTGCTTACTGATTTACAAGCATTTGGTTGCGAAGG
ATTTATGCTTAGAAATCATTCAACTGGAGAAAGTGGCCCTACAAGTCAAAAATGTGT
TATTTTTCTCCATGATAAGTCTTTAGCTTGTGGAGCAGATTGGAATATTAAGTGGC
AAGAAGACGTGCGGCAGAAAAAGCCAGTCAAAGATTGGAAGATGAGCCAGGATTA
TTGGAGTCTGTCTGTAAGTGCAGAATTTCTTACATCAAAGAGGTCTGTTACCAGA
GAAAGAAACAAAGAATATTGATGAGGATAGTGACACGAACCTTGAGTTAA

Anexo 5 Secuencias de las muestras LB6, LB15, LB20, del plásmido pGEM-T Easy utilizando los promotores M13 y SP6

Muestra: LB6

>M13/Forward_LB6

TCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTTCGATT TAATACGACTCACTATAG
GGAGATGGGGATATGCTGATCCTTGAAGGCGTATTTTCGATTTGCATCGGTTGCAAGCACAG
AATTAGGTGGTTGGTGCGCAGACCAGGTATGGGCTCTGGCTCTGGCGGACGAAGTGCTGC
CCAAGCTGGAGGGCAGCATCGGCAAAGTCACCGATTCTGATCCTCGGGATTCTGAAAAGG
CCTCGGAGGAGATCAAACGAATCCAAGAAGCCAGCCATCTTGTCAACGAATACATTACAGA
CCGGGCATTTATGCCGCCATCTATCGTGCAAGCTGCGGAGCAGTATGACCCTTATGTAGAC
CTTGACAAGGCTGGGCTTCGGGTCAGCTGTGCCAAACACGTTGAAGATATGCAGCAAT
GGGTCTGTAGATGAAGATCTGGCCATCAGCATAATTTTGCCAAGATTGACTCCGATGCCAC
ACCCATTCTCTCTACTGGGACTCCGAGACGTCCTTTG TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA
AATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCC

>SP6/Revers_LB6

TATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATT TAATACGACTCACTATAGGGA
GACAAAGGACGTCTCGGAGTCCAGTAGAGAGGAATGGGGTGTGGCATCGGAGTCAATCT
TGGCAAATTATGCTGATGGCCAGATCTTACATCTACAGACCCATTGCTGCATATCTTCAAGC
GTGTTTGGCACAGCTGACCCGAAGCCCAGCCTTGTGCAAGGTCTACATAAGGGTCATACTG
CTCCGCAGCTTGCACGATAGATGGCGGCATAAATGCCCGGTCTGTAATGTATTTCGTTGACA
AGATGGCTGGCTTCTTGGATTCTGTTTATCTCCTCCGAGGCCTTTTCAGAATCCCGAGGAT
CAGAATCGGTGACTTTGCCGATGCTGCCCTCCAGCTTGGGCAGCACTTCGTCCGCCAGAG
CCAGAGCCCATACTGGTCTGCGCACCAACCACCTAATTCTGTGCTTGAACCGATGCAAA
TCGAAATACGCCTTCAAGGATCAGCATATCCCCA TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA AATCG
AATCCC GCGGCCGCCATGGCGG

Muestra: LB15

>M13/Forward_LB15

ACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTTCGATT TAATACGACTCACTA
TAGGGAGA TGGGGATATGCTGATCCTTGAAGGCGCTCTTTGCATTACAGACCGGGCATTTA
TGCCGCCATCTATCGTGCAAGCGCGGAGCAAATGCGGCTTTGGTCCGAGGCCAGCCCT
CACTGTCTAACC GGAAGGACGTGAGCCGGCGCTCCATGAAGACGACACGGGATAAAGCG
CCACATCAGATGAGGGTTTCTTCCAAAAGGCTATCGTTATAGTAGATTGCAGCAGGCTGTC
ATTGGTAACCTGGGAC CCGAGACGTCCTTTG TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA

>SP6/Revers_LB15

TATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATT TAATACGACTCACT
ATAGGGAGACAAAGGACGTCTCGG GTCCCAGGTTACCAATGACAGCCTGCTGCAA
TCTACTATAACGATAGCCTTTTGAAGAAACCCTCATCTGATGTGGCGCTTTATCCC
GTGTCGTCTTCATGGAGCGCCGGCTCACGTCCCTTCCGGTTAGACAGTGAGGGGC
TGGGCCTCGGACCAAAGCCGCATTTGCTCCGCGCTTGCACGATAGATGG CGGCAT
AAATGCCCGGTCTGTAATGCAAAGAG CGCCTTCAAGGATCAGCATATCCCCA TCTC
CCTATAGTGAGTCGTATTA AATCGA

Muestra: LB20

>M13/Forward_LB20

ACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTTAATACGACTCACTA
TAGGGAGA TGGGGATATGCTGATCCTTGAAGGCGTATTTGATTTGCATCGGTTGCAAGCA
CAGAATTAGGTGGTTGGTGCAGACCAGGTATGGGCTCTGGCTCTGGCGGACGAAGTGC
TGCCCAAGCTGGAGGGCAGCATCGGCAAAGTCACCGATTCTGATCCTCGGGATTCTGAAA
AGGCCTCGGAGGAGATCAAACGAATCCAAGAAGCCAGCCATCTTGTCAACGAATACATTAC
AGACCGGGCATTATGCCGCCATCTATCGTGCAAGCTGCGGAGCCGAGACGTCTGGGAC
TCCGAGACGTCTTTG TCTCCCATAGTGAGTCGTATTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCG
CCT

>SP6/Revers_LB20

TATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTTAATACGACTCACTAT
GGGAGACAAAGGACGTCTCGGAGTCCCAGGACGTCTCGGCTCCGCAGCTTGCAC
GATAGATGGCGGCATAAATGCCCGGTCTGTAATGTATTTCGTTGACAAGATGGCTGG
CTTCTTGGATTTCGTTTGTCTCCTCCGAGGCCTTTTCAGAATCCCGAGGATCAGAAT
CGGTGACTTTGCCGATGCTGCCCTCCAGCTTGGGCAGCACTTCGTCCGCCAGAGC
CAGAGCCCATACCTGGTCTGCGCACCAACCACCTAATTCTGTGCTTGAACCGATG
CAAATCGAAATACGCCTTCAAGGATCAGCATATCCCA TCTCCCTATAGTGAGTCGT
ATTA AATCGAATTCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGA

Construido para *P. digitatum*, de color amarillo DCL 1, de color azul DCL 2 y de color verde el promotor T7.