

## EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL PROCESO DE INFECCIÓN DE *Colletotrichum truncatum* (SCHWEIN.) EN PAPAYA MARADOL

### GENE EXPRESSION DURING THE INFECTION PROCESS OF *Colletotrichum truncatum* (SCHWEIN.) IN MARADOL PAPAYA

Indira Rojo-Báez<sup>1</sup>, Raymundo S. García-Estrada<sup>2</sup>, Josefina León-Félix<sup>2</sup>, J. Adriana Sañudo-Barajas<sup>2</sup> y Raúl Allende-Molar<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Biología, Culiacán, Sinaloa, México. <sup>2</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Coordinación Culiacán, Culiacán, Sinaloa, México. <sup>3</sup>Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Tuxpan, Veracruz, México.

\*Autor de correspondencia (raallende@uv.mx)

#### RESUMEN

*Colletotrichum truncatum* (Schwein.) es uno de los hongos patógenos causantes de antracnosis en papaya (*Carica papaya* L.). El objetivo de este estudio fue determinar los cambios en la expresión de genes relacionados con la patogenicidad de *C. truncatum* en su interacción con hojas de papaya Maradol. Las esporas del hongo se inocularon en hojas escindidas; se analizaron muestras de tejidos inoculados al inicio (0 h) y a las 2, 6, 16, 20, 24, 48, 60, 72, 96 y 120 h después de inoculación (hdi). Se determinó la expresión relativa de los genes quitina sintasa (*CHS1*),  $\beta$ -1-3 glucano sintasa (*GLS1*) y cutinasa (*CUT1*) respecto al tiempo. El gen *CHS1* se expresó de manera permanente y alcanzó su máximo nivel de expresión a partir de las 2 hdi; el perfil de expresión del gen *GLS1* coincidió con el de *CHS1* al inicio de la infección, pero al final de la misma (120 hdi) la expresión de *GLS1* volvió a aumentar significativamente. La expresión del gen *CUT1* se consideró tardía porque el máximo se alcanzó a las 120 hdi. Estos genes se relacionan con la producción de estructuras de infección y desarrollo del patógeno en hojas de papaya Maradol durante la infección. Los resultados sugieren que la síntesis de quitina y  $\beta$ -1-3 glucanos se asocia con la etapa de producción de estructuras de infección (aprosorios, hifas de infección, conidios y acérvulos) y que la función de la cutinasa es posterior, posiblemente durante la lisis de la cutícula del hospedante.

**Palabras clave:** *Carica papaya* L., *Colletotrichum truncatum* (Schwein.),  $\beta$ -1-3 glucano sintasa, cutinasa, quitina sintasa.

#### SUMMARY

*Colletotrichum truncatum* (Schwein.) is one of the pathogenic fungi that causes anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.). The objective of this study was to determine changes in gene expression related to the pathogenicity of *C. truncatum* in interaction with Maradol papaya leaves. Fungal spores were inoculated on detached leaves; tissue samples inoculated at the beginning (0 h) and at 2, 6, 16, 20, 24, 48, 60, 72, 96 and 120 hours after inoculation (hai) were analyzed. The relative expression of chitin synthase (*CHS1*),  $\beta$ -1-3 glucan synthase (*GLS1*) and cutinase (*CUT1*) genes was determined through time. The *CHS1* gene is always expressed and reached its maximum expression after 2 hai; the expression profile of the *GLS1* gene coincided with that of *CHS1* at the beginning of the infection, but at the end (120 hai) the expression of *GLS1* increased significantly again. The expression of the *CUT1* gene was considered late because the maximum was reached at 120 hai. These genes are related to the production of infection structures and pathogen development in Maradol papaya leaves during infection. Results suggest that

the synthesis of chitin and  $\beta$ -1-3 glucans is associated with the stage of production of infection structures (appresoria, infection hyphae, conidia and acervuli) and that the function of cutinase occurs later, possibly during the lysis of the host cuticle.

**Index words:** *Carica papaya* L., *Colletotrichum truncatum* (Schwein.),  $\beta$ -1-3 glucan synthase, chitin synthase, cutinase.

#### INTRODUCCIÓN

*Colletotrichum truncatum* (Schwein.) es un hongo fitopatógeno causante de antracnosis en diversos hospedantes, entre los cuales se encuentran papaya (*Carica papaya* L.), chícharo (*Pisum sativum* L.), haba (*Vicia faba* L.), lenteja (*Lens culinaris* Medik.), chile (*Capsicum annuum* L.), garbanzo (*Cicer arietinum* L.), cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Latunde-Dada y Lucas, 2007; O'Connell et al., 1993; Pring et al., 1995; Ranathunge et al., 2012; Tapia-Tussell et al., 2008;). En el caso del cultivo de la papaya, *C. truncatum* produce pérdidas de hasta 50 % y es su principal enfermedad en el periodo de poscosecha; *C. truncatum* es uno de los agentes causales de antracnosis y su incidencia es de 40 % en frutos de papaya (Tapia-Tussell et al., 2008; Torres-Calzada et al., 2012); además, en México existen otras especies de *Colletotrichum* que también causan antracnosis como *C. coccodes*, que afecta la producción de los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Nieto-Angel et al., 2019).

Durante la patogénesis, *C. truncatum* utiliza procesos de infección distintos para ocasionar antracnosis en sus hospedantes. Durante la infección se presentan eventos de adhesión, germinación, penetración, estado biótrofo o estado necrótrofo, o ambos (De Silva et al., 2017). En otras especies de *Colletotrichum* se han estudiado genes que codifican proteínas mediadoras de la patogénesis como quitina sintasa (*CHS1*) y  $\beta$ -1-3 glucano sintasa

(*GLS1*), implicadas en la síntesis de quitina y  $\beta$ -glucanos, respectivamente (O'Connell *et al.*, 2012).

La quitina es un polímero de N-acetilglucosamina que representa el principal componente de la pared celular fúngica, le brinda rigidez y es esencial para el crecimiento vegetativo del hongo (Liu *et al.*, 2017). La síntesis de quitina se lleva a cabo por la enzima glicosil transferasa, denominada quitina sintasa (*CHS1*), la cual es primordial para la producción de estructuras infectivas y la colonización en el hospedante, puesto que se requiere sintetizar pared celular para producir apresorios durante la penetración, hifas de infección durante el estado necrótrofo, así como conidios dentro de acérvulos durante la reproducción y dispersión (Werner *et al.*, 2007).

Otro componente esencial de la pared celular fúngica es  $\beta$ -1-3 glucano, polisacárido en cuya síntesis está involucrada la enzima  $\beta$ -1-3 glucano sintasa (*GLS1*) (Bowman y Free, 2006; Fesel y Zuccaro, 2016). En hongos patógenos, la regulación de la formación de polímeros de pared celular es importante, así como el cambio estructural durante la morfogénesis relacionada con el proceso de infección; *GLS1* se requiere para dar rigidez a la pared celular del apresorio, la formación de hifas en células del hospedante y el establecimiento de comunicación y compatibilidad en la interacción planta-patógeno (Oliveira-García y Deising, 2013).

Por otra parte, la cutinasa (*CUT1*) es una esterasa que hidroliza los monómeros de cutina de la cutícula del hospedante, lo que desencadena señales moleculares para la formación del apresorio durante el proceso de penetración; además, las cutinasas también están implicadas en la adhesión y germinación de conidios (Vidhyasekaran, 2008). Una etapa del proceso de infección es la penetración, en la que en el extremo apical de los tubos germinativos se forman apresorios que facilitan su adhesión y penetración al hospedante por medio de acción mecánica y lisis enzimática (Kubo *et al.*, 2000). Se han realizado estudios histológicos del proceso de infección de *C. truncatum* en distintos hospedantes (Ranathunge *et al.*, 2012; Rojo-Báez *et al.*, 2016); sin embargo, la información de la expresión de genes de patogenicidad de esta especie es escasa. El objetivo de este estudio fue determinar el nivel de expresión de los genes *CHS1*, *GLS1* y *CUT1* en *C. truncatum* en su proceso de infección a través de tejido foliar en papaya Maradol y su relación con la formación de estructuras de infección como apresorios, hifas infectivas y acérvulos durante el desarrollo del patógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

La cepa fúngica utilizada en este estudio fue *C. truncatum* CCM, una cepa previamente caracterizada (ID NCBI: KF147902). El material vegetal consistió de 50 hojas sanas completamente desarrolladas, escindidas de plantas de papaya Maradol de ocho meses de edad en etapa de madurez fisiológica o fructificación, cultivadas en Balbuena, Navolato, Sinaloa con coordenadas 24° 44' 58" LN 107° 32' 28" LO y clima cálido. Las hojas se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Culiacán; se lavaron con agua corriente, se secaron, se desinfectaron con etanol 70 % y se colocaron en cámara húmeda (bolsas de plástico de 50 x 80 cm con papel absorbente humedecido con agua destilada) a 25 °C y 80 % de humedad relativa; después, se asperjaron 30 mL de una suspensión de esporas de *C. truncatum* a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas mL<sup>-1</sup> en haz y envés de las hojas de papaya. La inoculación se realizó con extremo cuidado para evitar daños físicos al tejido (Auyong *et al.*, 2015).

Los muestreos de tejido vegetal se realizaron a las 0, 2, 6, 16, 20, 24, 48, 60, 72, 96 y 120 h después de inoculación (hdi). Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C en un ultracongelador (Revco, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para su uso posterior. El proceso se realizó por triplicado.

### Extracción de ácidos nucleicos

El ARN total obtenido de las muestras de tejido vegetal desde 0 hasta 120 hdi se extrajo utilizando el reactivo de Trizol (Tri Reagent, Sigma, USA), como lo recomienda el fabricante; la concentración y pureza del ARN total se determinó espectrofotométricamente (NanoDrop, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) y su integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Se eliminó el ADN genómico presente en las muestras de ARN mediante DNasa I (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, se realizó la transcripción reversa de 1000 ng de ARN total en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L usando 100 U de SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) con los iniciadores Oligo DT y Primer H proporcionados en el kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN complementario (ADNc), obtenido a partir de ARN total, se cuantificó mediante espectrofotometría

(NanoDrop, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) y se diluyó en agua nanopura (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) hasta obtener una concentración de 125 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

### Expresión génica relativa

Se emplearon iniciadores previamente reportados para el gen *CUT1* y el gen endógeno *Tef* (Auyong *et al.*, 2015; Fang y Bidochka, 2006). Se diseñaron los iniciadores para los genes *CHS1* y *GLS1*; primeramente se amplificó la región genómica *CHS1* de *C. truncatum* de acuerdo con los iniciadores reportados por Jiang *et al.* (2014); así mismo, se amplificó la región genómica *GLS1* de *C. truncatum*, de acuerdo con los iniciadores reportados por Oliveira-García y Deising (2013) a partir de ADN de cultivo puro extraído de acuerdo con Zelaya-Molina *et al.* (2011); posteriormente, ambos amplicones se secuenciaron y con base en esta secuencia se diseñaron los iniciadores para los genes *CHS1* y *GLS1* utilizados en ensayos de qPCR, mediante el software PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>); tanto los iniciadores directos como los inversos se diseñaron sobre la región del exón del gen (Cuadro 1) (NCBI, 2018). Los iniciadores fueron sintetizados por la empresa Sigma-Aldrich® a una concentración de 50 nmol y purificados por desalación. Como análisis confirmatorio de especificidad, se alinearon las secuencias de los iniciadores diseñados *CHS1* y *GLS1* utilizando el software ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). Para comprobar la eficiencia de cada par de iniciadores durante la amplificación, a partir de 500 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  del ADNc obtenido de cada tratamiento, se prepararon siete diluciones seriadas (1:2) (500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.62 y 7.81 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ).

Las mezclas de reacción consistieron en 5  $\mu\text{L}$  de SYBR Green Master Mix (Bio-Rad, Hercules, California, EUA), 300 nM del iniciador endógeno (*Tef*) o 750 nM de cada iniciador de los genes de interés (*CUT1*, *CHS1* y *GLS1*) y 125 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de ADNc molde. Se usaron las siguientes condiciones de amplificación: precalentamiento 95 °C 5

min, seguido de 40 ciclos de 95 °C 30 s; 55.7 °C 30 s (*Tef*), 62.9 °C 30 s (*CUT1*), 63 °C 30 s (*CHS1*), 57.5 °C 30 s (*GLS1*); 72 °C 30 s. Al finalizar se realizó una curva de disociación con intervalo de 60 a 95 °C de los amplicones generados en cada reacción para la identificación de cada fragmento de ADN esperado de acuerdo con la temperatura de fusión ( $T_m$ ); se realizaron tres réplicas técnicas por cada réplica biológica.

Para cada gen se realizó una gráfica semi-logarítmica Ct versus la dilución. La eficiencia de un par de iniciadores se calculó usando la fórmula  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$ ; una pendiente de -3.321 indica 100% de eficiencia (Bustin *et al.*, 2009). Los pares de iniciadores con un nivel de eficiencia de 90 a 110 % se eligieron para el análisis de expresión génica.

El análisis de expresión se realizó mediante la plataforma de detección en tiempo real CFX96 (Bio-Rad, Hercules, California, EUA) para cuantificar la expresión de los genes de interés: *CUT1*, *CHS1* y *GLS1*, así como del gen endógeno *Tef*. Los niveles de expresión relativos de los genes de interés se normalizaron contra el gen endógeno y la cantidad relativa del producto amplificado con respecto al control (0 hdi) se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

### Diseño Experimental

Con los datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, con un solo factor (tiempo en hdi), se utilizaron 11 niveles (2, 6, 16, 20, 24, 48, 60, 72, 96 y 120 hdi) así como 0 hdi como control; se realizaron 2 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas y la unidad experimental consistió en una hoja de papaya. La variable respuesta fue el nivel de expresión relativa de los genes (*CHS1*, *GLS1* y *CUT1*). Se utilizó el programa estadístico Minitab 17; las medias se compararon con la prueba de Dunnett ( $P \leq 0.05$ ).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se determinaron los niveles de expresión

**Cuadro 1. Iniciadores para qPCR empleados en el estudio.**

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Referencia	Amplicón (pb)
Tef-F	AGGACGACAAGACTCACATC	Fang y Bidochka (2006)	268
Tef-R	G TTCAGCGGCTTCCTTCTC		
CUT1-F	TCTGTTCGGCTACACCAAGAA	Auyong <i>et al.</i> (2015)	136
CUT1-R	CAAGAAATGCGCCGGCAGGAT		
CHS1-F	GCAGCAGGTCAACAACAAGG	Este estudio	102
CHS1-R	TGCTTGGGGATCAAGGTGAC		
GLS1-F	ACGAAAGTCCGCATCCACTT	Este estudio	133
GLS1-R	ATCTTCACGGACCTAGGCGA		

relativa de tres genes relacionados a patogenicidad, *CUT1*, *GLS1* y *CHS1*, los cuales codifican, respectivamente, para las enzimas cutinasa, β-1,3 glucano sintasa y quitina sintasa en *C. truncatum*, durante su interacción curso temporal con hojas de papaya Maradol. Para ello, se emplearon los iniciadores Tef y *CUT1*, previamente reportados, y se diseñaron los iniciadores *CHS1* y *GLS1*. Posteriormente, se evaluó la especificidad de cada par de iniciadores para los genes de interés (*CUT1*, *GLS1*, *CHS1*) y el gen endógeno (*Tef*), obteniendo valores de eficiencia de 97 % para el gen *CUT1*, 106 % para el gen *GLS1* y 95 % para el gen *CHS1* (Figura 1), los cuales se ubican entre los valores de 90 a 110 % descritos como adecuados por diversos autores (Brookman-Amisshah *et al.*, 2015; Bustin *et al.*, 2009). La especificidad de los amplicones se comprobó a partir de la curva de disociación de las muestras de ADN analizadas, al obtener un único amplicón con temperatura de fusión específica para el fragmento predicho (Figura 2).

### Expresión del gen *CUT1*

La expresión del gen *CUT1* de *C. truncatum* se detectó a partir de las 20 hdi. El nivel de expresión del gen fue en aumento desde las 20 hasta las 120 hdi; a las 120 hdi se observó un incremento significativo en los niveles de

expresión relativa (835 veces más que el control) (Figura 3).

La detección de la expresión de *CUT1* en hojas de papaya Maradol a partir de las 20 hdi puede deberse al inicio de la penetración de *C. truncatum* en este hospedante. La expresión del gen *CUT1* facilita la entrada del patógeno en sus hospedantes (Auyong *et al.*, 2015; Liang *et al.* 2018; Villafana y Rampersad, 2020).

La expresión de este gen coincide con las etapas de germinación y formación de apresorios (etapa de penetración) durante el proceso de infección de *C. truncatum* en hoja de papaya Maradol (Rojo-Báez *et al.*, 2016). A pesar de que en el presente estudio se detectó la expresión del gen a partir de las 20 hdi, Auyong *et al.* (2015) y Rao y Nandineni (2017) reportaron la expresión del gen cutinasa en la interacción *C. truncatum*-chile durante las primeras horas de infección (6 a 24 hdi), etapa en que *C. truncatum* emplea estas enzimas para la penetración en hojas de chile.

La posterior sobreexpresión de *CUT1* a las 120 hdi (estado necrótrofo) posiblemente es debida a que *C. truncatum* rompe la cutícula de su hospedante en la etapa de reproducción y dispersión durante el proceso

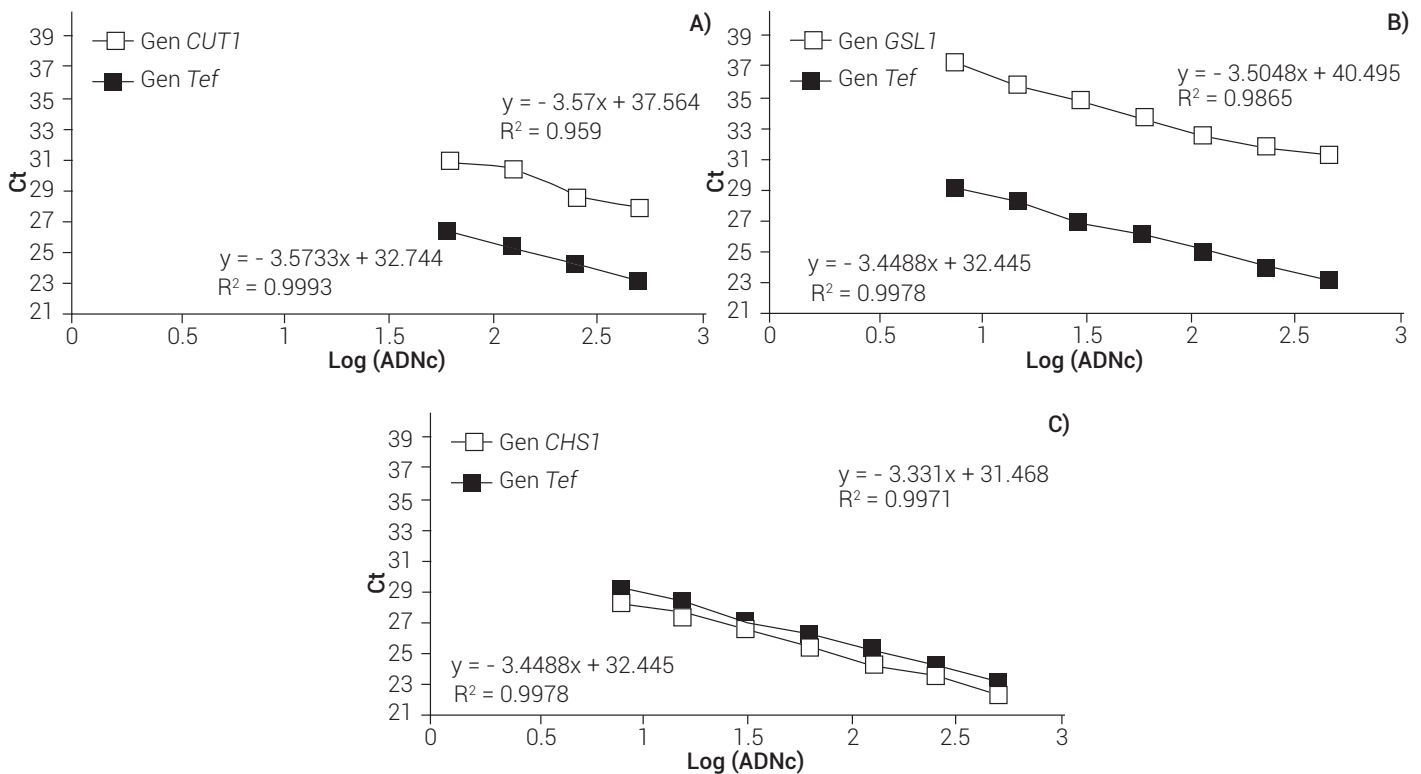


Figura 1. Eficiencia de los genes de *C. truncatum* con respecto al gen endógeno (*Tef*). A) Gen *CUT1*, B) Gen *GLS1*, C) Gen *CHS1*.

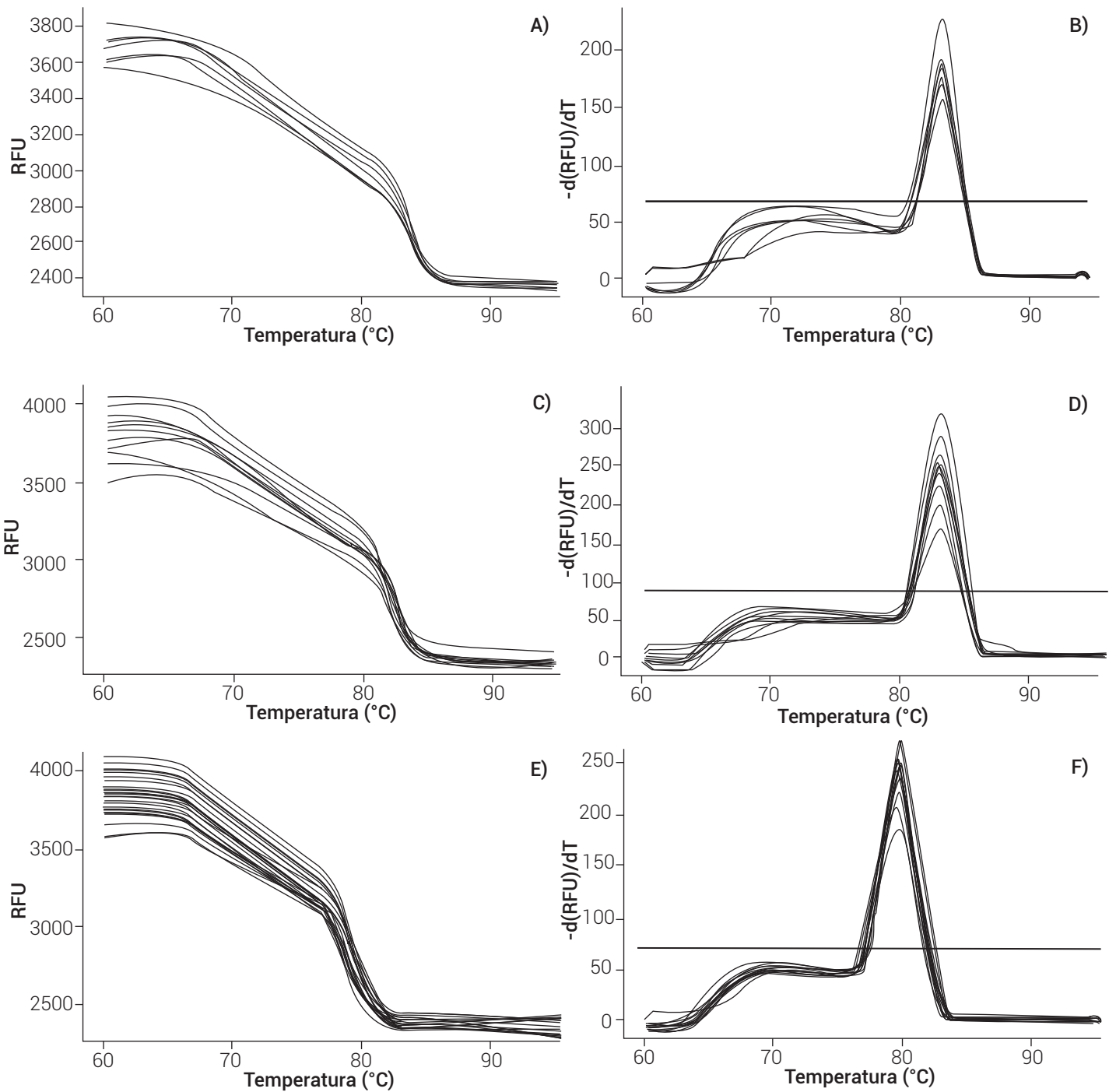


Figura 2. Curva de disociación y amplicón con temperatura de fusión específica de *C. truncatum* para los genes *CUT1* (A-B), *GLS1* (C-D) y *CHS1* (E-F).

de infección. Los antecedentes sobre la medición de los niveles de expresión de cutinasa durante el estado necrótrofo del proceso de infección son escasos debido a que esta enzima se asocia principalmente con los eventos iniciales (adhesión, germinación y penetración); no obstante, en este estudio se observó una notoria elevación del nivel de transcrito de este gen al final del proceso de patogénesis. De acuerdo con Rojo-Báez *et al.* (2016), durante el estado necrótrofo del proceso de infección de *C. truncatum* en hojas de papaya se observó la formación de conidios dentro de acérvulos, los cuales emergieron de la cutícula del hospedante entre las 96 y las 148 hdi, coincidiendo con el incremento aquí observado de la expresión del gen *CUT1*. Durante esta etapa el patógeno se desarrolló y se reprodujo para finalmente dispersarse. En el estado necrótrofo puede requerirse la síntesis de cutinasa, ya que los acérvulos de *Colletotrichum* spp. contienen una matriz mucilaginosa que envuelve a los conidios, los cuales segregan cutinasa extracelular para romper la cutícula de su hospedante, facilitando el proceso

de dispersión del patógeno (Bergstrom y Nicholson, 2000).

### Expresión del gen *GLS1*

La expresión del gen *GLS1* de *C. truncatum* se indujo fuertemente de forma temprana durante las primeras horas de contacto con el hospedante, siendo las 2 hdi la etapa con mayor expresión (58 veces más con respecto al control), después disminuyó su expresión de 16 a 96 hdi y finalmente, volvió a sufrir un aumento en la expresión a las 120 hdi (38 veces más) durante el estado patogénico, con respecto al control (Figura 4).

La expresión del gen *GLS1* en hojas de papaya Maradol inició en etapa temprana, recuperó los niveles normales y se incrementó a las 120 hdi, lo que indica que la síntesis de  $\beta$ -1-3 glucanos se inhibió en etapas intermedias de la patogénesis y se activó días después de la infección inicial. En este estudio se detectó la expresión relativa del gen *GLS1* a sólo 2 h de contacto con su hospedante. En

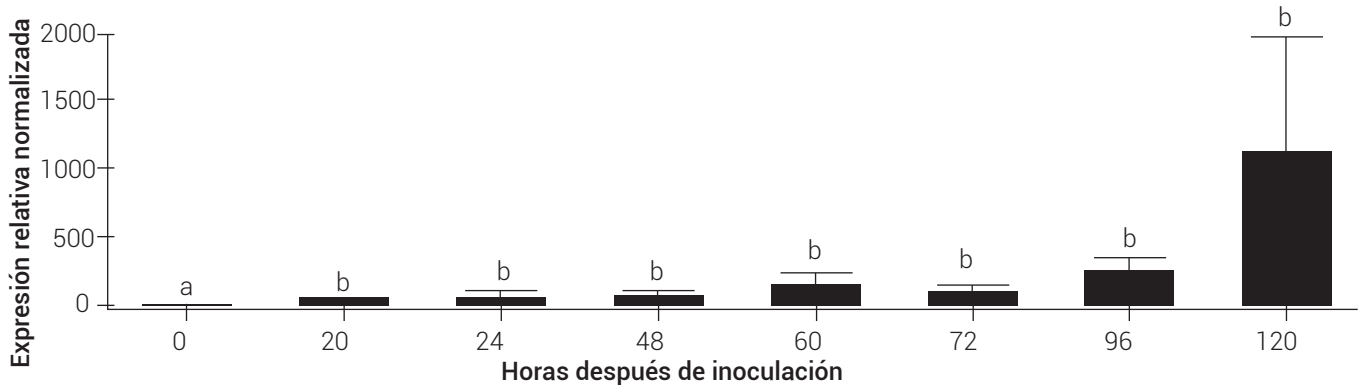


Figura 3. Expresión relativa del gen *CUT1* de *C. truncatum* a diferentes horas después de inoculación con respecto al control (0 hdi). Expresión relativa normalizada con el gen endógeno *Tef*. Letras diferentes en cada barra indican diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ).

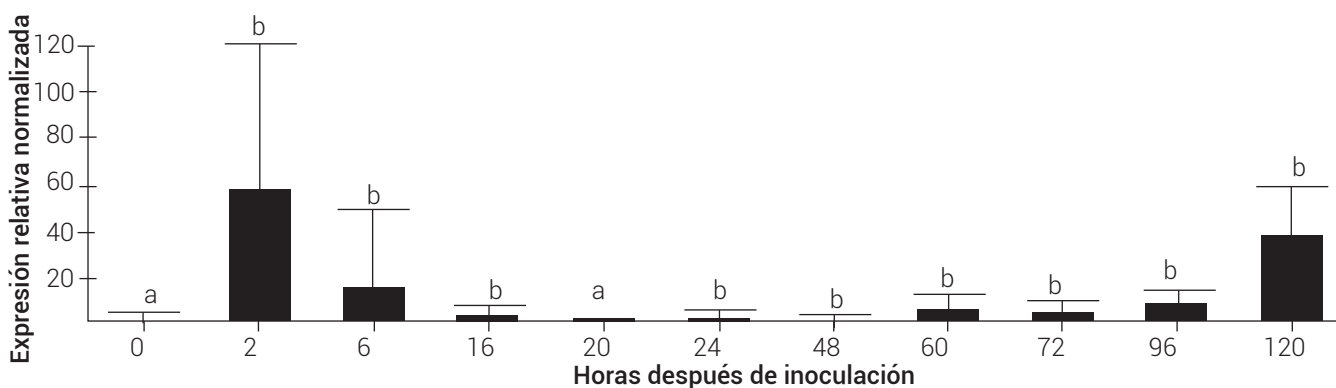


Figura 4. Expresión relativa del gen *GLS1* de *C. truncatum* a diferentes horas después de inoculación con respecto al control (0 hdi). Expresión relativa normalizada con el gen endógeno *Tef*. Letras diferentes en cada barra indican diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ).



contraste, Oliveira-García y Deising (2013) detectaron en maíz la expresión del gen *GLS1* de *C. graminicola* hasta las 12 hdi, atribuyendo su expresión a la formación de estructuras como apresorios e hifas de infección.

En este estudio, la expresión de *GLS1* observada durante las últimas horas de infección (120 hdi) sugiere que el patógeno también requiere de la producción de  $\beta$ -1-3 glucanos durante el estado necrótrofo, probablemente para la producción de estructuras de infección como hifas de infección. De acuerdo con Rojo-Báez *et al.* (2016), durante el estado necrótrofo del proceso de infección de *C. truncatum* en hojas de papaya Maradol, se observó la colonización del patógeno mediante hifas secundarias de infección, así como la formación de conidios dentro de acérvulos de las 96 a las 148 hdi. Los resultados de este estudio coinciden con ese proceso, ya que se indujo la expresión el gen *GLS1* de manera significativa entre las 96 y 120 hdi, coincidiendo con la etapa necrótrofa del proceso de patogénesis.

### Expresión del gen *CHS1*

La expresión del gen *CHS1* de *C. truncatum* se indujo de forma significativa durante las primeras horas de infección (2-6 hdi), 4.5 y 2.2 veces más con respecto al control (0 hdi), respectivamente; a partir de las 16 hdi no se encontró inducción de la expresión con respecto al control (Figura 5).

El gen *CHS1* usualmente se utiliza como marcador molecular para la identificación de especies de *Colletotrichum* (Hyde *et al.*, 2014); sin embargo, también se ha relacionado con patogenicidad en especies fúngicas. En este estudio, la expresión del gen *CHS1* de *C. truncatum*

en hojas de papaya Maradol se indujo en su máxima expresión a las 2 hdi; ésto puede deberse a que la quitina, como componente estructural del hongo, participa en los eventos de morfogénesis de las estructuras de infección durante el proceso de patogénesis. De acuerdo con Kong *et al.* (2012), el gen *CHS1* de *Magnaporthe oryzae* se expresó durante los eventos iniciales de la infección en hojas de arroz, destacando la importancia de la expresión del gen *CHS1* en la conidiogénesis como evento esencial del ciclo natural de infección.

En contraste con los resultados aquí obtenidos, Werner *et al.* (2007) reportaron la inducción del gen *CHS1* de *C. graminicola* a las 48 hdi (etapa de formación de apresorios) y 72 hdi (estado necrótrofo) durante el proceso de infección en hoja de maíz, siendo mayor la expresión durante el estado necrótrofo. En este estudio la expresión del gen *CHS1* disminuyó conforme avanzaba la infección, siendo importante su expresión durante las primeras horas de contacto con el hospedante.

### CONCLUSIONES

Los niveles de expresión de los genes *CUT1*, *GLS1* y *CHS1* de *C. truncatum* se indujeron diferencialmente durante su interacción curso temporal con hojas de papaya Maradol. La expresión del gen *CUT1* fue incrementando hasta llegar a su máxima expresión durante la etapa tardía del proceso de infección; además, el gen *GLS1* tuvo su máxima expresión durante la etapa temprana y tardía; por su parte, el gen *CHS1* aumentó su expresión al inicio del proceso de patogénesis. Esta expresión génica es congruente con la producción de estructuras de infección y desarrollo del ciclo de vida del patógeno previamente descritos.

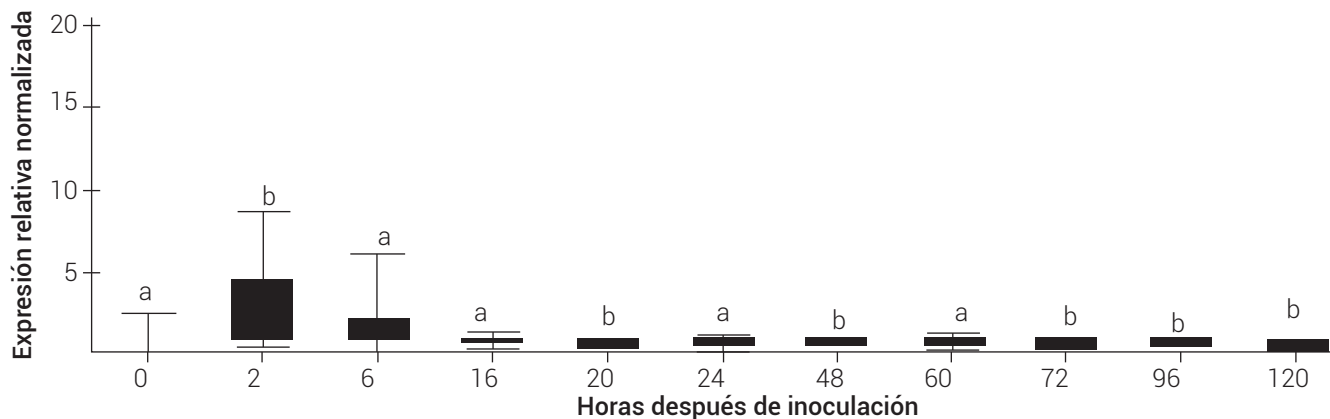


Figura 5. Expresión relativa del gen *CHS1* de *C. truncatum* a diferentes horas después de inoculación con respecto al control (0 hdi). Expresión relativa normalizada con el gen endógeno *Tef*. Letras diferentes en cada barra indican diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ).

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto 2011-163213 "El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador" financiado por SAGARPA; al CONACyT, por el financiamiento a los estudios de I. Rojo-Báez.

BIBLIOGRAFÍA

Auyong A. S. M., R. Ford and P. W. J. Taylor (2015) The role of cutinase and its impact on pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. *Plant Pathology and Microbiology* 6:259, <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000259>

Bergstrom G. C. and R. L. Nicholson (2000) The biology of *Colletotrichum graminicola* and maize anthracnose. In: Host Specificity, Pathology and Host Pathogen Interaction of *Colletotrichum*. D. Prusky, S. Freeman and M. B. Dickman (eds.). APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. pp:374-394.

Bowman S. M. and S. J. Free (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28:799-808, <https://doi.org/10.1002/bies.20441>

Brookman-Amisshah N., H. Packer, E. Prediger and J. Sabel (2015) qPCR Application Guide: Experimental Overview, Protocol, Troubleshooting. Fourth edition. Integrated ADN Technologies. Coralville, Iowa, USA. 93 p.

Bustin S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellems, J. Huggett, M. Kubista, ... and C. T. Wittwer (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55:611-622, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

De Silva D. D., P. W. Crous, P. K. Ades, K. D. Hyde and P. W. J. Taylor (2017) Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews* 31:155-168, <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>

Fang W. and M. J. Bidochka (2006) Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycological Research* 110:1165-1171, <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.04.014>

Fesel P. H. and A. Zuccaro (2016)  $\beta$ -glucan: crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology* 90:53-60, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.004>

Hyde K. D., R. H. Nilsson, S. A. Alias, H. A. Ariyawansa, J. E. Blair, L. Cai, ... and N. Zhou (2014) One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity* 67:21-125, <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0298-1>

Jiang J., H. Zhai, H. Li, Z. Wang, Y. Chen, N. Hong, ... and W. Xu (2014) Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spots on young fruits related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China. *Crop Protection* 58:41-48, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.01.003>

Kong L. A., J. Yang, G. T. Li, L. L. Qi, Y. J. Zhang, C. F. Wang, ... and Y. L. Peng (2012) Different chitin synthase genes are required for various developmental and plant infection processes in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens* 8(2):e1002526, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002526>

Kubo Y., Y. Takano, G. Tsuji, O. Horino and I. Furusawa (2000) Regulation of melanin biosynthesis genes during appressorium formation by *Colletotrichum lagenarium*. In: *Colletotrichum* Host specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction. D. Prusky, S. Freeman and M. D. Dickman (eds.). APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. pp:99-113.

Latunde-Dada A. O. and J. A. Lucas (2007) Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. *Plant Pathology* 56:437-447, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01576.x>

Liang X., S. Shang, Q. Dong, B. Wang, R. Zhang, M. L. Gleason and G. Sun (2018) Transcriptomic analysis reveals candidate genes regulating development and host interactions of *Colletotrichum*

*fructicola*. *BMC Genomics* 19:557, <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4934-0>

Liu R., C. Xu, Q. Zhanf and W. Fang (2017) Evolution of the chitin synthase gene family correlates with fungal morphogenesis and adaptation to ecological niches. *Scientific Reports* 7:44527, <https://doi.org/10.1038/srep44527>

Livak K. J. and T. D. Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta Ct$</sup>  method. *Methods* 25:402-408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

NCBI, National Center of Biotechnology Information (2018) Primer-Blast. National Center for Biotechnology Information. Bethesda, Maryland, USA. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (April, 2018).

Nieto-Angel D., A. Almaraz-Sánchez, V. Ayala-Escobar, M. Orozco-Santos y F. M. Lara-Viveros (2019) Primer reporte de *Colletotrichum coccodes* en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 42:195-200, <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.3.195-200>

O'Connell R. J., A. B. Uronu, G. Waksman, C. Nash, J. P. R. Keon and J. A. Bailey (1993) Hemibiotrophic infection of *Pisum sativum* by *Colletotrichum truncatum*. *Plant Pathology* 42:774-783, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01564.x>

O'Connell R. J., M. R. Thon, S. Hacquard, S. G. Amyotte, J. Kleemann, M. F. Torres, ... and L. J. Vaillancourt (2012) Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics* 44:1060-1065, <https://doi.org/10.1038/ng.2372>

Oliveira-García E. and H. B. Deising (2013) Infection structure-specific expression of  $\beta$ -1-3-glucan synthase is essential for pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* and evasion of  $\beta$ -glucan-triggered immunity in maize. *Plant Cell* 25:2356-2378, <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103499>

Pring R. J., C. Nash, M. Zakaria and J. A. Bailey (1995) Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46:137-152, <https://doi.org/10.1006/pmpp.1995.1011>

Ranathunge N. P., O. Mongkolporn, R. Ford and P. W. J. Taylor (2012) *Colletotrichum truncatum* pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defence mechanisms. *Australasian Plant Pathology* 41:463-473, <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0156-0>

Rao S. and M. R. Nandineni (2017) Genome sequencing and comparative genomics reveal a repertoire of putative pathogenicity genes in chilli anthracnose fungus *Colletotrichum truncatum*. *PLoS ONE* 12:e0183567, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183567>

Rojo-Báez I., R. S. García-Estrada, J. León-Félix, A. Sañudo-Barajas y R. Allende-Molar (2016) Histopatología del proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en hojas de papaya y chicharo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34:316-325, <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1604-3>

Tapia-Tussell R., A. Quijano-Ramayo, A. Cortes-Velazquez, P. Lappe, A. Larque-Saavedra and D. Pérez-Brito (2008) PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan peninsula. *Molecular Biotechnology* 40:293-298, <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9093-0>

Torres-Calzada C., R. Tapia-Tussell, I. Higuera-Ciapara and D. Pérez-Brito (2012) Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.). *European Journal of Plant Pathology* 135:67-79, <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0065-7>

Vidhyasekaran P. (2008) Fungal Pathogenesis in Plants and Crops: Molecular Biology and Host Defense Mechanisms. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 536 p.

Villafana R. T. and S. N. Rampersad (2020) Diversity, structure, and synteny of the cutinase gene of *Colletotrichum* species. *Ecology and Evolution* 10:1425-1443, <https://doi.org/10.1002/ece3.5998>

Werner S., J. A. Sugui, G. Steinberg and H. B. Deising (2007) A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 20:1555-1567, <https://doi.org/10.1094/MPMI-2007-09-0011>



[doi.org/10.1094/MPMI-20-12-1555](https://doi.org/10.1094/MPMI-20-12-1555)

Zelaya-Molina L. X., M. A Ortega, ad A. E. Dorrance (2011) Easy and efficient protocol for oomycete DNA extraction suitable for population

genetic analysis. *Biotechnology Letters* 33:715-720, <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0478-3>

