



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DETECCIÓN DE EVENTOS DE MIMETISMO MOLECULAR EN EL
PROTEOMA DEL PATÓGENO DE MAÍZ *Ustilago maydis*

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los
requisitos establecidos para optar por el título de
Ingenieras en Biotecnología

Profesor Guía

PhD Vinicio Danilo Armijos Jaramillo

Autoras

Nicole Andrea Espinosa Viteri

Karla Stephanie Vizcaíno Cárdenas

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Detección de eventos de mimetismo molecular en el proteoma del patógeno de maíz *Ustilago maydis*, a través de reuniones periódicas con las estudiantes Nicole Andrea Espinosa Viteri y Karla Stephanie Vizcaíno Cárdenas, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Vinicio Danilo Armijos Jaramillo

Doctor en Agrotecnología

C.I. 1716829666

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Detección de eventos de mimetismo molecular en el proteoma del patógeno de maíz *Ustilago maydis*, de las estudiantes Nicole Andrea Espinosa Viteri y Karla Stephanie Vizcaíno Cárdenas, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Carlos Andrés Bastidas

Magister en Microbiología

C.I. 0201619806

DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaramos que este trabajo es original, de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Nicole Andrea Espinosa Viteri

C.I. 1718315557

Karla Stephanie Vizcaíno Cárdenas

C.I. 1751089499

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Doctor Vinicio Armijos por ser nuestro guía y apoyo durante el desarrollo de nuestro trabajo.

Al Ing. Kevin Jaramillo y al Ing. Santiago Solórzano por colaborar en nuestro trabajo.

A la Universidad de las Américas por contribuir a nuestra formación profesional.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme haber llegado a culminar mi formación profesional.

A mi familia quienes con su paciencia y esfuerzo me han permitido cumplir una meta más en mi vida.

A mi ángel guardián que me acompañó en los momentos difíciles de mi carrera, bendiciéndome, brindándome su apoyo incondicional y fuerzas necesarias para seguir adelante.

Nico

DEDICATORIA

La fuerza y el crecimiento vienen sólo a través del esfuerzo y la lucha continua.

Quiero dedicar este trabajo de investigación a Dios quien ha guiado mis pasos durante toda mi vida, a mis padres por su sacrificio constante y permanente acompañamiento durante mis años de estudio, a mi hermana y mis sobrinas por motivar mi crecimiento personal y profesional y haber sido mi apoyo en momentos de debilidad, a mis abuelitos que desde el cielo bendicen cada uno de mis pasos y a Alexis Guerra por su amor incondicional y por brindarme la ayuda necesaria en todo momento.

Karlita

RESUMEN

El mimetismo molecular es una de las estrategias evolutivas que utilizan los patógenos para manipular el metabolismo y las funciones del huésped. Se han diseñado varias estrategias para detectar casos de mimetismo molecular *in silico*; sin embargo, no se ha desarrollado un modelo para detectar este fenómeno en sistemas planta-patógeno. En tal virtud, este trabajo desarrolló por primera vez un método *in silico* para detectar candidatos miméticos, usando el patosistema *Ustilago maydis*- *Zea mays* como modelo. En esta metodología se utilizó una comparación de secuencias entre el proteoma del patógeno, del huésped y de los hongos no fitopatógenos. Además, se determinó la localización subcelular de los candidatos imitador-imitado. Por otra parte, se utilizó información de RNA-seq para identificar la co-expresión de los candidatos. Entre los candidatos de mayor relevancia obtenidos por este método destacan: UDP-glucose: glycoprotein glycosyltransferase, Diaphanous-related Formin, Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase 1. Estas tres proteínas están involucradas en la división celular, y el establecimiento en plantas de la respuesta ante patógenos. Por tal razón, estos son candidatos con potencial para manipular las células vegetales en beneficio del patógeno.

Palabras claves: Mimetismo molecular, *Ustilago maydis*, *Zea mays*, co-expresión, co-localización.

ABSTRACT

Molecular mimicry is one of the evolutionary strategies used by pathogens to manipulate host metabolism and functions. Several strategies have been designed to detect cases of molecular mimicry *in silico*; however, a model has not been developed to detect this phenomenon in plant-pathogen systems. In this virtue, this work developed for the first time a method *in silico* to detect mimetic candidates, using the patosistema *Ustilago maydis*- *Zea mays* as model. This methodology shows a comparison of sequences between the pathogen protein, the host and the non-phytopathogenic fungi. In addition, the subcellular location of the imitated-imitated candidates is determined. On the other hand, RNA-seq information used to identify the co-expression of the candidates. Among the most relevant candidates obtained by this method are: UDP-glucose: glycoprotein glycosyltransferase, Diaphanous-related Formin, Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase 1. These three proteins are involved in cell division, and plant establishment of the response to pathogens. For this reason, these are candidates with potential to manipulate plant cells for the benefit of the pathogen.

Keywords: Molecular mimicry, *Ustilago maydis*, *Zea mays*, co-expression, co-localization.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 General	3
1.3.2 Específicos	4
1.4 Justificación	4
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Generalidades de <i>Zea mays</i>	4
2.1.1 Enfermedades fúngicas que afectan a cultivos de <i>Zea mays</i>	5
2.2 <i>Ustilago maydis</i>	6
2.2.1 Infección de <i>Ustilago maydis</i> en <i>Zea mays</i>	7
2.3 Mimetismo molecular.....	9
2.3.1 Definición.	9
2.3.2 Casos de mimetismo molecular.	9
2.3.3 Métodos de detección.....	12
3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS.....	13
3.1 Obtención de datos.....	13
3.2 Identificación de candidatos de mimetismo molecular por similitud de secuencias	14
3.3 Predicción de localización subcelular.....	15
3.4 Análisis de expresión génica	16

3.5 Análisis estructural de los candidatos.	16
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1 Predicción de la localización subcelular.	20
4.2 Co-expresión de los candidatos de mimetismo molecular.	21
4.3 Análisis estructural de los candidatos.	23
4.4 Rol potencial de los candidatos de mimetismo molecular.	25
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	28
5.1 Conclusiones	28
5.2 Recomendaciones	28
REFERENCIAS	30

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El maíz, papa, arroz, trigo y soja son los cinco cultivos más importantes que alimentan a la población mundial, abarcando el 60% de la dieta calórica (Mimica, 2018). Esta es una de las razones por las que se deben proteger los cultivos, ya que se evidencia gran cantidad de pérdidas debido a la presencia de hongos, bacterias, nemátodos y virus (Lima-Medina, 2018).

Zea mays conocido por su nombre común maíz, es el tercer cultivo más importante en el mundo y una de las mejores fuentes de nutrientes, energía y proteínas, tanto para el ser humano como para el ganado (FAO, 2016). Esta especie fue domesticada en México y después se esparció hacia los países de América del Sur como Perú y Ecuador (González et al., 2016). Al igual que muchos otros cultivos extensivos, el maíz se ve afectado por diversas plagas y patógenos que disminuyen su producción.

Uno de los patógenos que históricamente ha infectado campos de maíz es el hongo *Ustilago maydis*. *Ustilago maydis* pertenece al reino fungi, es un basidiomiceto del orden Ustilaginales. Los Ustilaginales conforman un grupo de fitopatógenos que poseen alrededor de 50 géneros y 1200 especies. Estos organismos son capaces de infectar a más de 4.000 plantas de 75 familias diferentes (Hernández et al., 2019). Actualmente, y debido a sus características, *Ustilago maydis* es un modelo de estudio para hongos biotrofos (Ruiz-Herrera, 2008).

Los organismos parasitarios tienen la capacidad de manipular al anfitrión para su beneficio, y una de las estrategias que tienen para conseguirlo es imitando ciertas características. A este fenómeno se lo conoce como mimetismo y puede existir tanto mimetismo morfológico como molecular. Un ejemplo de mimetismo morfológico lo constituyen los conidios del hongo *Monilinia vaccinii corymbosi*,

los cuales imitan el polen germinativo del arándano para acceder al ovario de la planta (Ngugi & Scherm, 2006). Por su parte, los mecanismos utilizados por los patógenos para imitar el comportamiento de una molécula, ya sea en su función o en su forma, se denomina mimetismo molecular. Este término fue utilizado por primera vez por Raymond (1964) para referirse a la compartición de determinantes antigénicos entre patógenos y hospedadores.

Por ejemplo, las bacterias *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*, poseen un efector llamado IpgB2 que imita la enzima Rho-GTPasa del huésped, manipulando la dinámica del citoesqueleto para aumentar la patogenicidad de la bacteria. IpgB2 y Rho-GTPasa no comparten similitudes estructurales y éste se considera un caso de mimetismo molecular funcional (Gangappa et al., 2002). Por su parte, las proteínas SOPE y SopE2 de *Salmonella*, se secretan al interior del huésped, estas proteínas intervienen en la invasión celular, alterando la acción de las proteínas de la célula huésped (Galyov et al., 2000). En el interior del huésped, estas proteínas imitan factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs). SOPE y SopE2 en la célula infectada activan Rac1 y Cdc4 (GTPasas) que conducen a la reorganización del citoesqueleto de actina y a la internalización bacteriana subsiguiente (Galán & Zhou, 2000). Para que el mimetismo sea efectivo SOPE, SopE2 y las GEFs deben compartir el mismo espacio subcelular, en este caso el citoplasma del huésped.

Incluso algunas enfermedades autoinmunes, pueden ser explicadas por mimetismo molecular. Por ejemplo, en el síndrome de Guillain-Barré, se ha demostrado mimetismo molecular entre los componentes microbianos de *Campylobacter jejuni* y el humano. *C. jejuni*, es una bacteria que durante su infección produce lipo-oligosacáridos, los cuales son parecidos estructuralmente a los gangliósidos del sistema nervioso, estos son glucolípidos que constituyen un subgrupo de glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico. Una vez que la infección de *C. jejuni* ya no está presente, el sistema inmune confunde las proteínas del patógeno con sus propias proteínas, atacando por error al sistema nervioso y conduciendo a la aparición

del síndrome de Guillain-Barré (Shahrizaila & Yuki, 2011). Este caso representa un ejemplo de mimetismo molecular estructural, en donde el patógeno no saca ventaja de imitar un componente de su huésped. Otro ejemplo en donde se evidencia mimetismo molecular es el caso de los poxvirus humanos y herpesvirus. Estos adquirieron el gen *Bcl-2* por transferencia horizontal de genes de sus anfitriones con el fin de lograr la replicación de las moléculas virales. La proteína viral v-Bcl-2 puede imitar la función de la proteína nativa interfiriendo el proceso de apoptosis de la célula huésped (Elde & Malik, 2009 ; Gangappa et al., 2002).

1.2 Planteamiento del problema

Los patógenos tienen diferentes mecanismos para atacar a sus huéspedes, y se estima que el mimetismo molecular puede ayudar en esta tarea. Sin embargo, la importancia de este fenómeno dentro de sistemas planta-patógeno no ha sido determinado. Esto, debido en parte a la falta de métodos disponibles para reconocer el fenómeno. Por tal razón, es necesario desarrollar metodologías que determinen a gran escala y de manera específica la importancia del mimetismo molecular como mecanismo de ataque de fitopatógenos a plantas, especialmente a aquellas de relevancia agrícola.

1.3 Objetivos

1.3.1 General

Identificar proteínas de *Ustilago maydis* que potencialmente imiten a proteínas de *Zea mays*.

1.3.2 Específicos

- ❖ Diseñar un método *in silico* para la detección de secuencias de mimetismo molecular aplicable a hongos fitopatógenos, usando como sistema modelo la interacción *Ustilago maydis* – *Zea mays*.
- ❖ Evaluar la importancia del mimetismo molecular como mecanismo de infección de *Ustilago maydis* dentro del maíz.

1.4 Justificación

En este proyecto se pretende conocer por primera vez la importancia del mimetismo molecular en el patosistema *Ustilago maydis*- *Zea mays*. Para esto se desarrollará un método semi-automático de detección de mimetismo molecular para sistemas planta-patógeno. Con el desarrollo y aplicación de dicha metodología se espera develar nuevos mecanismos efectivos usados por *U. maydis*. Siendo *U. maydis* un organismo modelo dentro de los hongos biotrofos, el estudio de éste patógeno permitirá entender las dinámicas asociadas al mimetismo molecular de organismos con mecanismos de infección similares.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de *Zea mays*.

El maíz (*Zea mays*) se originó en Mesoamérica, pertenece a la tribu Maydae de la familia Poaceae. Posee más de 32000 genes repartidos en 10 cromosomas con un tamaño de genoma de 2.3 Gb (Singh & Kumar, 2016). Es una especie importante en la alimentación tanto para el ser humano como para el ganado. Se lo considera como un alimento estratégico para la seguridad alimentaria (González et al., 2016).

Para la producción de maíz es necesario 450 a 600 mm de agua por hectárea por temporada de cultivo. Se produce alrededor de 15 kg de grano por cada

mm de agua consumida. Cuando se encuentre en la etapa de madurez, cada planta habrá consumido alrededor de 250 litros de agua (Plessis, 2017; Alexandru et al., 2018).

El maíz es un organismo modelo importante, de corta duración, cuyo cultivo es un recurso agrícola global que exhibe una enorme variación en los rasgos cuantitativos. Se necesitan de nuevas herramientas que mejoren la comprensión de la base genética de los rasgos cualitativos para guiar el mejoramiento de cultivos (Acqua et al., 2015).

Actualmente, el rendimiento del maíz ha aumentado debido a la mejora genética sustancial para la tolerancia a altas densidades de población de plantas (Gonzalez et al., 2018). Los cultivos están asociados con el medio ambiente, es decir: suelo y clima, el manejo del material genético, la población de plantas, la protección y nutrición de estas. Además, algunas de estas características son los límites biofísicos que están expresados en los rendimientos potenciales. Existen rendimientos bajos a causa de la deficiencia de nitrógeno, de agua y por el uso de genotipos inadecuados. Por estas razones es importante evaluar los insumos al intensificar los rendimientos de los cultivos. La intensificación sirve para aumentar los rendimientos, pero los límites biofísicos del medio ambiente y del material genético son complejos, lo que hace que el manejo de los cultivos sea más difícil (Maria, Boote et al., 2018).

2.1.1 Enfermedades fúngicas que afectan a cultivos de *Zea mays*.

Se han reportado varias enfermedades en el maíz producidas por agentes fúngicos, las más importantes se describen a continuación: *Phyllachora maydis* conocida por su nombre común mancha de asfalto, produce manchas brillantes y abultadas de color negro, se presenta en la parte inferior de las hojas antes de la época de floración. *Leptosphaeria michotii*, su nombre común mancha foliar, esta produce lesiones pequeñas en la parte inferior de la hoja en la

época de floración. Actualmente, las principales enfermedades son *Puccinia sorghi* (roya común) y *Exserohilum turcicum* (tizón foliar), se generan por varios factores como son: los biotipos de los patógenos, condiciones climáticas y el material genético (Rossi et al., 2016). La mancha foliar del maíz es causada por *Cercospora zea-maydis* conocida también como cercosporiosis, es una enfermedad que afecta a nivel mundial, produciendo pérdidas de entre 20 y 60%. La enfermedad más común que existe en las regiones tropicales y subtropicales es causada por *Puccinia polysora* (Roya polysora) generando pequeñas pústulas amarillentas sobre el haz de hoja. *Ustilago maydis* (Carbón común) produce agallas blancas, cerradas, posteriormente masas negras de esporas conocidos como tumores (Rossi et al., 2016).

El impacto de dichas enfermedades en los cultivos aumentan los costos de la producción agrícola. Sin embargo, existen varias estrategias para su control, como son la manipulación de las semillas y el material vegetal, además del uso de variedades resistentes a enfermedades (Quintero, 2019).

2.2 *Ustilago maydis*.

Ustilago maydis es un hongo perteneciente a la familia de basidiomicetos con un comportamiento biotrófico, es decir puede parasitar plantas sin que estas mueran. Por lo general, el hongo infecta al maíz y se han reportado infecciones en *Arabidopsis thaliana* (Moran, 2015; Ruiz-Herrera, 2008; Stgrasse, 2004).

La enfermedad que produce *U. maydis* en el maíz provoca el apareamiento de tumores en diferentes partes de la planta, produciendo retraso en el crecimiento, generando clorosis en las hojas y reduciendo el rendimiento de la planta. Adicional a esto, provoca la acumulación de pigmentos de antocianina que pueden convertir las flores femeninas en borlas (Kämper et al., 2006). Los tumores que se producen en la planta debido a este hongo, son apreciados por los comensales en regiones del centro de México, sin embargo, en muchas otras regiones del mundo se considera como una plaga para los cultivos de maíz (Martínez, 2010).

Una de las ventajas que tiene *U. maydis* como modelo de estudio es que su genoma está totalmente secuenciado y disponible en bases de datos. Este hongo posee un genoma pequeño con 20.5 millones de bases, organizadas en 23 cromosomas, contiene 6,902 genes que codifican proteínas, y tiene pocos intrones en su genoma en comparación con los genomas de otros hongos fitopatógenos (Kämper et al., 2006). Además, *U. maydis* cumple un papel de gran importancia como modelo fitopatógeno pues tiene métodos de cultivo fáciles y rápidos, presenta un corto tiempo de duplicación, y sofisticadas herramientas moleculares, todo lo cual hace de este hongo un modelo atractivo para la investigación bioquímica y biotecnológica (Hernández et al., 2019).

El uso de *U. maydis* puede ayudar a comprender las interacciones entre el huésped y el agente etiológico en una infección por hongos, para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos que conduzcan a la producción de nuevos compuestos biológicos activos para la investigación farmacéutica o agroquímica (Hernández et al., 2019).

2.2.1 Infección de *Ustilago maydis* en *Zea mays*.

El ciclo biológico de *U. maydis* está conformado por 2 fases:

- Parasítica y micelial → el hongo crece en forma de hifas dicarióticas que se desarrollan únicamente al interior del huésped (Hernández et al., 2013).
- Saprofítica → el hongo crece en forma de esporidios, los cuales son capaces de reproducirse por medio de gemación (Hernández et al., 2013).

El proceso de patogenicidad de *U. maydis* es complejo, implica cambios genéticos y morfológicos. El ciclo de vida de *Ustilago maydis* empieza con la germinación de teliosporas, las mismas darán origen al promicelio a través de

la meiosis y a su vez a cuatro basidiosporas, estas últimas se desprenderán y serán capaces de multiplicarse en forma de levadura. Después, la conjugación de dos esporidios sexualmente compatibles crea el dicarion que ataca a la planta, este tiene la capacidad de multiplicarse en forma de micelio dando lugar a los tumores donde se forman las teliosporas. Finalmente, estas germinan fuera de la planta para comenzar nuevamente el ciclo (Figura 1) (Covas, 2007; Ruiz-Herrera, 2008).

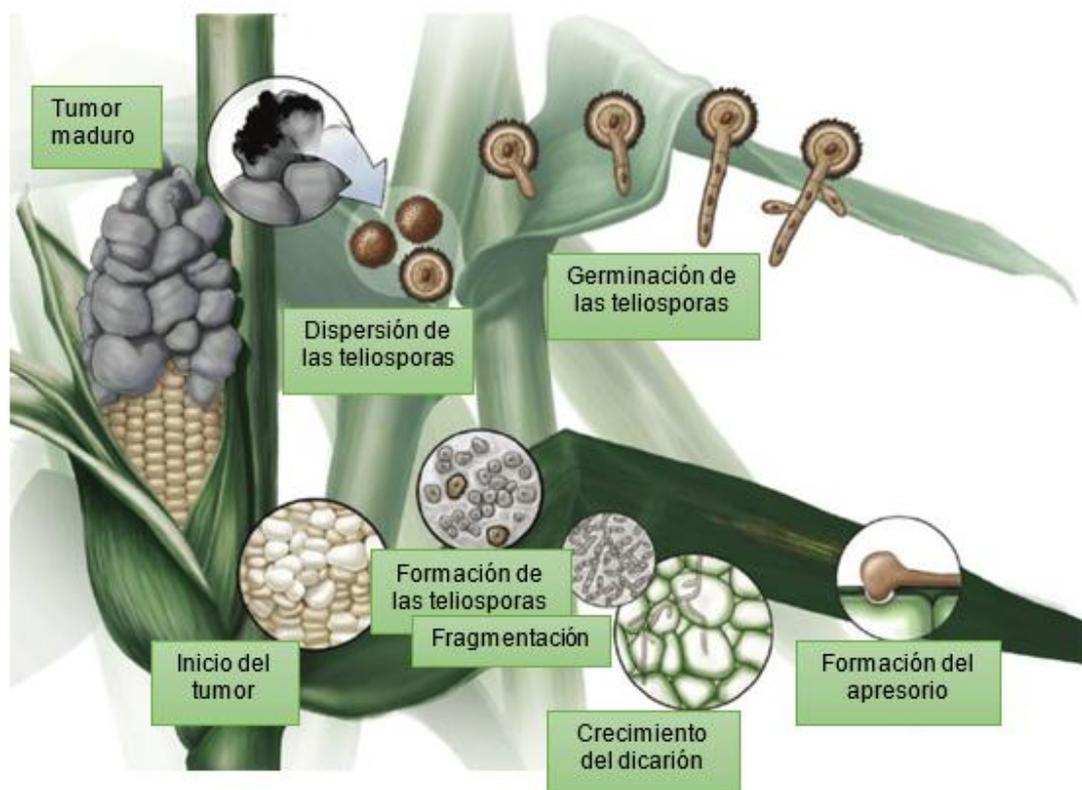


Figura 1. Esquema general de la infección de *Ustilago maydis* en *Zea mays*.

Adaptado de (Saville et al., 2012).

2.3 Mimetismo molecular.

2.3.1 Definición.

El mimetismo molecular es la capacidad que tiene una molécula para imitar a otra ya sea en su función o en su estructura. Este término fue usado por primera vez por Raymond (1964) para referirse a la compartición de determinantes antigénicos entre patógenos, animales y huéspedes. Del mismo modo, es una de las estrategias evolutivas que usan los parásitos para poder manipular el metabolismo del huésped y realizar una infección efectiva. De hecho, el mimetismo molecular en las interacciones huésped-patógeno plasman la cita de Picasso: "Los buenos artistas copian, los grandes artistas roban" (Gowthaman & Eswarakumar, 2013).

2.3.2 Casos de mimetismo molecular.

Se han reportado varios ejemplos de mimetismo molecular, entre los que se pueden mencionar los siguientes:

Las proteínas CLE (CLAVATA3 (CLV3) / Región Circundante del Endospermo (ESR)) están involucradas en el desarrollo de meristemas apicales del vástago y de la raíz en *Arabidopsis* (Clark, Running, & Meyerowitz, 1995). Se encontró un gen que codifica una proteína similar a CLE en el genoma del nematodo patógeno de plantas *Heterodera glycines* (HgCLE proteins) como se muestra en la figura 2 (Olsen & Skriver, 2003). Además, se detectó que la secreción continua de proteínas HgCLE pueden ser necesarias para mantener el sitio de alimentación del nematodo de la planta (J. Wang et al., 2010, 2011; X. Wang et al., 2005). Estas proteínas CLE se han identificado en varios nematodos que provocan quistes, incluido el nematodo del quiste de la papa (PCN).

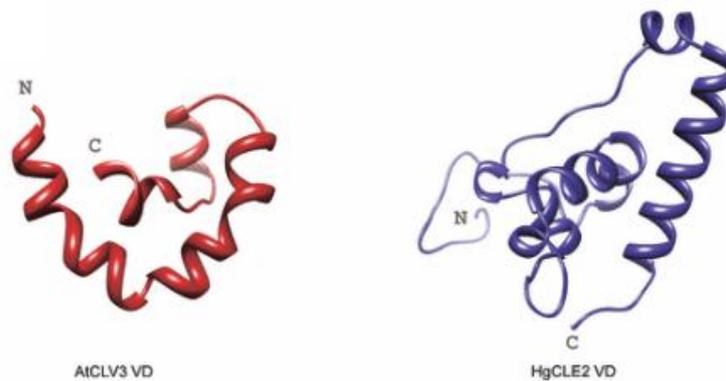


Figura 2. Modelos estructurales de los dominios variables entre CLAVATA3 (CLV3) similar al nematodo patógeno de plantas *Heterodera glycines* (HgCLE). Tomado de (J. Wang et al., 2010).

Existen proteínas implicadas en la regulación de calcio en la superficie de la membrana de células vegetales conocidas como anexinas. La proteína Hs4F01 de *Heterodera schachtii* y su producto proteico se expresaron exclusivamente dentro de la célula secretora de la glándula esofágica dorsal en las etapas parasitarias de *H. schachtii*. La expresión constitutiva de Hs4F01 en *Arabidopsis* de tipo salvaje promovió la hipersensibilidad a la infección por *H. schachtii*. La complementación de un mutante AnnAt1 en *Arabidopsis thaliana* por la expresión constitutiva de Hs4F01 revirtió la sensibilidad del mutante al estrés salino. Los resultados del estudio mostraron que la secreción de Hs4F01 de nemátodos en las células de la raíz del huésped puede imitar la función de la anexina de la planta durante la interacción parasitaria (Patel et al., 2010).

Otro ejemplo destacable de mimetismo molecular en plantas es el caso de la E3 ubiquitin ligasa. La ubiquitinación es un mecanismo esencial en los organismos eucariotas. El proteosoma-26S utiliza este mecanismo para degradar proteínas (Kerscher, Felberbaum, & Hochstrasser, 2006). En algunas bacterias patógenas de plantas, la E3 ubiquitin ligasa es capaz de imitar las funciones de ubiquitinación en células huésped. Particularmente, AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* (Abramovitch et al., 2006; Rosebrock et al., 2007) y

XopD de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Singer et al., 2013) funcionan como E3 ubiquitin ligasa de la planta, lo que permite el cambio en la respuesta del huésped al ataque del patógeno. La estructura cristalina de AvrPtoB reveló fuertes similitudes con la E3 ubiquitin ligasa de la planta, lo cual aporta más evidencia sobre el mimetismo que cumple en esta proteína como se muestra en la figura 3 (Janjusevic et al., 2006). Otras bacterias patógenas tienen sus propios mecanismos para utilizar vías de ubiquitinación del huésped para su beneficio, como es el caso de *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Chlamydia* y *Legionella*. Se ha sugerido que en estas bacterias existen varios efectores que secuestran la vía de ubiquitinación del huésped para facilitar su infección y su proliferación (Zhou & Zhu, 2015).

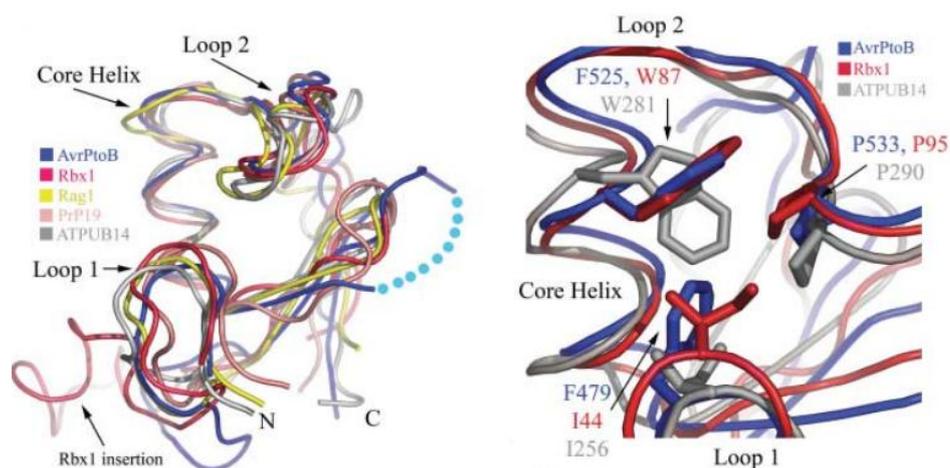


Figura 3. Estructura cristalina de AvrPtoB la cual imita a la E3 ubiquitin ligasa de *Arabidopsis thaliana* (AtPUB14).

Tomado de (Janjusevic et al., 2006).

Por otra parte, el patógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* imita a los péptidos natriuréticos de las plantas (PNP), un grupo de señalización de moléculas capaces de regular el agua y la homeostasis iónica en las plantas (Garavaglia et al., 2010). Este ejemplo muestra la eficacia de las estrategias de mimetismo molecular empleadas por patógenos bacterianos para evitar las

defensas de las plantas y para realizar una colonización exitosa como en la figura 4.

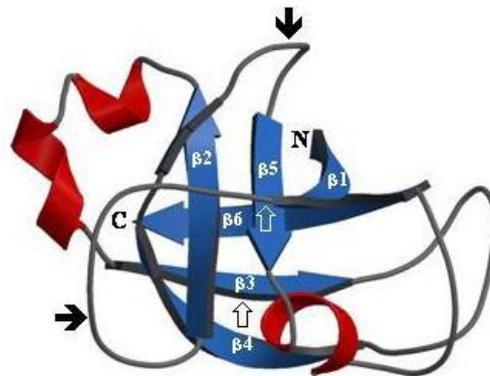


Figura 4. Estructura de *Xanthomonas axonopodis* la cual imita a los péptidos natriuréticos de *Arabidopsis thaliana* (AtPNP-A), adoptan este pliegue.

Tomado de (Nembaware et. al, 2004)

2.3.3 Métodos de detección.

La mayoría de los ejemplos mencionados de mimetismo molecular en este momento son el resultado de los experimentos funcionales en el laboratorio (Alto et al., 2006; Christensen & Kolomiets, 2011; J. Wang et al., 2011). Sin embargo, se han desarrollado métodos computacionales para detectar los posibles casos de mimetismo molecular mediante el análisis de secuencias. El primer método fue desarrollado para detectar el mimetismo molecular en endoparásitos eucariotas de humanos (Ludin, Nilsson, & Mäser, 2009) y el segundo fue desarrollado para detectar casos en bacterias patógenas en seres humanos (Doxey & McConkey, 2013). Ambos métodos se basan en la detección de la similitud de secuencia entre las proteínas del huésped y parásitos (Hebert et al., 2015).

3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS

3.1 Obtención de datos

Los proteomas de *Ustilago maydis* y de organismos filogenéticamente relacionados se descargaron de la base de datos UniProt (Tabla 1), al igual que el proteoma de *Zea mays* se descargó de la base de datos UniProt (UP000007305).

Tabla 1.

Proteomas de las especies utilizadas en este estudio.

Especies	Strain	Proteomas ID	Papel ecológico	Fuente
<i>Zea mays</i>	cv. B73	UP000007305	No patógeno	(Lanver et al., 2018)
<i>Ustilago maydis</i>	521 / FGSC 9021	UP000000561	Patógeno para plantas	(Lanver et al., 2018)
<i>Malassezia globosa</i>	ATCC MYA-4612 / CBS 7966	UP000008837	Patógeno para humanos	(Johansson et al., 2018)
<i>Coprinopsis cinerea</i>	Okayama-7 / 130 / ATCC MYA-4618 / FGSC 9003	UP000001861	Patógeno para animales	(Plaza, et al., 2016)
<i>Laccaria bicolor</i>	S238N-H82 / ATCC MYA-4686	UP000001194	No patógeno para plantas Inoculante del suelo	(Martin et al., 2008)
<i>Pseudozyma antarctica</i>	T-34	UP000011976	Patógeno para humanos	(Morita et al., 2013)
<i>Malassezia sympodialis</i>	ATCC 42132	UP000186303	Patógeno para humanos	(Gowthaman & Eswarakumar, 2013)
<i>Wallemia mellicola</i>	ATCC MYA-4683 / CBS 633.66	UP000005242	Patógenos para animales	(Skalski et al., 2018)

<i>Cryptococcus gattii</i>	WM276 / ATCC MYA-4071	UP000007805	Patógenos para humanos	(Souza, et al., 2011)
<i>Rhodotorula sp.</i>	JG-1b	UP000062823	Patógeno para humanos	(Gómez-López, et al., 2005)
<i>Mixia osmundae</i>	CBS 9802 / IAM 14324 / JCM 22182 / KY 12970	UP000009131	Infecta helechos	(Toome et al., 2014)
<i>Malassezia pachydermatis</i>	CBS 1879	UP000037751	Patógeno para humanos	(Lee, et al., 2018)
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	SY62	UP000014071	Patógeno para humanos	(Konishi, et al., 2013)

Nota: Todas las especies en negrilla corresponden a hongos que no atacan plantas.

3.2 Identificación de candidatos de mimetismo molecular por similitud de secuencias

Para la identificación de candidatos se realizaron búsquedas partiendo desde el patógeno (BBP) y el huésped (BBH). En la primera comparación se realizó un BLASTp con un e-value de $1e-5$ (según lo establecido por Gibbons et al., 2015). Según este criterio, se buscaron las coincidencias de secuencias con todas las proteínas predichas en el genoma de *U. maydis* versus la base de datos formada por los proteomas de hongos no fitopatógenos y el proteoma del maíz. Para la segunda comparación, se realizó un BLASTp con un e-value de $1e-5$ partiendo de todas las proteínas predichas en el genoma de maíz versus la base de datos compuesta de hongos no patógenos de plantas y *U. maydis*.

En el caso de la BBP, los candidatos se seleccionaron tomando en cuenta la diferencia de bitscore entre el mejor resultado de la proteína de búsqueda con el maíz y los hongos no fitopatógenos. Si la diferencia entre el bitscore del resultado de BLASTp para una proteína de maíz con respecto al bitscore del mejor resultado en hongos no fitopatógenos es mayor o igual a un límite establecido, se determinó como candidata. De igual forma BBH, si una proteína

de maíz registró un bitscore mayor o igual al valor límite para una secuencia de *U. maydis* que para un hongo no fitopatógeno, también se escogió como candidata. El valor límite entre los bitscores necesario para determinar si se toma a una proteína como candidata se determinó de acuerdo con la distribución de las diferencias de bitscores de todos los resultados de BLAST dentro de cada comparación (BBP y BBH respectivamente). Se calculó el rango intercuartil y se sumó al cuartil 3 para determinar el valor límite, tanto para BBP como para BBH.

3.3 Predicción de localización subcelular

Para predecir la localización subcelular de los candidatos obtenidos en las comparaciones BBP y BBH, se utilizaron los programas: SignalP 4.1 (Petersen, Brunak, von Heijne, & Nielsen, 2011), WolfPsort v0.2 (Horton et al., 2007) y TMHMM 2.0 (Krogh, Larsson, Von Heijne, & Sonnhammer, 2001). En los casos en los que se predijeron más de dos sitios transmembrana en la proteína, se anotó como una proteína transmembrana sin tomar en cuenta los resultados de los otros programas. En los casos en los que se predijo un péptido señal (por medio de SignalP o WolfPsort) y dos o menos sitios transmembrana, las proteínas fueron consideradas como extracelulares. Finalmente, las proteínas con dos o menos sitios transmembrana y sin péptido señal, se registraron con la categoría predicha por WolfPsort.

Con estas predicciones se evaluaron las localizaciones subcelulares putativas de las proteínas candidatas imitadoras (*U. maydis*) e imitadas (maíz). Se consideraron como interacciones posibles aquellos pares de candidatos que comparten espacio subcelular durante la infección. Esto es, proteínas de *U. maydis* extracelulares pueden interactuar con proteínas intra y extracelulares de maíz y proteínas transmembrana de *U. maydis* podrían interactuar con proteínas extracelulares y transmembrana de maíz (Anexo 3). Este criterio se utilizó para filtrar los primeros candidatos obtenidos del análisis de BLAST.

Los candidatos obtenidos con el criterio de localización subcelular fueron anotados en diferentes bases de datos como InterPro (Hunter et al., 2012), iPfam (Finn, Miller, Clements, & Bateman, 2014) y PROSITE (Cucho et al., 2013) para determinar la función putativa de los candidatos.

3.4 Análisis de expresión génica

Para analizar la coexpresión de los pares de candidatos (imitador- imitado) se usaron los datos de RNA-Seq de Lanver et al. (2018). Estos datos se encuentran disponibles en el repositorio GEO (Gene Expression Omnibus) con el código GSE103876. La expresión diferencial de los genes del maíz se calculó a partir de los conteos de reads del estudio citado anteriormente. La expresión diferencial de los datos se calcularon con el paquete DESeq (Anders & Huber, 2010) de R el cual está basado en una distribución binomial negativa. La expresión diferencial de *U. maydis* se obtuvo directamente de los datos reportados por Lanver et al. (2018).

3.5 Análisis estructural de los candidatos.

Para analizar la estructura de los candidatos se utilizó phyre 2 usando la secuencia fasta como input de cada candidato, mientras que para la superposición de los pares imitador e imitado se usó el programa pymol.

(Anexo 4).

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado es un par de proteínas candidatas que representan a la proteína imitadora (codificada en el genoma del patógeno) y una proteína imitada (codificada en el genoma del huésped). Para realizar este análisis, se

consideraron los proteomas completos de 11 especies de hongos no fitopatógenos (controles), el proteoma de *U. maydis* y de *Z. mays* (Tabla 1).

En la primera búsqueda de BLAST se utilizaron las proteínas de *U. maydis* (búsqueda basado en el patógeno; BBP) contra una base de datos conformada por los proteomas completos de hongos no fitopatógenos y el proteoma completo de *Z. mays*. Los resultados se resumieron en el boxplot de la Figura 5 y en el dotplot en el anexo 5a. En dicha figura se observa la distribución de las diferencias de los bitscores más altos obtenidos con proteínas de *Z. mays* y hongos no fitopatógenos. En este caso, se consideraron como candidatos miméticos las proteínas cuya diferencia resultó positiva, esto es, bitscores más altos en la comparación con *Z. mays* que, con hongos no fitopatógenos. Tres proteínas cumplieron con este requisito (Anexo 1).

La segunda búsqueda en BLAST fue realizada usando proteínas de *Z. mays* (de búsqueda basado en el huésped; BBH) contra una base de datos conformada por los proteomas de *U. maydis* y por los hongos no fitopatógenos. En la Figura 6 se observa la distribución de las diferencias entre los bitscores de *U. maydis* y los bitscores de los hongos no fitopatógenos ordenados de forma ascendente. Se consideraron como candidatos miméticos las proteínas *U. maydis* con puntuaciones de bitscores mayores o iguales al valor límite establecido. Este método fue fijado a partir de la distribución de diferencias de bitscores, calculando el rango intercuartil y sumando este valor al cuartil 3. El valor límite calculado fue 16.6. En total se obtuvieron 111 proteínas de maíz con diferencias de bitscores mayores o iguales al valor límite (Anexo 2) (Anexo 5b).

Se realizaron estas comparaciones ya que si se encuentran proteínas de *U. maydis* que se parezcan más a las de *Z. mays* que a los de sus hongos filogenéticamente relacionados, serían buenos candidatos de mimetismo molecular. Esto quiere decir que *U. maydis* ha evolucionado para imitar las proteínas del maíz y por eso se encuentran más parecidas al maíz que a sus propios parientes filogenéticamente relacionados.

Los primeros candidatos de mimetismo molecular fueron identificados en base a la similitud de secuencias, partiendo de un algoritmo que reúne la metodología de Ludin, Nilsson, & Mäser (2011) y Doxey & McConkey (2013) (ver métodos). En estas investigaciones, los autores comparan las proteínas de los patógenos con los anfitriones y, como control, las proteínas de especies no patógenas relacionadas filogenéticamente con el patógeno. Estos métodos pretenden detectar candidatos de mimetismo molecular que presenten mayor similitud de secuencia con las proteínas de su huésped que con las especies control.

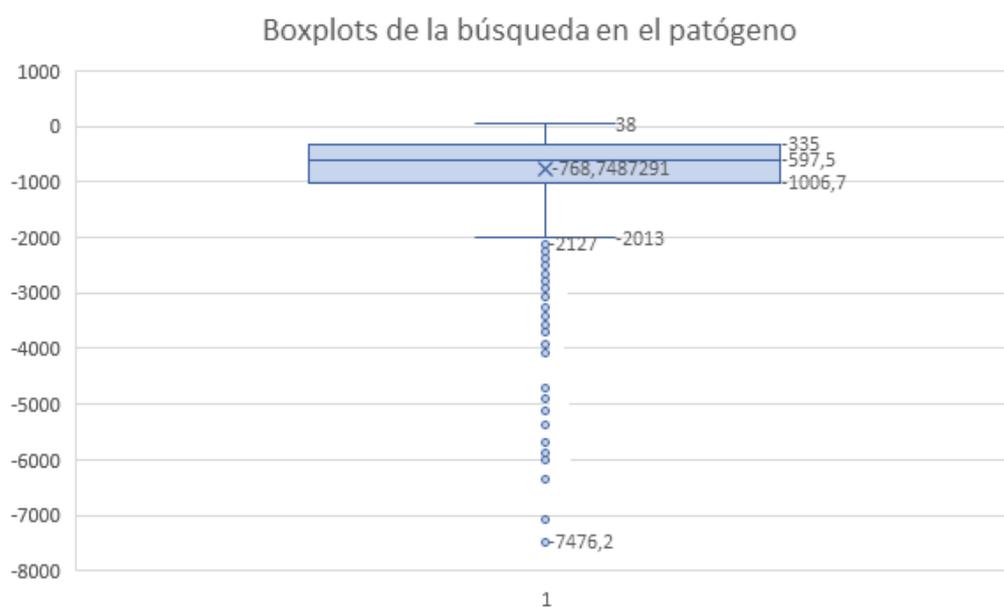


Figura 5. Boxplots de la distribución de la diferencia de bitscores para la comparación BBP.

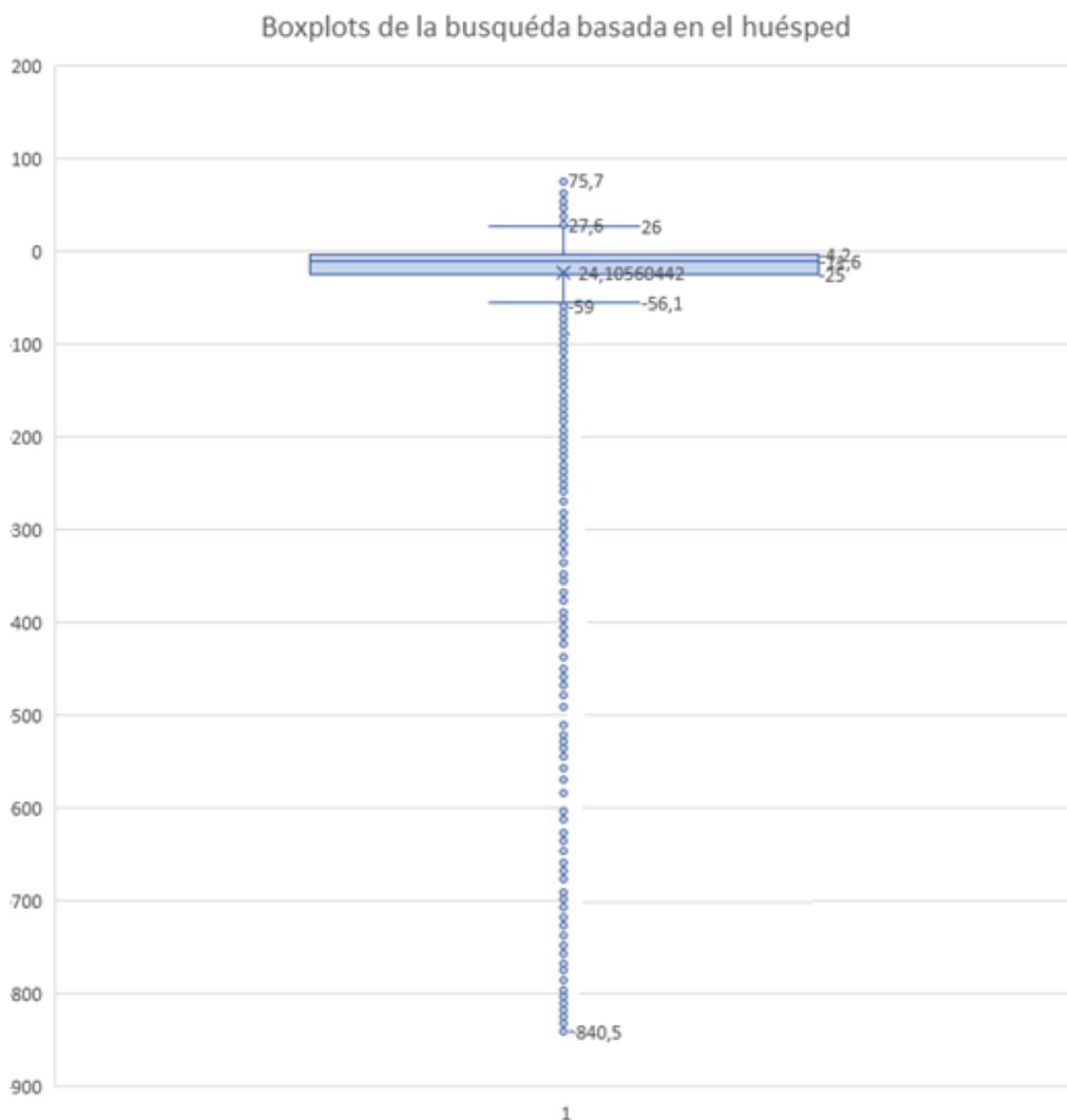


Figura 6. Boxplots de la distribución de la diferencia de bitscores para la comparación BBH.

Como se mencionó anteriormente se han realizado dos métodos de detección de mimetismo molecular utilizando sistemas de interacción entre el huésped y el patógeno. Uno de estos estudios es el caso de Doxey & Mcconkey (2013) utilizaron el sistema huésped-bacteria para detectar un subconjunto de imitadores de patógenos que funciona en la virulencia bacteriana. El objetivo principal de esta investigación fue detectar mimetismo entre el patógeno y el

huésped en escala genómica, realizando un análisis del proteoma bacteriano frente a los proteomas de los organismos no patógenos (usados como control) y compararon las similitudes con el proteoma humano (huésped). El otro estudio fue realizado por Ludin et al. (2011), utilizaron el sistema parásito-huésped, a partir de la búsqueda basada en el patógeno. El objetivo fue investigar el mecanismo mimético de los epítomos de aminoácidos lineales a través del análisis genómico comparativo. Una de las ventajas al realizar esta metodología es que estas se relacionan con los procesos evolutivos, los cuales pueden originar candidatos miméticos. Una desventaja es la presencia de falsos negativos debido a que el mimetismo de los epítomos no lineales compuestos de aminoácidos de pliegues separados (o incluso polipéptidos separados) no son reconocidos.

Nuestro enfoque fue combinar las dos metodologías de los estudios anteriormente mencionados a partir de la búsqueda basada en el patógeno y en el huésped, para obtener una mayor cantidad de candidatos de mimetismo molecular. Es posible considerar que debido a varios factores como: la pérdida de familias de genes en especie control no relacionadas, se pudiese obtener resultados falsos positivos. Se puede plantear posibles soluciones a este problema, en base a los organismos control, es decir tener en nuestra lista de grupo control proteomas de especies de vida libre para eliminar las proteínas que generalmente se conservan a través de los filios.

4.1 Predicción de la localización subcelular.

Se predijo la localización subcelular para cada par de candidatos (proteínas *U. maydis* – *Z. mays*) obtenidos de las búsquedas de BLAST descritas en la sección anterior. Las proteínas de *U. maydis* secretadas pueden estar en el apoplasto o en el citoplasma de la célula de la planta, por consiguiente, estas proteínas podrían imitar proteínas de plantas dentro o fuera de la célula vegetal. Las proteínas transmembrana de *U. maydis* podrían interactuar con las proteínas extracelulares y con las citoplasmáticas de *Z. mays*, pero no con las

proteínas transmembrana de la célula vegetal debido a que la pared celular del hongo separa el espacio entre ambos (Rafiqi et al., 2012; Yi & Valent, 2013), tal como se muestra en el anexo 3. Se planteó tres probabilidades para obtener las posibles proteínas candidatas al mimetismo. En primer lugar, las proteínas secretadas por *U. maydis* que puedan imitar proteínas extracelulares o transmembranales del huésped, es decir dentro o fuera de la célula vegetal (Cosio & Dunand, 2009). En segundo lugar, las proteínas extracelulares de maíz podrían interactuar con el dominio extracelular de las proteínas transmembrana de *U. maydis*. En tercer lugar, es posible la interacción del citoplasma de *Z. mays* con proteínas transmembrana de *U. maydis* debido a que la hifa del hongo durante la infección penetra el citoplasma de la célula huésped (Ruiz-Herrera, 2008).

Las proteínas probables que interactúan entre *U. maydis* y *Z. mays* son 14 pares de candidatos de la búsqueda BBH después de la aplicación del criterio de co-localización, sin embargo, solo 3 proteínas fueron candidatas de mimetismo molecular en este sistema como se muestra en el anexo 6, debido a que las 11 proteínas restantes corresponden a la interacción no posible (transmembrana-transmembrana). La búsqueda BBH muestra como resultado tres proteínas: UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT), Diaphanous related Formin, Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase 1 (DAGT). Mientras que en la comparación BBP ningún par de candidato cumple con el criterio de co-localización, ya que estos no son extracelulares, transmembrana y citoplasmáticas.

4.2 Co-expresión de los candidatos de mimetismo molecular.

El estudio de Lanver et al. (2018), se basa en un perfil transcripcional del desarrollo asociado a plantas de cepas tipo salvaje de *U. maydis*. Este análisis se centra en el metabolismo de los hongos y en las estrategias nutricionales. Las proteínas secretadas muestran 3 formas distintas como: superficie de la planta, establecimiento de la biotrofia e inducción de tumores. Este

comportamiento podría aumentar la eficacia de las proteínas del patógeno para imitar a su contraparte, ya que se localiza en el lugar correcto (co-localizar) y en el momento adecuado (co-expresada). La expresión de cada candidato en los granos de maíz infectados por *Ustilago maydis* después de la infección (dpi) fueron de 0.5, 2, 4, 6, 8, 12 (dpi) como se evidenció en Lanver et al. (2018). El conteo normalizado de los reads de los pares de candidatos se muestra en el anexo 7. Para conocer los posibles candidatos que se encuentran involucrados en la expresión diferencial, se formuló una hipótesis nula (H0), nuestros datos reflejaron que sí existe expresión diferencial en los distintos tiempos en comparación con el control.

Los candidatos de *U. maydis* y *Z. mays* que se encuentran diferencialmente expresados se pueden observar en el anexo 8 con sus respectivos valores p ajustados (padj), para el caso de *U. maydis* estos están representados en color morado con negrilla, mientras que en el caso de *Z. mays* los datos están en color celeste con negrilla. Por otra parte, en los anexos 9,10 y 11 se observan los perfiles de expresión de *U. maydis* en la mazorca del maíz que se encuentra diferencialmente expresado con respecto al control. Sin embargo, para analizar la expresión diferencial, se comparó la expresión con 28 combinaciones en diferentes tiempos de infección (8 tiempos), los datos se expresaron diferencialmente con un valor p ajustado menor a 0,01. Consideramos que, las comparaciones con respecto al control no podrían estar relacionados con las condiciones de la planta, tampoco con la disponibilidad de nutrientes. En contraparte, existieron genes que mostraron una expresión diferencial durante las etapas de desarrollo asociadas con la planta, esto es lo que distingue a *U. maydis* de otros fitopatógenos. Se han realizado estudios de RNA-seq similares con hongos como: *Zymoseptoria tritici*, *Colletotrichum higginsianum*, y *Puccinia striiformis f. sp tritici*, estos demostraron una baja expresión diferencial del 28, 44 y 50% de los genes respectivamente (O'Connell et al., 2012; Rudd et al., 2015; Dobon, et al., 2016), en comparación con *U. maydis* en el que se obtuvo el 68% de los genes que se expresan de manera diferencial (Lanver et al., 2018). Debido a esta información, es posible

deducir que el alto porcentaje de expresión diferencial de los genes de *U. maydis* es debido al acoplamiento entre el desarrollo del patógeno de *U. maydis* y los cambios morfológicos.

4.3 Análisis estructural de los candidatos.

Es posible analizar proteínas con secuencias similares, de esta manera se construyen y analizan familias proteicas. Sin embargo, en la actualidad se van descubriendo proteínas que muestran un scaffold (andamiaje) parecido, incluso si sus secuencias no se encuentran relacionadas. Se toma en cuenta que mientras menor sea el valor RMSD (Root Mean Square Deviation) entre dos estructuras mayor será la similitud estructural de las mismas (Mas Benavente, 2000). En la figura 7 se puede observar la superposición de las estructuras terciarias entre *U. maydis* y *Z. mays*, las mismas que están representadas en color celeste y en color verde respectivamente. En la figura 7a se observa la superposición de la UDP- glucose: glycoprotein glucosyltransferase (*U. maydis*-*Z. mays*), esta tiene un RMSD de 0.002, en la figura 7b se observa la superposición de Diaphanous related Formin (*U. maydis*-*Z. mays*), que tiene un RMSD de 0.000 y finalmente en la figura 7c se observa la superposición de Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase 1 (*U. maydis*-*Z. mays*), que obtiene un RMSD de 1.800. Los resultados que genera el programa para la predicción de estructuras proteicas, phyre 2 alcanza un nivel de confianza del 100%. Estas tres proteínas candidatas son las más fuertes para mostrar el caso de mimetismo molecular ya que comparten la localización subcelular y la similitud estructural.

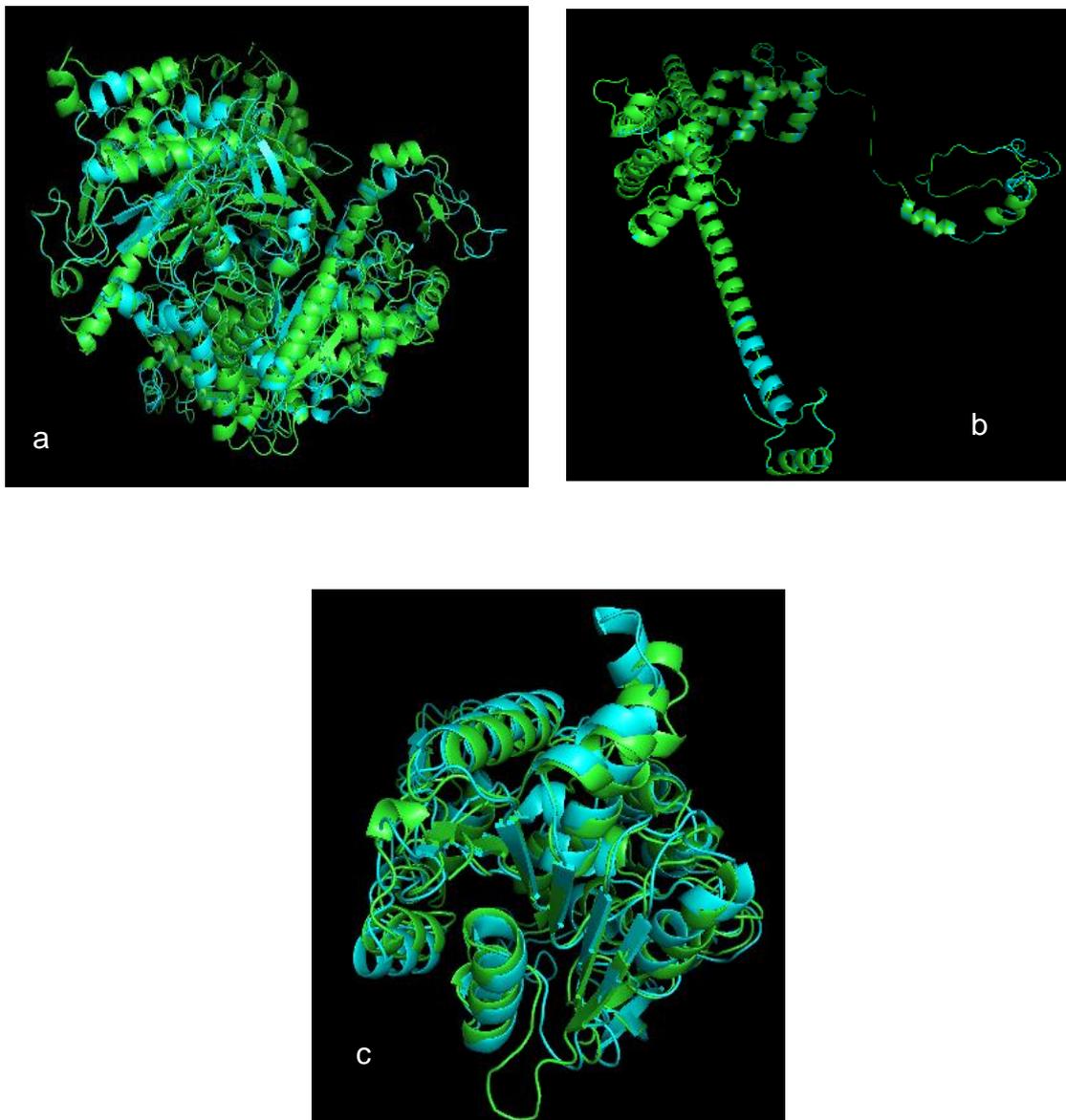


Figura 7. Superposición de estructura terciaria entre los candidatos imitador-imitado.

- a) Proteína UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (*U. maydis*-*Z. mays*).
- b) Proteína Diaphanous related Formin (*U. maydis*-*Z. mays*).
- c) Proteína Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase 1 (*U. maydis*-*Z. mays*).

4.4 Rol potencial de los candidatos de mimetismo molecular.

Las proteínas candidatas resultantes de los análisis previos fueron: UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT), Diaphanous related Formin, Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase 1 (DAGT).

Blanco-Herrera y sus colaboradores (2015) mostró que la UGGT es clave para el control de calidad del plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático, tanto en el crecimiento de las plantas como en el estrés biótico y abiótico en *Arabidopsis thaliana*. Esta proteína se activa cuando hay un mal plegamiento de proteínas. Los resultados presentados en este estudio determinaron que la falta de actividad de la UGGT en los mutantes genera un retraso en el desarrollo vegetativo de la raíz primaria y de la roseta; alterando el número de hojas de la planta después de 6 semanas, provocando sensibilidad al ataque de patógenos y al estrés biótico y abiótico. La sobreexpresión de UGGT (UGT 71C5) aumenta la tolerancia de glucosa de *A. thaliana*. Se demostró que la longitud promedio de la raíz se duplicó en comparación con la de tipo silvestre, también se evidenció un incremento en el crecimiento de la planta (Yan et al., 2010). Adicionalmente, estos mutantes son más sensibles al ácido salicílico durante la germinación, por lo que las plantas muestran un deterioro en el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Días Puentes, 2012).

Dada esta información relacionada a la UGGT, es posible inferir que cuando existe una sobreexpresión de la UGGT, podría existir un aumento en el crecimiento de *Z. mays*, por lo que *U. maydis* estaría involucrada en el proceso de la formación de tumores. Además, la aparición de estos tumores se corrobora con los niveles de expresión diferencial. Por otro lado, con respecto a la resistencia sistémica adquirida le convendría a *U. maydis* suprimir o retrasar el reconocimiento de SAR, para infectar a la planta (Días Puentes, 2012).

Por su parte la Diaphanous related Formin (Dfr1) actúa en el crecimiento de la planta y en la división celular. La formina ha sido identificada en organismos eucarióticos (hongos, animales y plantas), y está involucrada en los procesos celulares como: la motilidad celular, la polaridad y la citocinesis (Woychik et al., 1990; Goode & Eck, 2007). En hongos existen diversos estudios que demuestran que la Dfr1 es necesaria para la formación del anillo de actomiosina durante la septación de hifas infecciosas (Schink et al., 2011). Por otra parte, se ha visto que la Formina FH5 de clase II es crucial para la organización de la actina y la división de las células del arroz. En este estudio se observó que la formina afectó la expansión celular y la morfogénesis de las plantas en el cultivo del arroz. Además, el citoesqueleto de actina es utilizado como regulador en el alargamiento celular en algunas plantas como *Arabidopsis thaliana* (Yang et al., 2011). El estudio de Favery et al. (2004) muestra que tres forminas de tipo I, regulan el crecimiento en células gigantes y que específicamente la formina AtFH6 se encuentra a lo largo de la membrana plasmática. Por consiguiente, los investigadores de este último estudio lograron inferir que las forminas de este tipo cumplen un rol crucial en la organización del citoesqueleto de actina en la membrana plasmática, utilizada para el crecimiento celular.

Basados en la información anteriormente expuesta sobre el funcionamiento de la Formina, es posible inferir que la formina de *U. maydis* pueda estar imitando de manera funcional a la formina de *Z. mays*, con el objetivo de alterar la duplicación celular de la planta promoviendo la formación de tumores, una de las consecuencias que tiene *U. maydis*. La aparición de tumores en *U. maydis* empieza a producirse 2 días después de la infección (K. Lee, Pan, & May, 2009). Esto es totalmente coherente con nuestros niveles de expresión diferencial en donde se evidencia que la infección se genera a partir de los 2 hasta los 12 días. Se observó un efecto parecido en las proteínas CLE en nemátodos formadores de nodo, y en las plantas, estas proteínas están involucradas en la división celular (Clark et al., 1995).

Por último, la proteína Diaglicerol aciltransferasa (DGAT) cataliza los pasos en los que se encuentra involucrada la biosíntesis del triacilglicerol. Este es un componente fundamental para las membranas biológicas, el crecimiento celular y como fuente de energía. Además, los lípidos de la pared celular del huésped pueden actuar alternativamente como barreras antifúngicas o como inductores de patogenicidad (Keyhani, 2017). Existen investigaciones vinculadas a la función que cumple la proteína DGAT en donde Sharma (2016) explica acerca de la posible patogenicidad relacionada a *Colletotrichum gloeosporioides*. Sharma (2018) considera que la DGAT2 es crucial para la síntesis de triacilglicerol (TAG) involucrada en la homeostasis de la membrana celular y de los procesos celulares. Además, se ha visto que actúa en la reproducción y en la virulencia de *Botrytis cinerea*. Un mutante (BCM-55) con alteración en un gen (BcDGAT2) de la proteína DGAT2, mostró virulencia en los tejidos de varios huéspedes. El resultado que presentó el mutante de inserción fue el retraso en la germinación de las esporas y un bajo potencial de penetración.

La función que podría cumplir la DGAT en el proceso de infección es desconocido o a su vez, si esta proteína tiene un rol dentro de este proceso todavía no se ha reportado.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Existen proteínas de *U. maydis* que se asemejan a proteínas de *Z. mays* en secuencia, localización subcelular y co-expresión bajo condiciones de infección. Estas proteínas son fuertes candidatas para cumplir roles miméticos dentro de la planta.

De la misma forma, se logró desarrollar un método semiautomático de detección de mimetismo molecular *in silico* el cual ha arrojado candidatos de mimetismo molecular prometedores. Es la primera vez que uno de estos métodos se desarrolla para un sistema planta-patógeno.

UGGT está involucrada en el crecimiento de la planta y en el control del plegamiento de las proteínas en el retículo endoplasmático. Por esta razón, cuando exista una sobreexpresión de esta proteína podría incrementar el crecimiento celular, lo que podría conllevar a la formación de tumores. Además, sería capaz de retrasar o suprimir el reconocimiento de la SAR permitiendo la infección de la planta.

La formina actúa en la división celular y en la formación del anillo de actomiosina. Por este motivo, esta proteína podría intervenir en el crecimiento desmedido de la célula, dando lugar a la posible formación de tumores.

5.2 Recomendaciones

Para poder determinar si estas proteínas en realidad son casos de mimetismo molecular, se recomienda hacer estudios *in vitro*.

Se sugiere utilizar un patosistema diferente para poder comprobar si el método desarrollado es el adecuado en todos los casos.

Se recomienda ampliar el análisis estructural para poder observar de mejor manera la interacción de mimetismo molecular con el ligando original de la planta.

REFERENCIAS

- Abramovitch, R. B., Janjusevic, R., Stebbins, C. E., & Martin, G. B. (2006). *Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2851–2856. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507892103>
- Acqua, M. D., Gatti, D. M., Pea, G., Cattonaro, F., Coppens, F., Magris, G., Pè, M. E. (2015). *Genetic properties of the MAGIC maize population : a new platform for high definition QTL mapping in Zea mays. Genome Biology*, 1–23. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0716-z>
- Alexandru, P. O. P. H., Rusu, T., & Bogdan, I. (2018). *Study Concerning the Herbicidation Efficacy on Weed Biomass in Maize Crops*, 11, 7–12.
- Alto, N. M., Shao, F., Lazar, C. S., Brost, R. L., Chua, G., Mattoo, S., Dixon, J. E. (2006). *Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. Cell*, 124(1), 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.031>
- Anders, S., & Huber, W. (2010). *Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biology*, 11(10), R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- Blanco-Herrera, F., Moreno, A. A., Tapia, R., Reyes, F., Araya, M., Alessio, C. D., Orellana, A. (2015). *The UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase (UGGT), a key enzyme in ER quality control , plays a significant role in plant growth as well as biotic and abiotic stress in Arabidopsis thaliana. BMC Plant Biology*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0525-2>
- Christensen, S. A., & Kolomiets, M. V. (2011). *The lipid language of plant-fungal interactions. Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 48(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.005>

- Clark, S. M., Running, M. P., & Meyerowitz, E. M. (1995). *CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1*. *Development*, 121(7), 2057–2067.
- Cosio, C., & Dunand, C. (2009). *Specific functions of individual class III peroxidase genes*. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 391–408. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern318>
- Covas, G. (2007). El carbón común del maíz causado por *Ustilago maydis*. <https://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-carbonmaizcialp.pdf>.
- Cuche, A., Sigrist, C. J. A., Castro, E. De, Cerutti, L., Hulo, N., Bridge, A., Xenarios, I. (2013). *New and continuing developments at PROSITE*, 41(November 2012), 344–347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>
- Días Puentes, L. N. (2012). *Systemic Acquired Resistance Induced By Salicylic Acid Resistência Sistêmica Adquirida*. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol 10 No. 2 (257 - 267)*, 10(2), 257–267.
- Dobon, A., Bunting, D. C. E., Cabrera-Quio, L. E., Uauy, C., & Saunders, D. G. O. (2016). *The host-pathogen interaction between wheat and yellow rust induces temporally coordinated waves of gene expression*. *BMC Genomics*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2684-4>
- Doxey, A. C., & McConkey, B. J. (2013). *Prediction of molecular mimicry candidates in human pathogenic bacteria*. *Virulence*, 4(6), 453–466. <https://doi.org/10.4161/viru.25180>
- Elde, N. C., & Malik, H. S. (2009). *The evolutionary conundrum of pathogen mimicry*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(11), 787–797. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2222>
- FAO. (2016). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. <https://doi.org/0251-1371>
- Favery, B., Chelysheva, L. A., Lebris, M., Jammes, F., Marmagne, A., Almeida-

- engler, J. De, Arkowitz, R. A. (2004). *Arabidopsis Formin AtFH6 Is a Plasma Membrane – Associated Protein Upregulated in Giant Cells Induced by Parasitic Nematodes*, 16(September), 2529–2540. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024372.2>
- Finn, R. D., Miller, B. L., Clements, J., & Bateman, A. (2014). *iPfam: a database of protein family and domain interactions found in the Protein Data Bank*. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D364-373. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1210>
- Galán, J. E., & Zhou, D. (2000). *Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 8754–8761.
- Galyov, E. E., Bakshi, C. S., Singh, V. P., Wood, M. W., Jones, P. W., & Wallis, T. S. (2000). *Identification of SopE2, a Salmonella Secreted Protein Which Is Highly Homologous to SopE and Involved in Bacterial Invasion of Epithelial Cells*. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2341–2344. <https://doi.org/10.1128/JB.182.8.2341-2344.2000>. Updated
- Gangappa, S., van Dyk, L. F., Jewett, T. J., Speck, S. H., & Virgin, H. W. th. (2002). *Identification of the in vivo role of a viral bcl-2*. *Journal of Experimental Medicine*, 195(7), 931–940. <https://doi.org/10.1084/jem.20011825>
- Garavaglia, B. S., Thomas, L., Zimaro, T., Gottig, N., Daurelio, L. D., Ndimba, B., Gehring, C. (2010). *A plant natriuretic peptide-like molecule of the pathogen Xanthomonas axonopodis pv. citri causes rapid changes in the proteome of its citrus host*. *BMC Plant Biology*, 10, 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-51>
- Gibbons, T. R., Mount, S. M., Cooper, E. D., & Delwiche, C. F. (2015). *Evaluation of BLAST-based edge-weighting metrics used for homology inference with the Markov Clustering algorithm*. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0625-x>

- Gomez-Lopez, A., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J. L., & Cuenca-Estrella, M. (2005). *Susceptibility profile of 29 clinical isolates of Rhodotorula spp. and literature review. Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(3), 312–316. <https://doi.org/10.1093/jac/dki020>
- González-Cortés, N., Silos-Espino, H., Carlos, J., Cabral, E., Archivaldo, J., & Leonardo, C. (2016). Características y propiedades del maíz (*Zea mays* L.) criollo cultivado en Aguascalientes , México * Characteristics and properties of maize (*Zea mays* L.) grown in native Aguascalientes , Mexico Resumen Introducción, 7, 669–680.
- Gonzalez, V. H., Tollenaar, M., Bowman, A., Good, B., & Lee, E. A. (2018). *Maize yield potential and density tolerance. Crop Science*, 58(2), 472–485. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.06.0547>
- Goode, B. L., & Eck, M. J. (2007). *Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly*. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142647>
- Gowthaman, U., & Eswarakumar, V. P. (2013). *Good Artists Copy; Great Artists Steal. Virulence*, 4(6), 433–434. Recuperado el 19 de abril de 2019 de <http://quoteinvestigator.com/2013/03/06/artists-steal/>
- Hebert, F. O., Phelps, L., Samonte, I., Panchal, M., Grambauer, S., Barber, I., Aubin-Horth, N. (2015). *Identification of candidate mimicry proteins involved in parasite-driven phenotypic changes. Parasites & Vectors*, 8, 225. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0834-1>
- Hernández, D. R. O., Araiza, M. G., Juan, V., & Elisabet, P. P. (2019). *New Insights of Ustilago maydis as Yeast Model for Genetic and Biotechnological Research : A Review. Current Microbiology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01629-4>
- Hernández, E. S., Santiago, A. P., Campos, E. P., & Alva, F. C. (2013). Efecto de la Concanavalina A en el cultivo del fitopatógeno *Ustilago maydis*. *Interciencia*, 28(5), 276-280+247.

- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). *WoLF PSORT: Protein localization predictor*. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), 585–587. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm259>
- Hunter, S., Jones, P., Mitchell, A., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bateman, A., Yong, S. Y. (2012). *InterPro in 2011: New developments in the family and domain prediction database*. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), 306–312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr948>
- Janjusevic, R., Abramovitch, R. B., Martin, G. B., & Stebbins, C. E. (2006). *A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase*. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5758), 222–226. <https://doi.org/10.1126/science.1120131>
- Johansson, H. J., Vallhov, H., Holm, T., Gehrman, U., Andersson, A., Johansson, C., Scheynius, A. (2018). *Extracellular nanovesicles released from the commensal yeast *Malassezia sympodialis* are enriched in allergens and interact with cells in human skin*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27451-9>
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Birren, B. W. (2006). *Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis**. *Nature*, 444(7115), 97–101. <https://doi.org/10.1038/nature05248>
- Kerscher, O., Felberbaum, R., & Hochstrasser, M. (2006). *Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 159–180. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093503>
- Keyhani, N. O. (2017). *Lipid biology in fungal stress and virulence: entomopathogenic fungi*. *Fungal Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.07.003>
- Konishi, M., Hatada, Y., & Horiuchi, J. -i. (2013). *Draft Genome Sequence of the Basidiomycetous Yeast-Like Fungus *Pseudozyma hubeiensis* SY62*,

Which Produces an Abundant Amount of the Biosurfactant Mannosylerythritol Lipids. Genome Announcements, 1(4), 13–14.
<https://doi.org/10.1128/genomea.00409-13>

- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Lanver, D., Müller, A. N., Happel, P., Schweizer, G., Haas, F. B., Franitza, M., Kahmann, R. (2018). *The Biotrophic Development of Ustilago maydis Studied by RNA-Seq Analysis. The Plant Cell*, 30(2), 300–323. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00764>
- Lee, J., Cho, Y. G., Kim, D. S., Choi, S. I., & Lee, H. S. (2018). *First Case of Catheter-related Malassezia pachydermatis Fungemia in an Adult. Annals of Laboratory Medicine*, 39(1), 99. <https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.1.99>
- Lee, K., Pan, J. J., & May, G. (2009). *Endophytic Fusarium verticillioides reduces disease severity caused by Ustilago maydis on maize*, 1. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01719.x>
- Lima-Medina, I., Barvo, R., & Aguilar-Gomez, M. (2018). *Phytoparasitic nematodes associated with the cultivation of Maize (Zea mais L.) in the regions of Puno and Cusco*, 20(4). Recuperado el 13 de marzo de 2019 de <http://www.scielo.org.pe/pdf/ria/v20n1/a04v20n1.pdf>
- Ludin, P., Nilsson, D., & Mäser, P. (2009). *Symposia and Oral Abstracts. Integrative and Comparative Biology*, 49(Supplement 1), e1–e190. <https://doi.org/10.1093/icb/icp002>
- Maria, M. C., Boote, K. J., Sentelhas, P. C., & Romanelli, T. L. (2018). *Variability and limitations of maize production in Brazil: Potential yield, water-limited yield and yield gaps. Agricultural Systems*, 165(December 2017), 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2018.07.004>

- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G. J., Duchaussoy, F., Grigoriev, I. V. (2008). *The genome of Laccaria bicolor provides insights into mycorrhizal symbiosis*. *Nature*, 452(7183), 88–92. <https://doi.org/10.1038/nature06556>
- Martínez Rodríguez, J. M. (2010). Acuíferos y agroquímicos en una región fronteriza: retos y oportunidades del TLCAN para la agricultura mexicana. <http://www.cec.org/islandora/es/item/1882-aquifers-and-agrochemicals-in-border-region-es.pdf>
- Mas Benavente, J. M. (2000). Comparación computacional de estructuras de proteínas. Aplicación al estudio de un inhibidor de carboxipeptidasa como agente antitumoral. *Universitat Autònoma de Barcelona*.
- Mimica, N. (2018). *European Union provides € 12 million in support of global food security*, 1–3. <http://www.fao.org/news/story/en/item/1171495/icode/>
- Moran, L. M. (2015). *Ustilago maydis Infection of the Nonnatural Host Arabidopsis thaliana* This article is from the May 2005 issue of published by The American Phytopathological Society For more information on this and other topics, (October 2015). <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0480>
- Morita, T., Koike, H., Koyama, Y., Hagiwara, H., Ito, E., Fukuoka, T., Kitamoto, D. (2013). *Genome Sequence of the Basidiomycetous Yeast Pseudozyma antarctica T-34, a Producer of the Glycolipid Biosurfactants Mannosylerythritol Lipids*. *Genome Announcements*, 1(2), 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00064-13>
- Nembaware, V., Seoighe, C., Sayed, M., & Gehring, C. (2004). *A plant natriuretic peptide-like gene in the bacterial pathogen Xanthomonas axonopodis may induce hyper-hydration in the plant host: A hypothesis of molecular mimicry*. *BMC Evolutionary Biology*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-10>
- Ngugi, H. K., & Scherm, H. (2006). *Mimicry in plant-parasitic fungi*. *FEMS*

Microbiology Letters, 257(2), 171–176. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00168.x>

- O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., Vaillancourt, L. J. (2012). *Lifestyle transitions in plant pathogenic Colletotrichum fungi deciphered by genome and transcriptome analyses*. *Nature Genetics*, 44(9), 1060–1065. <https://doi.org/10.1038/ng.2372>
- Olsen, A. N., & Skriver, K. (2003). *Ligand mimicry? Plant-parasitic nematode polypeptide with similarity to CLAVATA3*. *Trends in Plant Science*, 8(2), 55–57. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00003-7)
- Patel, N., Hamamouch, N., Li, C., Hewezi, T., Hussey, R. S., Baum, T. J., Davis, E. L. (2010). *A nematode effector protein similar to annexins in host plants*. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 235–248. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp293>
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). *SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions*. *Nature Methods*, 8(10), 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Plaza, D. F., Schmieder, S. S., Lipzen, A., Lindquist, E., & Künzler, M. (2016). *Identification of a Novel Nematotoxic Protein by Challenging the Model Mushroom Coprinopsis cinerea with a Fungivorous Nematode*. *Genes/Genomes/Genetics*, 6(1), 87–98. <https://doi.org/10.1534/g3.115.023069>
- Plessis, J. du. (2017). *Maize production*. *Departament of Agriculture and Obtainable from Resource Center*, 10. Recuperado el 14 de septiembre del 2019 de [http://teca.fao.org/sites/default/files/technology_files/MAIZE PRODUCTION_0.pdf](http://teca.fao.org/sites/default/files/technology_files/MAIZE_PRODUCTION_0.pdf)
- Quintero, L. (2019). *Sistema experto para el diagnóstico presuntivo de enfermedades fúngicas en los cultivos*. 61–75. <https://rcci.uci.cu/?journal=rcci&page=article&op=view&path%5B%5>

D=1829

- Rafiqi, M., Ellis, J. G., Ludowici, V. A., Hardham, A. R., & Dodds, P. N. (2012). *Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant – fungal interactions. Current Opinion in Plant Biology, 15*(4), 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.003>
- Raymond, D. (1964). *Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. Am Naturalist, 98*, 129–149.
- Rosebrock, T. R., Zeng, L., Brady, J. J., Abramovitch, R. B., Xiao, F., & Martin, G. B. (2007). *A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. Nature, 448*(7151), 370–374. <https://doi.org/10.1038/nature05966>
- Rossi, D., Guerra, R. ;, Plaza, F. ;, Vuletic, M. C. ;, Brücher, E. ;, & Guerra, E. ; (2016). Enfermedades del maíz en las últimas cinco campañas.
- Rudd, J. J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., Derbyshire, M., Andongabo, A., Devonshire, J., Courbot, M. (2015). *Transcriptome and Metabolite Profiling of the Infection Cycle of Zymoseptoria tritici on Wheat Reveals a Biphasic Interaction with Plant Immunity Involving Differential Pathogen Chromosomal Contributions and a Variation on the Hemibiotrophic Lifestyle De. Plant Physiology, 167*(3), 1158–1185. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255927>
- Ruiz-Herrera, J. (2008). Revista Electrónica Nova Scientia *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico José Ruiz Herrera. *Revista Electrónica Nova Scientia Ustilago, 1*, 118–135. <https://doi.org/10.1063/1.4862656>
- Saville, Donaldson, & Doyle. (2012). *Investigating Host Induced Meiosis in a Fungal Plant Pathogen. Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*, (February 2012). <https://doi.org/10.5772/30032>
- Schink, K. O., Bo, M., Freitag, J., Lanver, D., & Bo, C. (2011). *Septation of Infectious Hyphae Is Critical for Appressoria Formation and Virulence*

in the Smut Fungus Ustilago Maydis, 7(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002044>

Shahrizaila, N., & Yuki, N. (2011). *The role of immunotherapy in Guillain-Barré syndrome: understanding the mechanism of action. Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 12(10), 1551–1560.
<https://doi.org/10.1517/14656566.2011.564160>

Sharma, E., Tayal, P., Anand, G., Mathur, P., & Kapoor, R. (2018). *Functional analysis of diacylglycerol O-acyl transferase 2 gene to decipher its role in virulence of Botrytis cinerea. Current Genetics*, 64(2), 443–457. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0752-1>

Sharma, M., Guleria, S., & Kulshrestha, S. (2016). *Diacylglycerol acyl transferase: A pathogenicity related gene in Colletotrichum gloeosporioides. Journal of Basic Microbiology*, 56(11), 1308–1315.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201500663>

Singer, A. U., Schulze, S., Skarina, T., Xu, X., Cui, H., Eschen-Lippold, L., Bonas, U. (2013). *A pathogen type III effector with a novel E3 ubiquitin ligase architecture. PLoS Pathogens*, 9(1), e1003121.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003121>

Singh, M., & Kumar, S. (2016). *Broadening the genetic base of grain cereals. Broadening the Genetic Base of Grain Cereals*, (September), 1–275.
<https://doi.org/10.1007/978-81-322-3613-9>

Skalski, J. H., Limon, J. J., Sharma, P., Gargus, M. D., Nguyen, C., Tang, J., Underhill, D. M. (2018). *Expansion of commensal fungus Wallemia mellicola in the gastrointestinal mycobiota enhances the severity of allergic airway disease in mice. PLoS Pathogens*, 14(9), 1–24.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007260>

Souza, C., Kronstad, J., Taylor, G., & Warren, R. (2011). *Genome Variation in Cryptococcus gattii, an Emerging Pathogen of Immunocompetent Hosts*, 2(1), 1–11. Recuperado el 17 de marzo de 2019 de http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/Mtruncatula_Interaction

withInsects.pdf

- Strasse, K. (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity *Ustilago maydis*, an interesting model, 5, 83–92. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2004.00210.X>
- Toome, M., Ohm, R. A., Riley, R. W., James, T. Y., Lazarus, K. L., Henrissat, B., Aime, M. C. (2014). *Genome sequencing provides insight into the reproductive biology, nutritional mode and ploidy of the fern pathogen Mixia osmundae*. *New Phytologist*, 202(2), 554–564. <https://doi.org/10.1111/nph.12653>
- Wang, J., Lee, C., Replogle, A., Joshi, S., Korkin, D., Hussey, R., Mitchum, M. G. (2010). *Dual roles for the variable domain in protein trafficking and host-specific recognition of Heterodera glycines CLE effector proteins*. *The New Phytologist*, 187(4), 1003–1017. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03300.x>
- Wang, J., Replogle, A., Hussey, R., Baum, T., Wang, X., Davis, E. L., & Mitchum, M. G. (2011). *Identification of potential host plant mimics of CLAVATA3/ESR (CLE)-like peptides from the plant-parasitic nematode Heterodera schachtii*. *Molecular Plant Pathology*, 12(2), 177–186. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00660.x>
- Wang, X., Mitchum, M. G., Gao, B., Li, C., Diab, H., Baum, T. J., Davis, E. L. (2005). *A parasitism gene from a plant-parasitic nematode with function similar to CLAVATA3/ESR (CLE) of Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, 6(2), 187–191. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00270.x>
- Woychik, R. P., Maas, R. L., Zeller, R., Vogt, T. F., & Leder, P. (1990). *“Formins”: proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene*. *Nature*, 346(6287), 850–853.
- Yan, J. P., He, H., Zhang, J. J., Liu, Z., Wang, J. M., Li, X. F., & Yang, Y. (2010). *Overexpression of UDP-glucosyltransferase 71C5 increases glucose tolerance in Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant*

Physiology, 57(6), 875–881.
<https://doi.org/10.1134/s1021443710060178>

Yang, W., Ren, S., Zhang, X., Gao, M., Ye, S., Qi, Y., He, Z. (2011). *BENT UPPERMOST INTERNODE1 Encodes the Class II Formin FH5 Crucial for Actin Organization and Rice Development*, 23(February), 661–680. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081802>

Yi, M., & Valent, B. (2013). *Communication between Filamentous Pathogens and Plants at the Biotrophic Interface*, (May), 1–25. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172916>

Zhou, Y., & Zhu, Y. (2015). *Diversity of bacterial manipulation of the host ubiquitin pathways*. *Cellular Microbiology*, 17(1), 26–34. <https://doi.org/10.1111/cmi.12384>

