



**“Evaluación del silenciamiento génico mediado por RNAi en *Pyrenophora tritici-repentis*
in vitro e in planta”**

Tapia Parra, Jennifer Carolina

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

8 de marzo del 2021

Reporte urkund



Document Information

Analyzed document	Evaluación del silenciamiento génico mediado por RNAi en Pyrenophora tritici-repentis in vitro e in planta.docx (D96189110)
Submitted	2/22/2021 12:57:00 AM
Submitted by	
Submitter email	fjflores2@espe.edu.ec
Similarity	0%
Analysis address	fjflores2.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report



Firmado electrónicamente por:

**FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR**



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, "**Evaluación del silenciamiento génico mediado por RNAi en *Pyrenophora tritici-repentis* in vitro e in planta**" fue realizado por la señorita **Tapia Parra Jennifer Carolina** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 8 de marzo del 2021

Firma:



Francisco Javier Flores Flor, Ph.D.

C.C. 1713443479



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Responsabilidad de autoría

Yo, **Tapia Parra, Jennifer Carolina** con C.C. 1724833429, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "*Evaluación del silenciamiento génico mediado por RNAi en Pyrenophora tritici-repentis in vitro e in planta*" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 8 de marzo del 2021

Firma:

Jennifer Carolina Tapia Parra

C.C. 1724833429



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Autorización de publicación

Yo, **Tapia Parra Jennifer Carolina** con C.C. 1724833429, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "Evaluación del silenciamiento génico mediado por RNAi en *Pyrenophora tritici-repentis in vitro* e *in planta*" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad

Sangolquí, 8 de marzo del 2021

Firma:

Jennifer Carolina Tapia Parra

C.C. 1724833429

Dedicatoria

A mis papás, Orlando y Jenny,
quienes me han brindado la confianza
el amor y la motivación para lograr
todo lo que me he propuesto.

A mis abuelitos, Vicente y Gloria, que
son como unos padres para mí, gracias por todo
el cariño que me han dado a lo largo de la vida

A mis hermanos Esteban y Sebastián,
por apoyarme, quererme y soportarme.

A toda la maravillosa gente que conocí a
lo largo de mi carrera en la ESPE.

Jennifer Carolina Tapia Parra

Agradecimientos

Quiero agradecer a muchas personas que han sido parte importante de mi vida y que han aportado, cada una de ellas, con algo especial durante lo largo de mi carrera. Todos ellos merecen estar en esta hoja, sin embargo, debido al gran número de personas y el poco espacio disponible para escribir solo haré una breve mención.

Primero quiero agradecer a mi tutor, Francisco Flores Ph.D., por los valiosos consejos y el apoyo que me ha brindado durante lo largo de mi carrera, al igual que en el desarrollo de este proyecto. Su esfuerzo y dedicación han sido una gran inspiración para todos sus alumnos. Gracias Dr. Francisco, por siempre alentarnos a ser mejores.

De igual manera a Alma Koch M.Sc., por su ayuda y colaboración desde el inicio del proyecto y por las enseñanzas que me ha dejado, tanto en el ámbito académico como personal.

Quiero hacer un agradecimiento especial al Departamento de Entomología y Fitopatología de la Universidad Estatal de Oklahoma, en especial al Dr. Stephen Marek, por darme la oportunidad de participar en su investigación. Su experiencia y guía fueron indispensables para el desarrollo de este proyecto. También quiero agradecer a Salomé Suarez M.Sc., quien además de trabajar conmigo durante todo el proyecto, me brindo su amistad, apoyo y valiosas enseñanzas.

Me gustaría expresar mi gratitud a Dr. Carla Garzón quien me apoyo desde mi llegada a Oklahoma y al Dr. Bob Hunger, quien ha sido un pilar fundamental en el desarrollo de este proyecto, no solo por su gran experiencia en el área, sino también por las grandes lecciones que me ha brindado al igual que su apoyo incondicional. "You're one of the most incredible professors that I've ever known, thank you for believe in me"

Llegar hasta este punto requirió más que apoyo académico y por eso quiero expresar mi gratitud a todos mis amigos de la ESPE quienes me brindaron su apoyo y

amistad durante lo largo de la carrera. Gracias Tefa, Paúl, Gabo, Josué, Dani, Cris, Cami, Gaby, Juan Carlos, Michelle, Karla y Nicolás. De igual manera quiero agradecer a los nuevos amigos que hice en la Universidad Estatal de Oklahoma. Gracias Patty y Felipe por haberme hecho sentir como en casa, brindarme su conocimiento, apoyo y cariño, y por compartirme su manera de ver el mundo.

Y ahora quiero dedicar el resto de la hoja para agradecer a la persona más importante de mi vida, mi papá. Como alguna vez te dije, un simple gracias no va a ser suficiente, pero de todas maneras trataré de expresar en pocas palabras toda la admiración, amor y gratitud que te tengo. Gracias por nunca dejar que me rinda, por siempre brindarme las palabras de aliento necesarias para continuar y por recordarme siempre lo orgulloso que estás de mí y lo fuerte que soy gracias a ti. Tú eres mi inspiración para ser mejor cada día.

Y, por último, pero no menos importante quiero agradecer a mi mamá porque gracias a ella me he convertido en la persona que soy. Gracias por inculcarme valores que me han llevado lejos y gracias por ser ese lugar seguro al que siempre puedo volver. Recuerda que todo triunfo que yo tenga también es tuyo porque gracias a ti hoy he podido cumplir mis metas.

Jennifer Carolina Tapia Parra

Índice de contenido

Carátula.....	1
Reporte urkund	2
Certificación.....	3
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de tablas	13
Índice de figuras.....	14
Listado de abreviaturas.....	15
Resumen	16
Abstract.....	17
Capítulo I Introducción	18
Formulación del problema.....	18
Justificación del problema.....	19
Objetivos de la investigación	19
 Objetivo General	19
 Objetivos específicos	19
Capítulo II Marco teórico.....	21
Origen e importancia del trigo.....	21
 Tipos de trigo.....	22
Tan spot.....	23

	10
Sintomatología	24
Agente causal	25
Razas del patógeno	26
Toxinas selectivas	27
Ciclo de la enfermedad	30
Control de la enfermedad	31
Silenciamiento génico mediado por RNAi	32
Capítulo III Materiales y métodos	34
Participantes	34
Zona de estudio	34
Duración de la investigación	34
Metodología	34
Material vegetal	34
Material fúngico	35
Inoculación de plantas de trigo con suspensión de esporas	35
Extracción de RNA	36
Síntesis de cDNA	36
Síntesis de dsRNA y siRNA	37
Evaluación de la captación de dsRNA	40
RNAi para silenciar GFP <i>in vitro</i> e <i>in planta</i>	41
RNAi para silenciar la resistencia a higromicina <i>in vitro</i>	42
RNAi para silenciar ToxA <i>in planta</i>	43

	11
RNAi para silenciar Pds <i>in planta</i>	43
Microscopía de fluorescencia	43
PCR en tiempo real	44
Análisis en ImageJ	44
Diseño experimental	45
Capítulo IV Resultados	46
Proceso de colonización e infección de Ptr en trigo	46
Evaluación de la captación de dsRNA	49
Evaluación del silenciamiento de GFP <i>in vitro</i>	50
Evaluación del silenciamiento de GFP <i>in planta</i>	52
Evaluación del silenciamiento de ToxA <i>in planta</i>	57
Evaluación del silenciamiento de la resistencia a Higromicina <i>in vitro</i>	61
Evaluación del silenciamiento de Pds <i>in planta</i>	66
Capítulo V Discusión	68
Proceso de colonización e infección de Ptr en trigo	68
Evaluación de la captación de dsRNA	68
RNAi para silenciar GFP <i>in vitro</i> e <i>in planta</i>	69
RNAi para silenciar la resistencia a higromicina <i>in vitro</i>	70
RNAi para silenciar ToxA <i>in planta</i>	70
RNAi para silenciar Pds <i>in planta</i>	71
Capítulo VI Conclusiones	73
Capítulo VII Recomendaciones	74

Capítulo VIII Bibliografía	75
Capítulo IX Anexos	80

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación científica de <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	25
Tabla 2. Condiciones de PCR	38
Tabla 3. Análisis de varianza para la intensidad de fluorescencia <i>in vitro</i>	52
Tabla 4. Análisis de varianza para la intensidad de fluorescencia en Glenlea con siRNA.....	55
Tabla 5. Análisis de varianza para la intensidad de fluorescencia en Glenlea con dsRNA.....	55
Tabla 6. Análisis de varianza para la intensidad de fluorescencia en Red Chief con siRNA	56
Tabla 7. Análisis de varianza para la intensidad de fluorescencia en Red Chief con siRNA	56
Tabla 8. Análisis de varianza entre el área de infección de tres tratamientos en Glenlea.....	60
Tabla 9. Análisis de varianza entre el área de infección de tres tratamientos en Red Chief	61

Índice de figuras

Figura 1 Teoría de Gen por gen	28
Figura 2 Ciclo de la enfermedad	31
Figura 3 Proceso de colonización e infección con un aislado ptr ToxA+	47
Figura 4 Proceso de colonización e infección con un aislado ptr toxa-	48
Figura 5 Gel de electroforesis al 1.5% de agarosa de dsRNA	49
Figura 6 Evaluación de la captación de dsRNA <i>in vitro</i>	50
Figura 7 Evaluación del silenciamiento de GFP <i>in vitro</i>	51
Figura 8 Evaluación del silenciamiento de GFP <i>in planta</i>	53
Figura 9 Gráfico de barras de la intensidad de la fluorescencia en Glenlea	54
Figura 10 Gráfico de barras de la intensidad de la fluorescencia en Red Chief	54
Figura 11 Curva estándar	58
Figura 12 Evaluación del silenciamiento de ToxA <i>in planta</i>	58
Figura 13 Desarrollo de síntomas inducidos por sGFP-K1-2NC-4 en Glenlea y Red Chief en respuesta al tratamiento con siRNA-ToxA	59
Figura 14 Gráfico de barras del área de infección	60
Figura 15 Evaluación del silenciamiento de Hph <i>in vitro</i> con dsRNA-Hph	62
Figura 16 Evaluación del silenciamiento de Hph <i>in vitro</i> control negativo con dsRNA	63
Figura 17 Evaluación del silenciamiento de Hph <i>in vitro</i> con siRNA-Hph	64
Figura 18 Evaluación del silenciamiento de Hph <i>in vitro</i> control negativo con siRNA	65
Figura 19 Evaluación del silenciamiento de Pds <i>in planta</i> con Silwet L-77	66
Figura 20 Evaluación del silenciamiento de Pds <i>in planta</i> con Hi-Yield Spreader Sticker...	67

Listado de abreviaturas

DNA Ácido desoxirribonucleico

RNA Ácido ribonucleico

PCR Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de polimerasa)

qPCR Real-time polymerase chain reaction (PCR en tiempo real)

Ptr *Pyrenophora tritici-repentis*

dsRNA RNA bicatenario

RNAi ARN de interferencia

Tdtom Proteína roja fluorescente Tdtomato

GFP Proteína verde fluorescente

HST Toxinas selectivas del huésped

μL microlitros

mL Mililitros

ng Nanogramos

Resumen

Tan spot es una importante enfermedad del trigo, capaz de causar una significativa pérdida de rendimiento en varias áreas de cultivo de trigo alrededor del mundo. La enfermedad es causada por el hongo necrotrófico *Pyrenophora tritici-repentis* (Ptr), el cual produce toxinas selectivas del huésped (HST), conocidas como ToxA, ToxB y ToxC. Estos HST son efectores de patogenicidad que interactúan con un gen de susceptibilidad en el huésped de una manera inversa a la teoría del gen por gen para inducir la enfermedad. ToxA es el principal efector de patogenicidad, causa necrosis en genotipos susceptibles y está presente en la mayoría de los aislados en Oklahoma. Debido a la importancia de ToxA en el desarrollo de la enfermedad, examinamos el proceso de infección y colonización de Ptr en diferenciales de trigo susceptibles y resistentes mediante la inoculación de dos aislados de Ptr; un aislado que posee (+) y un aislado que carece (-) del gen *ToxA*. Estos aislados se transformaron previamente para producir proteína verde fluorescente (GFP) y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se examinó el RNA de interferencia (RNAi) para silenciar el gen *ToxA* utilizando RNA bicatenario específico (dsRNA). La co-incubación *in vitro* del micelio con un control de dsRNA marcado con Cy3 sugiere que Ptr puede absorber dsRNA exógenos, sin embargo, en los ensayos *in planta* los dsRNA tienen que atravesar la cutícula, la pared celular y la membrana plasmática para poder acceder a la maquinaria de RNAi. No se logró silenciar ToxA porque probablemente los dsRNA no fueron capaces de atravesar estas barreras o una vez dentro de la planta fueron degradados por nucleasas. Se requieren más estudios para determinar la eficacia de RNAi en el patosistema de Tan spot.

Palabras clave:

- **TAN SPOT**
- **RNAi**
- **ToxA**
- **TRIGO**

Abstract

Tan spot is an economically important disease of wheat that causes significantly yield loss in several wheat-growing areas worldwide. The disease is caused by the necrotrophic fungus *Pyrenophora tritici-repentis* (*Ptr*), which produces host-selective toxins (HST), known as ToxA, ToxB, and ToxC. These HSTs are pathogenicity effectors that interact with the corresponding host susceptible gene in an inverse gene-for-gene manner to induce disease. ToxA is a major pathogenicity effector responsible of necrosis and is present in the majority of isolates in Oklahoma. Due to the importance of ToxA in disease development, we examined the infection and colonization process of *Ptr* on susceptible and resistant wheat differentials by inoculating two *Ptr* isolates; one isolate having (+) and one isolate lacking (-) the *ToxA* gene. These isolates were previously transformed to produce Green fluorescent protein (GFP) and was analyzed through fluorescent microscopy. Additionally, the capacity of interference RNA (RNAi) to silence the *ToxA* gene was examined using specific double-stranded RNA (dsRNAs). Co-incubation of the mycelium with Cy3-labeled long dsRNA control *in vitro* suggests that *Ptr* is able to uptake exogenous dsRNA, however *in planta* the dsRNAs have to cross the cuticle, cell wall and plasma membrane to access the RNAi machinery of the plant. ToxA silencing was not achieved probably due to a fast degradation of dsRNA by nucleases or the dsRNA were not able to travel through these barriers and penetrate inside the tissue to produce a successful silencing. Further studies are required to determine the efficiency of RNAi in the tan spot pathosystem.

Key words:

- TAN SPOT
- RNAi
- ToxA
- WHEAT

Capítulo I Introducción

Formulación del problema

Tan spot es una enfermedad foliar de importancia global que afecta a las áreas productoras de trigo alrededor del mundo y causa severas pérdidas de rendimiento estimadas hasta en un 50% de la producción, principalmente en áreas donde son plantadas variedades susceptibles. Ha sido reportada como una de las enfermedades de mayor prevalencia del trigo en Canadá y se han registrado pérdidas de entre 2 – 15 % con un máximo registrado de hasta el 50% en Estados Unidos. Su incidencia en América del sur se ha incrementado, especialmente en Argentina, Brasil, Chile y Uruguay. La técnica más usada para su control es el cultivo de variedades resistentes, sin embargo, en la actualidad la mayoría de cultivares de trigo comerciales aún siguen siendo susceptibles a esta enfermedad.

Pyrenophora tritici-repentis (Ptr) es el agente causal de tan spot. Se caracteriza por la producción de toxinas selectivas del huésped (HST) capaces de alterar el mecanismo de defensa del huésped y producir la enfermedad. Una de las principales HST es ToxA, la cual provoca lesiones necróticas en genotipos sensibles. El desarrollo de estas lesiones provoca una disminución de la capacidad fotosintética que induce estrés en la planta y por último una disminución en el rendimiento. Las pérdidas de rendimiento causadas por tan spot se caracterizan por la reducción de peso y calidad del grano y el número de granos por espiga, lo cual provoca severas pérdidas económicas para los productores de trigo.

Justificación del problema

La patogenicidad de Ptr se debe principalmente a la presencia de HST cuya producción es esencial para que haya una interacción compatible entre el patógeno y su huésped. Si el cultivar no es sensible a la toxina o el patógeno es incapaz de producirla, tan spot no se va a desarrollar. Esta interacción puede ser evitada mediante el silenciamiento del gen productor de la toxina mediante RNA de interferencia (RNAi), usando RNA de doble cadena (dsRNA) específico para ToxA, lo cual va a disminuir la incidencia de la enfermedad en áreas productoras de trigo donde esta toxina es predominante como Estados Unidos.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Evaluar el silenciamiento génico mediado por RNAi en *Pyrenophora tritici-repentis* *in vitro* e *in planta*

Objetivos específicos

- Analizar cambios fenotípicos en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) en respuesta al uso de siRNA-ToxA y siRNA-GFP mediante microscopía de fluorescencia.
- Cuantificar el nivel de expresión del gen ToxA en *Pyrenophora tritici-repentis* después de la aplicación de siRNA-ToxA mediante PCR en tiempo real.
- Cuantificar los cambios de fluorescencia del hongo previamente tratado con GFP-siRNA y GFP- dsRNA a los tres, cinco y siete días post inoculación mediante el software ImageJ.

- Medir variaciones en el crecimiento *in vitro* de un aislado de *Pyrenophora tritici-repentis* resistente a Higromicina, después de la aplicación de Hph-dsRNA mediante el software ImageJ.

Capítulo II Marco teórico

Origen e importancia del trigo

El trigo es una hierba silvestre que pertenece a la familia *Gramineae*, nativa de Asia occidental. Su cultivo se remonta hace aproximadamente 10.000 años atrás como parte de la revolución neolítica, una etapa de transición de una sociedad nómada dedicada a la caza y recolección a una sociedad sedentaria basada en la agricultura y ganadería. Esta transición generó un enorme salto en el desarrollo de la humanidad y fue el inicio de las civilizaciones actuales (Shewry, 2009).

La domesticación de los cereales fue esencial para el desarrollo de la agricultura. Los primeros tipos de trigo silvestre en ser domesticados fueron: una especie diploide, Einkorn (*Triticum monococcum*) y una especie tetraploide, Emmer (*Triticum dicoccum*), resultado de una hibridación natural. Con el pasar de los años, Emmer sufrió una mutación que dio como resultado una planta híbrida con semillas más grandes pero adheridas a la espiga después de su maduración, esto evitó la dispersión de semillas en poblaciones naturales sin embargo, facilitó su recolección y consumo por parte del ser humano (Encyclopedia of Food and Culture , 2020).

La hibridación, migración y selección natural tuvieron un papel importante en la evolución del trigo a través de un mecanismo de diversificación generando el genotipo actual. Un claro ejemplo de este mecanismo es el trigo harineo (*Triticum aestivum*), el resultado de una hibridación entre Emmer con la hierba silvestre (*Triticum tauschii*). El cual comprende el 95% de todo el trigo cultivado hoy en día (Carver, 2009). Entre los principales factores que hacen de este cultivo tan ampliamente utilizado destaca su gran adaptabilidad medioambiental gracias

a su naturaleza alopoliploide, que le ha conferido al trigo la denominada “plasticidad genómica”. Además es una fuente importante de carbohidratos, proteínas y vitaminas necesarias en la dieta de la población mundial (Venske, Santos, Busanello, Gustafson, & Oliveira, 2019).

El trigo es el cereal más producido a nivel mundial, cerca de 751.5 millones de toneladas son cosechadas al año en más de 40 países. Esto representa la tercera parte de la cosecha total de cereales y cerca de la cuarta parte de la producción agrícola a escala global (Nevo, 2002).

Estados Unidos es el cuarto productor de trigo a nivel mundial. La producción de trigo en el 2019 llegó a 52.258 millones de toneladas, generando 8.8 billones de dólares, lo cual superó en un 3% a la producción del año anterior. La mayoría de los estados se dedican a la producción agrícola de trigo; sin embargo, las estadísticas del 2019 muestran que Dakota del Norte, Kansas, Montana y Oklahoma fueron los principales productores de trigo en Estados Unidos durante ese año (USDA, 2019).

En Oklahoma el trigo representa uno de los principales ingresos económicos, durante el 2019 su producción alcanzó 110 millones de bushels o aproximadamente 4 millones de toneladas, produciendo un ingreso de 473 millones de dólares (USDA, 2019).

Tipos de trigo

El trigo se puede clasificar en dos grandes grupos según su calidad, *Triticum aestivum* L. ($2n=42$, genomas AABBDD) comúnmente llamado trigo harinero o trigo blando y *T. turgidum* L. ssp. *durum* ($2n=28$, genoma AABB). El trigo duro se caracteriza por su alta cantidad de gluten y consecuentemente alto contenido proteico, es usado para la producción de pan y pasta. Mientras que el

trigo blando tiene un nivel proteico más bajo y se utiliza para la producción de tortas y galletas (Pauly, Pareyt, Fierens, & Delcour, 2013).

Al trigo también se lo puede clasificar por el color del kernel en rojo o blanco y de acuerdo a la época del año donde es sembrado, en trigo de invierno y trigo de primavera. Por lo tanto, el trigo puede tener estas variaciones, rojo duro de invierno, rojo duro de primavera o trigo blando de invierno (Bushuk & Rasper, 1996).

El trigo rojo duro de invierno es el tipo de trigo más comúnmente cultivado en Estados Unidos, principalmente en las Grandes Llanuras, una amplia extensión de praderas que se encuentra al este de las montañas rocosas de Estados Unidos y Canadá. Esta área abarca 10 estados, entre ellos a principales estados productores de trigo Oklahoma, Kansas, Dakota del Norte y Montana (Wunder, 2009).

Tan spot

Es una enfermedad foliar causada por el hongo *Pyrenophora tritici-repentis* (*Ptr*). Afecta a los cultivos de trigo a nivel mundial, disminuyendo el rendimiento del cultivo y la calidad del grano. Causa pérdidas de hasta el 50% de la producción, particularmente en cultivos susceptibles.

La incidencia de esta enfermedad se ha incrementado dramáticamente con la reducción de la labranza y el incremento de monocultivos de trigo (Noriel, Sun, Bockus, & Bai, 2011).

En los últimos años, la reducción de la labranza ha sido considerada efectiva para evitar la erosión del suelo, sin embargo, esto ha provocado un incremento potencial de patógenos necrotróficos como *Ptr*. El patógeno puede

hibernar y sobrevivir saprofiticamente en los residuos de las cosechas del año anterior durante el invierno como un inóculo primario que infecta a la nueva cosecha de trigo. Esto ha resultado en el desarrollo de tan spot como una epidemia de proporciones mundiales (Singh, et al., 2009).

En Estados Unidos tan spot se ubica constantemente entre los tres patógenos fúngicos más prevalentes que reducen el rendimiento del trigo. Se estiman pérdidas de entre 2 – 15 % con un máximo registrado de hasta el 50% (Ciuffetti, et al., 2014). Esta enfermedad produce pérdidas significativas en Oklahoma, se han obtenido reducciones de hasta el 28% del rendimiento en Stillwater cuando no hay aplicación de fungicidas (Williams & Littlefield, 2004).

Sintomatología

Tan spot produce dos síntomas principales: necrosis y clorosis, los cuales están asociados con la producción de diferentes efectores necrotróficos, conocidos como toxinas selectivas para el huésped (HSTs). El desarrollo de cada síntoma es el resultado de interacciones específicas entre los aislados individuales del hongo y los genotipos del trigo.

Inicialmente pequeñas manchas marrones aparecen en las hojas inferiores que se van convirtiendo en lesiones irregulares en forma de lente con una mancha marrón oscura en el centro y una zona de color amarillo brillante que rodea la lesión. El tipo de lesión y los síntomas pueden variar de una mancha marrón con o sin halos amarillos a una mancha amarilla sin la presencia del centro marrón. Cuando las manchas son numerosas, las hojas se tornan de color amarillo lo cual da al campo un tono amarillo general (Singh, et al., 2009).

A medida que la enfermedad se desarrolla bajo condiciones ambientales favorables, las lesiones se fusionan y producen grandes áreas de tejido muerto, las hojas más afectadas eventualmente se marchitan y mueren prematuramente. En condiciones controladas, los cultivares susceptibles a las razas virulentas de *Ptr* manifiestan el desarrollo de necrosis y/o extensiva clorosis, mientras que la resistencia se expresa como pequeñas lesiones de color marrón oscuro que no aumentan de tamaño.

Las lesiones necróticas están bien definidas por la presencia de manchas marrones las cuales se expanden en lesiones ovales rodeadas de halos amarillos, mientras que la clorosis exhibe una gradual decoloración amarilla. El desarrollo de la lesión resulta en una disminución de la capacidad de fotosíntesis que se traduce en estrés de la planta y, en última instancia, pérdida de rendimiento (Lamari, Strelkov, Yahyaoui, Orabi, & Smith, 2003).

Agente causal

Pyrenophora tritici-repentis (Tabla 1) es un hongo necrotrófico y el agente causal de tan spot en las plantas de trigo (Strelkov & Lamari, 2003).

Tabla 1

Clasificación científica de Pyrenophora tritici-repentis

<i>División:</i>	<i>Ascomycota</i>
<i>Clase:</i>	<i>Dothideomycetes</i>
<i>Subclase:</i>	<i>Pleosporomycetidae</i>
<i>Orden:</i>	<i>Pleosporales</i>
<i>Familia:</i>	<i>Pleosporaceae</i>
<i>Género:</i>	<i>Pyrenophora</i>

Ptr es la forma sexual del hongo, presenta cuerpos fructíferos denominados pseudotecios, miden entre 300 a 1200 μm y son de color castaño, con forma de volcán, en su interior se diferencian los ascos de forma alargada dentro de los cuales se forman las ascosporas, esporas sexuales de forma oval y un tamaño de 33-112 μm . La fase asexual del hongo corresponde a *Drechslera triticirepentis* y es la forma principal en que la infección se esparce a tejidos sanos de la misma planta o a plantas cercanas. Las esporas asexuales se denominan conidios, son cilíndricas y miden entre 70-200 μm (Annone, Botta, & Ivancovich, 1994).

Razas del patógeno

Actualmente se han descrito ocho razas de *Ptr*, las cuales se diferencian entre ellas por el tipo de toxinas que producen *Ptr ToxA*, *Ptr ToxB* y *Ptr C* (Lamari, Strelkov, Yahyaoui, Orabi, & Smith, 2003).

La raza 1 produce *ToxA* y *ToxC*, y es la predominante en las grandes llanuras de Estados Unidos y Canadá. La raza 2 también se caracteriza por la producción de *ToxA*. La raza 3 produce únicamente *ToxC* y ha sido identificada en América del Norte y el Cáucaso, una región ubicada entre Europa del Este y Asia occidental. La raza 4 es considerada avirulenta y no produce ninguna toxina, ha sido reportada en el Norte de América y el Norte de África. Generalmente la raza 4 se encuentra en baja frecuencia en el trigo; sin embargo, comúnmente está presente en hierbas que no pertenecen a los cereales. La raza 5 produce *ToxB* y fue reportada en Estados Unidos, Canadá y Siria. La raza 6 produce *ToxB* y *ToxC* y solo ha sido identificada en Algeria (Ciuffetti, et al., 2014). La raza 7 al igual que

la 8 producen las tres toxinas, ToxA, ToxB y ToxC y han sido reportadas en el medio oriente (Lamari, Strelkov, Yahyaoui, Orabi, & Smith, 2003).

En Estados Unidos se ha documentado la presencia de las razas 1, 2 y 4, con una incidencia de 3% para la raza 2 y 5% para la 4, mientras que la 1 se caracteriza por ser la más prevalente en el área. Esto se debe principalmente a la producción de múltiples HSTs como ToxA y ToxC, las cuales actúan como factores de patogenicidad, que incrementan la virulencia de esta raza (Ali & Francl, 2003).

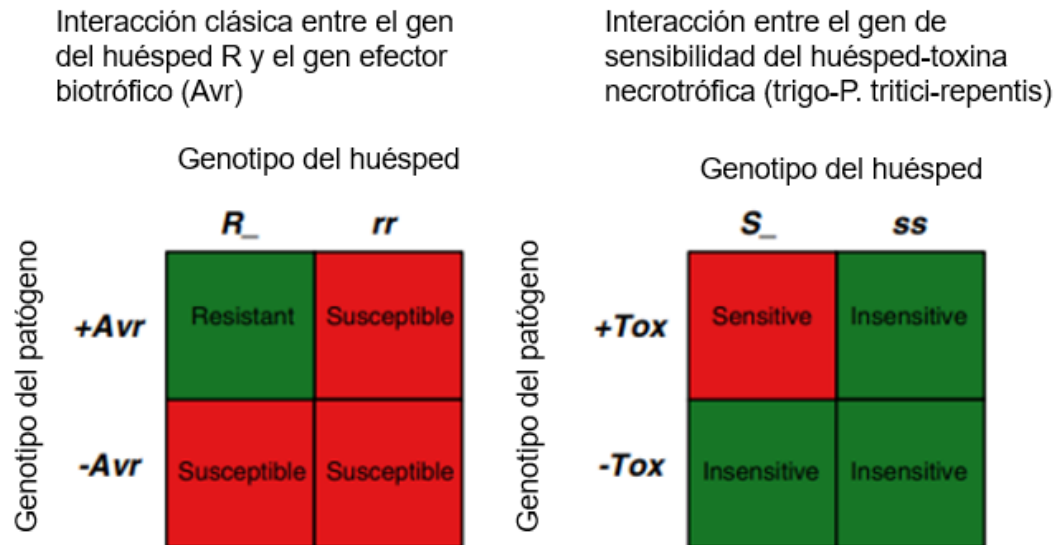
Además, se ha demostrado que cuando se dan las dos interacciones, Ptr ToxA-Tsn1 y Ptr ToxC-Tsc1 en un cultivar se incrementa el desarrollo de la enfermedad (Kariyawasam, et al., 2018).

Toxinas selectivas

El hongo produce toxinas selectivas (HSTs) conocidas como Ptr ToxA, Ptr ToxB y Ptr ToxC que interactúan directa o indirectamente con los genes del huésped dominante Tsn1, Tsc2 y Tsc1 respectivamente. El patógeno utiliza la interacción huésped-HSTs para alterar el mecanismo de defensa del huésped y causar la enfermedad.

Figura 1

Teoría de Gen por gen



Nota. Comparación de la interacción gen por gen entre un hospedador y un patógeno biotrofo (izquierda), y las interacciones inversas de Gen por gen que involucran genes específicos de sensibilidad del huésped y las correspondientes toxinas selectivas del patógeno (derecha) (Faris, Liu, & Xu, 2013)

La interacción del huésped con patógenos biotrofos es explicada mediante la teoría de gen por gen donde el reconocimiento de un patógeno con un gen de avirulencia (+Avr) por un huésped que posee un gen de resistencia (R) resulta en una interacción incompatible, y por ende se produce como respuesta la resistencia a la enfermedad sin embargo, en el caso de los hongos necrotrofos sucede todo lo contrario, el reconocimiento de una HSTs (+Tox) por un gen de susceptibilidad del huésped (S) resulta en una interacción compatible la cual conlleva al desarrollo de la enfermedad, mientras que la falta de reconocimiento de HSTs por el huésped resulta en una interacción incompatible lo cual produce resistencia por parte del huésped. Si el huésped no presenta genes de susceptibilidad o si el patógeno no

produce HSTs, el resultado es una respuesta de resistencia frente a la enfermedad (Faris, Liu, & Xu, 2013).

ToxA actúa como un efector reconocido por el alelo dominante *Tsn1* del huésped y activa una respuesta hipersensible (HR), observada como un mecanismo de defensa contra los hongos biotrofos en cultivares resistentes. *Ptr* al ser un hongo necrotrófico se desarrolla en tejido muerto por lo cual utiliza el mecanismo de defensa de la planta a su favor, provocando la muerte celular (Wang, Jiang, Liu, Liu, & Liang, 2014).

Se ha descubierto que para que ToxA sea capaz de inducir necrosis en los genotipos susceptibles de trigo, primero debe internalizarse en las células mesófilas. Una vez dentro se dirige hacia los cloroplastos en donde interactúa con una proteína localizada en su membrana llamada ToxA binding protein 1 (ToxABP1) e interfiere con su mecanismo de acción, lo cual provoca un cambio en la estructura y función de los tilacoides, alteración de la homeóstasis del fotosistema I y II afectando el transporte de electrones, que causa la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los cloroplastos y necrosis (Manning, Chu, Steeves, Wolpert, & Ciuffetti, 2009).

Ptr ToxB ha sido identificada y aislada de las razas 5, 6, 7 y 8. Codifica una pre-proteína de 87 aminoácidos y produce clorosis en los cultivares de trigo susceptibles (Manning & Ciuffetti, 2015).

Ptr ToxC es controlada por un gen localizado en el brazo del cromosoma 1AS y es producida por las razas 1 y 3 para inducir clorosis en los cultivares sensibles de trigo (Singh, et al., 2009). Esta toxina no ha sido purificada, ni el gen que la codifica ha sido previamente clonado por lo cual la única forma de caracterizar un aislado de *ptr* que produce esta toxina, es probándolo en una línea diferencial de trigo sensible a ToxC, como 6B365 (Abdullah, et al., 2017).

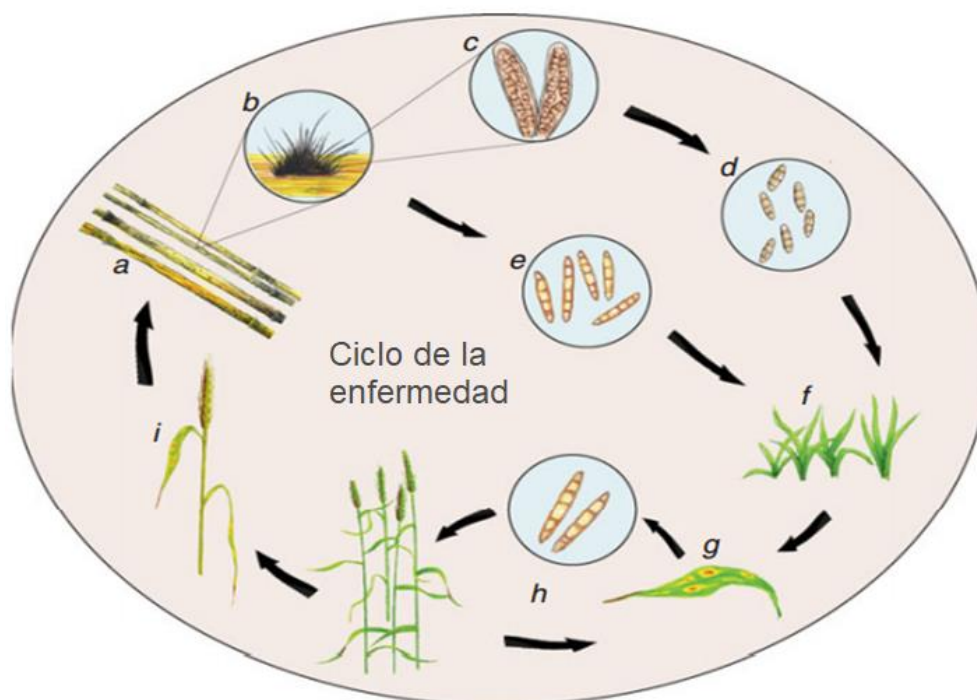
Ciclo de la enfermedad

Ptr es un hongo homotálico que se reproduce tanto sexual como asexualmente. El hongo inverna saprofiticamente durante el invierno en los residuos de la cosecha de trigo, donde se desarrolla una pseudotecia para la producción de ascosporas, que son la fuente del inóculo primario durante la primavera, estas esporas se presentan en la temporada de crecimiento e infectan a las hojas más jóvenes.

La reproducción asexual ocurre en varios ciclos durante la temporada de crecimiento, las lesiones ya maduras en las hojas son la fuente de conidios que sirven como un inóculo secundario. La humedad induce a la producción de conidios y el viento favorece su dispersión, infectando nuevas plantas (Figura 2) (Ciuffetti, et al., 2014).

Figura 2

Ciclo de la enfermedad



Nota. El esquema describe los principales pasos de la infección del trigo por *P. tritici-repentis*. (a) Donde se desarrolla la pseudotecia (b) y la asci (c) que contiene ascosporas maduras. En primavera, se liberan ascosporas maduras (d) que sirven como inóculo primario para infectar plantas jóvenes (f). Los conidios asexuales (e) también pueden estar presentes en las primeras etapas de la inducción de la enfermedad. Las lesiones maduras (g) son la fuente de conidios recién producidos que sirven como inóculo secundario durante la temporada de crecimiento. Los conidios, dispersados por el viento y la lluvia, promueven la infección de nuevas plantas y la reinfección de las plantas ya infectadas (h). Dependiendo de las condiciones ambientales y climáticas, puede ocurrir infección de follaje, tallos y / o espigas (i). (Ciuffetti, et al., 2014)

Control de la enfermedad

Los brotes de tan spot pueden ser controlados mediante diferentes prácticas como rotación de cultivos, tratamientos de labranza para la eliminación de residuos y el uso de fungicidas del grupo de la estrobilurina y triazol como azoxistrobina, piractrostrobina y metaconazol, entre otros (Kariyawasam, et al.,

2018). La aplicación de fungicidas evita la pérdida de producción cuando la enfermedad está en una etapa muy avanzada, sin embargo, su uso prolongado puede generar resistencia por parte de los patógenos que conlleva a un aumento de su aplicación, aumentando los costos de producción. Por lo cual el uso de estos métodos no siempre es rentable. La opción más factible ha sido la producción de cultivares resistentes mediante diferentes técnicas de hibridación, sin embargo, el patógeno genera nuevos genes de virulencia capaces de atacar a estos cultivares resistentes, aumentando la incidencia de la enfermedad y disminuyendo el rendimiento (Wegulo, 2011).

Actualmente los estudios se están enfocando en la comparación de locus de rasgo cuantitativo (QTL) en cultivares resistentes y susceptibles a tan spot para poder redirigir los programas de mejoramiento genético en la eliminación sistemática de los genes que causan sensibilidad a las diferentes razas del patógeno y obtener niveles más altos de resistencia (Kariyawasam, et al., 2018).

La rotación de trigo con cultivos no hospederos de tan spot es una estrategia muy eficaz para el control de la enfermedad. También el plantar trigo en residuos de otras gramíneas como avena o cebada puede ayudar al control de tan spot, sin embargo existe el riesgo de presencia de inóculo de otros patógenos como *Fusarium*. (NDSU Extension Service, 2016)

Silenciamiento génico mediado por RNAi

El RNAi puede inducir el silenciamiento de la expresión génica en una amplia variedad de eucariotas mediante la aplicación de dsRNA exógenos correspondientes a un gen diana.

El silenciamiento mediante RNA es un mecanismo altamente conservado que ocurre en la mayoría de eucariotas. Se basa en la generación de pequeños RNA de 21–30 nucleótidos de longitud que pueden regular la expresión génica, el RNAi es producido a partir del procesamiento de dsRNAs por enzimas de la familia RNAsa tipo III, en especial la enzima conocida como Dicer, posteriormente son incorporados a un complejo denominado RISC, en donde se separa la doble cadena para dar lugar a una cadena simple unida al complejo que sirve como guía para el reconocimiento de RNA mensajero (mRNA) y su posterior silenciamiento. Si los RNAi son transportados hasta el núcleo e inhiben la síntesis de mRNA a partir de la metilación de DNA en la región promotora, toma el nombre de silenciamiento transcripcional, mientras que el reconocimiento y silenciamiento de mRNA en el citoplasma corresponde a silenciamiento postranscripcional (López, Silva, López, & Carlos, 2011). El uso de RNAi para silenciar genes específicos se ha convertido en una herramienta valiosa para la genómica funcional de plantas. Se han desarrollado varias aplicaciones agrícolas de RNAi, incluyendo mejoras en la composición nutricional de los alimentos, al igual que el control de enfermedades causantes de grandes pérdidas de rendimiento y calidad de los cultivos (Eamens, Wang, Smith, & Waterhouse, 2008).

Capítulo III Materiales y métodos

Participantes

En la presente investigación participaron los docentes de la Universidad de las fuerzas armadas “ESPE”, Francisco Flores, PhD. Como tutor, Alma Koch, M.Sc. como cotutora de la tesis, docentes de la Universidad Estatal de Oklahoma, Dr. Stephen Marek como director del proyecto y docente a cargo del laboratorio de “Fungal genomics” y Salomé Suarez, M.Sc. asistente de investigación.

Zona de estudio

El trabajo de investigación se realizó en la Universidad Estatal de Oklahoma, Departamento de Entomología y Fitopatología, Laboratorio de “Fungal genomics”; localizado en Stillwater, Oklahoma, Estados Unidos.

Duración de la investigación

Esta investigación se realizó en un tiempo aproximado de 9 meses. Se inició en el mes de mayo del 2020 y se culminó en el mes de febrero del 2021.

Metodología

Material vegetal

Los cultivares de trigo utilizados en este estudio incluyeron, “Glenlea” un cultivar sensible a ToxA y “Red Chief”, un cultivar resistente. Se sembraron dos semillas de cada cultivar en conos de plástico con un sustrato BM1 (Berger, Canadá, QC), con condiciones de 12 h de luz a 25 ° C y 12 h de oscuridad a 20 ° C en una cámara de crecimiento durante tres semanas o hasta el desarrollo de la

tercera hoja en el tallo principal. Las plantas se regaron periódicamente y se fertilizaron después de siete días de la siembra, con $\sim 4 \text{ g L}^{-1}$ Peters Professional 20-20-20 General Purpose Fertilizer () y $\sim 1 \text{ g L}^{-1}$ VANSIL® W-20 (Vanderbilt Minerals. LLC).

Material fúngico

Para el presente estudio se utilizaron aislados de *Pyrenophora tritici-repentis*, previamente transformados mediante *Agrobacterium* AGL1 que contenía el plásmido pOHTsGFP (proteína verde fluorescente). Todos los aislados presentaban resistencia a higromicina.

El material fúngico se cultivó en medio CV8 (1.63% de jugo V8, 0.163% de carbonato de calcio, 1.9% de agar) y se incubó en la oscuridad durante cinco días, para la producción de esporas, se adicionó 1 ml de agua estéril al plato de cultivo y se frotó el micelio con un asa de siembra. Los platos de cultivo se incubaron bajo luz fluorescente durante 24h para la inducción de conidióforos y luego se colocaron en la oscuridad a 16°C durante 24 h para inducir conidios. Los conidios se suspendieron en 5 ml de agua y se contaron en el microscopio mediante una cámara de Neubauer, la suspensión de esporas se ajustó a 1×10^5 esporas/mL y se le agregó 0.001% Hi-Yield spreader sticker (Voluntary Purchasing Groups, Inc, Bonham, Tx) para mejorar la absorción de las esporas en la hoja.

Inoculación de plantas de trigo con suspensión de esporas

La inoculación se la realizó mediante microgotas, se aplicó en forma localizada 5 μl de la suspensión de esporas en la segunda hoja de cada planta, posteriormente se colocaron las plantas inoculadas en una cámara húmeda con 100% de humedad durante 48 horas para luego llevarlas nuevamente a la cámara de crecimiento con las condiciones previamente mencionadas. Se evaluaron los síntomas a los tres, cinco y siete días mediante microscopía de fluorescencia.

Extracción de RNA

Se colocó aproximadamente 6 cm² del área infectada de cada hoja dentro de un tubo Eppendorf de 1,5 mL, que contenía perlas de vidrio, se colocó los tubos durante aproximadamente 7 s en nitrógeno líquido y se agregó 1 mL de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) por cada 100 mg de tejido vegetal. El tubo Eppendorf se sujetó firmemente a un homogenizador FastPrep®-24 (MP Biomedicals) durante 20 s a 4000 rpm para homogenizar el tejido vegetal, se dejó reposar durante 5 min y posteriormente se agregó 200 µl de cloroformo por cada 1 mL de TRIzol, se centrifugó durante 15 min a 12000 xg a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, se colocó 500 µl de isopropanol y se dejó incubar por 10 min, pasado este tiempo se volvió a centrifugar la muestra con las condiciones anteriores, se resuspendió el pellet en 1 mL de etanol al 75% , se centrifugó por 5 min a 7500 xg a 4°C y finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 30 µl de DEPC-treated water (Ambion), se incubó a 55°C por 12 min. Para medir la integridad del RNA, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 100 V durante 60 min y se midió la calidad y pureza usando un NanoDrop 2000 C (Thermo Fisher Scientific, Hudson, New Hampshire, EE. UU.)

Síntesis de cDNA

A partir de las muestras de RNA previamente analizadas, se sintetizó cDNA mediante retro transcripción con el kit Verso cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Hudson, New Hampshire, EE. UU.) en una reacción de 20 µl que contenía por reacción 4 µl de 5X cDNA synthesis buffer, 2 µl de dNTP Mix, 1 µL de RNA Primer random hexamers, 1 µL RT Enhancer, 1 µL de Verso Enzyme Mix,

8 μ L de Nuclease-Free Water y 2 μ L de RNA. Las condiciones del termociclador fueron 42 ° C por 30 minutos y 95 ° C por 2 min, cada una durante un ciclo.

Síntesis de dsRNA y siRNA

Se agregó el promotor T7 RNA polimerasa al DNA template mediante dos reacciones de PCR. En la primera reacción se utilizó el primer forward con el extremo T7 y el reverse “normal” y en la segunda se usó el primer Forward “normal” y el reverse con el extremo T7. Los primers con el promotor T7 en su extremo 5' fueron diseñados mediante la aplicación web E-RNAi (Anexo 1). La PCR fue realizada en un volumen total de 20 μ l que contenía 1 μ l de cada primer (5 μ M), 10 μ L de 2X Gotaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI), 6 μ L de agua y 2 μ L de DNA de un aislado transformado (sGFP-K1-2NC-4) o 2 μ L de cDNA del mismo aislado en el caso de ToxA y 2 μ L de DNA de una planta sana para Pds (fitoeno desaturasa). Las condiciones del termociclador fueron las mismas para Tdtom (proteína roja fluorescente TDtomato), GFP (Proteína verde fluorescente), ToxA, Hph (Resistencia a Higromicina) y Pds a excepción de la temperatura de annealing que variaron entre cada gen, como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2.*Condiciones de PCR*

Ciclo	Temperatura	Tiempo	# Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	1 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	30 s	
Annealing	GFP	58 °C	45 S
	Tdtom	58 °C	
	Hph	55 °C	
	ToxA	58 °C	
	Pds	58 °C	
		30 s	35 ciclos
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	10 min	1 ciclo

Los dos productos de PCR fueron visualizados mediante un gel de electroforesis al 1.5% teñido con bromuro de etidio con un voltaje de 100V por 60 minutos en TAE buffer. Las bandas fueron observadas en GelDoc-It Imaging System y analizados usando VisionWork, para verificar que se estaba generando un único producto de PCR del tamaño esperado.

Se purificaron ambos productos de PCR antes de la transcripción mediante Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI), para la purificación se utilizó el volumen restante de la reacción de PCR y se adicionó igual volumen de Membrane Binding Solution, se agitó y se transfirió la mezcla al tubo con la columna de purificación y se dejó incubar por un minuto a temperatura ambiente, se centrifugó a 16.000 xg por 1 min y se realizó un lavado con 700 µL

Membrane Wash Solution, se centrifugó con las condiciones anteriores, se volvió a repetir el lavado pero esta vez con un volumen de 500 μ L. Se centrifugó nuevamente en una centrifuga con la tapa abierta para permitir la evaporación de los restos de etanol. Finalmente se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se agregó 50 μ L de Nuclease-Free Water, se dejó incubar por 1 min y se centrifugó a 16.000 xg por 5 min.

Una vez purificados los dos productos de PCR, fueron usados como template para la síntesis de dsRNA con el kit T7 RiboMAX™ Express RNAi System (Promega Madison, WI) siguiendo el protocolo de manufactura. Se preparó un Master Mix para dos reacciones con 20 μ L de Ribomax Express T7 2X buffer, 4 μ L de Enzyme Mix T7 Express, 14 μ L de Nuclease-Free Water y 8 μ L de cada producto de PCR purificado, se incubó a 37°C por 30 min y se mezclaron las dos reacciones complementarias, se incubó a 70°C por 10 min. Posteriormente se agregó 1 μ L de la solución de RNase 1:200 y 1 μ L de RQ1 RNase-Free DNase por cada 20 μ L de reacción, se incubó por 30 min a 37°C para remover cualquier residuo de RNA monocatenario y el DNA template y dejando solamente los dsRNA, se adicionó 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y un volumen de isopropanol, se mezcló y se dejó en hielo por 5 min, se centrifugó por 10 min y se lavó el pellet con 500 μ L de etanol frío al 70% y luego se lo eliminó y se dejó secar el pellet por 5 min y finalmente se resuspendió la muestra en 100 μ L de Nuclease-Free Water. Para medir la concentración de los dsRNA se usó un NanoDrop 2000 C (Thermo Fisher Scientific, Hudson, New Hampshire, EE. UU).

Para la síntesis de siRNA se utilizó el kit ShortCut RNaseIII, (NEB, Ipswich, MA, EE. UU.) Siguiendo el protocolo de manufactura. Se realizó una reacción de 100 μ L que contenía 67 μ L de Nuclease-Free Water, 10 μ L de 10XShortCut Reaction Buffer, 10 μ L de ShortCut RNase III, 10 μ L de 10XMnCl₂ y 3 μ L de los

dsRNA previamente sintetizados, se mezcló y se incubó por 20 min a 37°C, finalmente se agregó 10 µL de EDTA para inactivar la reacción. Como paso opcional se purificó los siRNA mediante precipitación de etanol, agregando un volumen de 1:10 de acetato de sodio 3M, 2 µL de Glycogen y tres volúmenes de etanol frío al 95%, se dejó a -20 ° C durante 2h y se procedió a centrifugar por 15 min a 14.000 rpm, se lavó el pellet con 200 µL de etanol al 80% y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó durante 5 min y se dejó secar el pellet para posteriormente resuspenderlo en 1/3 del volumen original de Nuclease-Free Water.

Los dsRNA fueron visualizados mediante un gel de electroforesis al 1.5% teñido con bromuro de etidio con un voltaje de 100V por 60 min en TAE buffer,

Evaluación de la captación de dsRNA

Se evaluó la capacidad para captar dsRNA exógenos en *Zyoseptoria tritici*, *Botrytis cinerea* y *Pyrenophora tritici-repentis* como se detalla a continuación. Para la recolección del material fúngico, se adicionan 2 ml de medio líquido SNA (1.0 g de KH₂PO₄, 1.0 g de KNO₃, 0.5 g de MgSO₄·7H₂O, 0.5 g de KCl, 0.2 g de glucosa, 0.2g de sacarosa) en el plato de cultivo, con ayuda de una lámina de vidrio se frotó el micelio y se lo recolectó en un nuevo tubo, se incubó junto con 2 µL de Cy3 Transfection Control DsiRNA (IDT, Newark, NJ) en placas con medio SNA sólido a 21°C, protegido de la luz. La absorción de los dsRNA por los hongos se evaluó a las 12h, 24h y 48h usando un microscopio de epifluorescencia.

RNAi para silenciar GFP *in vitro* e *in planta*

In vitro

El hongo sGFP-K1-2NC-4 creció en CV8 por 5 días, y se aplicó 5 μ L de dsRNA específicos para GFP en un área determinada del micelio y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante toda la noche. Como método de control se aplicaron dsRNA para TdTom y un control que no contenía ningún dsRNA. Se realizó tres repeticiones de este ensayo. Los resultados fueron evaluados a las 24h, 48h y 72h mediante microscopía de fluorescencia.

In planta

Para el ensayo en planta, se cultivó un aislado transformado (sGFP-K1-2NC-4) en CV8 durante cinco días. Los conidios se suspendieron en 5 ml de agua y se contaron en el microscopio mediante una cámara de Neubauer, la suspensión de esporas se ajustó a 1.5×10^5 esporas/mL y se le agregó 0.01% Hi-Yield spreader sticker. Se aplicó 10 μ L de esta mezcla en la superficie de la segunda hoja, las plantas se incubaron en una cámara húmeda durante toda la noche para inducir la germinación de esporas. Al día siguiente, 5 μ L de dsRNA específicos para GFP con una concentración de 2500 ng/ μ L se aplicaron en la misma área que la suspensión de esporas, de igual manera se aplicaron dos controles negativos para poder comparar la intensidad de la fluorescencia, el primer control consistió en dsRNA específicos para Tdtom y para el segundo control solo se aplicó agua con 0.01% Hi-Yield spreader sticker. Las plantas fueron colocadas en una incubadora con condiciones de 12h de luz a 25°C y 12 h de oscuridad a 20°C.

Los resultados fueron evaluados a los tres, cinco y siete días mediante microscopía de fluorescencia.

En el segundo ensayo *in planta* para silenciar GFP se utilizó siRNA como un pretratamiento. Se colocó 5 μ L de siRNA con una concentración de 20 ng/ μ L con 0.01% de Silwet L77 en la segunda hoja de cada planta. Se aplicaron dos controles negativos para poder comparar la intensidad de la fluorescencia, el primer control consistió en siRNA específicos para Tdtom y para el segundo control solo se aplicó agua con 0.01% de Silwet L77. La suspensión de esporas fue producida como se mencionó previamente usando un aislado transformado de GFP y fue aplicado 24h después de la aplicación de siRNA. Las plantas se colocaron en la cámara húmeda por 48h. Los resultados fueron evaluados a los tres, cinco y siete días mediante microscopía de fluorescencia

RNAi para silenciar la resistencia a higromicina *in vitro*

Se cultivó un aislado resistente a Higromicina (sGFP-K1-2NC-4) en CV8 por cinco días, de este plato se tomaron tres plugs de agar de aproximadamente 1 cm cada uno y se los colocó dentro en un tubo con tres perlas de vidrio, se agregó 1 mL de agua. El tubo se sujetó firmemente a un homogenizador FastPrep®-24 durante 20 s a 4000 rpm para homogenizar el tejido. A partir de esta mezcla se realizaron diluciones seriadas de 1:10, se tomaron 600 μ L de cada dilución y se colocaron en un medio YPS (0.8% sorbosa + higromicina 200 μ g/mL). Después de 24h se escogió y se marcó un área específica del medio que contenía micelio para la aplicación de dsRNA y siRNA.

DsRNA y siRNA fueron aplicados por separado en el área seleccionada de cada plato que contenía la dilución y se los incubó a temperatura ambiente. Para cada aplicación se utilizaron 5 μ L de cada uno y después de 24h se realizó un reaplicación. Los resultados se evaluaron a 24, 48 y 72 horas mediante

microscopía de fluorescencia. Para comparar la inhibición de la resistencia a higromicina se utilizaron dos controles, el primer control fueron los dsRNA incluidos en el kit RiboMAX™ Express RNAi System y para el segundo control se sintetizaron siRNA con el kit ShortCut RNaseIII a partir de los dsRNA previamente mencionados.

RNAi para silenciar ToxA *in planta*

Para el silenciamiento de ToxA *in planta* se siguió el mismo protocolo que el ensayo en planta para el silenciamiento de GFP, la única diferencia fue que los siRNA eran específicos para ToxA.

RNAi para silenciar Pds *in planta*

Para evaluar el silenciamiento de Pds se mezcló 10 µL de dsRNA con una concentración de 2800 ng/µL con 0.01% Hi-Yield spreader sticker y se aplicó directamente en la superficie de dos diferenciales: Glenlea y Red Chief. Adicionalmente otro set de plantas fue inoculado con 10 µL de dsRNA con una concentración de 2800 ng/µL mezclado con 0.01% de Silwet L-77. Las plantas se colocaron en una incubadora con condiciones de 12 h de luz a 25°C y 12 h de oscuridad a 20°C. Como control se utilizó 10 µL de agua mezclada con 0.01% de Hi-Yield spreader sticker o 0.01% de Silwet. Se realizó una reaplicación de los siRNA cada 24 h. Los resultados se evaluaron a las 24 y 48h.

Microscopía de fluorescencia

Se analizó el área infectada de cada hoja bajo el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E800 (Nikon Inc, Tokyo, Japan) con un aumento de 4X en Qimaging system con tres filtros diferentes y Brightfield. Las imágenes se combinaron como diferentes capas de acuerdo a cada filtro usando Q capture pro version 5.1.1.14

PCR en tiempo real

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L compuesta por 2 μ L de cDNA, 0.75 μ L de primers (cada uno a 5 μ M), 1.5 μ L de Nuclease-Free water, 5 μ L de PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, EE. UU.). La amplificación y el análisis por PCR se lograron utilizando un analizador rotatorio en tiempo real Rotor-Gene™ 6000 con un Rotor-Disc de 72 tubos (Qiagen S.A., Germantown, MD, EE. UU.). Las condiciones del ciclo de reacción fueron: desnaturalización inicial 95 ° C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de 95 ° C durante 30 s, 58 ° C durante 30 s, 72 ° C durante 1 min y extensión final a 72 ° C durante 10 min. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. Para el desarrollo de las curvas estándar se utilizaron cuatro concentraciones diferentes (1, 0.1, 0.01 y 0.001) y se midieron en un Qubit (Promega, Madison, WI). Todos los componentes de la reacción sin muestra se utilizaron como control negativo (NTC). El valor de Ct (ciclo de umbral) se determinó automáticamente utilizando Rotor-Gene Q software 2.3.5.

Análisis en ImageJ

Se utilizó el software ImageJ para analizar cambios en la fluorescencia de las plantas de trigo tratadas con siRNA-GFP y dsRNA-GFP. Para realizar las mediciones se utilizaron únicamente las imágenes de 16bit con el filtro GFP y se ajustó el Threshold mediante el algoritmo de Li para evitar cualquier sesgo durante el análisis de la intensidad. El programa midió mean gray value que es la suma de los valores de gris de todos los píxeles de la selección dividida por el número total de píxeles, lo cual nos indica la intensidad de la fluorescencia, estos valores se usaron para el análisis estadístico.

Para el análisis del área de infección, el programa ajustó automáticamente el Threshold en donde se resaltó únicamente el área infectada y se descartó el

resto de la hoja, para poder obtener el valor del área en micrómetros se estableció una medida estándar de 100 micrómetros que se usó como referencia.

Diseño experimental

Para identificar si existen diferencias significativas en la intensidad de la fluorescencia *in planta* entre los tratamientos (Control, GFP y TdTom), se realizó un análisis de varianza de dos factores sin repeticiones donde la intensidad de la fluorescencia está determinada por “mean gray value” y se presenta como la variable de respuesta, mientras que los tratamientos y el número de días son las variables independientes. Para el ensayo *in vitro* se realizó un diseño factorial completo con dos factores y tres repeticiones.

Mientras que, para determinar diferencias significativas en cuanto al área de infección, se realizó un análisis de varianza de dos factores donde la variable de respuesta es el área, y los factores a comparar fueron los tratamientos (Control, GFP y TdTom) y el número de días con la ayuda del programa estadístico JMP (Versión Pro 14, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2019).

Capítulo IV Resultados

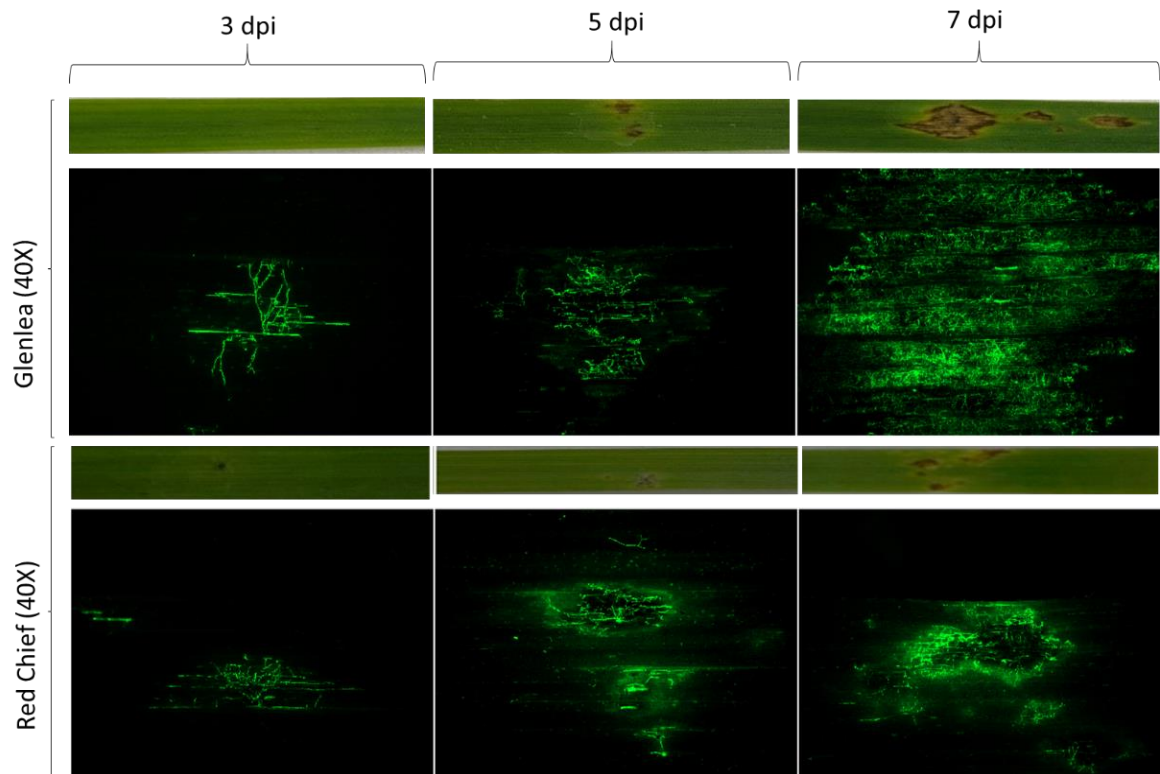
Proceso de colonización e infección de Ptr en trigo

Los aislados ToxA+ provocan necrosis en cultivares susceptibles desde los tres días pos inoculación (dpi), la cual se fue expandiendo a través del tejido epidérmico y mesófilo de las hojas a los cinco y siete dpi. En cultivares resistentes las hifas no son capaces de penetrar en el interior de la hoja, solo permanecen en la superficie de las plantas a los tres dpi y su expansión se restringe exclusivamente al sitio inicial de infección durante los cinco y siete dpi mostrando una respuesta de resistencia en el tejido epidérmico (Figura 3).

En cuanto a los cultivares inoculados con un aislado toxa⁻, no se desarrolla necrosis en las hojas y la expansión de las hifas queda restringida al sitio de infección. También se evidencia la presencia de una respuesta de resistencia en ambos cultivares a los cinco y siete días y por ende una limitación en el avance de la infección (Figura 4).

Figura 3

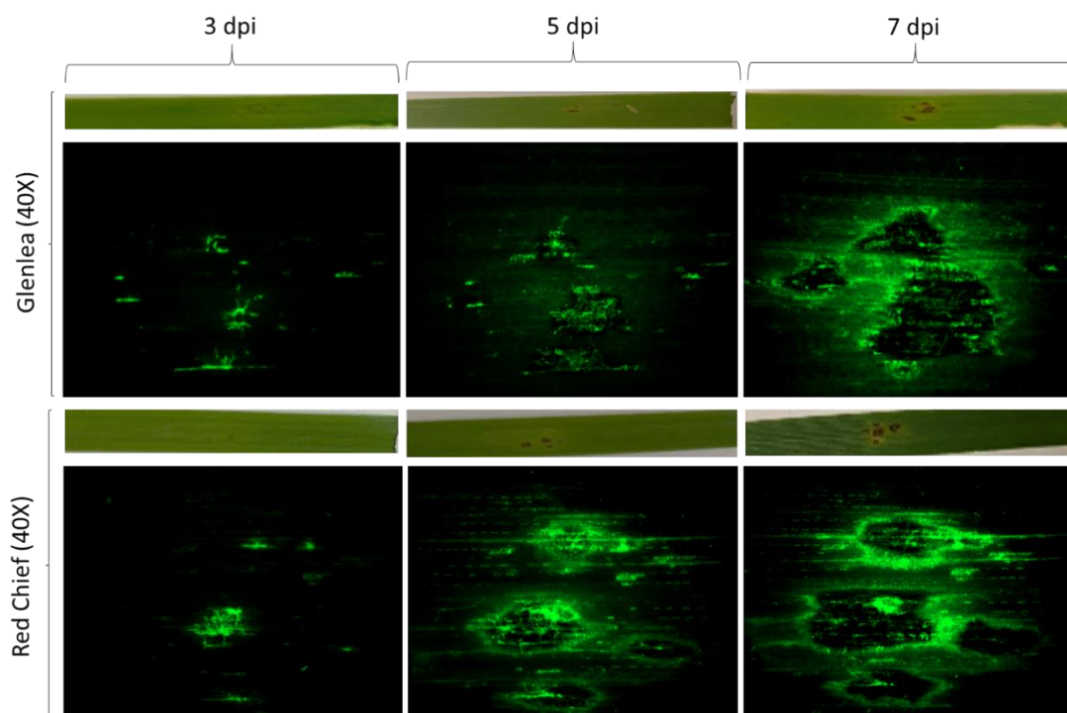
Proceso de colonización e infección con un aislado *ptr ToxA+*



Nota. Colonización e infección de un cultivar susceptible (Glenlea) y uno resistente (Red Chief) por un aislado de *ptr ToxA+* que produce GFP, a los 3, 5 y 7 dpi. La expansión de la infección abarca una mayor área en Glenlea que en Red Chief en donde queda restringida a un sitio específico.

Figura 4

Proceso de colonización e infección con un aislado ptr toxa-



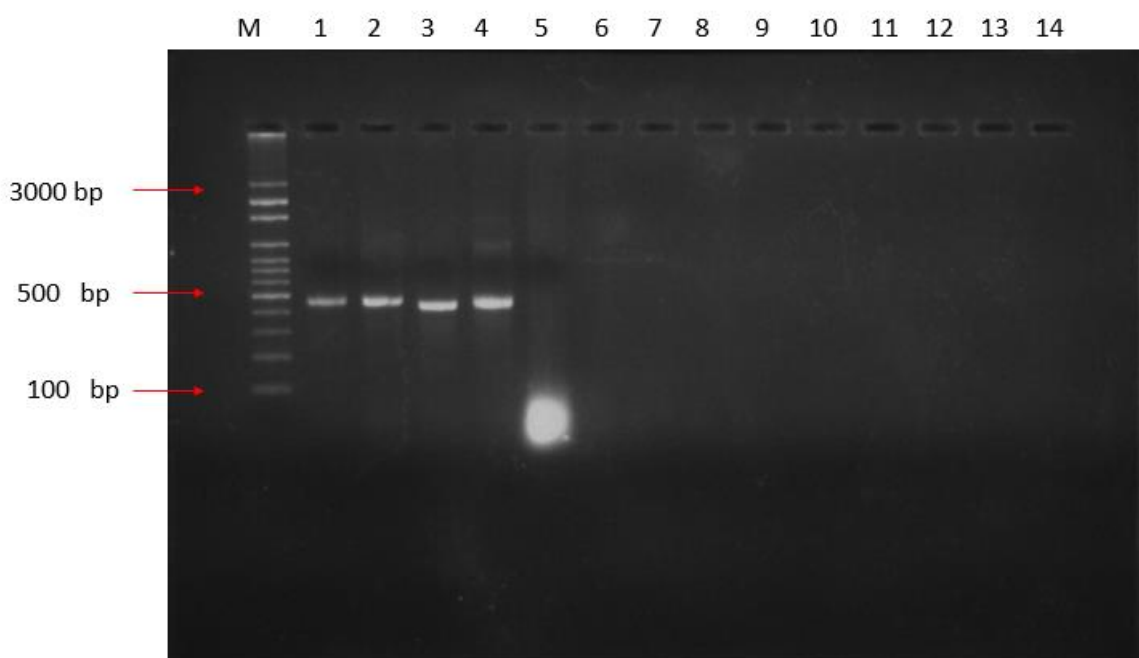
Nota. Colonización e infección de un cultivar susceptible (Glenlea) y uno resistente (Red Chief) por un aislado de ptr toxa⁻ a los 3, 5 y 7 dpi. Se puede observar en ambos cultivares que el sitio de infección está rodeado por tejido muerto por lo cual la colonización está limitada al sitio de infección

Síntesis de dsRNA y siRNA

Se realizó un gel de 1.5% de agarosa para confirmar la presencia de los dsRNA sintetizados por el kit T7 RiboMAX™ Express RNAi System y verificar que tengan un tamaño de aproximadamente 500 bp, tal como se especificó en la aplicación web E-RNAi (Figura 5)

Figura 5

Gel de electroforesis al 1.5% de agarosa de dsRNA



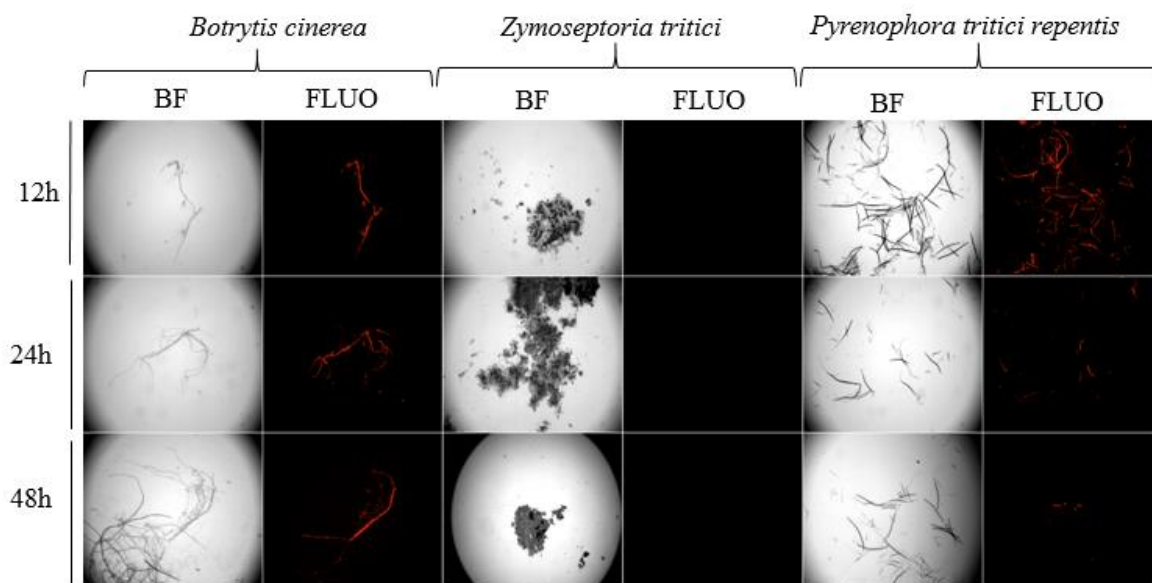
Nota. Gel de electroforesis al 1.5% de agarosa, dsRNA de aproximadamente 500 bp generados usando T7 RiboMAX™ Express RNAi System. M: marcador, Banda 1: dsRNA-GFP Banda 2: dsRNA-Hph, Banda 3: dsRNA-ToxA, Banda 4: dsRNA-Tdtom Banda 5: Control negativo

Evaluación de la captación de dsRNA

Para evaluar la capacidad de Ptr para absorber dsRNA exógenos se co-incubó con Cy3-labeled 250 nt long dsRNA a Ptr y dos controles. B. Cinerea como control positivo y Z. Tritici como negativo. Como se esperaba Z. Tritici no presentó ninguna señal de fluorescencia, pero si fue detectada en B. Cinerea y Ptr a partir de las 12 horas (Figura 6) hasta las 48 horas, aunque con menor intensidad en Ptr a partir de las 24 horas. Esto demostró que Ptr es capaz de absorber dsRNAs exógenos, los cuales se localización dentro de las hifas, pero no en las esporas.

Figura 6

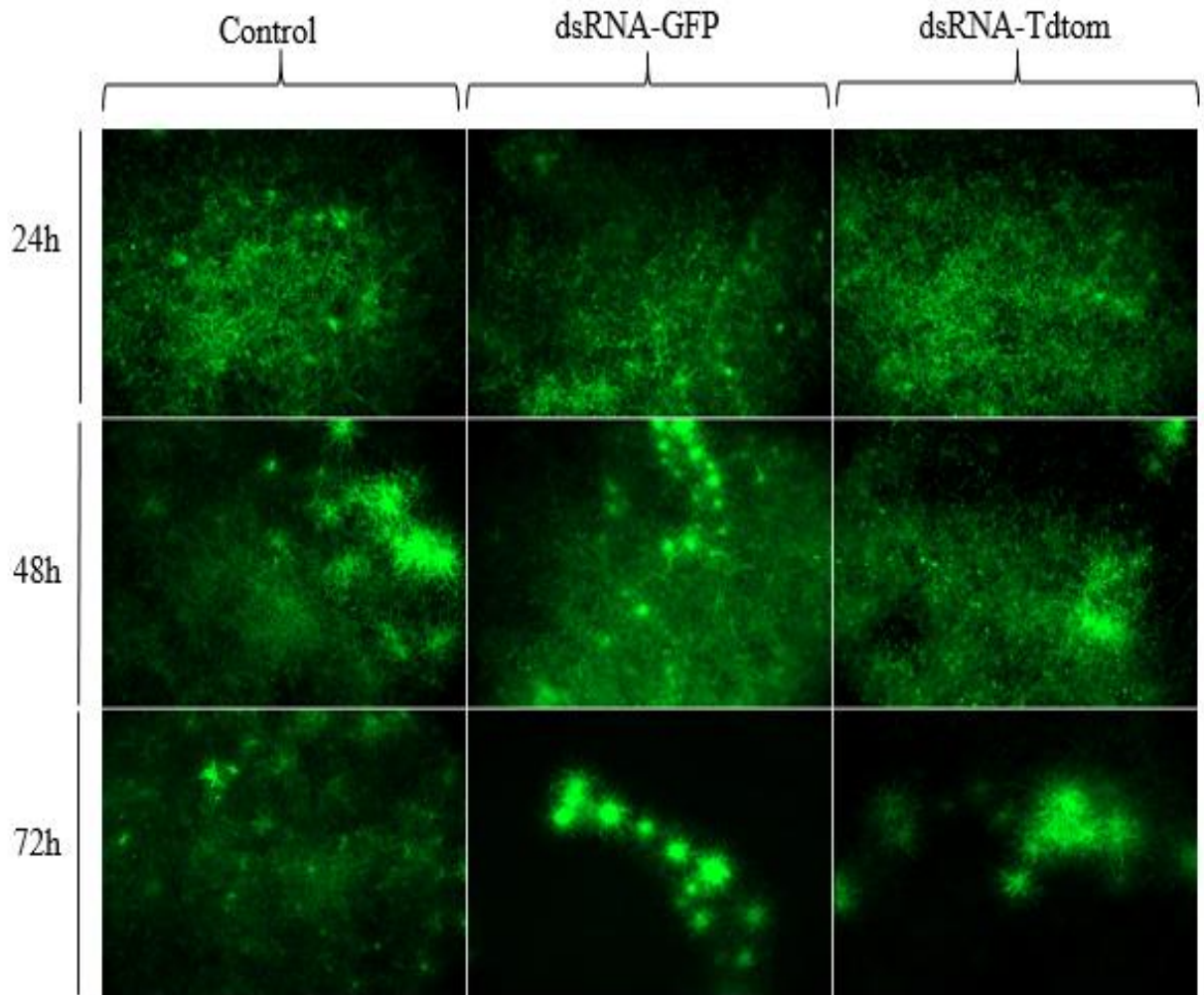
Evaluación de la captación de dsRNA *in vitro*



Nota. Evaluación de la captación de dsRNA marcado con Cy3 en *Zymoseptoria tritici*, *Botrytis cinerea* y *Pyrenophora tritici repentis*. Se controló a las 12, 24 y 48 h de co-incubación usando microscopía. Las imágenes fueron capturadas con configuraciones de campo brillante (BF) y absorción fluorescente (FLUO). El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Evaluación del silenciamiento de GFP *in vitro*

Después de verificar que ptr es capaz de absorber dsRNA exógenos *in vitro*, se aplicaron dsRNA-GFP en el micelio de un aislado transformado; sin embargo, ninguna de las tres réplicas demostró una disminución en intensidad de la fluorescencia (Figura 7). El análisis estadístico demuestra que no hay diferencia significativa entre el tratamiento con dsRNA-GFP y los controles (Tabla 3).

Figura 7*Evaluación del silenciamiento de GFP in vitro*

Nota. No se observa una disminución en la fluorescencia en ninguno de los tres tratamientos

Tabla 3

Análisis de varianza para la intensidad de fluorescencia in vitro

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>
Horas	807.0459	2	403.523	0.256522	0.776519
Tratamiento	1310.943	2	655.4714	0.416687	0.665426
Tratamiento*Hora	1180.815	4	295.2038	0.187663	0.94176
Within	28315.01	18	1573.056		
Total	31613.82	26			

Nota. Ho1: No hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia para cada hora

Ho2: No hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia para cada tratamiento

Ho3: El efecto de una variable independiente (días) no influye sobre el efecto de la otra variable independiente (tratamientos)

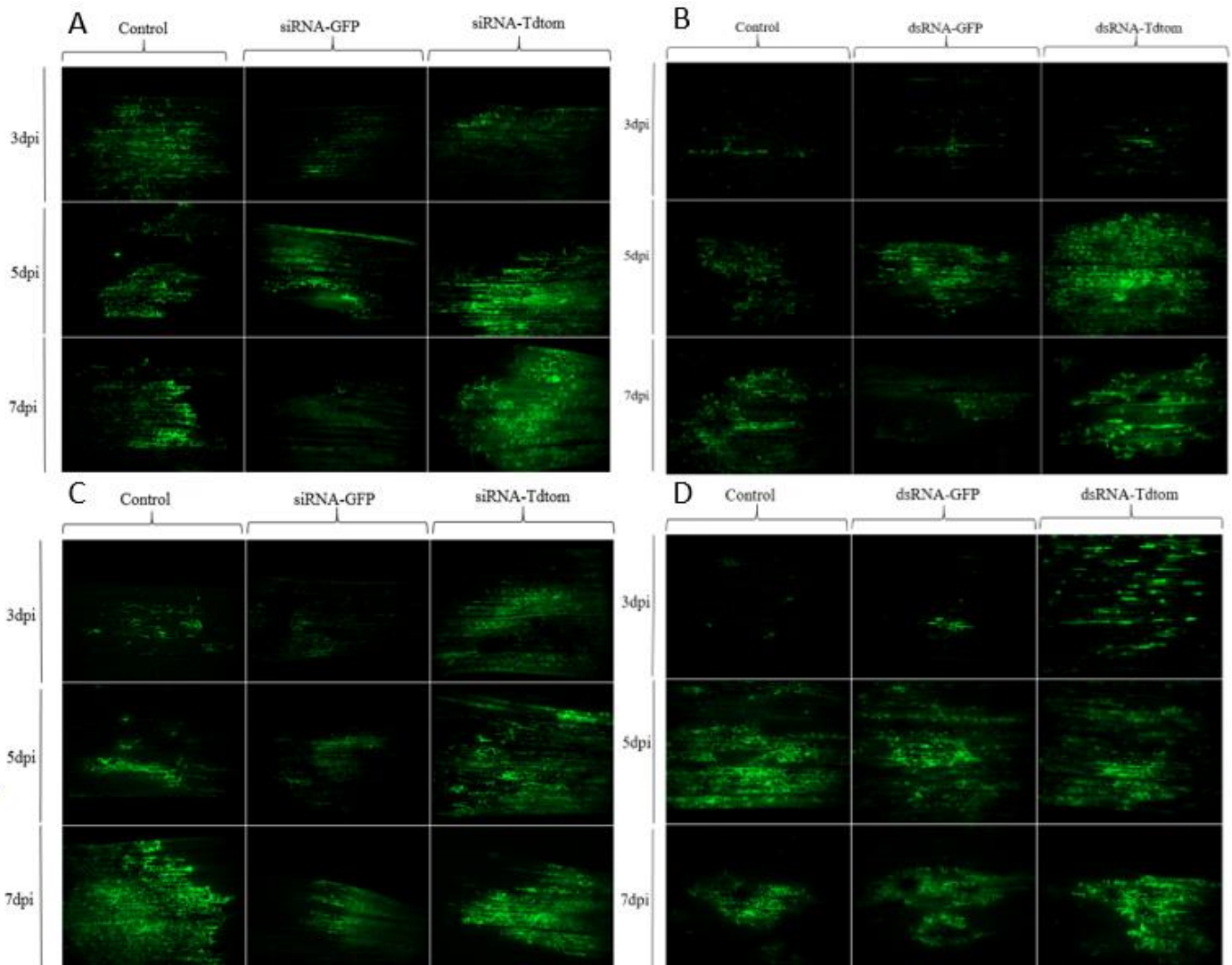
Conclusión: En base a ($p\text{-value} > 0.05$) se aceptan las tres hipótesis nulas (Ho) con un nivel de confianza del 95% concluimos que no hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia de los tratamientos en las horas estudiadas y no

Evaluación del silenciamiento de GFP *in planta*

Los dsRNA-GFP se aplicaron directamente en la superficie de la hoja con un surfactante como se describe en (US Patent No. 20110296556 A1, 2011). Sin embargo, no hay diferencia significativa en la fluorescencia de GFP con los controles (Tabla 5 y 7). Una de las posibles explicaciones es que los dsRNA no pudieron ingresar a las células de la planta y acceder a la maquinaria de RNAi. Por lo tanto, para comprobar esta hipótesis se aplicó directamente siRNA-GFP. Pero este enfoque tampoco dio como resultado una disminución en la fluorescencia en ninguno de los dos cultivares (Tabla 4 y 6).

Figura 8

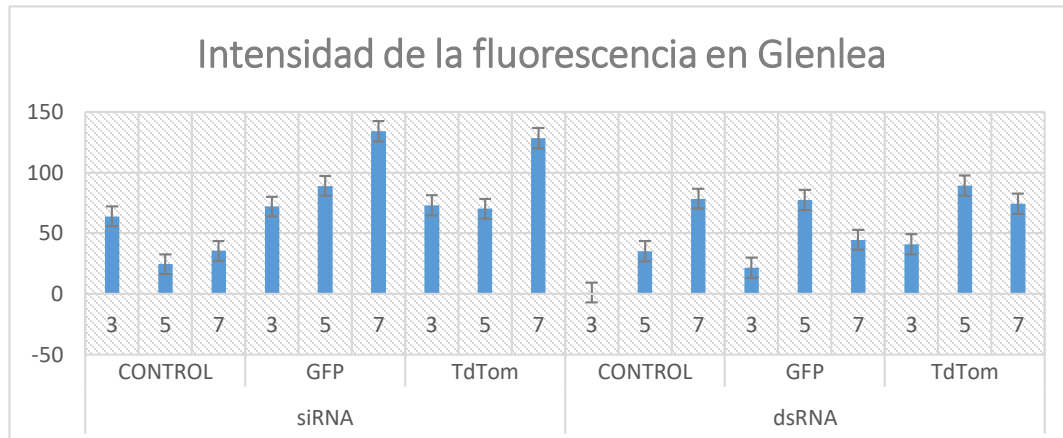
Evaluación del silenciamiento de GFP in planta



Nota. Imágenes de epifluorescencia de un aislado de *Ptr ToxA+* que produce GFP, colonizando hojas de trigo a los 3, 5 y 7 dpi, A, Glenlea no presenta diferencia en el tratamiento con siRNA-GFP en comparación a los controles, se puede observar una similitud en la intensidad de la fluorescencia de todos los tratamientos, B, Glenlea tratada con dsRNA tampoco evidencia un cambio notable en la intensidad de la fluorescencia, Red Chief sin cambio en la intensidad de la fluorescencia en tratamientos son siRNA, D, Red Chief tratada con dsRNA tampoco se observa un cambio en la intensidad de la fluorescencia en ningún dpi

Figura 9

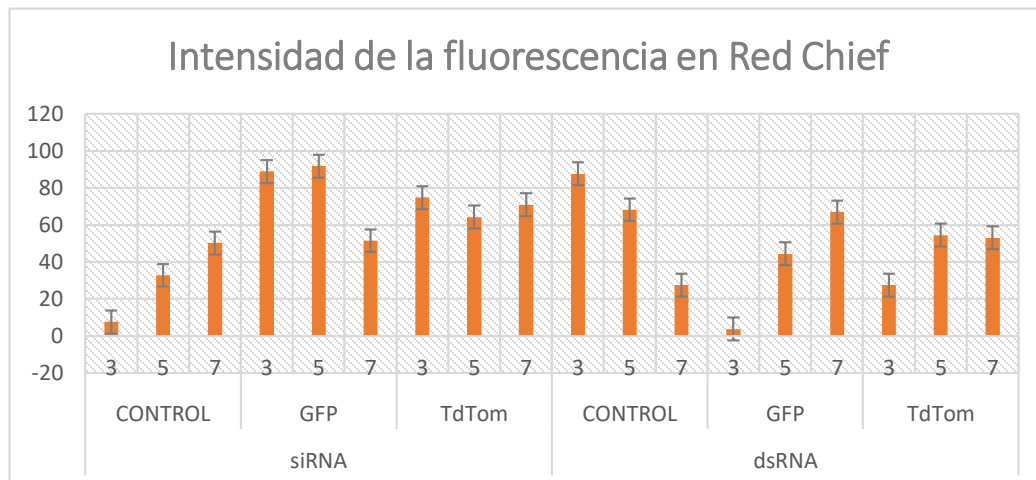
Gráfico de barras de la intensidad de la fluorescencia en *Glenlea*



Nota. Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia mediante ImageJ en *Glenlea*. Se controló a los 3, 5 y 7 días post inoculación

Figura 10

Gráfico de barras de la intensidad de la fluorescencia en *Red Chief*



Nota. Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia mediante ImageJ en *Red Chief*. Se controló a los 3, 5 y 7 días post inoculación

Tabla 4.

Análisis de varianza para la intensidad de fluorescencia en Glenlea con siRNA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>
DPI	2402.433	2	1201.217	1.818433	0.27434
Tratamientos	5742.939	2	2871.47	4.346906	0.099297
Error	2642.311	4	660.5779		
Total	10787.68	8			

Nota. Ho: No hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia entre las medias (poblacionales) para los días en Glenlea

Ho: No hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia entre las medias (poblacionales) para los tratamientos con siRNA en Glenlea

Conclusión: En base a ($p\text{-value} > 0.05$) se aceptan las dos hipótesis nulas (Ho) con un nivel de confianza del 95% concluimos que no hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia de los tratamientos en los DPI estudiados

Tabla 5

Análisis de varianza para la intensidad de fluorescencia en Glenlea con dsRNA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>
DPI	4114.134	2	2057.067	4.845677	0.085355
Tratamientos	1408.214	2	704.1069	1.658612	0.298832
Error	1698.063	4	424.5158		
Total	7220.411	8			

Nota. Ho: no hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia entre las medias (poblacionales) para los días en Glenlea

Ho: no hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia entre las medias (poblacionales) para los tratamientos con dsRNA en Glenlea

Conclusión: En base a ($p\text{-value} > 0.05$) se aceptan las dos hipótesis nulas (Ho) con un nivel de confianza del 95% concluimos que no hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia de los tratamientos en los DPI estudiados

Tabla 6

Análisis de varianza para la intensidad de fluorescencia en Red Chief con siRNA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>
DPI	63.72015	2	31.86008	0.066264	0.93689
Tratamientos	3868.125	2	1934.062	4.022533	0.110281
Error	1923.228	4	480.807		
Total	5855.073	8			

Nota. Ho: no hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia entre las medias (poblacionales) para los días en Red Chief

Ho: no hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia entre las medias (poblacionales) para los tratamientos con siRNA en Red Chief

Conclusión: En base a ($p\text{-value} > 0.05$) se aceptan las dos hipótesis nulas (Ho) con un nivel de confianza del 95% concluimos que no hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia de los tratamientos en los DPI

Tabla 7

Análisis de varianza para la intensidad de fluorescencia en Red Chief con dsRNA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>
DPI	390.5959	2	195.298	0.195467	0.829862
Tratamientos	821.2719	2	410.6359	0.410992	0.688127
Error	3996.534	4	999.1335		
Total	5208.402	8			

Nota. Ho1: no hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia entre las medias (poblacionales) para los días en Red Chief

Ho2: no hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia entre las medias (poblacionales) para los tratamientos con dsRNA en Red Chief

Conclusión: En base a ($p\text{-value} > 0.05$) se aceptan las dos hipótesis nulas (Ho) con un nivel de confianza del 95% concluimos que no hay una diferencia significativa en la intensidad de la fluorescencia de los tratamientos en los DPI estudiados

Evaluación del silenciamiento de ToxA *in planta*

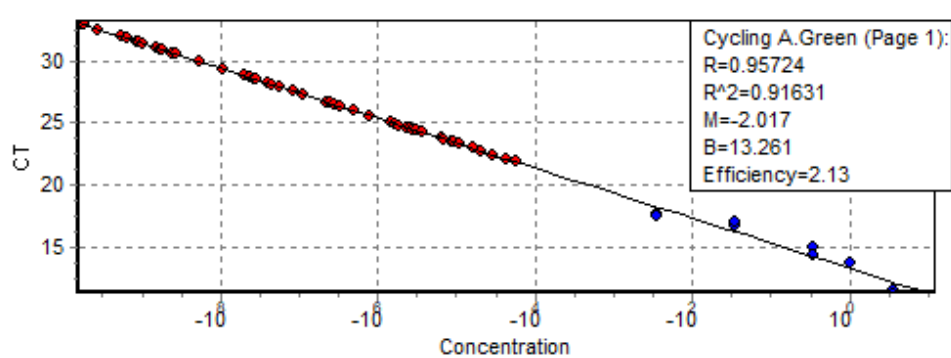
En el análisis de la qPCR no se detecta la expresión de ToxA en ninguna de las muestras debido a que sus concentraciones están muy por debajo de los estándares. Además, la eficiencia es de 213.17% y el coeficiente de correlación $R^2 = 0.91631$. En cuanto a la curva estándar (Figura 11) las muestras empiezan a amplificar a partir de los 22 ciclos y continúan hasta los 38 ciclos al igual que los controles negativos, por lo cual los resultados no son confiables. Por este motivo se utilizó otro método para cuantificar ToxA, mediante el análisis de los síntomas y la medida del área infectada en las hojas inoculadas.

En Glenlea (Figura 13A) se puede observar que sGFP-K1-2NC-4 C1 (ToxA+) induce necrosis en los controles negativos a partir de los cinco días, pero las hojas tratadas con siRNA-ToxA aparentemente tienen un menor desarrollo de la enfermedad, con una pequeña lesión necrótica rodeada por clorosis, sin embargo, en la figura 12A se observa que esta lesión presenta un aumento en la expansión de hifas tanto a los cinco como a los siete días. El cultivar resistente (Figura 13B) presenta pequeñas manchas marrones, características de resistencia.

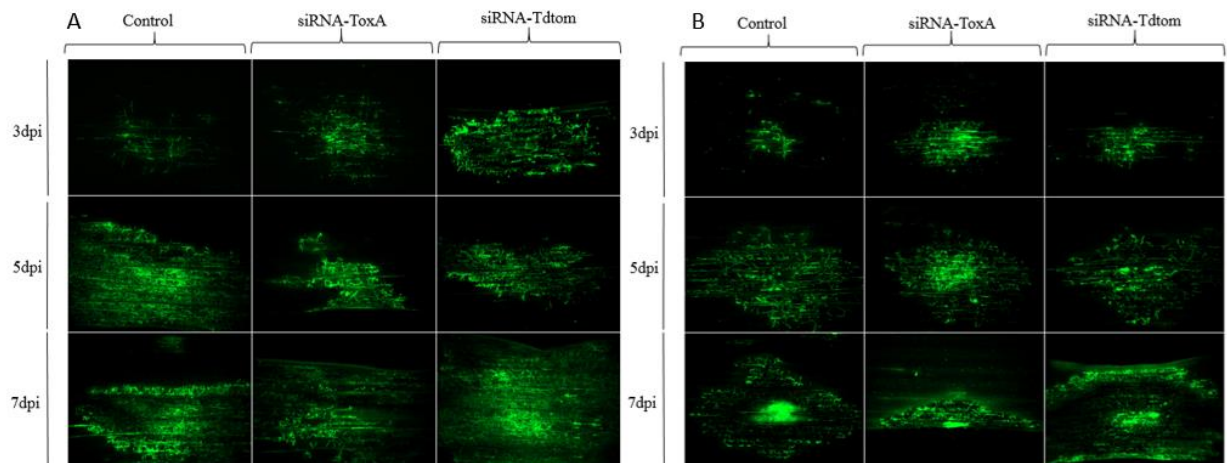
El análisis del área de infección demuestra que no hay una diferencia significativa entre ninguno de los tres tratamientos (Tabla 8 y 9)

Figura 11

Curvas estándar



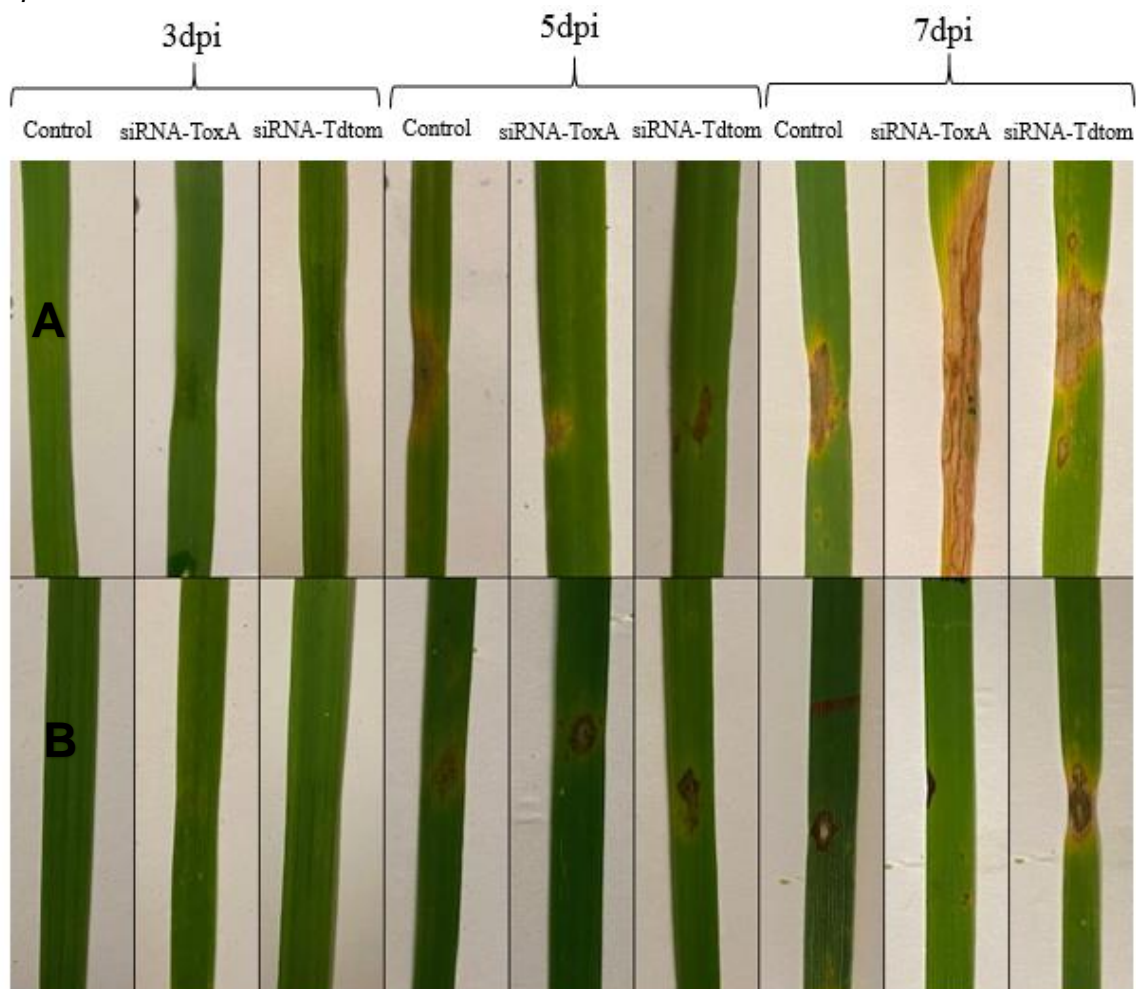
Nota. Los puntos azules en la curva representan las muestras que se han definido como estándares y los puntos rojos representan los puntos de datos de muestra desconocidos.

Figura 12Evaluación del silenciamiento de *ToxA* in planta

Nota. Imágenes de epifluorescencia de *Ptr* colonizando hojas de trigo tratadas con siRNA-*ToxA*, siRNA-*Tdtom* y un control, A, *Glenlea* a los 3 días muestra una expansión de hifas que va avanzando por todo el tejido epidérmico y mesofilo a los 5 y 7 dpi, B, *Red Chief* a 3 dpi muestra un crecimiento reducido de hifas entre las células epidérmicas el cual se restringe al sitio de infección, levantando una respuesta de resistencia a los 7 dpi.

Figura 13

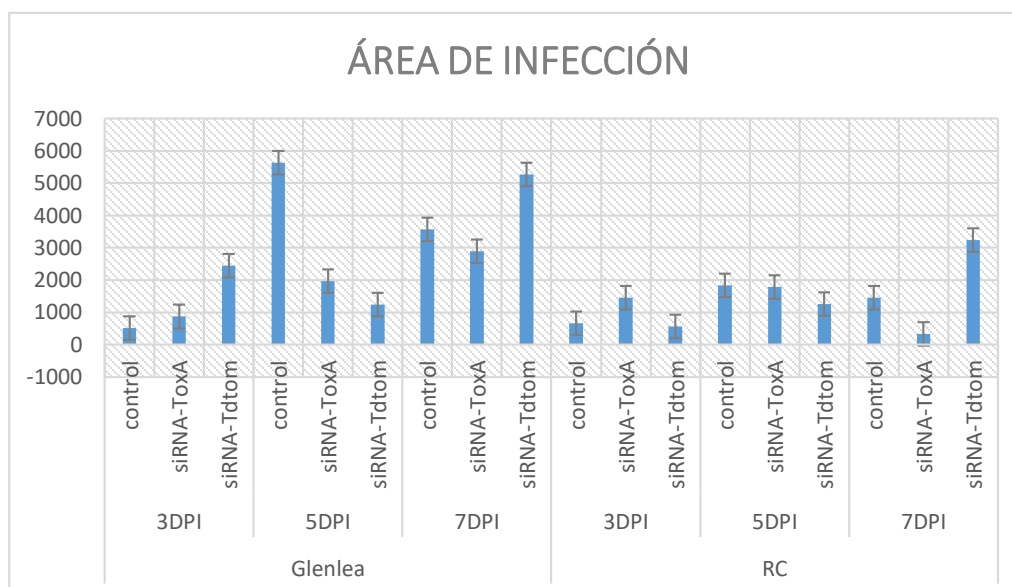
Desarrollo de síntomas inducidos por *sGFP-K1-2NC-4* en *Glenlea* y *Red Chief* en respuesta al tratamiento con *siRNA-ToxA*



Nota. Los cultivares sensible e insensible a ToxA, *Glenlea* y *Red Chief* respectivamente, fueron inoculados con *Ptr* y tratadas con *siRNA-ToxA*, *siRNA-Tdtom* y un control, A, *Glenlea* a los 3 días no muestra ningún síntoma visible, sin embargo, a partir de los 5 dpi se puede observar pequeños centros necróticos rodeados de clorosis B, *Red Chief* a 3 dpi tampoco muestra ningún síntoma visible, pero a partir de los 5 dpi se evidencia la presencia de pequeñas manchas marrones características de una respuesta de resistencia

Figura 14

Gráfico de barras del área de infección



Nota. Colonización y necrosis causada por Ptr en hojas de trigo tratadas con siRNA-ToxA, siRNA-Tdtom y un control a los 3, 5 y 7 dpi

Tabla 8.

Análisis de varianza entre el área de infección de tres tratamientos en Glenlea

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value
DPI	10637020.42	2	5318510.209	1.616525	0.305828
Tratamiento	2968166.876	2	1484083.438	0.451077	0.665804
Error	13160355.96	4	3290088.991		
Total	26765543.26	8			

Nota. Ho: no hay una diferencia significativa en el área de infección entre las medias (poblacionales) para los días en Glenlea

Ho: no hay una diferencia en el área de infección entre las medias (poblacionales) para los tratamientos con siRNA en Glenlea

Conclusión: En base a ($p\text{-value} > 0.05$) se aceptan las dos hipótesis nulas (Ho) con un nivel de confianza del 95% concluimos que no hay una diferencia significativa en el área de infección de los tratamientos en los DPI estudiados

Tabla 9

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>
DPI	1155104.254	2	577552.1269	1.388044	0.637538
Tratamientos	398354.8868	2	199177.4434	0.178868	0.842555
Error	4576293.717	4	1144073.429		
Total	6129752.857	8			

Nota. Ho: No hay una diferencia significativa en el área de infección entre las medias (poblacionales) para los días en Red Chief

Ho: No hay una diferencia significativa en el área de infección entre las medias (poblacionales) para los tratamientos con siRNA en Red Chief

Conclusión: En base a ($p\text{-value} > 0.05$) se aceptan las dos hipótesis nulas (Ho) con un nivel de confianza del 95% concluimos que no hay una diferencia significativa en el área de infección de los tratamientos en los DPI estudiados

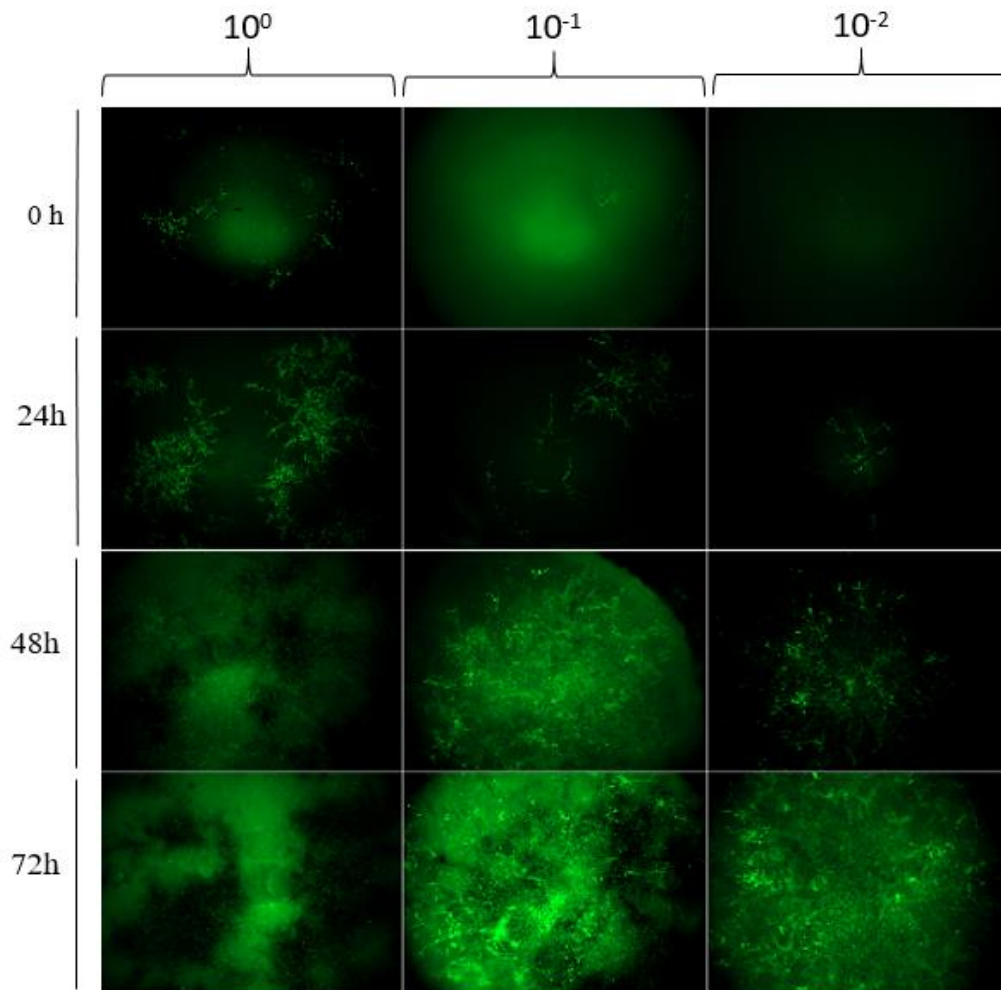
Análisis de varianza entre el área de infección de tres tratamientos en Red Chief

Evaluación del silenciamiento de la resistencia a Higromicina *in vitro*

Se llevaron a cabo dos ensayos para silenciar la resistencia a Higromicina, uno con dsRNA-Hph (Figura 13) y con siRNA-Hph (Figura 15). Sin embargo, los resultados de estos ensayos presentaron resultados similares al control negativo de dsRNA igual que al de siRNA (Figura 14 y 16). Esto sugiere que no se dio el silenciamiento de la resistencia a higromicina.

Figura 15

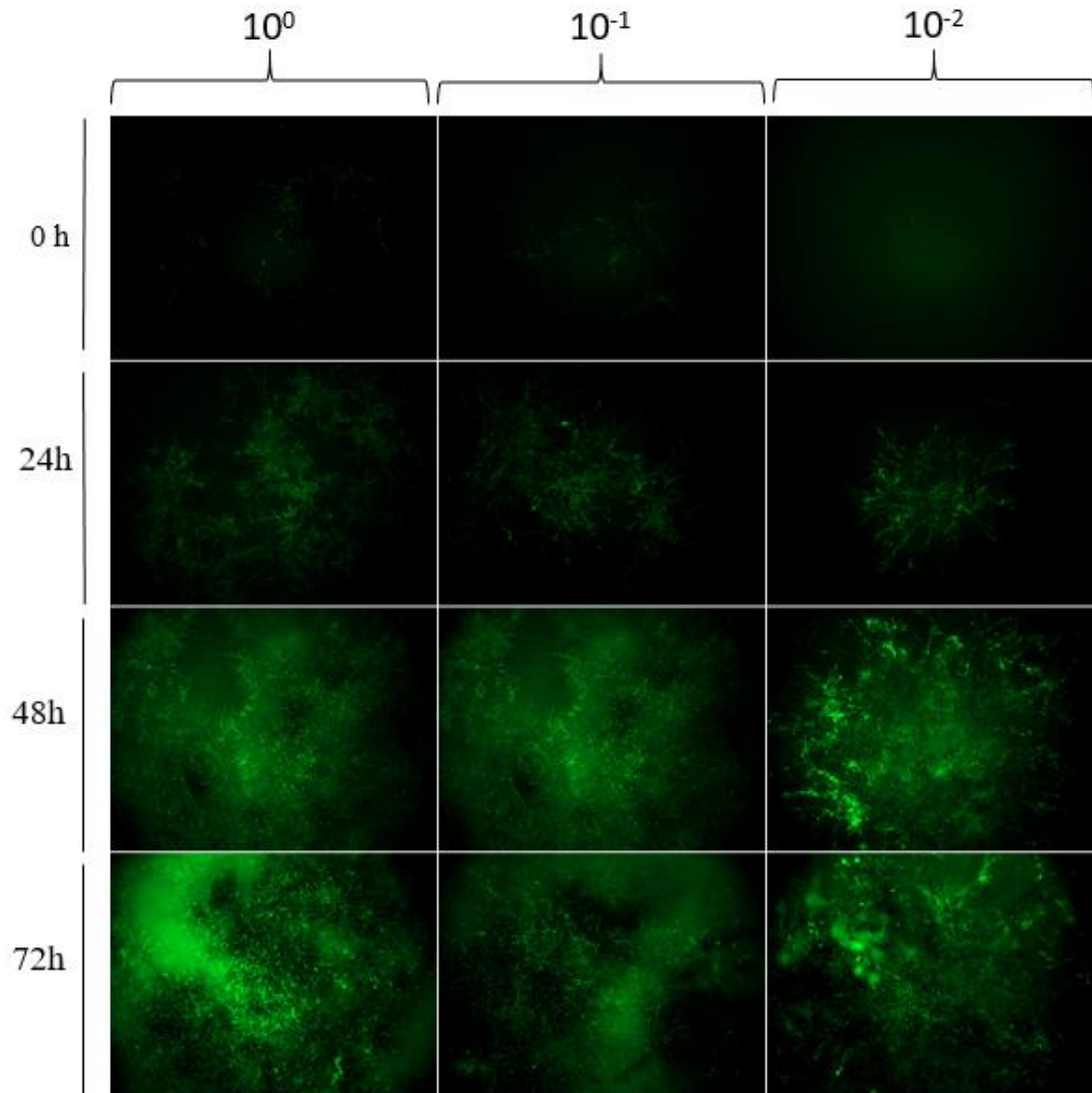
Evaluación del silenciamiento de Hph in vitro con dsRNA-Hph



Nota. Incubación de suspensión de esporas (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}) con dsRNA-Hph a las 0, 24, 48 y 72 horas después de su aplicación

Figura 16

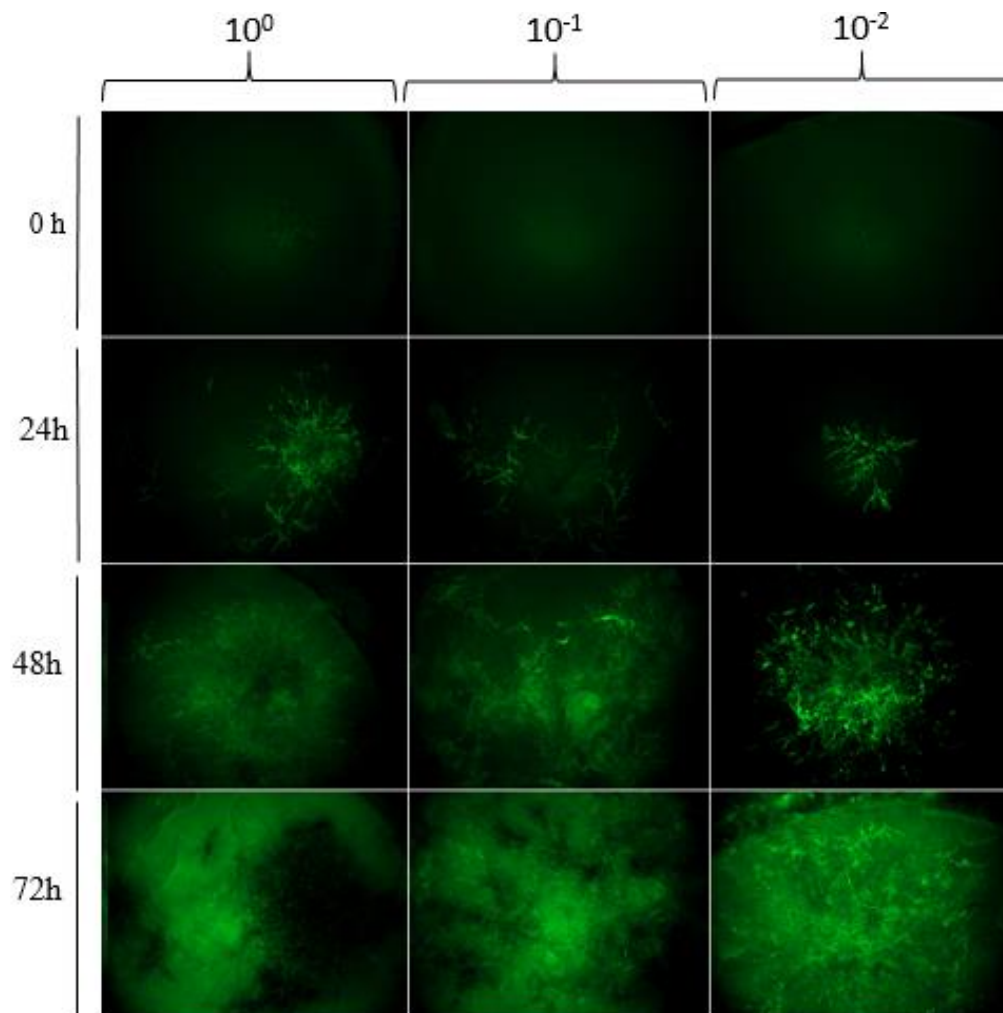
Evaluación del silenciamiento de Hph in vitro control negativo de dsRNA



Nota. Incubación de suspensión de esporas (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}) con un control negativo de dsRNA a las 0, 24, 48 y 72 horas después de su aplicación

Figura 17

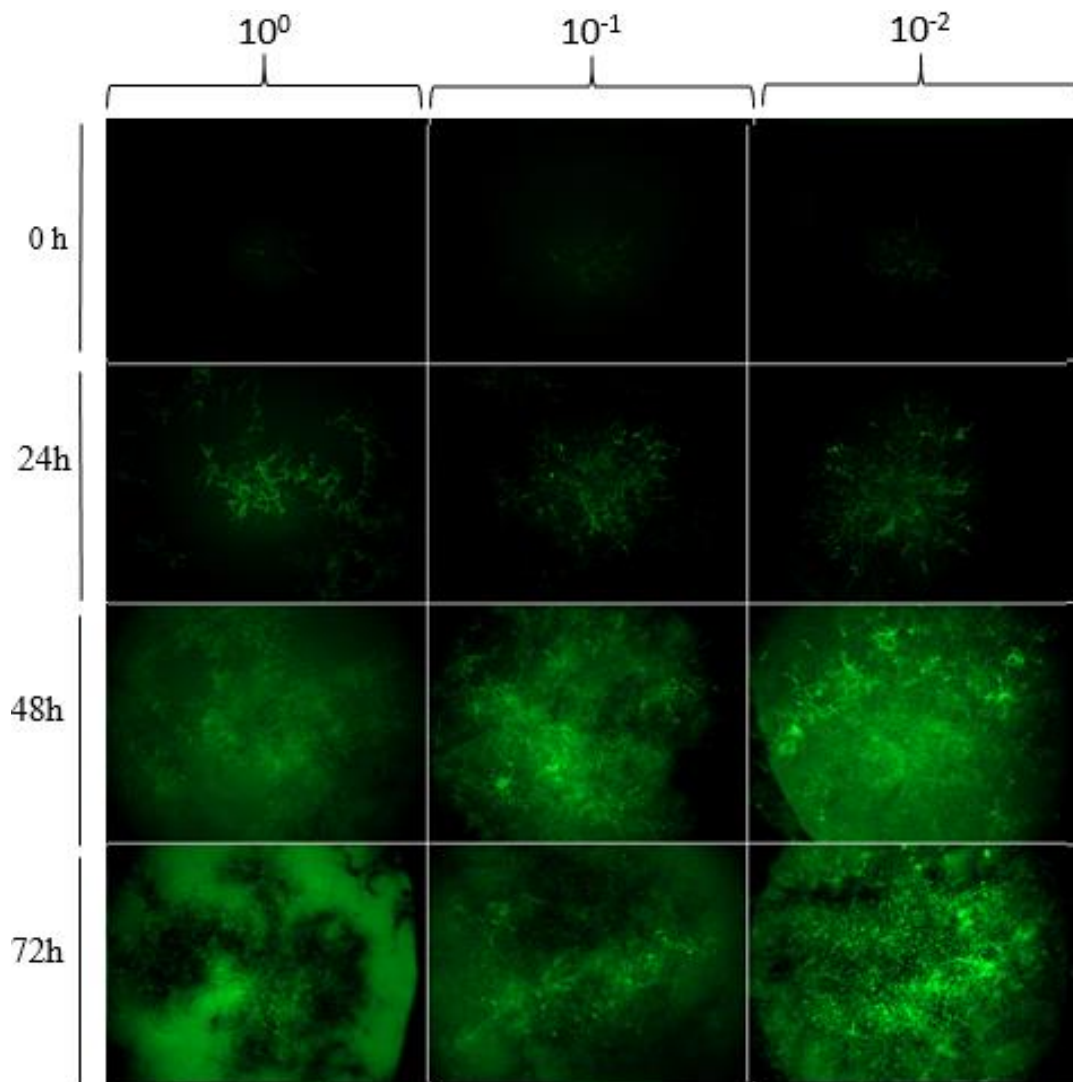
Evaluación del silenciamiento de Hph in vitro con siRNA-Hph



Nota. Incubación de suspensión de esporas (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}) con siRNA-Hph a las 0, 24, 48 y 72 horas después de su aplicación

Figura 18

Evaluación del silenciamiento de Hph in vitro control negativo de siRNA



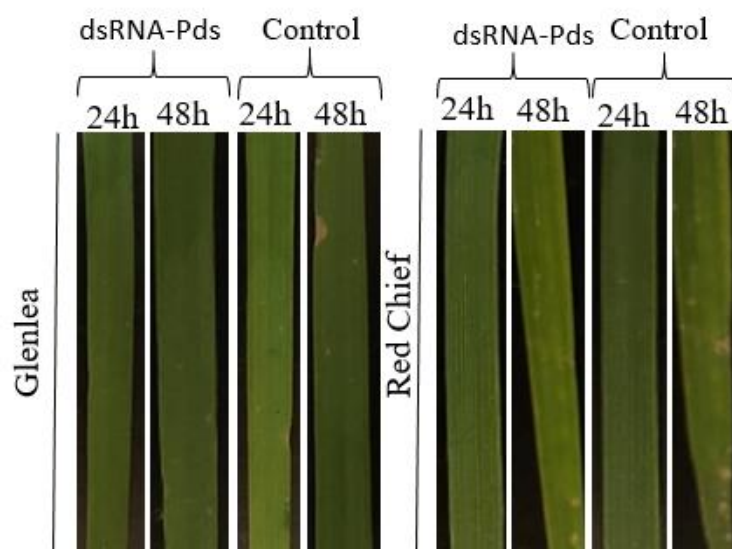
Nota. Incubación de suspensión de esporas (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}) con un control negativo siRNA a las 0, 24, 48 y 72 horas después de su aplicación

Evaluación del silenciamiento de Pds *in planta*

Para evidenciar fenotípicamente el silenciamiento génico mediado por RNAi en plantas de trigo se trató de silenciar la expresión de fitoeno desaturasa. Esta enzima es esencial en la biosíntesis de carotenoides y su inhibición da como resultado la reducción del contenido de carotenoides, también conocida como fotoblanqueo, en los tejidos afectados (Scofield, Huang, Brandt, & Gill, 2005). Para mejorar la penetración de los dsRNA en la cutícula se aplicó Silwet L-77 y Hi-Yield Spreader Sticker. No se observó evidencia de fotoblanqueo en ninguna de las plantas (Figura 17 y 18). Sin embargo, en las plantas con Hi-Yield Spreader Sticker se observa un cambio en la coloración tanto en el tratamiento con dsRNA-Pds y en el control, por lo cual no es un resultado confiable y puede solo ser por efecto del surfactante.

Figura 19

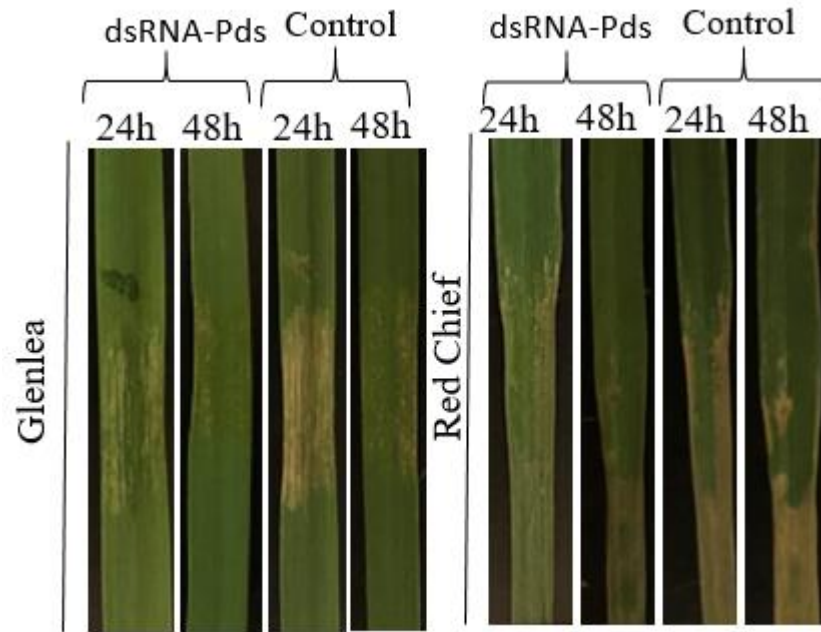
Evaluación del silenciamiento de Pds *in planta* con Silwet L-77



Nota. Aplicación de dsRNA-Pds con Silwet-L77 en dos diferenciales de trigo: Glenlea, cultivar susceptible y Red Chief, cultivar resistente

Figura 20

Evaluación del silenciamiento de Pds in planta con Hi-Yield Spreader Sticker



Nota. Aplicación de dsRNA-Pds con Hi-Yield Spreader Sticker en dos diferenciales de trigo: Glenlea, cultivar susceptible y Red Chief, cultivar resistente

Capítulo V Discusión

En la presente investigación se analizó el silenciamiento génico de ToxA, el principal efector de patogenicidad en la interacción de *Pyrenophora tritici-repentis* con su huésped natural (trigo) y se evaluó el potencial de RNAi como una posible estrategia para el control de tan spot.

Proceso de colonización e infección de Ptr en trigo

Los resultados obtenidos mediante microscopía de epifluorescencia del proceso de colonización e infección de tan spot en trigo confirman la importancia de ToxA para la inducción de necrosis en los genotipos susceptibles como Glenlea. Es necesaria la internalización de ToxA dentro de las células mesófilas para la producción de ROS que está directamente relacionada con la producción de necrosis, esto no sucede en los cultivares resistentes como Red Chief en donde se ha demostrado que los niveles de enzimas antioxidantes aumentan durante el ataque de un patógeno necrotrófico para evitar la acumulación de ROS y por ende evitar la inducción de necrosis mediante la producción de una HR como se observa en la fig. 5 (Wen, 2013) . Estos resultados confirman la importancia del silenciamiento de ToxA en Ptr mediante RNAi

Evaluación de la captación de dsRNA

La co-incubación con dsRNA-Cy3 demuestran que Ptr es capaz de absorber dsRNA exógenos, a diferencia del control negativo *Z. tritici*, un patógeno del trigo que pertenece a la misma clase que *Ptr*, en el que se ha demostrado que al no ser capaz de absorber dsRNA-Cy3 tampoco se da un silenciamiento en genes fúngicos mediante RNAi (Kettles, et al., 2019). Sin embargo, este resultado no es suficiente para afirmar un eficaz silenciamiento mediante RNAi en Ptr. Se puede observar que a las 48 horas disminuye la fluorescencia de dsRNA-Cy3

únicamente en Ptr, posiblemente porque se degradan más rápido que en el control positivo *B. Cinerea*.

RNAi para silenciar GFP *in vitro* e *in planta*

Para evidenciar fenotípicamente el silenciamiento génico mediado por RNAi en plantas de trigo se trató de silenciar la expresión de GFP en un aislado de Ptr transformado que produce esta proteína, mediante la aplicación de dsRNA específicos. Como se puede observar en la fig. 7 no hay una diferencia significativa entre la intensidad de la fluorescencia de las plantas tratadas con dsRNA-GFP y sus controles en ninguno de los días post inoculación. De acuerdo con estos resultados no se observó el silenciamiento de GFP por RNAi en trigo. Una de las explicaciones que surgieron en base a estos resultados es que Ptr posiblemente no posee maquinaria de RNAi algunos hongos patógenos han perdido la maquinaria de procesamiento de dsRNA como en el caso de *Ustilago Maydis*, un patógeno del maíz o *Cryptococcus gattii* que se ha demostrado que carecen de la maquinaria de RNAi (Billmyre, Calo, Feretzaki, Wang, & Heitman, 2014). Por lo cual se decidió aplicar directamente siRNA para evidenciar, Sin embargo, este enfoque tampoco dio como resultado el silenciamiento de GFP. Probablemente debido a la incapacidad de los dsRNA para ingresar a las células vegetales. Dalakouras et al. (2016) reportó que no observaron el silenciamiento de GFP en *Nicotiana benthamiana* al pipetear los siRNA en la superficie de la hoja ni mediante infiltración.

La cutícula es una lámina lipófila que actúa como primera barrera ante la entrada de patógenos (Schreiber, 2005). En un estudio publicado por (Bennett, Deikman, Hendrix, & landolino, 2020) Cy3-siRNA de 21 bp fue aplicado en hojas de *Amaranthus palmeri* con 0.5% de Silwet L-77 y los resultados mediante microscopía de fluorescencia indicaron que la mayor parte de Cy3-siRNA se

quedó únicamente en la superficie de la hoja, esto demostró que las propiedades que posee la cutícula le confieren resistencia a la entrada de dsRNA debido a la alta solubilidad que estos tienen al agua al igual que Cy3-siRNA.

RNAi para silenciar la resistencia a higromicina *in vitro*

En el ensayo para silenciar la resistencia a higromicina todos los tratamientos presentaron resultados similares al control. Este ensayo fue realizado bajo las mismas condiciones que el ensayo de Cy3, excepto por el tiempo en que se controló los resultados, en la figura 6 se puede observar que Cy3-dsRNA empieza a disminuir a partir de las 24 horas y a las 48 horas, la fluorescencia es apenas evidente. En el caso de la resistencia a la higromicina los resultados se empezaron a controlar a partir de las 24 horas, con lo cual es muy probable que los dsRNA-Hph ya se hayan degradado en especial por el pequeño volumen que se aplicó en el plato, el kit T7 RiboMAX™ Express RNAi System (Promega) permite obtener un volumen final de apenas 100 µL, lo cual limita mucho la aplicación a gran escala de los dsRNA.

RNAi para silenciar ToxA *in planta*

ToxA, al ser el principal factor de patogenicidad de ptr, aumenta la virulencia del patógeno y por ende la severidad de tan spot. Por lo cual si un aislado carece de esta HST no se va a producir necrosis en cultivares susceptibles como Glenlea (Figura 4). Al silenciar ToxA mediante RNAi se esperaba observar la misma reacción que en la Figura 4. Pero los resultados demuestran la inducción de necrosis y el avance de la enfermedad en Glenlea (Figura 12 y 13). Esto demuestra que no se pudo lograr el silenciamiento de ToxA.

En cuanto a los resultados obtenidos en la qPCR, no fueron tomados en cuenta en esta investigación debido a que sus concentraciones son demasiado bajas y similares a las de los controles negativos, además la eficiencia está muy

por encima de 100%, lo que indica una mala calidad de RNA, errores de pipeteo o primers dimers (Čepin, 2017).

Los resultados obtenidos en el silenciamiento de GFP *in planta* concuerdan con los de ToxA no se evidencio el silenciamiento de ninguno de los dos genes. Lo cual sugiere que los dsRNA exógenos no están entrando al interior de la célula o están siendo degradados antes de que puedan ejercer su acción. La degradación por parte de las nucleasas afecta la capacidad de siRNA aplicado foliarmente de ingresar a la célula vegetal (Pérez-Amador, et al., 2000). Los ensayos realizados en *Nicotiana benthamiana* han demostrado que los siRNA se degradan a partir de 4 horas después de su aplicación. Los resultados para ToxA fueron evaluados tres días después de su inoculación por lo que es posible que si hubo silenciamiento el efecto no duró lo suficiente como para ser documentado.

Por otro lado, se ha demostrado que no todos los genes pueden ser silenciados aplicando tópicamente siRNA o dsRNA en la superficie de las hojas. Se observó que el mRNA se redujo solo para el 40% de los genes diana seleccionados, después de probar al menos 4 homólogos de siRNA por gen (unpublished Bayer Crop Science research).

En una investigación publicada por (Dalakouras, et al., 2018) demuestra que para obtener un silenciamiento génico eficaz no basta con la aplicación tópica de siRNA, sino que es necesario que la planta tenga lesiones que permitan la internalización de estas moléculas. De igual manera sugieren el uso de silenciamiento génico inducido por virus, sin embargo, la aplicación de este tipo de vectores no es rentable para aplicaciones comerciales.

RNAi para silenciar Pds *in planta*

Los resultados apuntan a que no se pudo silenciar los genes en el hongo debido a que los dsRNA no eran capaces de entrar a la planta por lo cual en este

ensayo se intentó silenciar Pds para probar esta hipótesis, como se esperaba no se silenció la expresión de este gen. Consistentemente con estos resultados, Dalakouras et al. (2018) observaron que el silenciamiento génico mediante siRNA de 22 bp en *Nicotiana benthamiana* solamente fue local y no se ha podido silenciar con éxito genes endógenos. Además, es necesario el uso de diferentes técnicas que faciliten la entrada de los dsRNA a la planta. Los datos obtenidos en esta investigación demuestran que la aplicación tópica de dsRNA en la superficie de la hoja no es suficiente para que puedan ser internalizados por lo cual se necesita más investigación para poder determinar si esta técnica puede ser aplicada exitosamente en el patosistema de tan spot de trigo

Capítulo VI Conclusiones

- Los resultados de esta investigación demostraron que los dsRNA aplicados sobre la superficie de la hoja no son capaces de atravesar las barreras de la planta por lo cual no se puede lograr el silenciamiento génico.
- ToxA es necesaria para la producción de tan spot en el trigo, su ausencia levanta una respuesta de resistencia tanto en cultivares resistentes como susceptibles.
- El hongo necrótrofo *Pyrenophora tritici-repentis* es capaz de tomar dsRNA exógenos a través de su micelio, sin embargo, son degradados a las 24 horas.
- No existe diferencia significativa entre la intensidad de la fluorescencia en los tres tratamientos (Control, GFP y TdTom). por lo cual se puede concluir que no se logró silenciar con éxito GFP.
- Basado en el análisis de varianza no existe una diferencia significativa en las áreas de infección medidas entre los tres tratamientos (Control, GFP y TdTom), de igual manera los síntomas en las hojas muestran el desarrollo de necrosis en los cultivares susceptibles por lo cual se puede concluir que no se logró silenciar ToxA.
- Las pruebas *in vitro* en un asilado de ptr resistente a higromicina no mostraron una reducción en el crecimiento del hongo, por lo cual se puede concluir que no se logró silenciar la resistencia a Hph.

Capítulo VII Recomendaciones

- Se debe verificar que tanto el agente patógeno como la planta sean capaces de absorber los dsRNA antes de iniciar las pruebas de silenciamiento génico.
- Se recomienda silenciar un gen vital para el patógeno en donde se pueda observar un cambio en el fenotipo para poder verificar el funcionamiento de los dsRNA
- Una alternativa para verificar la captación de los dsRNA por parte de la planta es mediante el uso de un marcador fluorescente que se una a los dsRNA y pueda ser observado mediante microscopía
- Es recomendable sintetizar dsRNA para su uso *in planta* mediante la producción en *E. coli* para poder obtener un gran volumen debido al alto precio de los kits para su síntesis y el poco volumen que se obtiene en cada reacción.
- Se necesita establecer un buen método de entrega de los dsRNA como el uso de carbón dots para la formación de nanocomplejos que permitan la entrada de los dsRNA y eviten su degradación por parte de nucleasas en la planta.

Capítulo VIII Bibliografía

- Abdullah, S., Sehgal, S. K., Ali, S., Liatukas, Z., Ittu, M., & Kaur, N. (2017). Characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* (tan spot of wheat) races in Baltic states and Romania. *The plant pathology journal*, 133.
- Aghamiri, A., Mehrabi, R., & Talebi, R. (2014). Genetic Diversity oh *Pyrenophora tritici-repentis* Isaolates, the Causal Agent of Wheat Tan Spot Disease from Northern Iran.
- Ali, S., & Francl, L. J. (2003). Population race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* prevalent on wheat and noncereal grasses in the Great Plains. *Plant Disease*, 418-422.
- Bennett, M., Deikman, J., Hendrix, B., & landolino, A. (2020). Barriers to Efficient Foliar Uptake of dsRNA and Molecular Barriers to dsRNA Activity in Plant Cells.
- Billmyre, R. B., Calo, S., Feretzaki, M., Wang, X., & Heitman, J. (2014). RNAi Function, Diversity, and Loss in the Fungal Kingdom.
- Carver, B. F. (2009). *Wheat Science and trade*. Wiley-Blackwell.
- Čepin, U. (2017, November 15). *BioSistemika*. Retrieved from Understanding qPCR efficiency and why it can exceed 100%: <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/>
- Ciuffetti, L. M., Manning, V. A., Pandelova, I., Faris, J. D., Friesen, T. L., Strelkov, S. E., . . . Figueroa, M. (2014). *Pyrenophora tritici-repentis*: A plant pathogenic fungus with global impact.

Dalakouras, A., Jarausch, W., Buchholz, G., Bassler, A., Braum, M., Manthey, T., . . . M., W. (2018). Delivery of Hairpin RNAs and Small RNAs Into Woody and Herbaceous Plants by Trunk Injection and Petiole Absorption. *Front. Plant. Sci.*

Dalakouras, A., Wassenegger, M., McMillan, J. N., Cardoza, V., Maegele, I., Dadami, E., . . . Wassenegger, M. (2016). Induction of Silencing in Plants by High-Pressure Spraying of In vitro-Synthesized Small RNAs. *Front Plant Sci.*

Eamens, A., Wang, M. B., Smith, N. A., & Waterhouse, P. M. (2008). RNA Silencing in Plants: Yesterday, Today, and Tomorrow. *Plant physiology*, 147(2), 456-468.

Encyclopedia of Food and Culture . (2020, August 11). *The Natural History of Wheat* . Retrieved from Encyclopedia of Food and Culture : <https://www.encyclopedia.com/food/encyclopedias-almanacs-transcripts-and-maps/natural-history-wheat>

Faris, J., Liu, Z., & Xu, S. (2013). Genetics of tan spot resistance in wheat.

Gozde S. Demirer¹, H. Z., Pinals, R. L., & Chang, R. (2020). Carbon nanocarriers deliver siRNA to intact plant cells for efficient gene knockdown.

Kariyawasam, G. K., Hussain, W., Easterly, A., Guttieri, M., Belamkar, V., Poland, J., & Liu, Z. (2018). Identification of quantitative trait loci conferring resistance to tan spot in a biparental population derived from two Nebraska hard red winter wheat cultivars. *Molecular Breeding*, 1-12.

Kettles, G. J., Hofinger, B. J., Hu, P., Bayon, C., J. J., Balm, D., . . . Kanyuka, K. (2019). sRNA Profiling Combined With Gene Function Analysis Reveals a Lack of

Evidence for Cross-Kingdom RNAi in the Wheat – *Zymoseptoria tritici* Pathosystem.

Lamari, L., Strelkov, S. E., Yahyaoui, A., Orabi, J., & Smith, R. B. (2003). The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat. *Phytopathology*, 93(4), 391-396.

Manning, V. A., Chu, A. L., Scofield, S. R., & Ciuffetti, L. M. (2010). Intracellular expression of a host-selective toxin, ToxA, in diverse plants phenocopies silencing of a ToxA-interacting protein, ToxABP1.

Manning, V. A., Chu, A. L., Steeves, J. E., Wolpert, T. J., & Ciuffetti, L. M. (2009). A host-selective toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*, Ptr ToxA, induces photosystem changes and reactive oxygen species accumulation in sensitive wheat.

Manning, V., & Ciuffetti, L. (2015). Necrotrophic Effector Epistasis in the *Pyrenophora tritici-repentis*-Wheat interaction.

NDSU Extension Service. (2016). Fungal Leaf Spot Diseases of Wheat: Tan spot, Septoria/Stagonospora nodorum blotch and Septoria tritici blotch.

Nevo, E. (2002). *Evolution of wild emmer and wheat improvement*. Berlin: Springer-Verlag.

Noriea, A. J., Sun, X., Bockus, W., & Bai, G. (2011). Resistance to tan spot and insensitivity to Ptr ToxA in Wheat. *Crop science*.

- Noriea, A., Sun, X., Bockus, W., & Bai, G. (2011). Resistance to Tan Spot and Insensitivity to Ptr ToxA in Wheat. *Crop science*.
- Pandelova, I., Figueroa, M., Wilhelm, L. J., Manning, V. A., Mankaney, A. N., Mockler, T. C., & Ciuffetti, L. M. (2012). Host-selective toxins of *Pyrenophora tritici-repentis* induce common responses associated with host susceptibility. *PLoS One*.
- Pérez-Amador, M. A., Ablner, M. L., De Rocher, E. J., Thompson, D. M., van Hoof, A., & LeBrasseur, N. D. (2000). Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 169–179.
- Sammons R., I. S. (2011). *US Patent No. 20110296556 A1*.
- Schreiber, L. (2005). Polar paths of diffusion across plant cuticles new evidence for an old hypothesis.
- Schwartz, S. H. (2020). Carbon dot delivery of siRNA.
- Scofield, S. R., Huang, L., Brandt, A. S., & Gill, B. S. (2005). Desarrollo de un sistema silenciador de genes inducido por virus para trigo hexaploide y su uso en el análisis funcional de la vía 1 de resistencia a la roya de la hoja mediada por Lr21. *Plant Physiology*.
- Shewry, P. R. (2009). Wheat. *Journal of experimental botany*.
- Singh, P. K., Singh, R. P., Duveiller, E., Mergoum, M. M., Adhikari, T. B., & Elias, E. M. (2009). Genetics of wheat-*Pyrenophora tritici-repentis* interactions. *Springerlink*.

- Strelkov, S., & Lamari, L. (2003). Host-parasite interactions in tan spot [Pyrenophora tritici-repentis] of wheat.
- Venske, E., Santos, R. S., Busanello, C., Gustafson, P., & Oliveira, A. C. (2019). Bread wheat: a role model for plant domestication and breeding. *BMC journal*.
- Wang, X., Jiang, N., Liu, J., Liu, W., & Liang, G. (2014). The role of effectors and host immunity in plant-necrotrophic fungal interactions.
- Wen, L. (2013). Cell Death in Plant Immune Response to Necrotrophs. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*.
- Williams, E. J., & Littlefield, L. J. (2004). Major Foliar Fungal Diseases of wheat in Oklahoma.
- Williams, P. (1993). *The world of wheat*. Winnipeg.
- Xiu-Shi Song, K.-X. G.-X.-M., Hou, Y.-P., Duan, Y.-B., Wang, J.-X., Yu, N., & Zhou, M.-G. (2018). Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing.

