

AVANCES EN EL CONOCIMIENTO GENÓMICO Y TRANSCRIPTÓMICO DE LA INTERACCIÓN *Musa - Pseudocercospora fijiensis* COMO HERRAMIENTA EN LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES FÚNGICOS DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD

Javier Torres¹, Reis O², JD. Sánchez³, J. Morales⁴, Arango R⁴.

¹ javier.torres@colmayor.edu.co - Docente Facultad de Ciencias de la Salud – COLMAYOR, Investigador Grupo de Biotecnología Vegetal Unalmed-CIB.

² Laboratorio de tecnología de Alto Desempeño – Universidad de Campinas

³ Cenibanano 2013 - 2017

⁴ Docente Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín

Santa Marta, Mayo de 2024



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN

CiB Corporación para
Investigaciones
Biológicas
La ciencia al servicio de la vida



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

cenibanano
centro de investigaciones del banano
augura



El conocimiento
es de todos

Minciencias


LaCTAD


INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA
COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

INTRODUCCIÓN

- El Banano es el segundo producto alimenticio con mayor importancia económica en la balanza comercial de Colombia después del café (FAOSTAT 2021) .
- La producción nacional se encuentra concentrada en las regiones de Urabá y Magdalena con un total de 53.318 hectáreas sembradas (AUGURA, 2023).
- Colombia exportó 108 millones de cajas de banano por un valor de 892 millones de US dólares en 2022 (AUGURA 2023).



Figura 1. Planta de banano.

- Su centro de origen y diversidad se encuentra ubicado en el sudeste asiático y en la región oeste del Pacífico.
- Los reportes más antiguos de cultivo datan de más de 2500 años en la India (Robinson & Saúco, 2010; Daniells et al., 2001; Simmonds, N.W. 1962).
- Dos especies diploides, *M. acuminata* Colla (genoma A) y *M. balbisiana* Colla (genoma B), son los ancestros comunes de todos los cultivares triploides y tetraploides conocidos (Perrier et al. 2011).

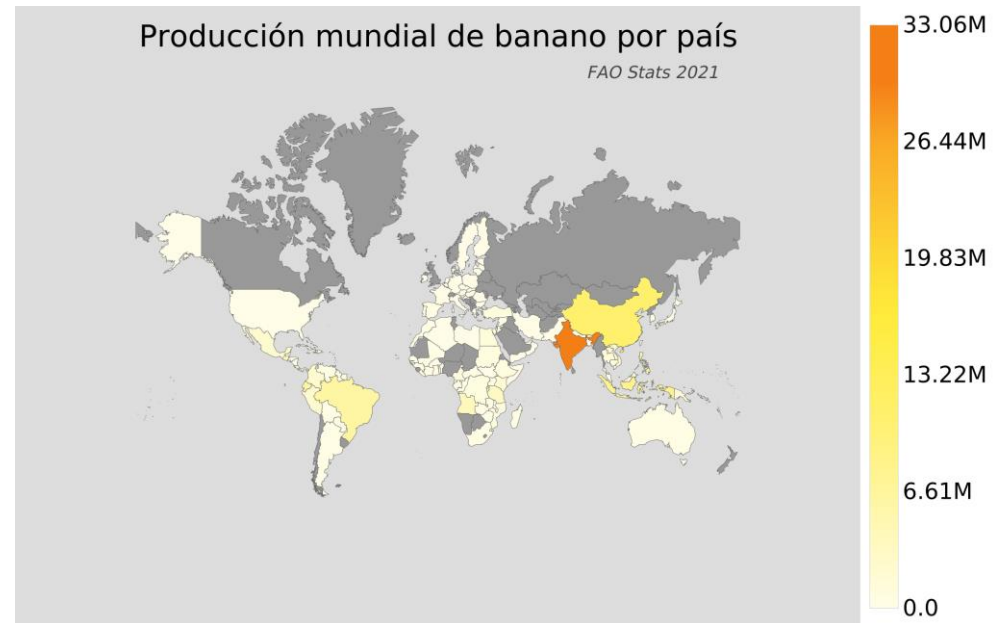


Figura 2. producción mundial de banana.



<https://www.seedsdelmundo.com/>

Figura 3. *Musa balbisiana*.

Chang et al. 2017

EL COMPLEJO SIGATOKA

- El complejo Sigatoka está conformado por tres enfermedades causadas por:
 - *Pseudocercospora fijiensis*
 - *Pseudocercospora musae*
 - *Pseudocercospora eumusae*
- El control de estos patógenos representa grandes inversiones para el sector bananero a nivel mundial.
- El estudio de la estructura y contenido genómico de dichos patógenos se ha estudiado poco, al igual que los mecanismos de interacción planta-microorganismo.



Figura 4. Especies del complejo Sigatoka.

P. fijiensis



Arango et al. 2016

- Primer genoma reportado (74.1 MB)
- 13.107 proteínas predichas
- 172 SSP encontradas

Stergiopoulos et al. 2010 & 2014

- Avr4 – proteína de unión a quitina (6 isoformas)
- Ecp2 – Proteína Extracelular

P. eumusae



P. musae

Chang et al. 2016

- Primer genoma reportado *P. eumusae* (47.1 MB)
- Primer genoma reportado *P. musae* (60.44 MB)
- 10.632 proteínas predichas – *P. eumusae*
- 11.064 proteínas predichas – *P. musae*



Caracterización del genoma de *P. fijiensis*, reportando un tamaño de 74 MB para los aislamientos CIRAD86 y CIRAD 139A, con un total de 13.107 modelos génicos y 172 genes codificantes para SSPs (Proteínas Pequeñas Secretadas) (Arango et al. 2016)

Caracterización inicial de los genomas de *P. musae* (60.4 MB) y *P. eumusae* (47.12 MB) (Chang et al. 2016).

Obtención de la secuencia del genoma mitocondrial de *P. fijiensis* (Arcila et al. 2021).

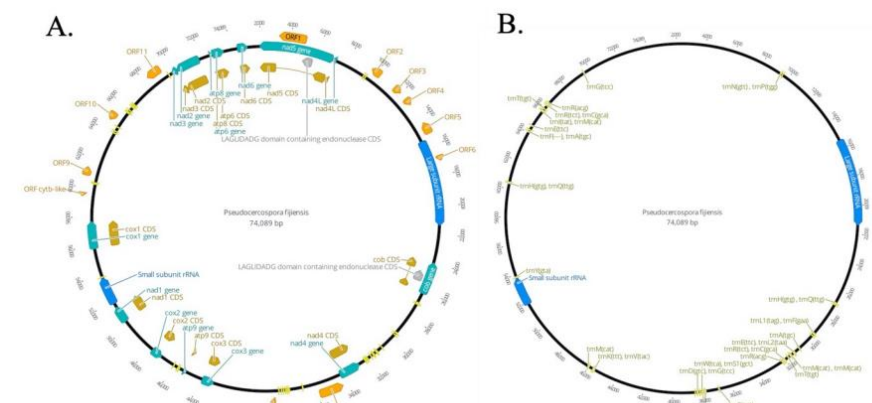


Figura 5. Mapa circular del genoma mitocondrial de *P. fijiensis* (Arcila et al. 2021).

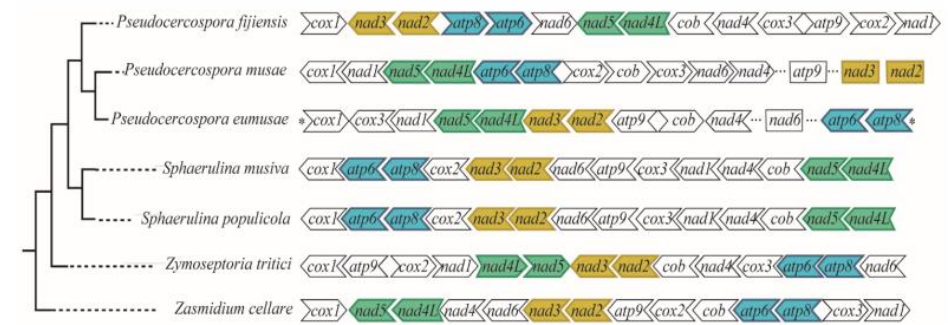


Figura 6. Comparación de estructura génica mitocondrial de *P. fijiensis* (Arcila et al. 2021).



DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y DISPERSIÓN

- *Pseudocercospora fijiensis* se ha distribuido en todas las zonas productoras de banano y plátano alrededor del mundo, desde su primera descripción en 1963 (Rhodes, P. L. 1964).

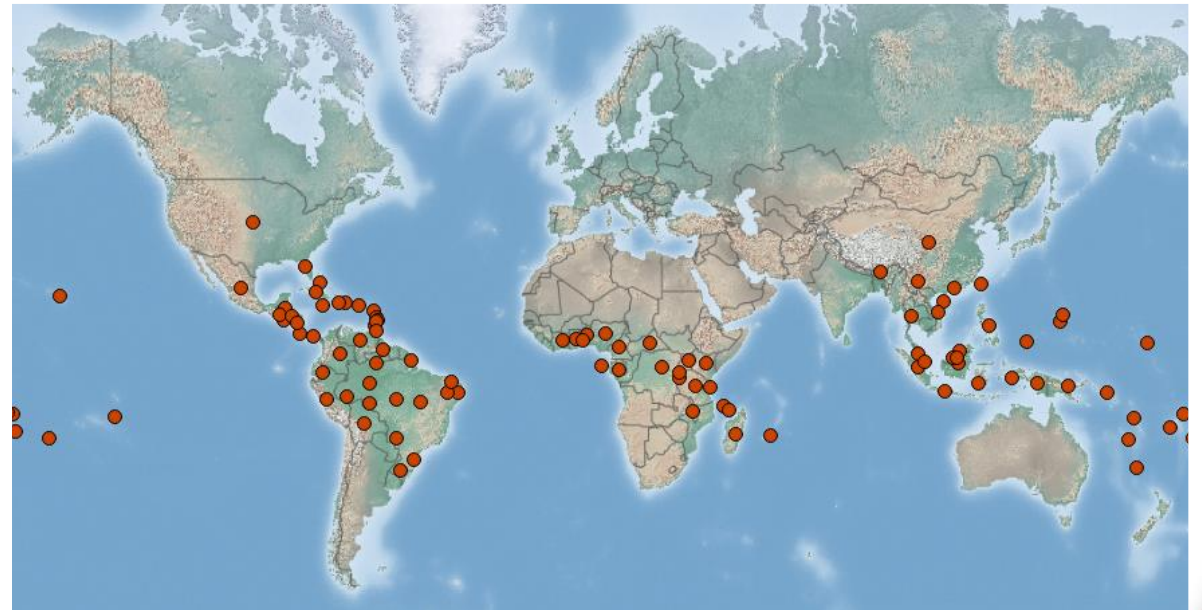


Figura 7. Mapa de distribución de *Pseudocercospora fijiensis*.
Fuente: CABI 2019

- El estudio de la Sigatoka negra se ha centrado principalmente en la búsqueda de metodologías de control principalmente mediante la aplicación de fungicidas químicos protectantes y sistémicos (Arango, 2002; Orozco, et. al., 2002.; Corrales, et al., 2002.; Fraaije et al., 2007).
- Con un estudio más profundo y la aplicación de principios y técnicas de biología molecular y genómica podría lograrse una comprensión más básica y profunda de la enfermedad (Canto, et al. 2007).



Figura 8. Fumigación tradicional Sigatoka negra.
Fuente:https://youtu.be/E7mB9pQL4Bw?si=V41dcYh5Vq037lr_

INTERACCIÓN BANANO- *Pseudocercospora fijiensis*

- En las interacciones incompatibles la resistencia puede darse de dos maneras: constitutiva e inducida.
- Una fracción importante del secretoma de los microorganismos comprende enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas, ligninasas, celulasas, glucosil hidrolasas, esterases, etc.
- Douaiher et al (2007), compararon en *Mycosphaerella graminícola* (*Zymoseptoria tritici*) la producción de proteínas extracelulares en dos cepas con diferente grado de patogenicidad, en particular la producción de xilanasas fueron correlacionadas con la patogenicidad de las cepas.

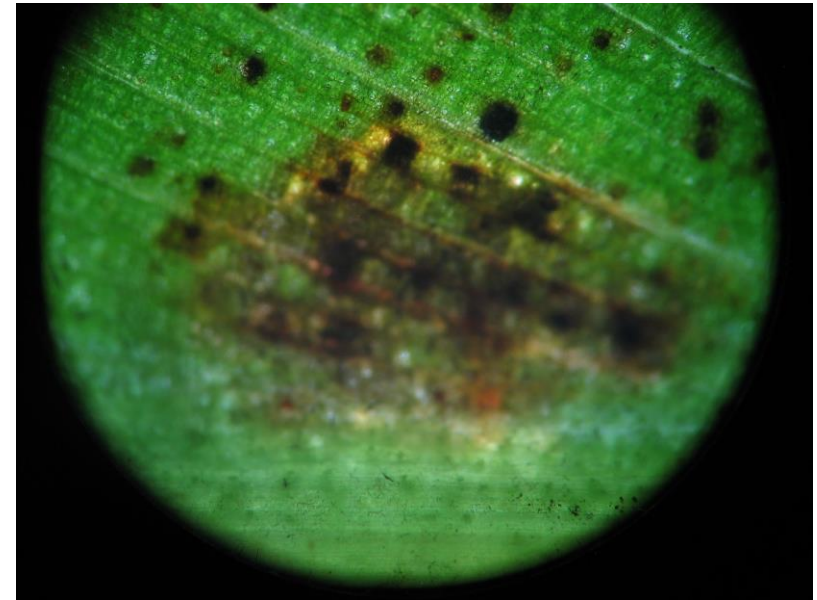


Figura 9. Infección en plantas susceptibles de banano (Torres et al 2013).

A pesar de la importancia que tienen los cultivos de banano y plátano a nivel mundial, la mayoría de los aspectos de la interacción planta – patógeno son desconocidos.



GENÓMICA

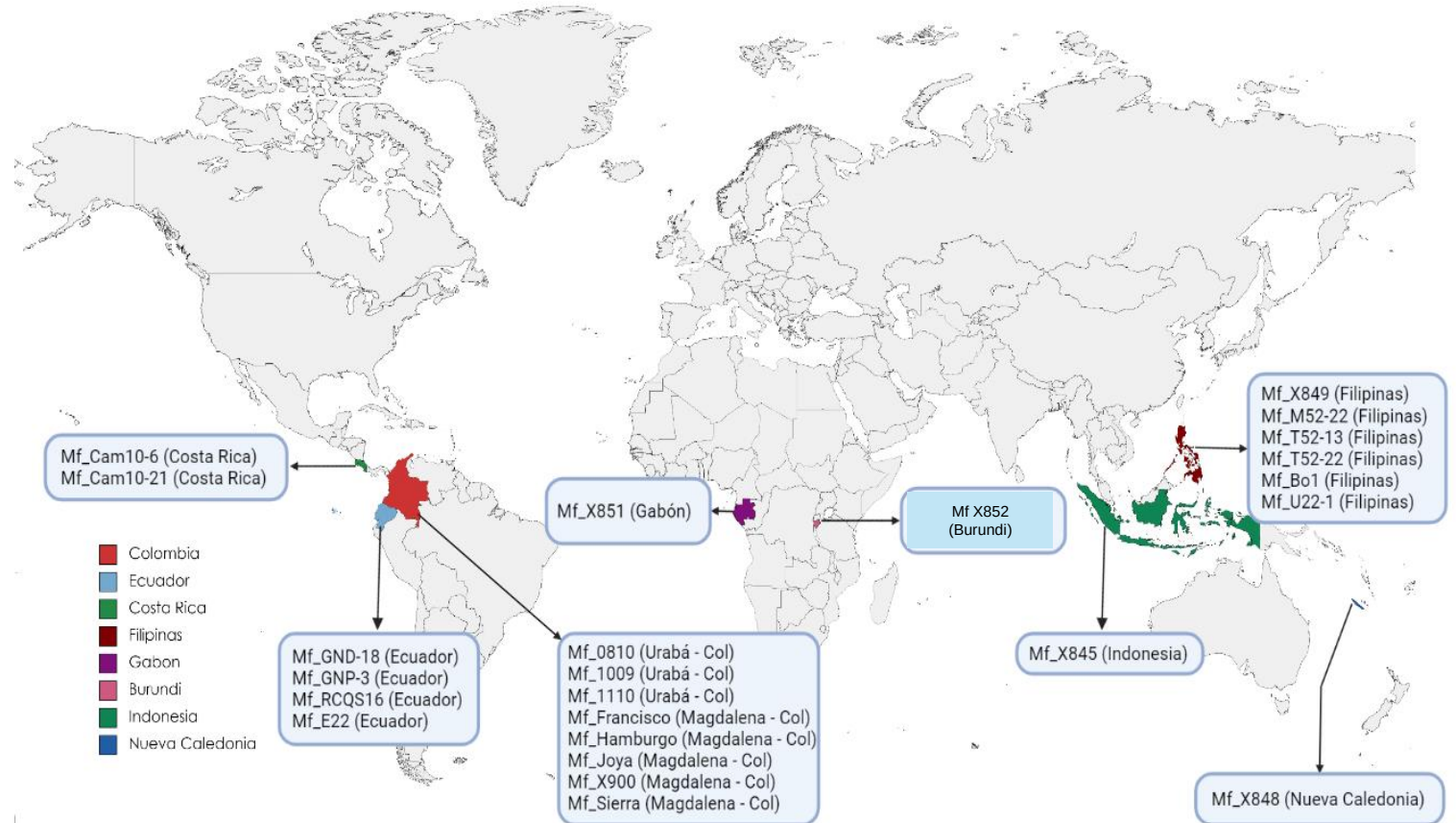
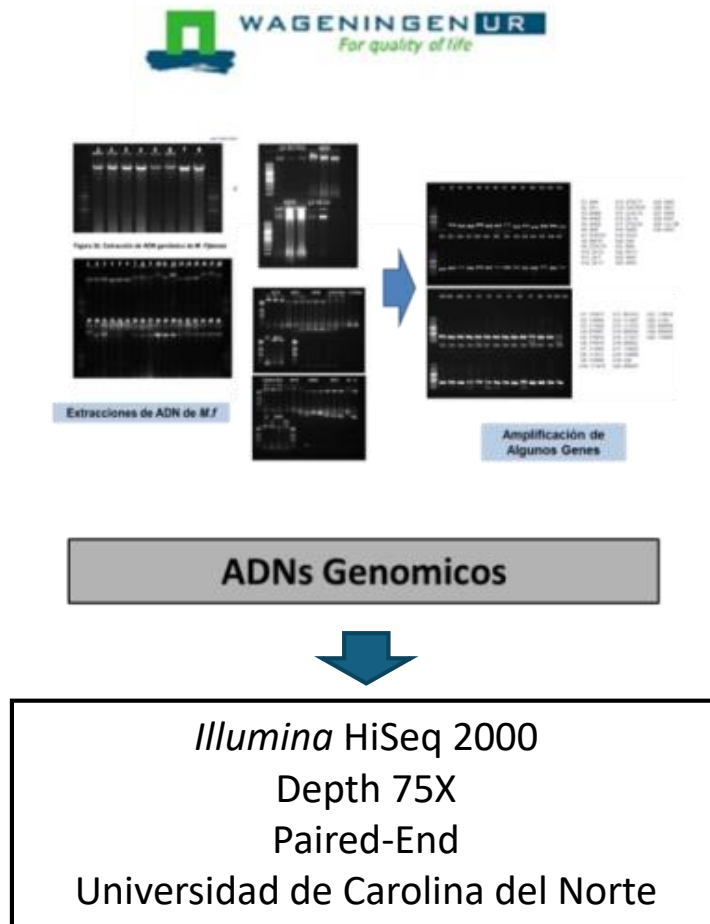
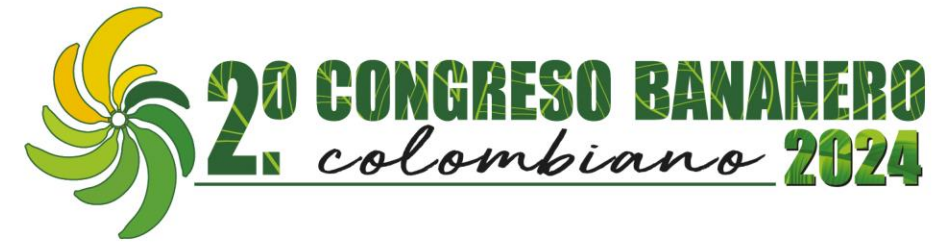
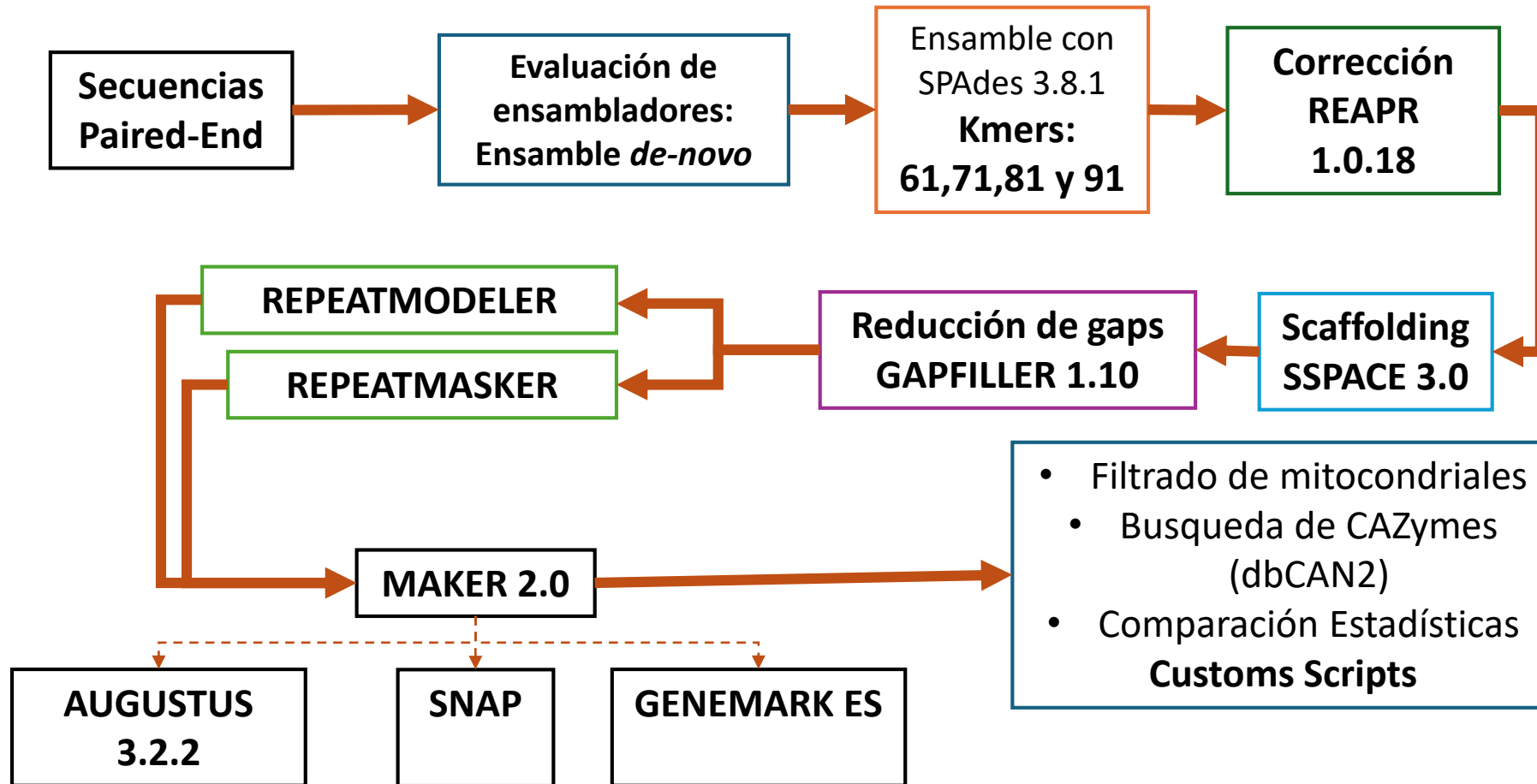
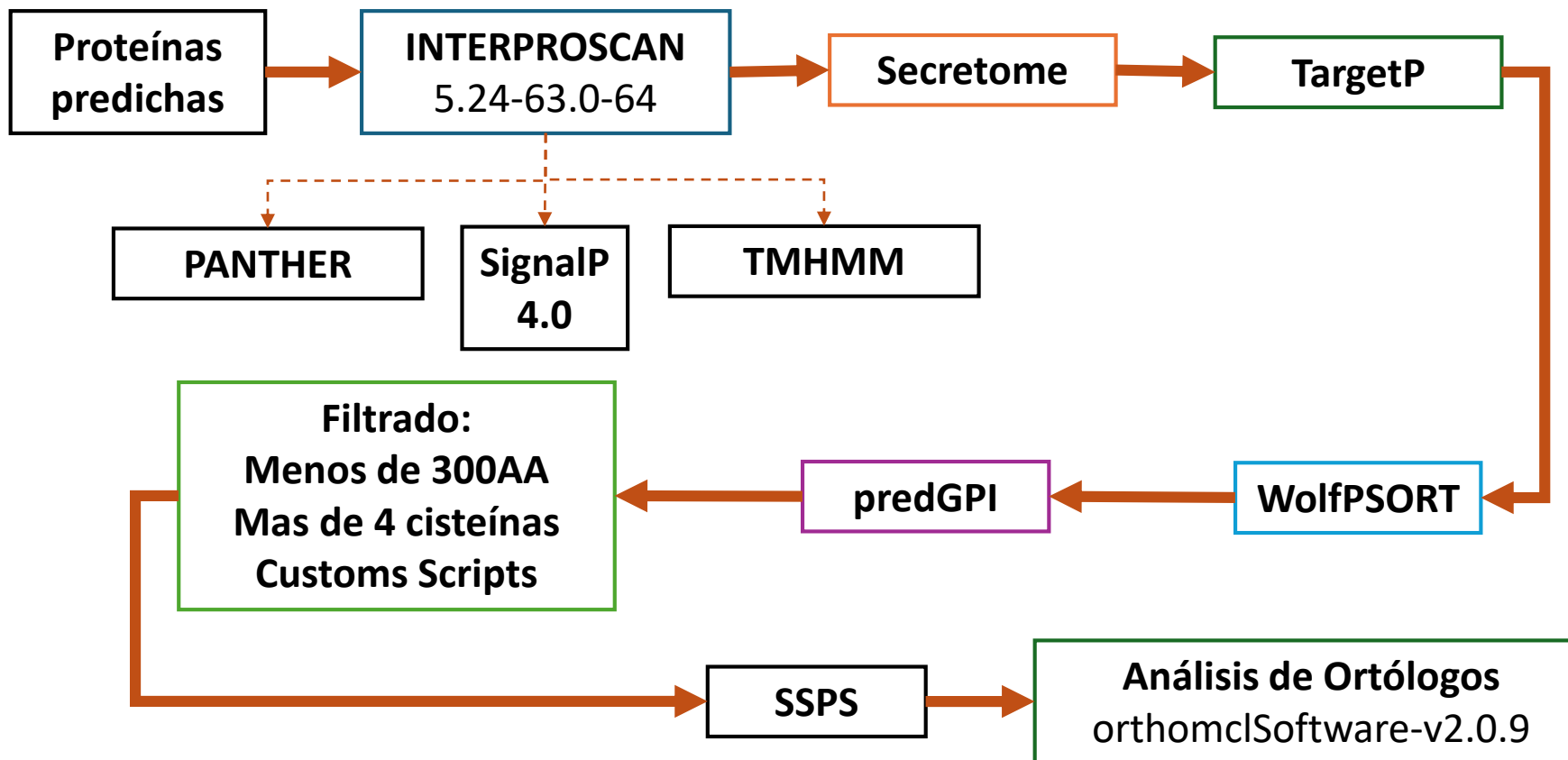


Figura 10. Distribución geográfica de los aislamientos del complejo Sigatoka. ●

Pipeline de Análisis de *secuencias* genómicas



Pipeline Obtención de proteínas secretadas y SSPs



Análisis filogenéticos



Secuencias:
• ITSs

PCR en Silico

Secuencias:

- Ef1
- G3PD
- ITS, 26s, 5.8s, 18s, Actina, TUBULINA, calmodulina

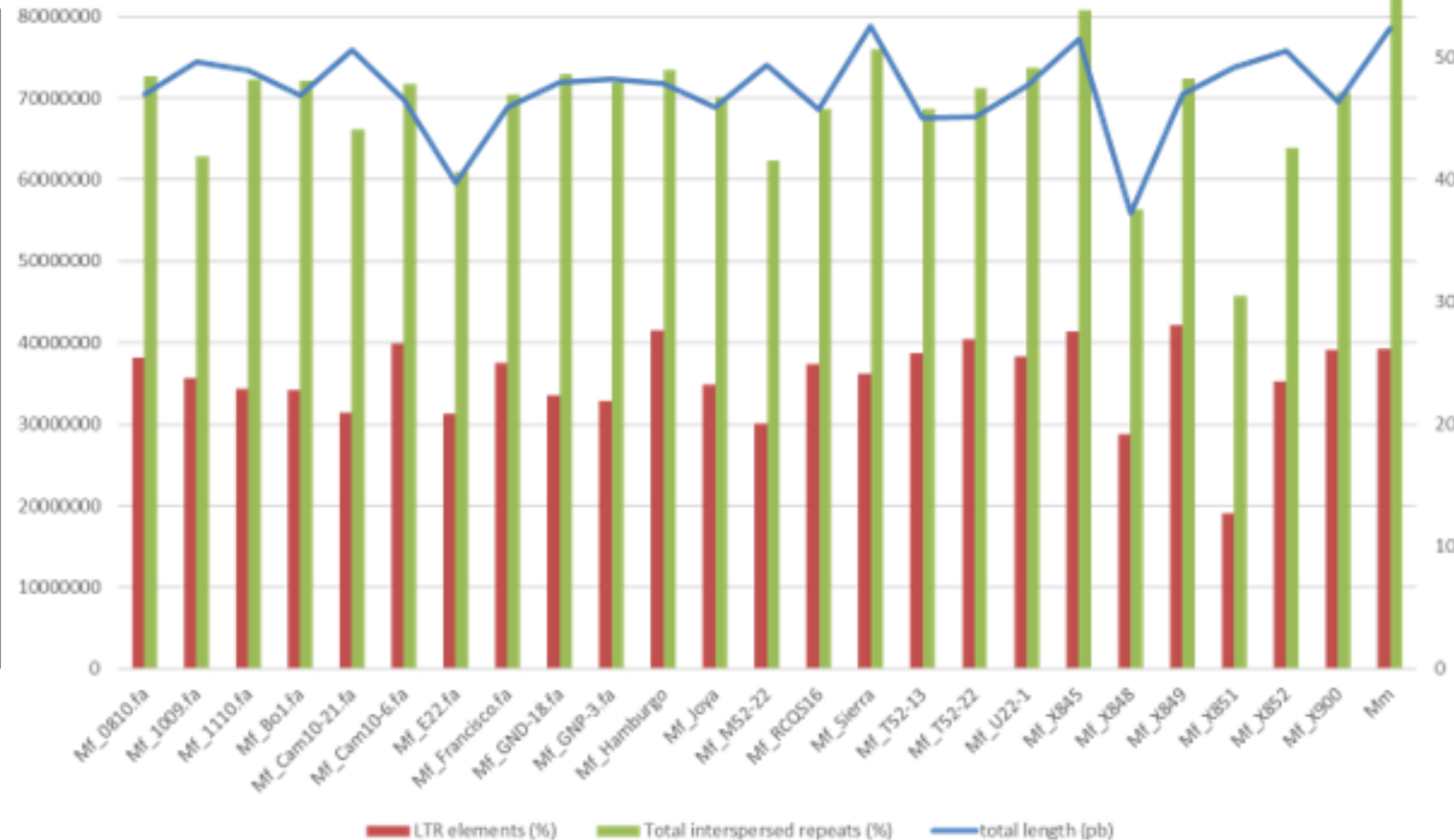
Secuencias Concatenadas

1. Predicción de modelo
2. Análisis de Máxima verosimilitud



Molecular Evolutionary
Genetics Analysis

Tamaño de genoma (pb)



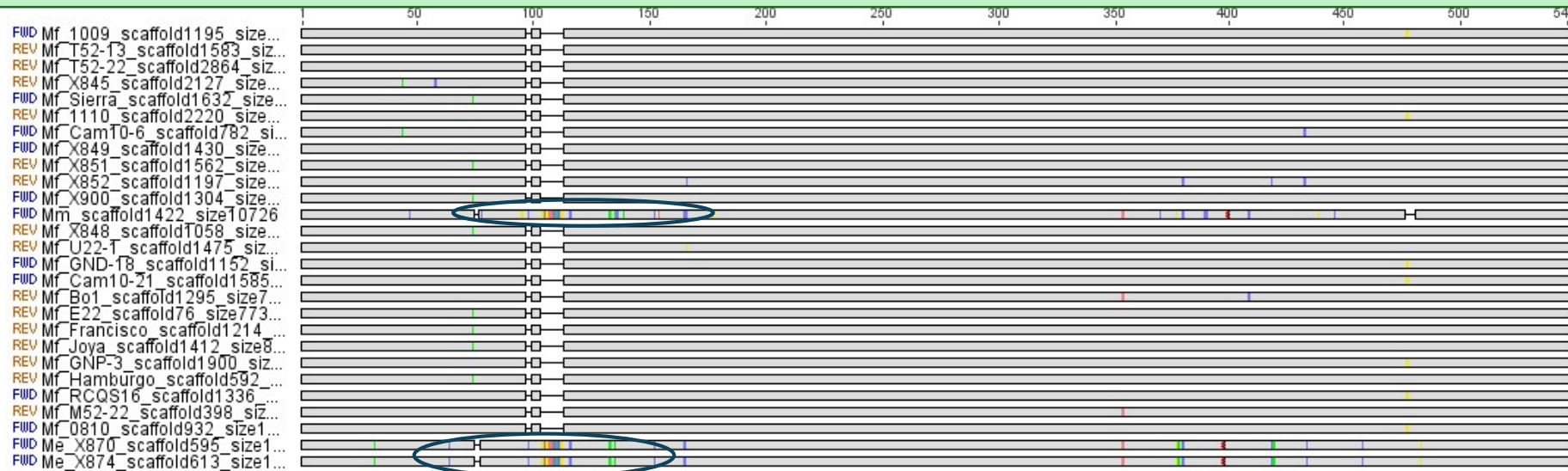
Se encontró una relación directamente proporcional entre el total (%) de repeticiones intercalados y el tamaño de los genomas obtenido.

Figura 11. comparación de tamaño de los genomas ensamblados vs regiones repetidas.

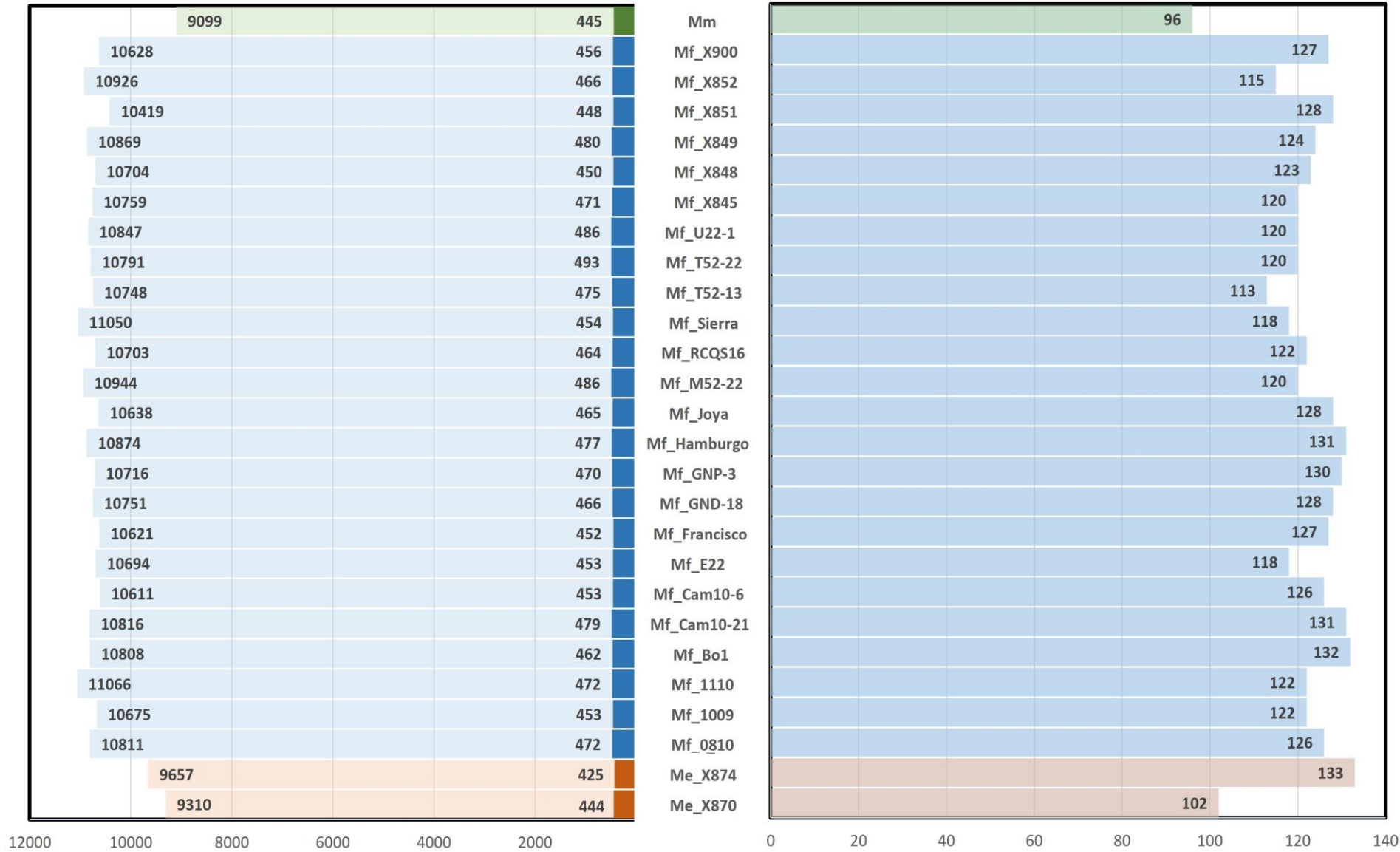
- Variaciones de tamaño debido a repeticiones
- *P. eumusae* en tamaño cercano al reportado 47,12 MB - (Chang et al. 2016)
- Variación del 33% en tamaño de *P. musae* – 60,44 MB (Chang et al. 2016)

Comparación de ITSs en aislamientos del complejo Sigatoka

Se evidencian pequeñas diferencias entre los aislamientos de *P. fijiensis* y mayor similitud entre las secuencias provenientes de *P. musae* y *P. eumusae*, similar a lo obtenido por Chang et al. 2016



Mayor similitud de *P. eumusae* y *P. musae*.



Se denota una diferencia significativa en la cantidad vs al reportado, esto se podría justificar por la diferencia en los pipelines empleados en los dos trabajos, pero se destaca la similaridad en la cantidad de SSPs para todos los aislamientos.

Figura 12. Resultados de la predicción de proteínas SSPs en los genomas ensamblados

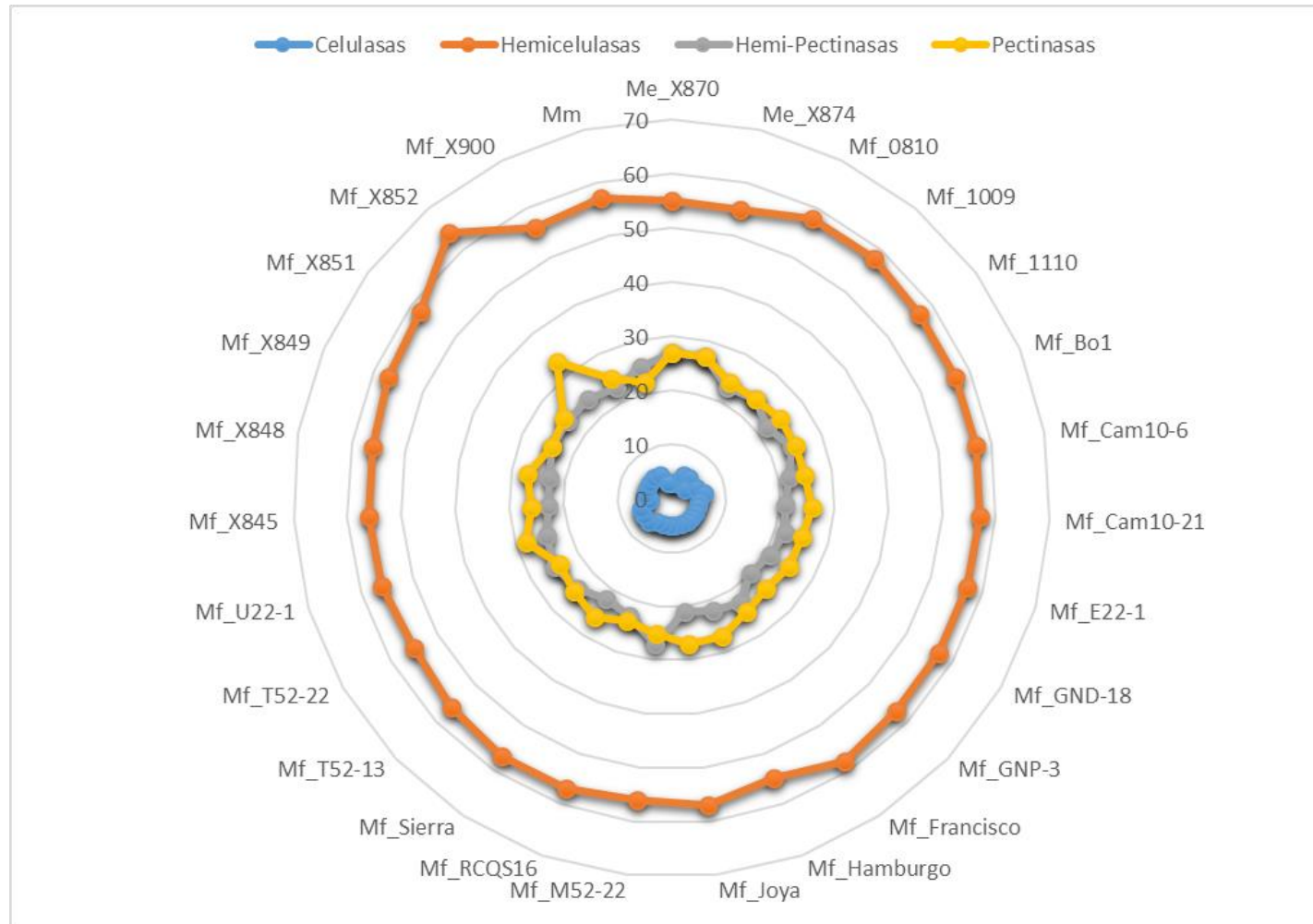
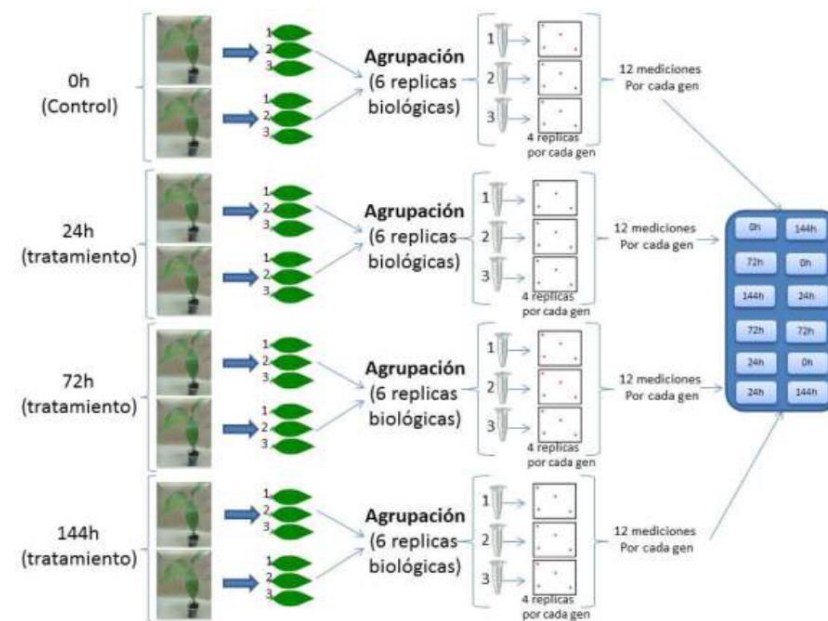


Figura 13. CAZymes



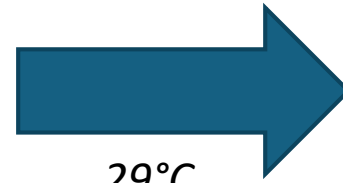
Figura 15. Plantas de banano *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides* var. calcutta 4 (Musa AA) de 25 cm de alto



Rodríguez, H. 2012



Inoculación por aerógrafo
 1×10^6 conidias por hoja

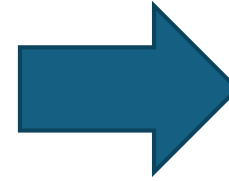


29°C
% HR 95 %
12 h luz/12

ARN total
Concert Plant RNA
Reagent (Invitrogen)

0, 24, 72 y 144
Horas post
infección (HPI)

Rodríguez, H. 2012



Librerías de cDNA
kit TransPlex Whole
Transcriptome
Amplification (Sigma,
USA)



Microarreglo
Roche Nimblegen
14,872 Unigenes
4 sondas

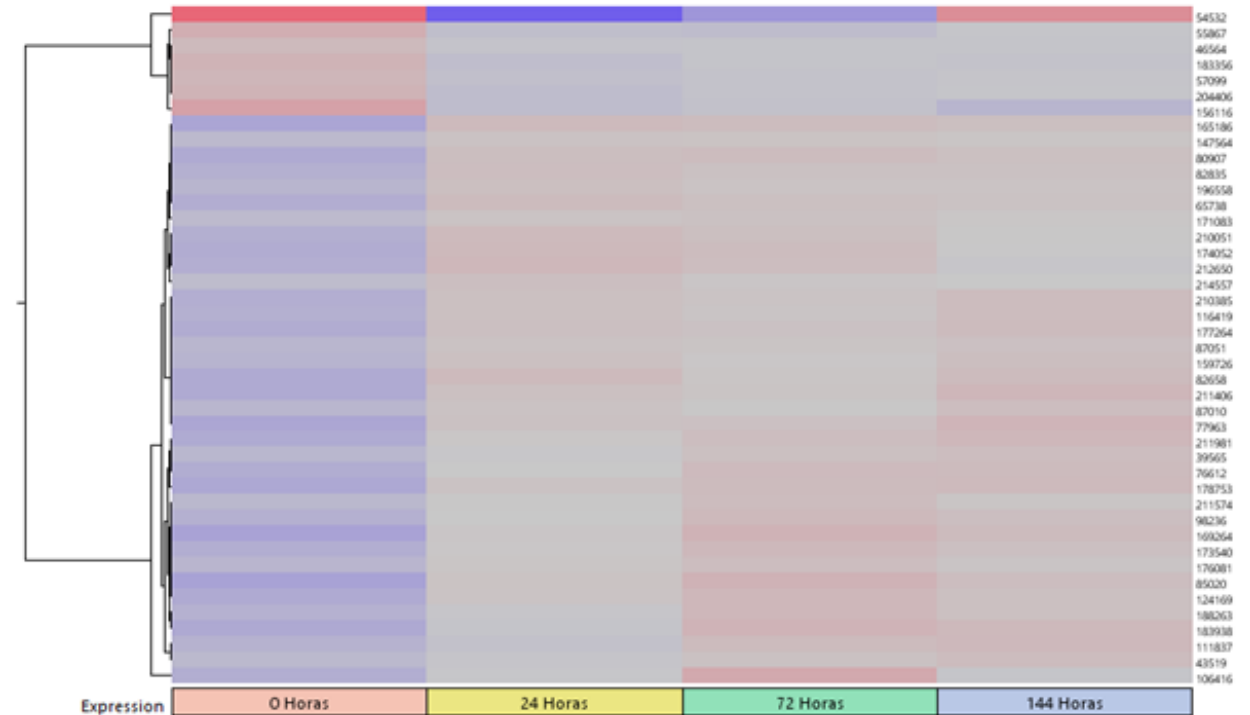
Análisis de Microarreglo

- Se encontraron 760 genes con expresión diferencial.
- En el genoma de *M. fijiensis* hay 220 SSPs
- 12 SSPs con expresión diferencial.

TIEMPO	GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS	SSPS DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS
24 horas	218	4
72 horas	308	4
144 horas	288	5

Tabla 1. Información obtenida a partir del microarreglo

Heatmap del análisis de los genes diferencialmente expresados en los 4 tiempos post infección



24 Horas	72 Horas	144 Horas
SSP148	SSP221	SSP221
SSP186	SSP222	SSP148
SSP085	SSP223	SSP186
SSP109	SSP149	SSP159
SSP070	SSP040	SSP133
		SSP040

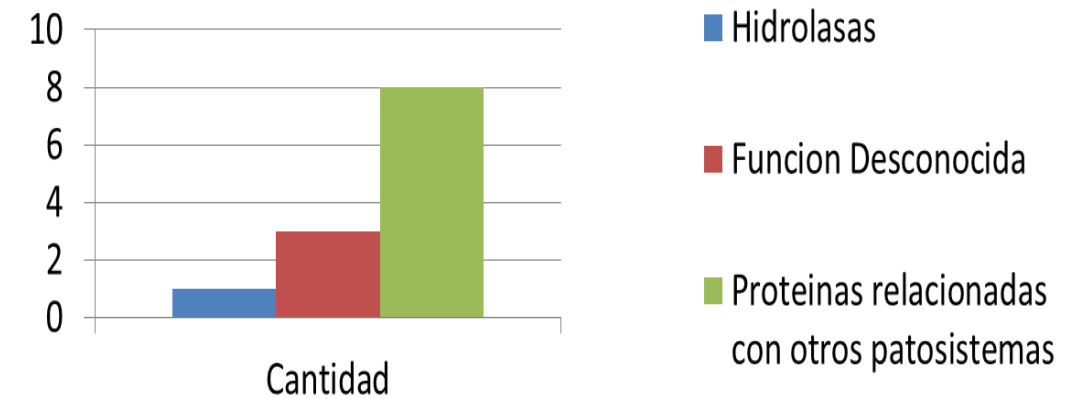


Tabla 2. SSPs Expresadas diferencialmente en la interacción *Musa* (Calcutta 4) – *P. fijiensis*

FUNCIÓN	CANTIDAD GENES	COD.
Desarrollo Ascosporas	1	Gen MF-DASC01
Pared Celular	2	Gen MF-DPCEL001
		Gen MF-DPCEL002
Desarrollo de Micelio	4	Gen MF-DMC001
		Gen MF-DMC002
		Gen MF-DMC003
		Gen MF-DMC004
Patogénesis	1	Gen MF-PAT001

Tabla 3. Otros Candidatos

Validación Funcional de Genes

Construcción de vectores de transformación para *P. fijiensis*

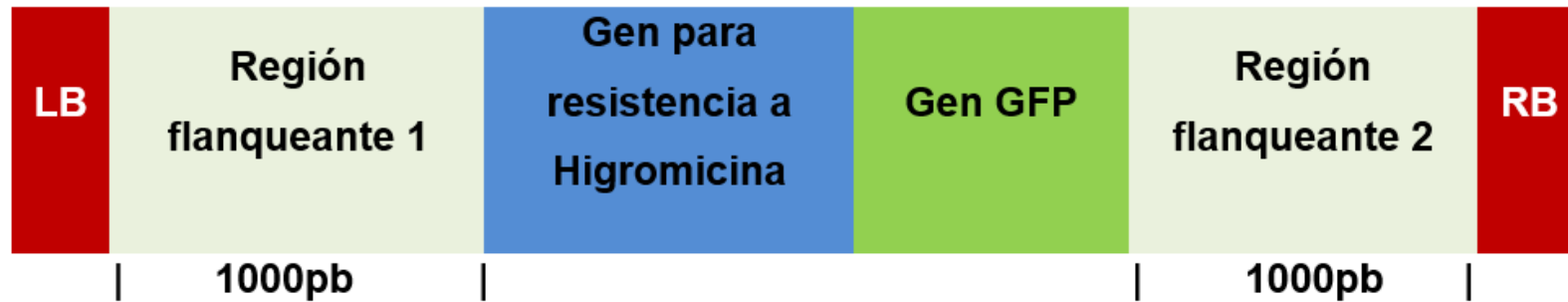


Figura 14. Estructura general del casete de transferencia para el desarrollo de nocaouts de *P. fijiensis*

Cultivo de *A. tumefaciens*
OD₆₀₀ de 0.3



A.

Mezcla de
Agrobacterium
y suspensión
micelar en una
proporción 1:1
vol/vol.



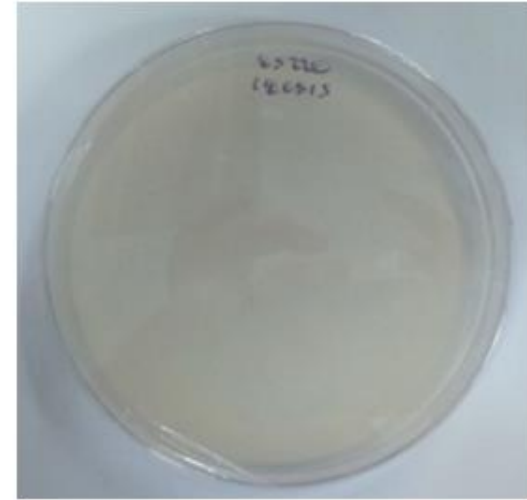
B.

Plateado en membranas de
nylon, puestas en cajas de
medio IM sin
suplementación, en
oscuridad por 48 h a 28 °C.



C.

Medio PDA
suplementado con
Higromicina (50 mg/L) y
cefotaxime (200 mg/L).
15 y 30 días



D.

Figura 15. Proceso de generación de nocaúts de *P. fijiensis*. A. Inoculo de *A. tumefaciens*; B. Suspensión micelar; C. Co-cultivo; D. Regeneración.

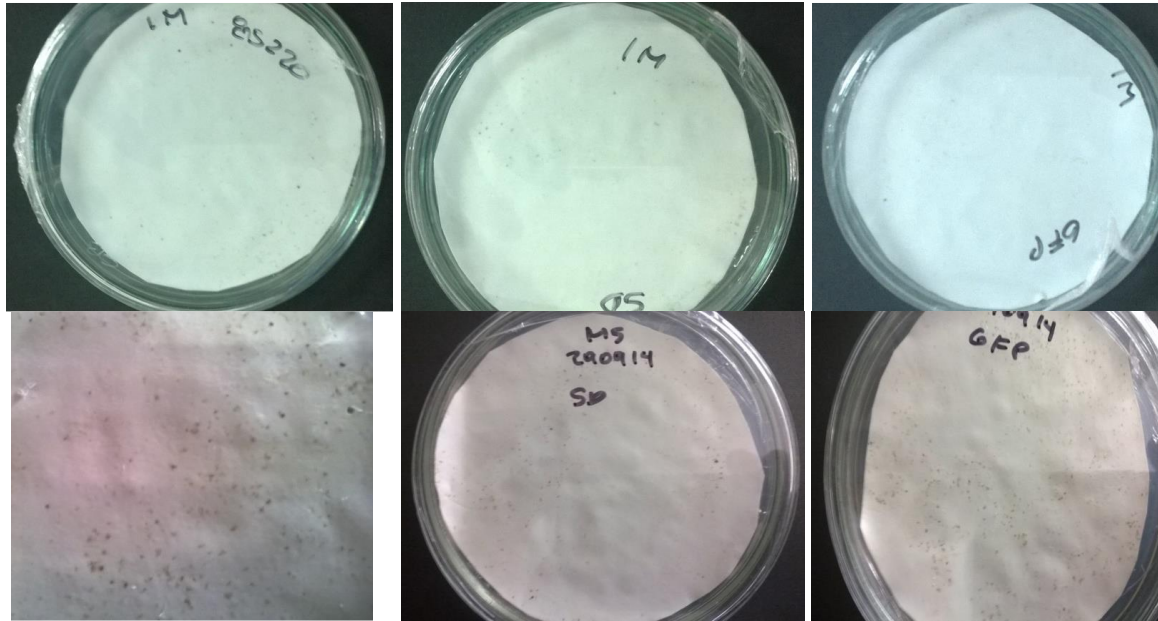


Figura 16. Regeneración de colonias transformadas 30 días posinoculación.

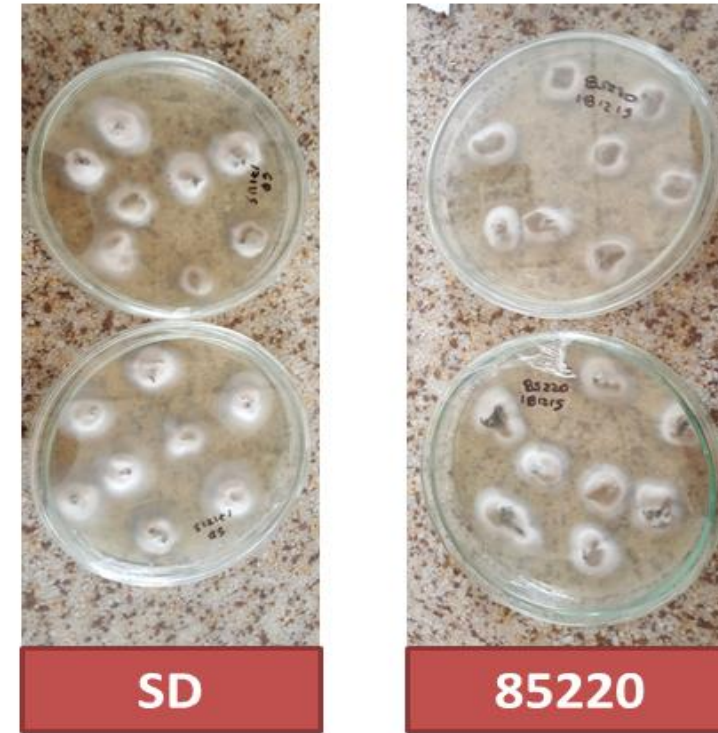
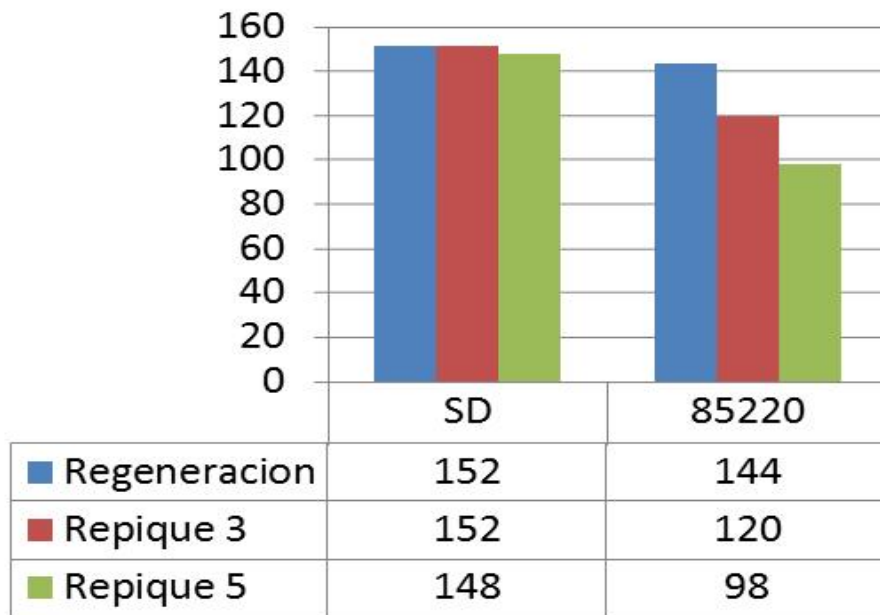
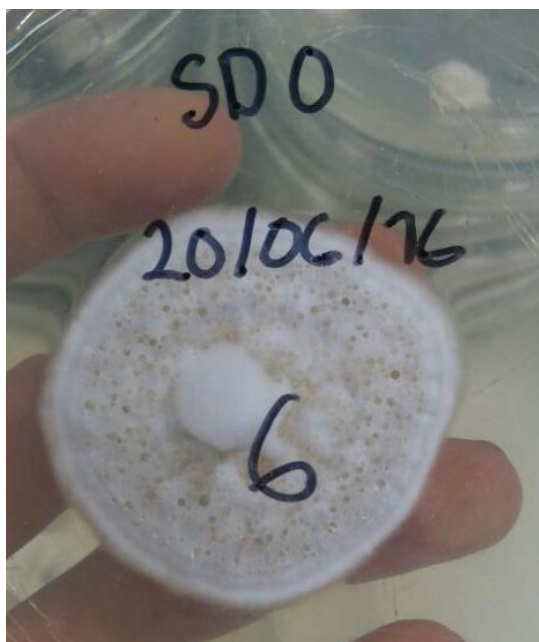
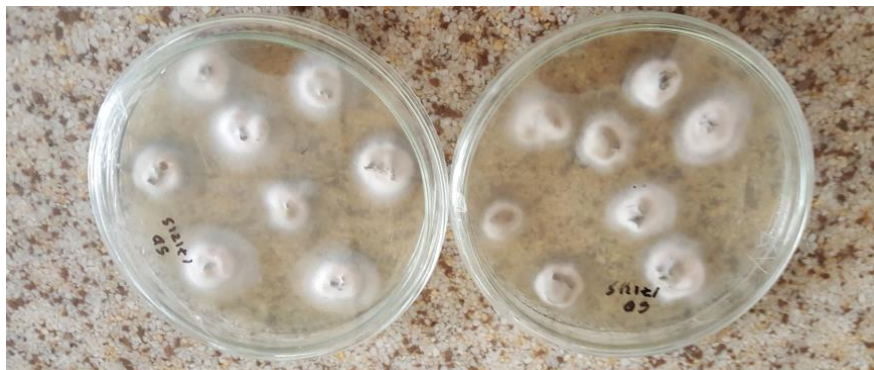


Figura 17. Resultados de la transformación de *P. fijiensis* para la obtención de nocautes para los genes SD y 85220.



CONCLUSIONES

- Se encontraron diferencias significativas en el tamaño de los genomas de los aislamientos de *P. fijiensis* secuenciados, asociadas con la abundancia de regiones altamente repetitivas, fenómeno reportado en otros hongos ascomicetos, sin afectar la cantidad de SSPs y proteínas secretadas demostrando la conservación de los mecanismos de patogenicidad.
- Se evidencia una separación clara del origen filogenético de los aislamientos de las dos principales zonas productoras de banano en Colombia, Urabá con relación con aislamientos de Centroamérica y Suramérica; Santa Marta con relación con aislamientos de África, Oceanía y Asia, desmontando el efecto de las acciones humanas sobre el efecto fundador y una influencia directa del el flujo del material vegetal entre regiones productoras.

- Se encontraron genes que pueden ser importantes en el proceso infectivo del hongo sobre plantas de banano, genes como las proteínas secretadas (SSPs), genes asociados con la síntesis de la melanina, proteasas secretadas, hidrolasas e hidrofobinas; estos genes pueden ser empleados en posteriores estudios funcionales y de mejoramiento genético de variedades comerciales de banano.
 - La metodología de disrupción génica mediante *Agrobacterium tumefaciens* puede llegar a ser útil para la evaluación funcional de genes en hongo, pero su baja eficiencia hace necesario el desarrollo de metodología que empleen sistema de edición génica.
- 

PERSPECTIVAS:

- Es importante avanzar con el estudio de otros grupos específicos de genes.
- Se debe mejorar la calidad del ensamble de los genomas, esto se puede realizar mediante el enriquecimiento de las presentes secuencias con otras obtenidas por técnicas de secuenciación de reads largos, como PacBio y Oxford Nanopore.
- Se requiere de el establecimiento de una metodología precisa para la secuenciación del transcriptoma de *P. fijiensis* durante la infección de plantas de banano
- Se deben realizar ensayos con plataformas más específicas para el noqueo de genes como CRISPR-CAS.

Agradecimientos



Financiación



Ciencias





*Grupo de Biotecnología Vegetal
UNALMED-CIB*

GRACIAS POR SU ATENCIÓN

