



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Análisis transcriptómico de *Physcomitrella patens*
durante la interacción con el hongo patógeno
Colletotrichum gloeosporioides.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Lic. Adriana Otero Blanca

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Ramón Alberto Batista García

Cuernavaca, Morelos

Junio, 2020

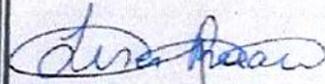
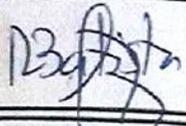
SINODALES

- Dr. Daniel Padilla Chacon
- Dra. Verónica Lira Ruan
- Dra. Sonia Dávila Ramos
- Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
- Dr. Ramón Alberto Batista García

DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “Análisis transcriptómico de *Physcomitrella patens* durante la interacción con el hongo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*”, que presenta la alumna Adriana Otero Blanca (10019233) para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Daniel Padilla Chacon Colegio de Posgraduados	Aprobado	
Dra. Verónica Lira Ruan CIDC-UAEM	Aprobado	
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC-UAEM	Aprobado	
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente CEIB-UAEM	Aprobado	
Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC-UAEM	Aprobado	

AGRADECIMIENTOS

Todo el que haya pasado por estudios de Maestría o Doctorado sabe que este no es trabajo para una sola persona. Esta tesis no estuviese terminada si no fuera por la ayuda y participación de muchas personas, a las que quiero que llegue mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Ramón Batista por brindarme la oportunidad y apoyo en todo momento, para él mi agradecimiento y admiración.

A la Dra. Inés Ponce de León, por abrirme las puertas de su laboratorio y su casa.

A mi mamá por su apoyo y por hacerme fuerte, si no fuera por ella, no hubiese llegado hasta aquí.

A mi esposo Eduardo por tener siempre fe en mí, saltar conmigo al vacío y luego darme fuerzas para seguir adelante.

A Guille por trabajar mano a mano conmigo, y por responder siempre a todas mis preguntas (que fueron muchas).

A Yordanis por compartirme sus conocimientos y por las noches en vela ayudándome con la bioinformática.

A Angélica (Angie) porque me enseñó a dar los primeros pasos en un mundo completamente desconocido.

A la Dra. Verónica Lira por brindarme su laboratorio y ayudarme a perfeccionar este trabajo con señalamientos siempre precisos.

A mis amigos, los viejos, los nuevos, los que están lejos y los que están cerca, TODOS. Tengo la fortuna de decir que son muchos y a todos les agradezco su ayuda, tanto en el trabajo como en la vida.

A Eilyn y Dany por darle un sabor cubano a Montevideo y acogerme en su hogar.

A Leo, Lu, Sofi, Paola, Fer y el resto del laboratorio de Biología Molecular del IBCEE por hacer de mi estancia allí una maravilla.

Al Dr. Ayixon por brindarme amablemente su tiempo y sacarme de apuros.

A CONACyT por el apoyo económico brindado a lo largo de mis estudios, dándome la oportunidad de realizar este trabajo de la manera más efectiva posible.

A todos muchísimas gracias, y sepan que esto no acaba aquí.

Tabla de contenido

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	5
3.1. Mecanismos de defensa en plantas.....	6
3.2. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	8
3.2.1. La antracnosis.....	9
3.2.2. Ciclo de infección de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	12
3.2.3. Incidencia de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y la antracnosis.....	15
3.3. <i>Physcomitrella patens</i>	16
3.3.1. Ciclo de vida de <i>Physcomitrella patens</i>	18
3.3.2. <i>Physcomitrella patens</i> como modelo experimental.....	21
3.4. Transcriptómica.....	23
4. Antecedentes.....	27
4.1. Respuesta de <i>Physcomitrella patens</i> al ataque de patógenos.....	27
4.2. Transcriptómica de <i>Physcomitrella patens</i>	31
5. Problema.....	33
6. Hipótesis.....	33
7. Objetivos.....	33
7.1. Objetivo general.....	33
7.2. Objetivos específicos.....	33
8. Metodologías.....	35
8.1. Cultivo de <i>P. patens</i> y <i>C. gloeosporioides</i> e inoculación del patógeno.....	35
8.2. Caracterización morfológica de la interacción entre <i>P. patens</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	35
8.3. Análisis fenómico de la interacción entre <i>P. patens</i> y.....	36
8.3.1. Determinación de la eficiencia cuántica del Fotosistema II.....	36
8.3.2. Análisis de segmentación de color.....	37
8.3.3. Análisis de variación de temperatura.....	38

8.4. Extracción, purificación y secuenciación del ARN total de <i>P. patens</i> sin inocular e inoculado con <i>C. gloeosporioides</i> .	38
8.5. Procesamiento de las secuencias del transcriptoma.....	39
8.6. Análisis de expresión diferencial.....	39
8.7. Enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas	40
9. Resultados y Discusión	41
9.1. <i>C. gloeosporioides</i> infecta a <i>P. patens</i> y provoca síntomas de enfermedad	41
9.2. La infección con <i>C. gloeosporioides</i> provoca disminución del rendimiento cuántico del fotosistema II de <i>P. patens</i>	43
9.3. La infección con <i>C. gloeosporioides</i> provoca cambios en la coloración del tejido de <i>P. patens</i>	46
9.4. <i>C. gloeosporioides</i> provoca cambios de temperatura en <i>P. patens</i>	47
9.5. La presencia de hormonas en el medio de cultivo mejora la resistencia de <i>P. patens</i> ante la infección con <i>C. gloeosporioides</i>	49
9.6. Purificación y análisis de calidad del ARN	51
9.7. Análisis de calidad de las secuencias.....	52
9.8. Alineamiento con el genoma de referencia	54
9.9. Análisis de expresión diferencial.....	55
9.10. Enriquecimiento de términos de GO	62
9.11. Respuesta de <i>P. patens</i> durante la interacción con <i>C. gloeosporioides</i>	65
9.11.1. Ruta de fenilpropanoides y reforzamiento de la pared celular	65
9.11.2. Expresión de genes asociados a la respuesta de defensa.....	69
9.11.3. Receptores LRR	71
9.11.4. Especies reactivas del oxígeno (ROS)	72
9.11.5. Otros genes expresados diferencialmente	73
9.12. Respuesta de <i>P. patens</i> debido a la duración de la infección	76
10. Conclusines.....	78
11. Perspectivas.....	79
12. Referencias	80

1. RESUMEN

Las malas prácticas de gestión agrícola y de los recursos hídricos, así como el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas, han dado lugar a la erosión y la desertificación del suelo. Actualmente alrededor del 70% de los suelos tienen problemas de degradación en diferentes niveles, desde leves hasta extremos. El desarrollo de nuevas estrategias para el control de las enfermedades vegetales y para el mejoramiento de las plantas, reduciendo el empleo de fertilizantes industriales, puede constituir una alternativa que ayude a disminuir la contaminación y al mismo tiempo, controlar la incidencia de los patógenos resistentes. *Physcomitrella patens* es un organismo modelo ampliamente utilizado para el estudio de las respuestas de defensa en plantas. *Colletotrichum gloeosporioides* es un hongo fitopatógeno responsable de grandes pérdidas en la agricultura a nivel mundial.

En este estudio se analizó mediante microscopía óptica, fenómica y transcriptómica comparativa la interacción entre *P. patens* y *C. gloeosporioides*. A partir de las 8 horas posteriores a la infección se observaron respuestas tanto celulares como moleculares de *P. patens* ante el ataque del patógeno, aun cuando los síntomas no eran visibles a simple vista. También se calculó el rendimiento cuántico de la fotosíntesis como medida indirecta del estrés en la planta, y se observó cómo este parámetro disminuye drásticamente en las muestras infectadas. Asimismo, se analizó el efecto de la aplicación las fitohormonas ácido salicílico y ácido jasmónico, en la respuesta de defensa de *P. patens*. Se observó que, en presencia de ácido salicílico y ácido jasmónico, disminuye significativamente el daño celular en *P. patens* ante la infección con *C. gloeosporioides*. Se obtuvo el transcriptoma de *P. patens* a las 8 y 24 horas de

infección con *C. gloeosporioides*. El análisis bioinformático reveló que, debido al efecto de la infección 841 genes se regulan positivamente y 410 negativamente, mientras que como consecuencia de la duración de la infección 206 genes son regulados positivamente y 160 negativamente.

Entre las principales rutas bioquímicas sobrerrepresentadas como consecuencia de la infección se encontró la síntesis de fenilpropanoides, que está estrechamente relacionado con la respuesta de defensa en plantas. También se encontraron sobrepresadas las vías relacionadas con las especies reactivas del oxígeno (H_2O_2) y de síntesis y remodelación de componentes de la pared celular como lignanos, celulosa y pectina. Genes específicos de respuesta de defensa, como los que codifican para las proteínas tipo DIR1, ERG3 y SNC1 también estaban sobrepresados, al igual que varios factores de transcripción típicos de las respuestas a estrés biótico en plantas. Sin embargo, no se encontraron diferencialmente expresados algunos genes típicos de la respuesta de defensa en plantas vasculares como el gen que codifica para la proteína reguladora NPR1 o los factores de transcripción WRKY.

2. ABSTRACT

Poor agricultural and water management practices, as well as excessive use of fertilizers and pesticides, have led to soil erosion and desertification. Currently around 70% of soils have degradation problems at different levels, from mild to extreme. The development of new strategies to control plant diseases and to improve plants, reducing the use of industrial fertilizers, can be an alternative that helps to reduce contamination and, at the same time, control the incidence of resistant pathogens. *Physcomitrella patens* is a model organism widely used for the study of defense responses in plants. *Colletotrichum gloeosporioides* is a phytopathogenic fungus responsible for large losses in agriculture worldwide.

In this study, the interaction between *P. patens* and *C. gloeosporioides* was analyzed using comparative light microscopy, phenomic, and transcriptomic. Since 8 hours after infection, both, cellular and molecular responses of *P. patens* to the attack of the pathogen were observed, even when the symptoms were not visible to the naked eye. The quantum yield of photosynthesis was also calculated as an indirect measure of stress in the plant. It was observed how this parameter decreases dramatically in the infected samples. Likewise, the effect of the application of the phytohormones salicylic acid and jasmonic acid on the defense response of *P. patens* was analyzed. It was observed that, in the presence of salicylic acid and jasmonic acid, cell damage in *P. patens* decreases significantly when infected with *C. gloeosporioides*. The *P. patens* transcriptome was obtained at 8 and 24 hours after infection with *C. gloeosporioides*. Bioinformatic analysis revealed that, due to the effect of infection, 841 genes are upregulated and 410 downregulated, while 206 genes are upregulated and 160 downregulated as a consequence of the duration of infection.

Synthesis of phenylpropanoids was one of the main biochemical over-represented pathways as consequence of infection. This pathway is closely related to the defense response in plants. The pathways related to reactive oxygen species (H_2O_2) and synthesis and remodeling of cell wall components, such as lignans, cellulose and pectin were also overexpressed. Specific defense response genes, like those encoding DIR1, ERG3, and SNC1 proteins, were also overexpressed, as well as several transcription factors typical of responses to biotic stress in plants. However, some genes also typical of the defense response in vascular plants, such as genes encoding the regulatory protein NPR1 or transcription factors WRKY were not differentially expressed.

3. INTRODUCCIÓN

El aumento de la población mundial ha generado una creciente demanda de productos agrícolas, lo cual ha llevado al uso extensivo de pesticidas y fertilizantes químicos que permiten incrementar la producción de alimentos (Fukase and Martin 2017; Carvalho 2017). Estas estrategias, aunque útiles, no han resultado suficientes para resolver la demanda de alimentos, provocando además la contaminación de aguas y suelos (Rohr et al. 2019). Las malas prácticas de gestión agrícola y de los recursos hídricos, el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas, y el vertimiento incontrolado de desechos nocivos, han dado lugar a la erosión y la desertificación del suelo (Rahman et al. 2017). Actualmente alrededor del 70% de los suelos tienen problemas de degradación en diferentes niveles, desde leves hasta extremos (Reza Salgado et al. 2017). Asimismo, la aplicación de estos compuestos químicos ha originado poblaciones de bacterias y hongos fitopatógenos resistentes a estos pesticidas, lo que reduce significativamente su efectividad en el combate de las enfermedades. Existen numerosas evidencias de que los pesticidas empleados para la protección de los cultivos de interés para el hombre son dañinos para el medio ambiente, pueden comprometer en cierta medida la calidad de las cosechas e incluso afectar la salud de los trabajadores de las granjas y los consumidores (Burketova et al. 2015; Ahmed et al. 2018; Altman 2018).

Dado el grado de deterioro de los suelos, aguas subterráneas y superficiales, es necesario encontrar nuevas estrategias para el control de las enfermedades vegetales. El mejoramiento de las plantas constituye una alternativa que podría contribuir a reducir el empleo de fertilizantes industriales, ayudar a disminuir la contaminación y al mismo tiempo, controlar la incidencia de los patógenos resistentes.

A lo largo de su evolución las plantas han desarrollado mecanismos de resistencia que les permiten adaptarse y sobrevivir a diversos tipos de estrés biótico y abiótico. Estos mecanismos pueden ser inducidos en las plantas mediante diferentes procesos con el fin de prepararlas ante la llegada del estrés, mecanismo que se conoce como resistencia inducida (Mauch-Mani et al. 2017). El estudio y comprensión de estos mecanismos es indispensable para el desarrollo de estrategias de manejo de cultivos amigables con el ambiente.

3.1. Mecanismos de defensa en plantas

En la naturaleza, las plantas interactúan con una amplia gama de patógenos microbianos e insectos herbívoros. A lo largo de la evolución de las plantas, las respuestas inmunes primarias y secundarias se fueron transformando para reconocer cada vez más eficazmente las características comunes o altamente especializadas del atacante encontrado, lo que resultó en mecanismos complejos de defensa inducida (Van der Ent et al. 2018). Estos sistemas defensivos pueden ser activados por el ataque de un patógeno, produciéndose lo que se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés); o por la colonización de las raíces por microorganismos radiculares no patógenos, activándose una respuesta sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés) (Jung et al. 2012; Shah and Zeier 2013; Pieterse et al. 2014).

La SAR comienza con la interacción entre receptores de reconocimiento de patrones presentes en la planta y patrones moleculares asociados a patógenos (Figura 1). Esta interacción provoca la activación de una cascada de transducción de señales que involucra la despolarización de la membrana plasmática debido al flujo de iones, la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estos mensajeros activan factores de transcripción, provocando la expresión masiva de genes

relacionados con la defensa, lo que lleva a la acumulación de enzimas y metabolitos estrés-específicos como las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), compuestos con actividad antimicrobiana como las fitoalexinas, así como lignina y calosa para el reforzamiento de la pared celular (Boller and Felix 2009; Boudsocq et al. 2010). La SAR es un mecanismo que depende de la acumulación y propagación del ácido salicílico (SA) (Gozzo and Faoro 2013) . Por otra parte, la ISR se desencadena a partir de la interacción entre microorganismos promotores del crecimiento y la planta, a nivel de la raíz de esta (Figura 1), sin embargo, la protección que inducen estos se distribuye por todo el organismo, dependiendo en este caso de las fitohormonas etileno (ET) y ácido jasmónico (JA) (Conrath 2011).

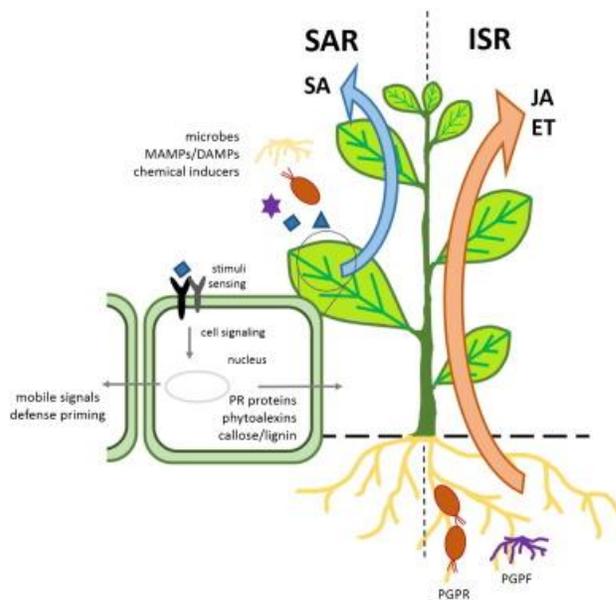


Figura 1. Esquema de diferentes tipos de resistencia sistémica (Burketova et al. 2015). A la izquierda resistencia sistémica adquirida (**SAR**) se activa con el ataque de patógenos o activadores químicos. Después del reconocimiento por un sensor, la célula de la planta desencadena respuestas complejas de señalización y defensa, incluida la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (**PR**), fitoalexinas antimicrobianas o fortificación de la pared celular con calosa o lignina. Las defensas locales son seguidas por la producción de señales móviles que se transportan a través de

xilema y partes primarias distales de la planta mediante la hormona **SA** para la acumulación de compuestos de defensa. A la derecha resistencia sistémica inducida (**ISR**) se puede desencadenar por la colonización de la raíz con rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (**PGPR**) u hongos (**PGPF**). **ISR** es independiente de **SA**, depende principalmente del ácido jasmónico (**JA**) y el etileno (**ET**).

El estudio de los diversos mecanismos naturales que las plantas han desarrollado para defenderse del ataque por patógenos ha permitido generar las bases para el

desarrollo de estrategias de manejo y de mejora genética de cultivos. Estas estrategias sólo potencian los mecanismos naturales que ya presentan las plantas, por lo que son amigables con el medio ambiente. Además, este tipo de resistencia puede ser transferida a la progenie mediante modificaciones de la estructura de la cromatina, lo que hace que su efecto sea más duradero (Gao et al. 2014).

La eficacia de estas estrategias aún no supera a la de estrategias más tradicionales. En los estudios realizados muchos de los inductores de resistencia proporcionan un nivel de protección menor que los pesticidas químicos, además las condiciones ambientales de los cultivos influyen notablemente en la eficacia de la resistencia inducida como estrategia de control de plagas (Burketova et al. 2015). Por todo esto cobra tanta importancia el estudio a nivel molecular y celular de los mecanismos naturales que las plantas han desarrollado para defenderse del ataque por patógenos. La profundización en estos conocimientos puede conducir al perfeccionamiento de la resistencia inducida como estrategia de manejo de enfermedades en las plantas.

3.2. *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum es un género amplio de hongos ascomicetos, que contiene más de 40 especies, de las cuales la mayoría provocan antracnosis en una amplia gama de plantas ornamentales y cultivos importantes como cereales y pastos, leguminosas, vegetales y cultivos perennes, incluidos árboles frutales desde las regiones tropicales a las templadas (Sharma and Kulshrestha 2015). Por otra parte, este género se ha utilizado durante muchos años en estudios relacionados con la diferenciación de hongos y las interacciones entre hongos y plantas (Perfect et al. 1999; Hong et al. 2016; Wang et al. 2017; Chakraborty et al. 2019). En base a su repercusión en los ámbitos científico y económico, el género *Colletotrichum*

fue nominado en el año 2012 como el octavo grupo más importante de hongos fitopatógenos en el mundo (Dean et al. 2012; Cheon et al. 2016).

C. gloeosporioides fue propuesto por primera vez como *Vermicularia gloeosporioides* por Penzig (1882). Luego la especie fue reclasificada por Von Arx en el complejo de especies *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc. (von Arx 1970). Durante su estadio asexual (anamorfo) la especie se clasifica como *C. gloeosporioides*, y se encuadra en la división *Eumycota*, subdivisión *Deuteromycotina*, clase *Coelomycetes* y orden *Melanconiales* (Ainsworth 1973); mientras que durante la fase sexual (telomorfo) se clasifica como *Glomerella cingulata*, que se inserta en el subreino *Dikarya*, phylum *Ascomycota*, subphylum *Pezizomycotina*, clase *Sordariomycetes* y orden *Phyllachorales* (Hibbett et al. 2007).

3.2.1. La antracnosis

La antracnosis se caracteriza por provocar manchas en las flores, pudrición de los frutos y síntomas de manchas foliares (Figura 2). *C. gloeosporioides* es capaz de invadir inflorescencias, frutas, hojas y tallos de los hospederos previo a la cosecha. Las hojas jóvenes infectadas desarrollan manchas negras, se marchitan y se caen. El hongo es capaz de persistir en los frutos y llegar a los almacenes, causando pérdidas considerables durante el almacenamiento, el transporte y la comercialización (Rabari et al. 2018). *C. gloeosporioides* provoca la antracnosis en diversos cultivos con elevada relevancia económica como cítricos, manzana, aceituna, mango, plátano y fresas, entre otros (Reboledo et al. 2015).

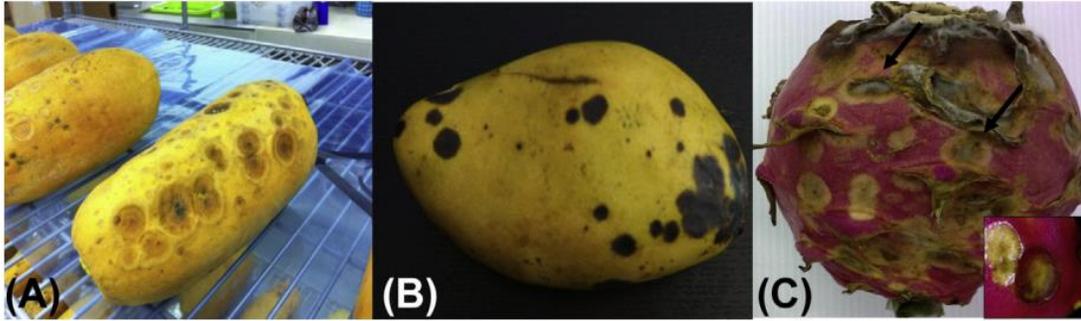


Figura 2. Síntomas típicos de antracnosis en **(A)** papaya, **(B)** mango y **(C)** pitaya. **Insertión en (C)** muestra una lesión hundida y acuosa (Siddiqui and Ali 2014).

La principal fuente de inóculo de la antracnosis en los campos tras el invierno pueden ser los frutos momificados y hojas infectadas que quedan en la copa de los árboles, o capullos de flores latentes (Wharton and Diéguez-Uribeondo 2004). El hongo esporula en los tejidos infectados durante los períodos de humedad prolongada en la primavera, y los conidios se dispersan por las salpicaduras de lluvia (Figura 3). Esta dispersión natural es de corto alcance, la dispersión de inóculo a larga distancia se debe a la distribución de plantones infectados o contaminados (Cacciola et al. 2012) y a la posible dispersión por insectos o la maquinaria de recolección. La infección de las flores durante la primavera puede ocasionar grandes pérdidas también, debido a que estas se pudren y no producen frutos (Sharma and Kulshrestha 2015).

Durante el verano, puede que las elevadas temperaturas impidan la proliferación del hongo, además mientras los frutos están verdes la infección se mantiene quiescente (Lima et al. 2011). Cuando los frutos comienzan a madurar y las condiciones ambientales son favorables, se completa la infección de los frutos apareciendo los síntomas de la antracnosis. *C. gloeosporioides* puede crecer a temperaturas entre 17 y 30 °C, siendo óptimo su crecimiento entre 25 y 28 °C, con una humedad relativa superior al 95% (Ponte 1996). Cuando están dadas las condiciones requeridas el hongo puede esporular sobre los frutos infectados y los conidios se dispersan con la lluvia, infectando otros frutos. Este ciclo secundario

se repite hasta que la temperatura media baja por debajo de los 15 °C (Moral and Trapero 2012), entonces el hongo vuelve a quedar latente en los tejidos infectados de las plantas durante el invierno (Figura 3).

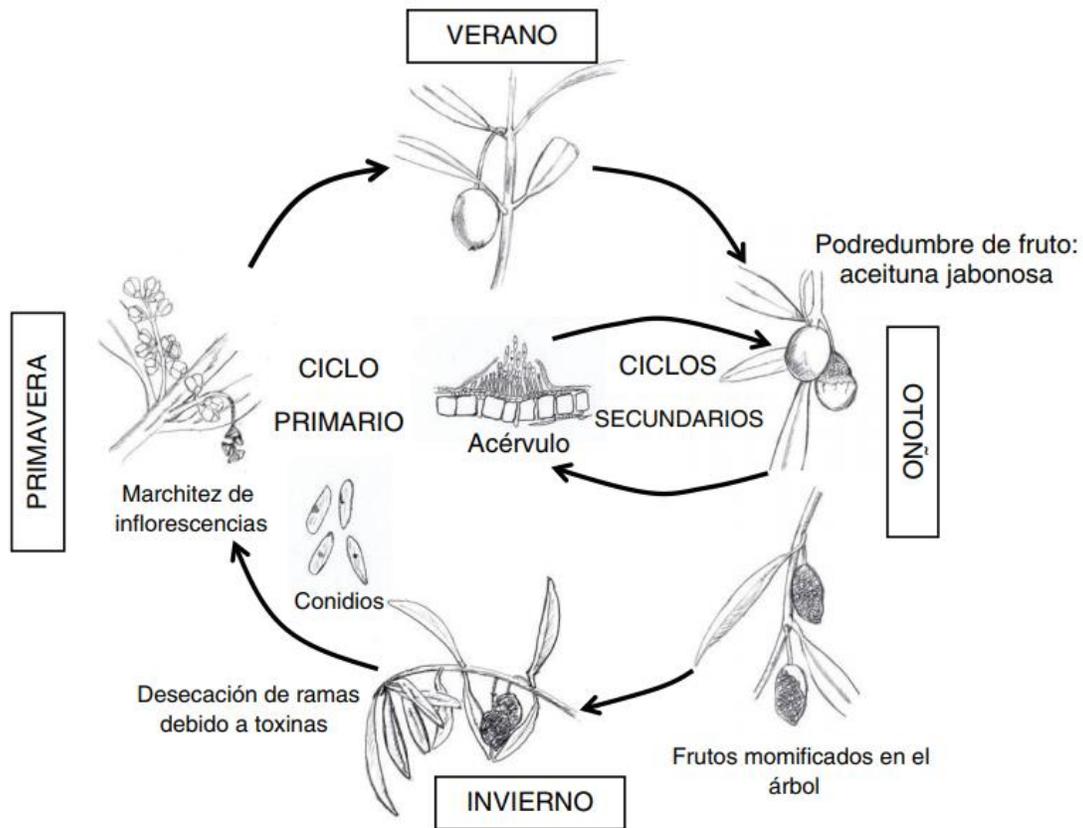


Figura 3: Ciclo de patogénesis de la Antracnosis causada por *Colletotrichum* spp (Moral et al. 2014). Durante el invierno *Colletotrichum* permanece latente en hojas, tallos y frutos desecados. Durante las lluvias de primavera el hongo esporula y los conidios se dispersan por salpicaduras de lluvia. En el verano el hongo permanece latente en los tejidos infectados y desarrolla la infección durante el otoño cuando vuelve a aumentar la humedad. Durante esta estación ocurre un ciclo secundario pues el hongo esporula en los frutos infectados y los conidios se dispersan con la lluvia infectando nuevos frutos, hasta que la temperatura media desciende con el invierno y vuelve a entrar en latencia.

3.2.2. Ciclo de infección de *Colletotrichum gloeosporioides*

C. gloeosporioides es un ascomiceto hemibiótrofo, durante la infección tiene una fase inicial biotrófica, durante la cual no se produce daño aparente en el hospedero, luego presenta una segunda fase necrotrófica, donde va destruyendo

los tejidos del hospedero (Gan et al. 2013). El proceso de infección se puede separar en las etapas siguientes:

1. La adhesión de conidios sobre las superficies de las plantas.
2. La germinación de los conidios.
3. La producción de apresorios.
4. La penetración de la epidermis de la planta.
5. El crecimiento y la colonización de los tejidos de la planta.
6. La producción de acervulos y esporulación.

Las especies del género *Colletotrichum* utilizan dos estrategias principales de infección: la colonización intramural subcuticular o la colonización intracelular que es el caso de *C. gloeosporioides* (Figura 4). En ambos casos las cuatro primeras etapas ocurren de manera muy similar. Primeramente, los conidios se adhieren a las superficies de las plantas mediante interacciones hidrofóbicas y germinan. Luego producen tubos de germinación y forman apresorios, estructuras especializadas que permiten que el hongo penetre en la cutícula del hospedero y la PC epidérmica directamente por medio de una estrecha púa de penetración que emerge de su base y presión de turgencia (Rodríguez-López et al. 2013). Los apresorios de *C. gloeosporioides* están impregnados con melanina, lo que le permite al hongo ejercer una presión osmótica mayor para penetrar la cutícula y la pared celular de las células epidérmicas del hospedero (Reboledo et al. 2015).

En el caso de las infecciones intramurales subcuticulares, luego de que la púa de penetración atraviesa la cutícula se desarrolla una hifa de infección que se desarrolla debajo de la cutícula formando una red intramural de hifas, antes de propagarse rápidamente por todo el tejido con hifas inter e intracelulares (Perfect et al. 1999). El desarrollo intramural se asocia con una hinchazón y disolución de las paredes celulares del hospedero, mientras que la propagación extensa por los

tejidos de la planta, penetrando las células de esta, provoca la aparición de zonas de necrosis (Wharton and Diéguez-Urbeondo 2004).

En el caso de la infección intracelular, después de que el patógeno atraviesa la cutícula, este penetra en las células epidérmicas y se forma una hifa de infección primaria muy gruesa (Figura 4, A) que crece hacia el lumen celular sin penetrar el protoplasto (Perfect et al. 1999). Esta es la fase biotrófica, y tiene duración variada, a veces es inexistente en dependencia del hospedero. Mientras dura esta fase no se aprecia muerte celular en los tejidos infectados. Después de colonizar una o más células huésped, estas hifas primarias dan lugar a hifas necrotróficas secundarias (Figura 4, B). Estas son estrechas y se ramifican a través de todos los tejidos del hospedero y, en última instancia, conducen al desarrollo de lesiones visibles en el sitio de infección. Finalmente, las esporas se forman en la superficie del tejido infectado y luego son dispersadas por insectos, corrientes de aire y salpicaduras de agua para iniciar otro ciclo de infección (Sharma and Kulshrestha 2015).

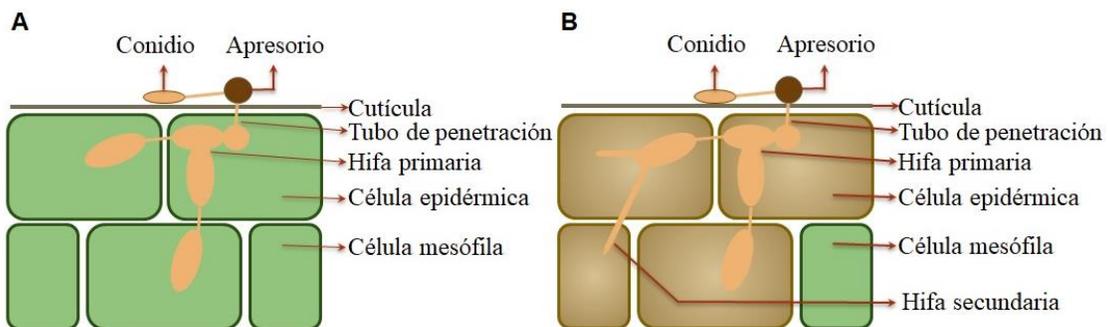


Figura 4. Estrategias de infección adoptadas por especies de *Colletotrichum* (adaptada de Wharton y Diéguez-Urbeondo, 2004). **(A)** El conidio germina y forma el apresorio, el cual produce un poro y un tubo de penetración que atraviesa la cutícula del hospedero. El tubo de penetración penetra en la célula epidérmica y se inflama para producir una vesícula de infección e hifas amplias, llamadas hifas primarias, que pueden colonizar células epidérmicas y mesófilas adyacentes. Durante las primeras etapas de este tipo de colonización, la interacción entre el huésped y el patógeno es biotrófica (célula viva representada en verde). **(B)** La subsiguiente interacción necrotrófica (representada en marrón) se caracteriza por la formación de hifas secundarias delgadas. Estas hifas secundarias crecen intracelular e intercelularmente mientras secretan enzimas degradadoras de la PC y matan a las células hospedero.

Por otra parte, en el caso de *C. gloeosporioides* puede ocurrir una infección quiescente, en la cual los conidios se adhieren, germinan, forman el apresorio sobre frutos inmaduros e invaden el hospedero hasta formar las hifas primarias, luego permanecen en latencia hasta que el fruto alcanza el climaterio, es cosechado y madura (Alkan et al. 2015). En este momento crecen las hifas secundarias, se desarrolla la fase necrotrófica de la infección y comienza la aparición de síntomas. Por lo general, los síntomas de la enfermedad en las frutas se caracterizan por lesiones pequeñas, deprimidas y húmedas que son circulares o angulares con márgenes translúcidos de color marrón claro. A medida que la infección avanza en estas lesiones circulares hundidas, se desarrollan masas conidiales de color naranja a rosa y frecuentemente se presentan en anillos concéntricos. El tejido interno es firme con una decoloración blanca grisácea, que luego se vuelve marrón (Pujari et al. 2013).

3.2.3. Incidencia de *Colletotrichum gloeosporioides* y la antracnosis.

La antracnosis está ampliamente distribuida en las regiones tropicales, subtropicales y, en menor medida, en zonas templadas. La enfermedad es consecuencia de la infección con diferentes especies de *Colletotrichum*, las cuales afectan alrededor de 3000 especies de plantas silvestres y cultivables (Farr and Rossman 2013). De ellas, *C. gloeosporioides* es capaz de infectar al menos con 470 especies diferentes, muchas de estas con elevado valor económico.

La antracnosis es la enfermedad más importante de la aceituna, por ejemplo, (Cacciola et al. 2012) y, sin duda alguna, la enfermedad que causa un mayor deterioro de la calidad del aceite (Carvalho et al. 2004). En Portugal, se han descrito varias epidemias severas asociadas al cultivar de olivo dominante del país "Galega vulgar". En estudios realizados entre 2004 y 2006, Talhinhos et al. (2009) describen una prevalencia de la enfermedad entre el 65 y 100% y una

incidencia del 22% en los años más secos (2004 y 2005), y del 85% en el año más lluvioso (2006), en los olivares de la región del Algarve. En España, la antracnosis ocupa el 5° lugar en importancia entre las plagas y enfermedades del olivo, produciendo unas pérdidas medias anuales del 2.6% de la cosecha y se ha estimado que las pérdidas ascienden a 75.2 millones de euros anuales (Moral et al. 2014).

En Ecuador, el banano (*Musa spp.*) es el cultivo más importante debido a su importancia como fruta ampliamente comercializable. Riera et al. (2018) reportaron la incidencia de *C. gloeosporioides* en bananas recolectadas de cuatro plantaciones orgánicas en la provincia de Los Ríos, Ecuador. Por su parte, la India es un gran productor de mango y comparte alrededor del 56% de la producción global (Kumar et al. 2011). *C. gloeosporioides* es uno de los principales patógenos del mango, provocando pérdidas que alcanzan el 39% de las cosechas (Rabari et al. 2018).

Existen reportes sobre la incidencia de *C. gloeosporioides* en México, afectando varios cultivos importantes. El aguacate es un cultivo de gran importancia económica en México. En la actualidad, la producción total mundial de aguacate es superior a 3.5 millones de toneladas y México es el mayor productor (Bost et al. 2013). La antracnosis afecta gravemente a los frutos de aguacate en todos los países productores (Dann et al. 2013), incluyendo, por supuesto, a México (Dann et al. 2013; Rodríguez-López et al. 2013). En 2018 Nieto-López y colaboradores reportaron la presencia de *C. gloeosporioides* provocando antracnosis en, aproximadamente, el 60% de un cultivo de tejocote (*Crataegus gracilior*) en Oaxaca (Nieto-López et al. 2018). También se ha reportado la incidencia de la antracnosis en guanábana (*Annona muricata*), en Nayarit, la región mayor productora de guanábana en México (Ramos-Guerrero et al. 2018).

3.1. *Physcomitrella patens*

Los musgos son plantas no vasculares pertenecientes al filo *Bryophyta*, el segundo grupo más grande del reino *Plantae* (Glime 2013). Las briofitas conquistaron los ambientes terrestres en el período Ordovícico, hace al menos 450 millones de años (Figura 5), descendientes de un ancestro evolutivamente cercano a las algas verdes, el cual comparten con las plantas vasculares (Carels 2015). Estas plantas presentan tejidos poco diferenciados y no poseen vasos de conducción, no cuentan con raíces, tallos ni hojas verdaderas, sino que se componen de un cuerpo vegetativo con estructuras relativamente simples denominadas rizoides, caulóide y filidios, análogos de las raíces, tallos y hojas respectivamente en las plantas vasculares, pero estas estructuras no constituyen órganos verdaderos (Prigge and Bezanilla 2010).

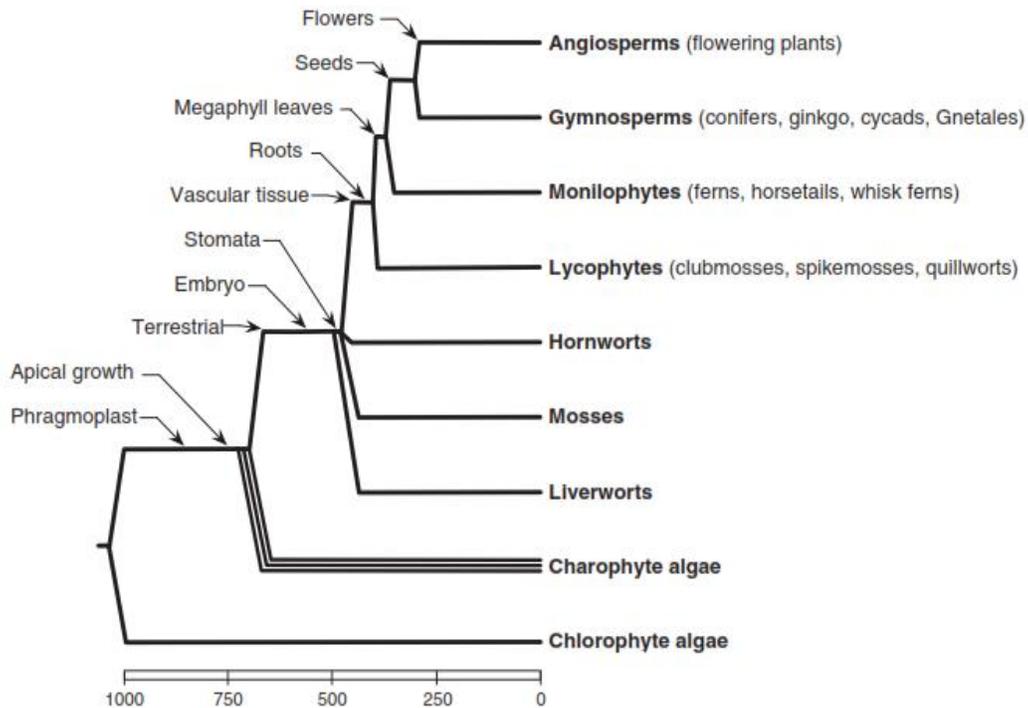


Figura 5. Relaciones filogenéticas entre plantas verdes (Modificado de Prigge and Bezanilla 2010). El dendrograma muestra las relaciones probables entre los principales linajes de las plantas verdes. La línea de tiempo en la parte inferior indica el tiempo aproximado (millones de años antes del presente) en el que los linajes se separaron. Los tiempos aproximados en los que aparecieron importantes innovaciones morfológicas están a la izquierda de los nodos.

Aun así, los musgos comparten procesos genéticos y fisiológicos fundamentales con las plantas vasculares, aunque los dos linajes divergieron tempranamente en la evolución vegetal (Cove 2005). Las familias de genes que codifican para proteínas involucradas en el desarrollo básico identificado en las plantas con flores, se conservan en el genoma de los musgos, así como vías de señalización que incluyen fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), auxinas, citoquinas, además de los pigmentos fotomorfogénicos fitocromo y criptocromo. Aunque carecen de otros como es el caso del JA, presente en las respuestas frente a estrés biótico en las plantas vasculares, pero ausente en *P. patens* (Ponce de Leon et al. 2012). Un estudio comparativo entre los representantes modernos de musgos y plantas con flores puede dar una mirada dentro de la evolución de diversos mecanismos hacia la complejidad de la flora moderna, así como nos permitiría inferir las propiedades biológicas de dicho ancestro común, permitiendo comprender mejor la diversidad de la vida vegetal. Esto podría tener un valor práctico en la medida en que la comprensión de diversos sistemas de plantas pueda aportar soluciones novedosas a problemas en el mejoramiento de cultivos, por ejemplo. Es en este contexto que *P. patens* se emplea como organismo modelo (Rensing et al. 2008; Cove et al. 2009).

3.3.1. Ciclo de vida de *Physcomitrella patens*

Como todas las plantas terrestres, el ciclo de vida del musgo consiste en una generación de gametofitos haploides multicelulares que alterna con una generación de esporofitos diploides morfológicamente distintos. Sin embargo, a diferencia de las plantas vasculares, en el caso de los musgos el gametofito es la parte dominante del ciclo de vida. Las esporas haploides germinan para producir el protonema filamentoso, el cual está compuesto por dos tipos de filamentos: el cloronema, que se caracteriza por tener células con abundantes cloroplastos bien desarrollados. Las células cloronémicas se extienden por división en serie de la

célula apical, mientras que las células subapicales se ramifican para formar nuevos ápices. Algunas células cloronémicas apicales se convierten en un segundo tipo de célula, las cuales dan lugar al caulonema (Figura 6). Las células de los filamentos caulonemales contienen menor cantidad de cloroplastos, y estos están menos desarrollados, pero se extienden más rápidamente que el cloronema. Los tiempos de división de las células apicales del caulonema y el cloronema son aproximadamente 6 y 24 horas, respectivamente (Cove 2005).

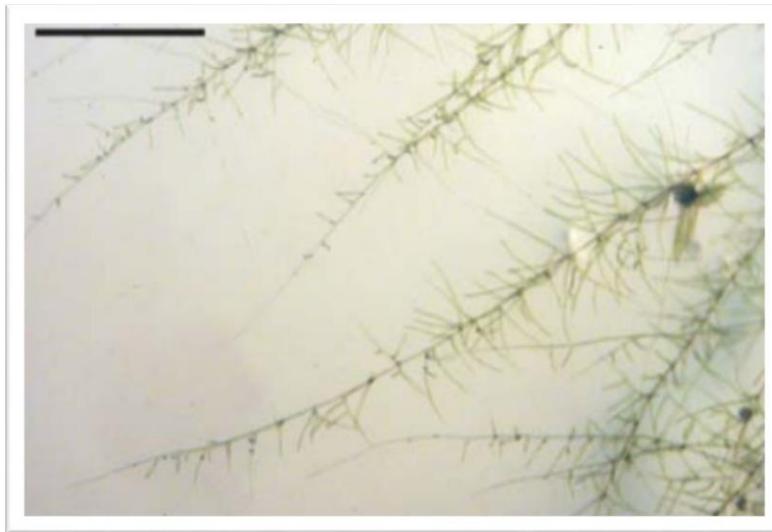


Figura 6. Filamentos protonemales de un cultivo de *P. patens* de 22 días (Cove et al. 2006). Los ejes principales son filamentos cloronemales, que se extienden por la división de sus células apicales. La mayoría de las células subapicales se han dividido para producir mayoría de las cuales se han desarrollado una o dos ramas laterales, la en filamentos caulonemales, pero algunas de ellas se están convirtiendo en gametóforos. Barra de escala: 1 mm.

Las células subapicales de los filamentos caulonemales se pueden ramificar para formar más filamentos y tallos frondosos, llamados gametóforos, sobre los cuales se producen los gametos. Los gametos masculinos se producen en el anteridio y son móviles pues tienen flagelos, mientras que los gametos femeninos se producen en el arquegonio. El anteridio y el arquegonio surgen en el mismo gametóforo, por lo que la autofecundación es habitual, aunque la fertilización cruzada puede ocurrir cuando dos cepas crecen adyacentes entre sí, las

condiciones de humedad propicias son indispensables para la fertilización. Los huevos fertilizados se convierten en esporofitos, estructuras diploides que permanecen unidos al gametóforo. Dentro del esporófito, las células madre de la espora dan lugar a las esporas mediante meiosis (Figura 7) (Cove et al. 2009; Prigge and Bezanilla 2010).

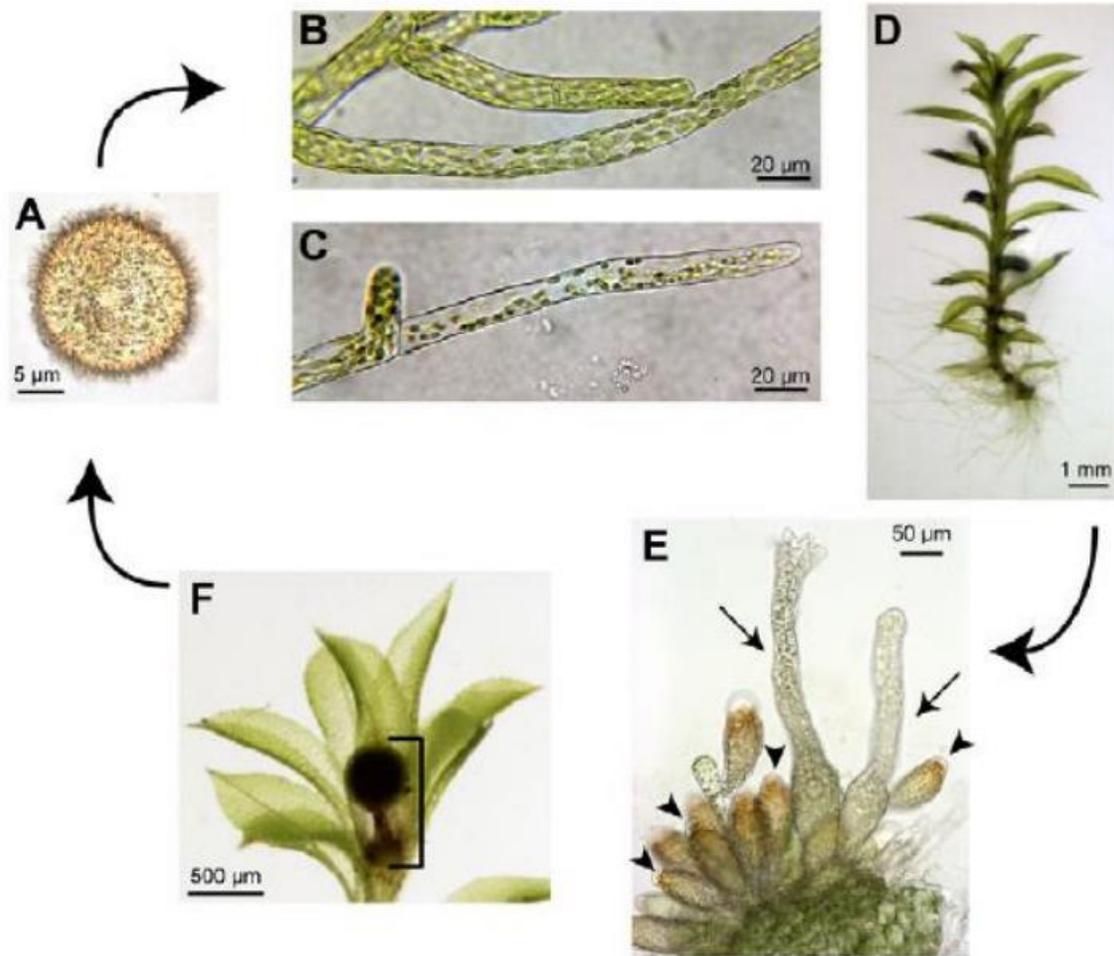


Figura 7. Ciclo de vida de *Physcomitrella patens* (Prigge y Bezanilla, 2010). **(A)** Una espora haploide germina para dar lugar al **(B)** cloronema, filamento caracterizado por la presencia de abundantes de cloroplastos, este crece y se diferencia en el **(C)** el caulonema, un filamento con menos abundancia de cloroplastos y estos a su vez están menos desarrollados. **(D)** El gametóforo emerge del caulonema y se fija al sustrato a través de los rizoides que crecen por la división de las células apicales a partir de la base del gametóforo. **(E)** En el ápice del gametóforo, este desarrolla estructuras sexuales, el arquegonio (flechas) y el anteridio (puntas de flechas). **(F)** Cuando el gameto masculino fertiliza el huevo se forma un esporofito diploide, donde posteriormente, se originan esporas haploides reiniciando el ciclo.

3.1.1. *Physcomitrella patens* como modelo experimental

Son varias las características de este organismo que lo hacen idóneo para realizar diversos estudios tanto evolutivos como de procesos fisiológicos en las plantas. Una de las características más atractivas de *P. patens* es su patrón de desarrollo relativamente sencillo pero que se asemeja a la organización básica de las plantas con flores, siendo los rizoides, cauloides y filidios, análogos a las raíces, tallo y hojas de las plantas vasculares, aunque no constituyen órganos verdaderos (Prigge and Bezanilla 2010). Este musgo se puede cultivar fácilmente in vitro, es viable en un rango de temperaturas entre 15 y 26 °C y se puede cultivar tanto en medio sólido como líquido. *P. patens* tiene una alta capacidad de regeneración, pequeños fragmentos de tejido, ya sea del gametofito o el esporofito, se regeneran rápidamente para producir tejido protonémico, que se comporta de manera similar al desarrollo de las esporas en germinación. Asimismo, el tejido del protonema puede romperse mecánicamente con un homogeneizador de tejido, por ejemplo, y los fragmentos de tejido resultantes pueden usarse como un inóculo para cultivos subsecuentes (Cove 2005; Cove et al. 2009).

La presencia de una fase gametofítica haploide dominante durante el ciclo de vida de este musgo, permite la detección de fenotipos mutantes en transformantes primarios, eliminando la necesidad de retrocruzamientos. Una ventaja adicional es que las hojas, los rizoides y los filamentos protonemales consisten en una sola capa de células, por lo que la evaluación de la enfermedad y la respuesta del huésped se pueden hacer fácilmente mediante análisis microscópico (Ponce de León 2011). Por otra parte, *P. patens* presenta una elevada tasa de recombinación homóloga, comparable con la de las levaduras (Alvarez et al. 2016), lo que convierte a este musgo en una herramienta poderosa y sensible para realizar análisis funcionales de los genes de plantas con posibles roles en defensa. Otra gran ventaja de *P. patens* es que se cuenta con su genoma secuenciado

disponible en bases de datos (<http://www.cosmoss.org/> y <http://www.phytozome.net/>) (Rensing et al. 2008; Zimmer et al. 2013). Asimismo, están disponibles los EST y los cDNA de longitud completa [<http://moss.nibb.ac.jp/>], y los datos de expresión basados en microarrays de *P. patens* se pueden encontrar en Genevestigator (<https://www.genevestigator.com>) (Zimmermann et al. 2008). Además, este musgo presenta una mayor tolerancia a cambios ambientales bruscos en comparación con plantas vasculares, incluyendo una mayor tolerancia al estrés hídrico, salinidad y temperaturas extremas (Frank et al. 2005; Rensing et al. 2008).

El musgo *P. patens* (Hedw.) Bruch & Schimp se estableció por primera vez como un sistema experimental de laboratorio en la década de 1920 por Fritz von Wettstein en 1924, quien estudió los efectos de la variación de la ploidia y los patrones de herencia en cruces interespecíficos e intergenéricos dentro de la familia de musgos *Funariaceae*. La era moderna de la investigación con *Physcomitrella* se remonta al trabajo de Paulinus Engel (1968), quien generó los primeros mutantes bioquímicos y morfológicos en la especie (Cove et al. 2009).

Bezanilla et al. (2005) desarrollaron un método de ARN de interferencia (ARNi) para *P. patens*, a partir de ahí numerosos estudios se han llevado a cabo para investigar las funciones de diversas proteínas, empleando a *P. patens* como modelo. Empleando dicho modelo, Harries et al. (2005) investigaron el papel de la proteína ARPC1. Más tarde, en 2007, Vidali et al. analizaron el rol de la profilina, mientras Khandelwal y colaboradores estudiaron el rol de la proteína presenilina en la enfermedad de Alzheimer (Vidali et al. 2007; Khandelwal et al. 2007)

En 2006 Perroud y Quatrano aprovecharon las facilidades que ofrece la biología celular de *P. patens* para estudiar la implicación de las proteínas ARPC4 y BRICK1 en los ápices de los filamentos protonemales, mediante delección y remplazo de

genes diana (Perroud and Quatrano 2006). También se han realizado disímiles estudios metabólicos (Thelander et al. 2004; Kaewsuwan et al. 2006; Schulte et al. 2006), así como análisis detallados de microRNAs (Axtell et al. 2006; Axtell et al. 2007), utilizando *P. patens* como modelo. Por otra parte, los estudios de genómica comparativa han esclarecido el papel de diferentes moléculas involucradas en procesos celulares como los reguladores transcripcionales LEAFY (Maizel et al. 2005) y ABI3 (Marella et al. 2006) y los factores de transcripción involucrados en la función de enraizamiento (Menand et al. 2007).

En el marco del proyecto Gene Atlas, el Joint Genome Institute seleccionó a *P. patens* como genoma insignia (Perroud et al. 2018). En la actualidad *P. patens* está notablemente integrado en estudios centrados en la transición de las plantas acuáticas a las terrestres (Ortiz-Ramírez et al. 2016; Renault et al. 2017), así como el surgimiento de estructuras tridimensionales en las plantas (Harrison 2017). Ambos campos de estudio integran la investigación detallada de la biología celular funcional con comparación de genes y genomas a lo largo de todo el reino *Plantae*.

3.2. Transcriptómica

El dogma central que define el paradigma de la biología molecular dicta que los genes se perpetúan como secuencias de ácidos nucleicos, y las proteínas derivadas del proceso de traducción desempeñan las funciones biológicas y, por tanto, tienen un impacto claramente esencial en la expresión de los fenotipos. La replicación es responsable de la herencia de la información genética, mientras la transcripción y la traducción son responsables de la síntesis de ARN y proteínas, respectivamente. La transcripción es el proceso mediante el cual se sintetiza una cadena de ARN a partir de una cadena molde de ADN. Como resultado de la transcripción se obtienen los diferentes tipos de ARNs con diferentes características estructurales y funcionales. Al conjunto de todos los ARNs de una

célula o tejido y su cantidad, en una etapa específica de desarrollo o condición fisiológica se le denomina transcriptoma.

La transcriptómica estudia y compara las poblaciones de RNA, lo cual es esencial para el entendimiento de la expresión de los genes, su función, interacción y regulación. El estudio global del transcriptoma permite también establecer patrones de regulación génica coordinada, lo que contribuye, no solo a dilucidar la función y agrupamiento de varios genes bajo un estímulo o condición específica, sino también a identificar elementos promotores comunes a varios genes (Maher et al. 2009).

Comprender el transcriptoma es esencial para interpretar los elementos funcionales del genoma y revelar los constituyentes moleculares de las células y los tejidos, así como para comprender el desarrollo celular y el curso de las enfermedades. La transcriptómica ha sido de gran importancia para catalogar todas las especies de transcritos, como son los ARNm, los ARN no codificantes y los ARN pequeños; para determinar la estructura transcripcional de los genes, en términos de sus sitios de inicio, extremos 5' y 3' y predecir otras modificaciones postranscripcionales; y también para caracterizar las variaciones espaciotemporales (perfiles de expresión) de los transcritos, tanto con respecto al desarrollo como a las perturbaciones ambientales (Wang et al. 2009). También se está utilizando el conocimiento detallado del transcriptoma de un organismo dado para mejorar los ensamblajes del genoma (Song et al. 2016), así como para comprender y describir mejor el patrón de empalme del ARN (Gaidatzis et al. 2015).

Un punto decisivo en el desarrollo de la transcriptómica fue el surgimiento de la técnica del RNA-seq, que actualmente domina el campo de la detección y cuantificación de RNA a nivel de transcriptoma, reemplazando la tecnología de

microarrays basada en sondas de ácidos nucleicos. Desde que la tecnología de RNA-seq se encuentra disponible se han desarrollado un grupo relativamente amplio de investigaciones dirigidas a caracterizar y a cuantificar transcriptomas, así como a comprender los mecanismos de la variación de la expresión génica. Se ha empleado el RNA-seq en especies eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* y *Homo sapiens* (Nagalakshmi et al. 2008; Mortazavi et al. 2008; Maher et al. 2009; Pickrell et al. 2010; Gan et al. 2010; Daines et al. 2011; Peng et al. 2012; Soltis et al. 2020), lo que demuestra la alta aplicabilidad que el RNA-seq ha tenido en estudios de especies modelo.

El avance de la tecnología RNA-seq ahora ofrece a los científicos un mayor poder, menores costos y nuevas herramientas para comprender mejor un amplio espectro de fenómenos biológicos (Spies and Ciaudo 2015). El estudio de las respuestas de las plantas a diferentes tipos de estrés se ha enriquecido con la vasta información que se ha recuperado empleando estas tecnologías. Los estudios transcriptómicos han sido invaluable en la adquisición de conocimiento sobre las estrategias de resistencia de las plantas frente a condiciones como sequía, salinidad de los suelos, altas o bajas temperaturas (Fox et al. 2018; Jithesh et al. 2019; Sharma et al. 2018; Bashir et al. 2019; Yan et al. 2016). La resistencia de algunas plantas a ciertos patógenos también es de gran interés, y se han reportado numerosos estudios al respecto, tanto en plantas modelos como en otras de interés económico (Hong et al. 2016; Lu et al. 2012). En un trabajo reportado por Wang et al. (2017) se analizaron los transcriptomas de dos variedades de fresa (una susceptible y otra resistente) en interacción con *C. gloeosporioides*, y observaron que la variedad resistente expresó el doble de genes específicos de respuesta al patógeno que la variedad susceptible. El análisis del transcriptoma de *A. thaliana* en diferentes tiempos de la interacción

con el patógeno *Plasmodiophora brassicae* mostró que la infección potencia las vías de síntesis de lignina, la acumulación de glucosinolatos, terpenoides y proantocianidinas, así como la expresión de muchos genes relacionados con las hormonas y receptores quinasas (Zhao et al. 2017). Los conocimientos adquiridos de este tipo de análisis ayudan a comprender mejor las interacciones entre las plantas hospederas y los microorganismos fitopatógenos, y contribuyen al desarrollo de medidas futuras para la prevención de enfermedades fitosanitarias.

4. ANTECEDENTES

4.1. Respuestas de *Physcomitrella patens* al ataque de patógenos

Aunque las briófitas son plantas no vasculares y se consideran basales en la evolución, se ha demostrado que los musgos responden de manera similar a las plantas vasculares, a una variedad de estímulos ambientales y a varios factores comunes de crecimiento de las plantas (Ponce de León and Montesano 2013). Debido a su ubicación en la escala evolutiva, que une las algas verdes unicelulares con las plantas vasculares, *P. patens* es un organismo interesante para explorar los mecanismos de adaptación desarrollados durante la evolución de las estrategias de defensa de las plantas ante los agentes patógenos.

P. patens percibe los patrones moleculares asociados a patógenos mediante los receptores de membrana plasmática y transduce la señal con el Ca^{2+} como segundo mensajero y una cascada de MAPK, lo que conduce a la producción de ROS, la activación de las defensas asociadas a la pared celular y la expresión de genes que codifican proteínas con diferentes funciones en la resistencia de las plantas (Bressendorff et al. 2016). En la Figura 8 se pueden apreciar algunas de las respuestas de *P. patens* en respuesta al ataque de patógenos.

Una de las principales respuestas de *P. patens* ante el ataque de patógenos es la fortificación de la pared celular. Las briofitas tienen paredes celulares delgadas ricas en celulosa, manano, pectinas, xiloglucano e hidroxiprolina, como las plantas con flores (Sarkar et al. 2009). Sin embargo, estas no poseen lignina, sino que tienen otros compuestos polifenólicos tales como lignanos o polímeros similares a la lignina (Españeira et al. 2011). En respuesta al ataque de hongos patógenos, los musgos responden con la acumulación de compuestos fenólicos y calosa en la pared celular, además de la inducción de la expresión de genes que codifican para proteínas ricas en prolina. Tras la infección con *Botrytis cinerea* se observó

el aumento de la expresión de genes que codifican para proteínas tipo DIR (Ponce de Leon et al. 2012). Se considera que las proteínas DIR están involucradas en el acoplamiento de radicales de monolignol para producir lignanos y lignina (Davin and Lewis 2000). Por tanto, la expresión de estos genes tipo DIR deben estar involucrados en el reforzamiento de la pared celular como respuesta a la infección con *B. cinerea*.

Otra respuesta de gran importancia en el mecanismo de defensa de *P. patens* es la acumulación de ROS. Esta es una de las primeras respuestas que se observa en una planta atacada por un patógeno, y es un mecanismo complejo que, además de ser una respuesta efectiva, ya que estas moléculas son tóxicas para los patógenos, constituyen una señal intracelular para activar otras respuestas. La liberación de ROS está involucrada en el fortalecimiento de la pared celular para restringir la propagación de hongos y oomicetos, la inducción de la HR y la muerte celular programada (Ponce de León 2011).

La activación de la respuesta de hipersensibilidad (HR) es una de las reacciones de resistencia más eficientes contra los patógenos biótropos. Se caracteriza por la muerte programada de las células en la región infectada, así previene la propagación de la infección (Kumari et al. 2017). Varios estudios han demostrado que la muerte celular de las plantas durante la HR es un tipo de muerte celular programada en plantas (PCD) (Greenberg and Yao 2004; Morel and Dangl 1997). Han sido definidas dos clases principales de PCD en plantas, que incluyen la muerte celular vacuolar y la muerte celular necrótica, aunque la HR cae en una modalidad separada, ya que las características de ambos tipos de muerte celular están presentes (Van Doorn et al. 2011). Como parte de la HR que se desarrolla en *P. patens* tras la infección con *B. cinerea* o elicitors de *P. carotovorum*, se puede observar la plasmólisis del citoplasma, la acumulación de compuestos autofluorescentes, así como el reordenamiento y cambio de coloración de los

cloroplastos, los cuales se acumulan en dirección al sitio de infección y se tornan marrón, probablemente debido a la acumulación de ROS (Ponce de León et al. 2007).

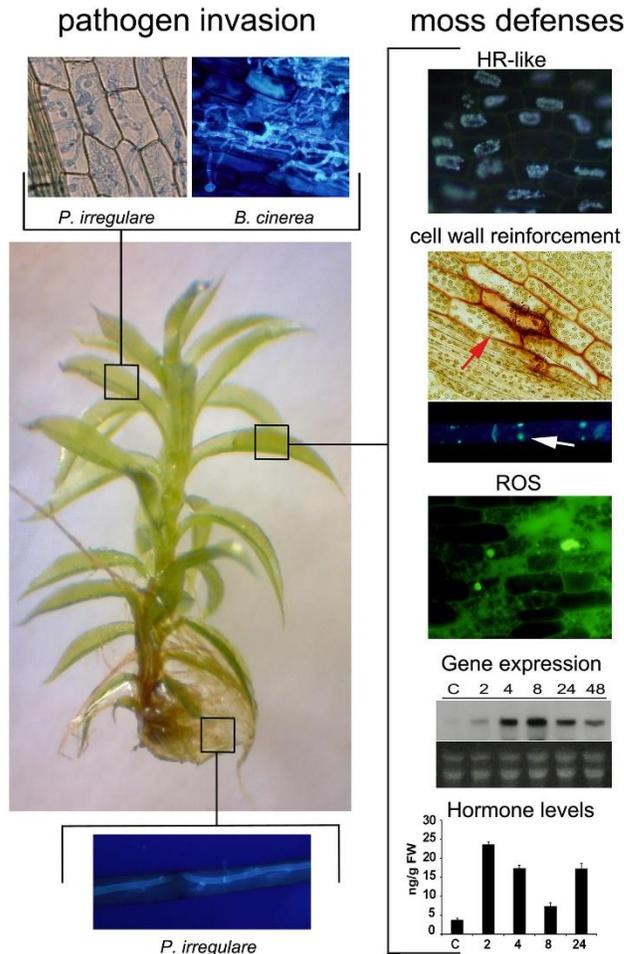


Figura 8. Invasión de patógenos y respuestas de defensa de *P. patens* (Ponce de León y Montesano, 2017). Las hojas y los rizoides están colonizados por diferentes patógenos, que se visualizan fácilmente mediante diferentes técnicas de tinción (hoja; azul tripano y solofenil flavina, rizoide: solofenil flavina). Se muestran imágenes de tejidos infectados con el oomiceto *Pythium irregulare* y el hongo *B. cinerea* respectivamente. Se muestran las defensas que se activan en *P. patens* después de la infección por patógenos: respuesta similar a la HR; el fortalecimiento de la pared celular (acumulación de compuestos fenólicos, evidenciada por paredes celulares teñidas); la reorientación de los cloroplastos (flecha roja); deposición de calosa en células protonemales (flecha blanca); la acumulación de ROS en hojas infectadas por *B. cinerea*; la expresión diferencial del gen de defensa *PpalphADOX* y la variación de los niveles de auxina a diferentes horas después de la infección.

La respuesta tipo HR se visualizó mediante compuestos autofluorescentes, fortificación de la pared celular por tinción con safranina-O, la deposición de calosa por tinción con azul de metilo y las ROS intracelulares con diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína.

Como parte de las respuestas de defensa en *P. patens* se produce también el aumento de la producción de hormonas y oxilipinas. Las oxilipinas son ácidos grasos oxigenados que participan en el desarrollo y la defensa de las plantas contra la infección por patógenos, insectos y heridas (Deboever et al. 2018). La principal oxilipina que se acumula en los tejidos de *P. patens* ante el ataque de patógenos es el ácido (+)-cis-12-oxophytodienoico (OPDA, por sus siglas en

inglés). El OPDA tiene actividad antimicrobiana y es, además, un mensajero intracelular que activa la expresión de diversos genes implicados en la respuesta de defensa. El OPDA es también el precursor del JA, una hormona importante en la defensa de las plantas con flores ante el ataque de patógenos necrótrofos (Ponce de León et al. 2015). Sin embargo, el JA no se produce en *P. patens*, a pesar de que este organismo cuenta con todos los genes que codifican para las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de esta molécula (Ponce de León et al. 2012). Aun así, *P. patens* es capaz de responder a la presencia de JA, reduciendo el tamaño de las colonias y de los rizoides, puesto que cuenta con receptores para esta molécula. Otras oxilipinas que se pueden producir en el musgo son las derivadas del ácido 12-hidroperoxy eicosatetraenoico (HPTE), como los compuestos volátiles octenol y nonenal, con actividad antimicrobiana también (Ponce de León et al. 2015).

Por otra parte, las hormonas tienen también actividad antimicrobiana y reguladora de la expresión génica (Verma et al. 2016). Dependiendo del patógeno, se activan diferentes vías hormonales que conducen a la resistencia a patógenos particulares (Glazebrook 2005). La infección de *B. cinerea* provoca en *P. patens* el aumento de las concentraciones de SA y ácido abscísico, mientras que las concentraciones de la auxina ácido indolacético (IAA) disminuyen (Ponce de León et al. 2012). Esto puede deberse a que el SA inhibe la vía de señalización de la auxina como parte del mecanismo de defensa de la planta (Wang et al. 2007). Sin embargo, se ha demostrado la activación de la vía de señalización de las auxinas en *P. patens* ante la infección con *C. gloeosporioides* y *Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum* (Reboledo et al. 2015; Alvarez et al. 2016).

Como resultado del reconocimiento de un patógeno, se activan diferentes vías de señalización que culminan en la activación de la expresión de genes involucrados en las respuestas de defensa. La infección de *P. patens* con patógenos fúngicos

induce la expresión de genes asociados con la inducción de la PCD, como los que codifican proteasas, nucleasas y el inhibidor de Bax-I, implicados en la regulación de la PCD (Lawton and Saidasan 2009). Alvarez y colaboradores encontraron que, como respuesta a la exposición a elicitores de *P. carotovorum*, se induce la expresión de genes relacionados con las respuestas de defensa. Entre ellos, genes que codifican para una quitinasa, una proteína relacionada con la patogénesis (PR-1), varias proteínas dirigidas (DIR), una betaína-aldehído deshidrogenasa, una lipoxigenasa, una α -dioxigenasa y varios factores de transcripción. Además, aumenta también la expresión de corismato sintasa, corismato mutasa, fenilalanina amonio liasa (PAL), ácido cinámico 4-hidroxisasa, 4-coumarato-CoA ligasa, chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa, flavanona 3-hidroxisasa, y cinamil-alcohol dehidrogenasa (Alvarez et al. 2016). Estas enzimas son componentes clave requeridos para producir diferentes clases de metabolitos secundarios fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides, cumarinas y lignanos, los cuales desempeñan diferentes funciones de defensa. La PAL está involucrada en la síntesis de fenilpropanoides y SA, mientras que la CHS es la enzima que inicia la síntesis de flavonoides. La activación de algunos de estos genes también ha sido demostrada en *P. patens* en respuesta al ataque de otros patógenos como *B. cinerea*, *C. gloeosporoides* y *Pythium* spp. (Oliver et al. 2009; Ponce de Leon et al. 2012; Reboledo et al. 2015).

4.2. Transcriptómica de *Physcomitrella patens*

Varios conjuntos de datos de RNA-seq de *P. patens* han sido publicados en múltiples contextos experimentales. El perfil del transcriptoma de *P. patens* se ha estudiado con respecto a las diferentes etapas de su desarrollo (Xiao et al. 2011; Perroud et al. 2018); en presencia de tratamientos de estrés como la bleomicina (Kamisugi et al. 2016); ante el estrés por calor y su impacto en el splicing alternativo (Chang et al. 2014); bajo tratamientos de hormonas vegetales con

ácido abscísico (Stevenson et al. 2016) y auxina (Lavy et al. 2016); se ha analizado la especialización de reguladores de la transcripción involucrados en la adaptación a las bajas temperaturas (Beike et al. 2015). Además, se han aplicado enfoques transcriptómicos comparativos para el análisis de mutantes (Chen et al. 2012; Demko et al. 2014) y para analizar y catalogar los RNA pequeños en *P. patens* (Coruh et al. 2015; Lang et al. 2018). Sin embargo, no se han encontrado reportes de análisis transcriptómicos de *P. patens* durante la interacción con patógenos o algún otro microorganismo.

5. PROBLEMA

Existen pocos estudios globales de los mecanismos moleculares que se activan en *P. patens* ante la interacción con microorganismos. La respuesta del musgo frente a algunos patógenos ha sido abordada principalmente mediante caracterizaciones morfológicas y bioquímicas, y analizando la respuesta de genes puntuales involucrados en estos mecanismos. Sin embargo, con los resultados obtenidos en estos estudios, no es posible comprender los procesos que tienen lugar en el musgo cuando este se enfrenta al estrés biótico.

6. HIPÓTESIS

El análisis del transcriptoma de *P. patens* durante la interacción con *C. gloeosporioides* permitirá identificar patrones moleculares específicos de la respuesta de defensa de *P. patens* que revelen diferencias con aquellos propuestos en plantas vasculares.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Analizar la respuesta de *Physcomitrella patens* ante la infección con *Colletotrichum gloeosporioides*.

7.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar mediante microscopía óptica los daños histológicos y micromorfológicos en el musgo durante la interacción con *C. gloeosporioides*.
2. Evaluar mediante análisis fenómico el efecto en *P. patens* de la infección con *C. gloeosporioides*.

3. Evaluar la influencia de la presencia de hormonas exógenas en la respuesta de defensa de *P. patens* ante *C. gloeosporioides*.
4. Analizar los transcriptomas y perfiles de expresión diferencial de genes de *P. patens* en respuesta a la infección con *C. gloeosporioides*.

8. METODOLOGÍAS

8.1. Cultivo de *P. patens* y *C. gloeosporioides* e inoculación del patógeno

La cepa *Physcomitrella patens* Gransden se cultivó en medio Hoagland's, consistente en 1 mM de MgSO₄, 1.8 mM de KH₂PO₄ pH 6.5, 10 mM de KNO₃, 45 μM de FeSO₄, 1 mM de CaCl₂, 4.5 mM de tartrato de amonio y 10 g/L de agar. En el caso de los medios suplementados con hormonas, estas se añadieron a las concentraciones de 0.1 y 0.5 mM de ácido salicílico y 50 μM de ácido jasmónico. Las colonias de musgo crecieron a 22 °C bajo un fotoperíodo de 16 h de luz según lo descrito anteriormente por Oliver et al. (2009). Para todos los experimentos se emplearon colonias incubadas durante tres semanas previamente, y en el caso de los experimentos en presencia de hormonas, las colonias de *P. patens* de tres semanas fueron transferidas a placas con el medio suplementado con hormonas y se incubaron durante 24 horas para la posterior infección.

C. gloeosporioides se cultivó en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) 29 g/L a 22 °C. Los conidios se recuperaron a partir de mucílagos de color naranja sobre las colonias fúngicas cultivadas en PDA. La inoculación de *C. gloeosporioides* se realizó atomizando una suspensión de aproximadamente 5×10^5 conidios/mL en agua (Reboledo et al. 2015).

8.2. Caracterización morfológica de la interacción entre *P. patens* y *C. gloeosporioides*

La caracterización morfológica de la interacción se realizó mediante la medición indirecta del daño celular con la tinción de Azul Evans y mediante microscopía óptica empleando colorantes como la Safranina-O y Solofenil flavina. Para la medición del daño celular se siguió el protocolo descrito por Alvarez et al. (2016). Las colonias del musgo se incubaron durante 2 horas en azul de Evans al 0,1% y luego se lavaron cuatro veces con agua miliQ para eliminar el excedente de tinte.

El tinte unido a las células dañadas se recuperó con una solución de metanol al 50% y SDS al 1% durante 30 minutos a 65 °C y se midió la absorbancia a 600 nm. Cada muestra consistió en cuatro colonias incubadas en 6 ml de la mezcla metanol-SDS. Se analizaron ocho muestras, correspondientes a 32 colonias, por cada condición experimental y los datos se expresaron como DO/mg de peso seco. El peso seco se midió después de secar las colonias del musgo sobre papel aluminio durante 18 horas a 65 °C.

Se emplearon tinciones de Safranina-O 0,01% y Solofenil flavina 0,1% para observar la acumulación de compuestos fenólicos en la pared celular y las estructuras del hongo respectivamente. Se separaron los gametóforos de las colonias del musgo y se embebieron en la solución de la tinción durante 15 minutos en oscuridad, seguido de dos enjuagues con agua miliQ para retirar el exceso de colorante. Luego se separaron los filidios para ser observados.

8.3. Análisis fenómico de la interacción entre *P. patens* y *C. gloeosporioides*

8.3.1. Determinación de la eficiencia cuántica del Fotosistema II

Se obtuvieron imágenes de fluorescencia de la clorofila *a* a partir de colonias de *P. patens* previamente adaptadas a la oscuridad durante 15 minutos. El método de Damm et al. (2010) se utilizó para cuantificar la fluorescencia de la clorofila *a*, en el cual las colonias previamente adaptadas a la oscuridad recibieron una alta densidad de flujo de fotones fotosintéticos para obtener un valor estable de la fluorescencia de la clorofila *a*. El PSI Open FluorCam FC 800-O (PSI, Brno, República Checa) se utilizó para obtener imágenes de fluorescencia de la clorofila *a* y para estimar el rendimiento cuántico máximo del Fotosistema II (PSII), que se expresó como $(F_v/F_m) = (F_m - F_0)/F$. Las imágenes se obtuvieron utilizando el método de Rousseau et al. (2013) con un sistema que incluía cuatro paneles LED

divididos en dos pares de sensores del sistema (luz actínica con una longitud de onda de 618 nm e intensidad de luz de fotones de 200–400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Se usó una cámara CCD con una resolución de píxeles de 512 x 512 y una dinámica de 12 bits para obtener imágenes en una escala de colores, que determinó los valores de Fv/Fm (0.1-0.8). Un par de LED proporcionó luz naranja en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este par proporcionó un pulso de 2 s que permitió la medición del estado fluorescente inicial (F_0). El otro par de LED proporcionó un pulso saturado durante 1 s en la longitud de onda azul, típicamente 455 nm, con una intensidad de hasta 3 000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El pulso saturado permitió la recolección de los valores máximos de fluorescencia (F_m) y Fv/Fm.

8.3.2. Análisis de segmentación de color.

Se tomaron imágenes de la vista superior de las placas con colonias de *P. patens* sanas e inoculadas a diferentes tiempos con *C. gloeosporioides*. Estas imágenes se analizaron con el software LemmaGrid. Primeramente se separó el primer plano del fondo de la imagen, como resultado se obtiene una imagen binaria. Posteriormente, los objetos se separan según la clasificación del color: verde muy iluminado y marrón necrótico (Figura 9).

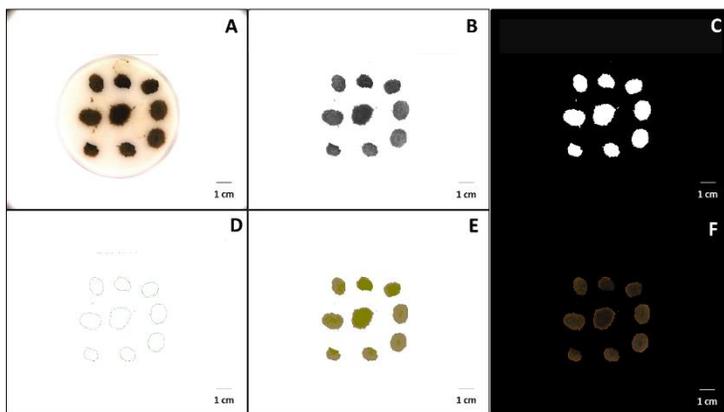


Figura 9. Procesamiento de imagen de una caja de *P. patens* inoculada con *C. gloeosporioides* (48 h), procesada con el software LemmaGrid. Primero se separan el primer plano y el fondo (A-C), resultando en imágenes binarias.

Posteriormente, los objetos se separan según la clasificación del color (verde iluminado y marrón necrótico) (D-F).

8.3.3. Análisis de variación de temperatura

El análisis de variación de la temperatura se realizó mediante el procesamiento de termografías. Para la captura de imágenes de infrarrojos se utilizó una cámara FLIR T440 (FLIR Systems Inc., North Billerica, MA, USA) con el microbolómetro no refrigerado como arreglo de plano focal, 320 × 240 píxeles y un rango espectral de 7.5–13 µm. La configuración de la cámara para la emisividad fue de 0,95. Las imágenes se procesaron con el programa FLIR Tools® para obtener los datos de temperatura de las colonias.

8.4. Extracción, purificación y secuenciación del ARN total de *P. patens* sin inocular e inoculado con *C. gloeosporioides*.

Las muestras de tejido control (*P. patens* inoculado con agua miliQ estéril) e infectado con *C. gloeosporioides* se tomaron a las 8 y 24 horas posteriores a la infección (hpi). Cada muestra corresponde al tejido recuperado de dos placas de cultivo, cada una con 16 colonias de *P. patens*, y se tomaron tres muestras de cada tratamiento. Estas muestras se recolectaron y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y luego se conservaron a -80°C para su posterior maceración.

La extracción del ARN se realizó con el RNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, según las recomendaciones en el manual del fabricante. Todas las muestras fueron tratadas con DNasa I (Qiagen) durante el proceso de purificación para eliminar posibles trazas de ADN. Luego se comprobó la calidad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Además, como índice de calidad, se evaluó la integridad y pureza del ARN en cada muestra mediante cromatografía de líquidos en columna capilar para determinar el número de integridad de ARN (RIN, por sus siglas en inglés, *RNA Integrity Number*).

La construcción de bibliotecas, así como la secuenciación del ARNm mediante la técnica RNA-seq se realizaron en las instalaciones de Macrogen, República de Corea. La secuenciación se realizó por ambos extremos, con fragmentos de 150 pb, y una profundidad de más de 40 millones de lecturas, mediante la tecnología Illumina. Estas características previenen la pérdida de información, incluso de aquellos genes muy poco expresados. Para la construcción de las librerías de cDNA se empleó el *TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit (Plant)*.

8.5. Procesamiento de las secuencias del transcriptoma

Primeramente, se realizó un análisis de la calidad de las secuencias obtenidas con el *software* FastQC (versión 0.10.1) (Andrews 2010). Luego se procesaron las secuencias con el script *RemoveOverrepresentedSequence.py* para descartar las secuencias sobrerrepresentadas reportadas en el resultado del primer análisis de calidad. Luego se eliminaron los adaptadores y las secuencias de baja calidad con el *software* Trimmomatic 0.39 (Bolger et al. 2014); seguido de otro análisis de calidad con el *software* FastQC. Las secuencias obtenidas del Trimmomatic se alinearon con el genoma de referencia de *P. patens* (Lang et al., 2018; <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), al cual se le añadieron los genomas de cloroplastos (NC_005087.1), mitocondrias (NC_007945.1) y secuencias de ARN ribosomal (HM751653.1, X80986.1 y X98013.1). Para el alineamiento y conteo de secuencias se ocupó el paquete RSubread de R (versión 3.6) (Liao et al. 2019) y luego se realizó el conteo de las secuencias con el *software* featureCounts.

8.6. Análisis de expresión diferencial

Para realizar el análisis de expresión diferencial, primeramente se filtraron los genes con bajo número de lecturas. Para ello se probaron diferentes valores de corte para determinar el umbral de filtrado que mejor se ajustaba a los datos

(Figura 10). Los genes expresados a bajos niveles se filtraron eliminando aquellos genes con menos de 0,5 recuentos por millón de lecturas en al menos 9 de las secuencias. Posteriormente se realizó la normalización de los datos mediante el método de Upper-Quartile (Bullard et al. 2010).

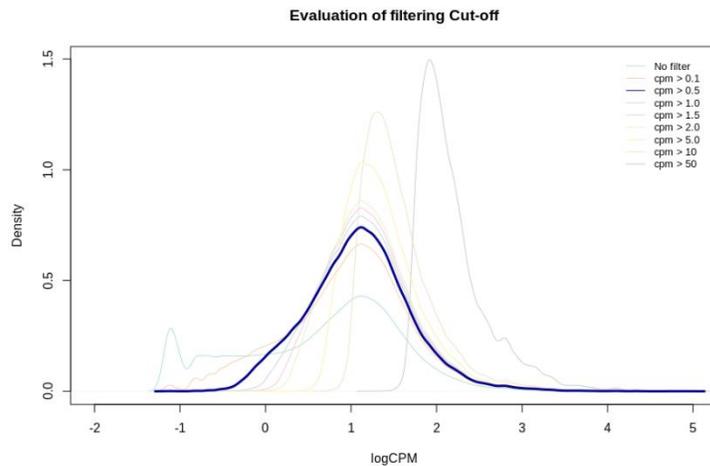


Figura 10 Evaluación del umbral de corte para filtrar los transcritos con bajo CPM.

Para el análisis de expresión diferencial empleamos el paquete DESeq2 (Love et al. 2014), de R puesto que este paquete nos permite hacer un análisis multivariado de los datos, además, emplea una regresión local de las dispersiones en los datos que le proporciona mayor flexibilidad ante varianzas inestables y utiliza estimadores más potentes (Carrasco Carrasco 2015). Para este análisis se emplearon dos modelos: uno donde se compararon las muestras de la infección con su control correspondiente y la infección a las 24 hpi respecto a la infección a 8 hpi; el otro modelo se basó en un diseño multivariado donde se analizaron los efectos del tratamiento (muestras infectadas contra controles) y del tiempo (24 hpi contra 8 hpi) sobre las muestras, así como la interacción entre estas dos variables (\sim tratamiento + tiempo + tratamiento:tiempo). Luego del análisis de expresión diferencial, los resultados obtenidos se filtraron según el FDR (de inglés *False Discovery Rate*) $< 0,05$ y el $|\logFC| > 2$ para obtener los genes sobre y subexpresados.

8.7. Enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas

El análisis de enriquecimiento de términos GO se realizó en la interfaz de *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR), que provee para el análisis de enriquecimiento de términos de GO en plantas, (https://www.arabidopsis.org/tools/go_term_enrichment.jsp), con el sistema de clasificación de Panther (Mi et al. 2019). Para la determinación del enriquecimiento se empleó el método de Prueba Exacta de Fischer (FDR < 0,05). El análisis de enriquecimiento de vías metabólicas se realizó con la herramienta BlastKOALA de la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

9. RESULTADOS y DISCUSIÓN

9.1. *Colletotrichum gloeosporioides* infecta a *Physcomitrella patens* y provoca síntomas de enfermedad.

Las colonias de *P. patens* fueron inoculadas con una suspensión de esporas y se realizaron análisis microscópicos a diferentes tiempos de incubación. Primeramente, a simple vista, se puede ver cómo, a medida que avanza el tiempo, las colonias de *P. patens* muestran síntomas de la infección (Figura 11, A-D). La germinación de los conidios se puede observar desde las 8 hpi (Figura 11, N y T), y a 24 hpi ya se distingue la formación del apresorio (Figura 11, Q). *C. gloeosporioides* se caracteriza por la formación de apresorios durante la primera etapa de la infección. Este apresorio consta de una pared celular melanizada y la acumulación concomitante de glicerol, lo que genera un sistema que proporciona una presión turgente altamente localizada, enfocada para perforar las barreras celulares. Este mismo comportamiento se ha visto en *C. gloeosporioides* cuando infecta plantas vasculares como el tomate (*Solanum lycopersicum*) (Alkan et al. 2015).

La Safranina-O reconoce y se unen a compuestos fenólicos. *P. patens* no presenta lignina en sus paredes celulares, sin embargo, ante la presencia de un patógeno, el musgo refuerza sus paredes celulares con otros compuestos fenólicos como lignanos (Roberts et al. 2012), provocando así la tinción de estas estructuras con el colorante (Figura 11, J-L).

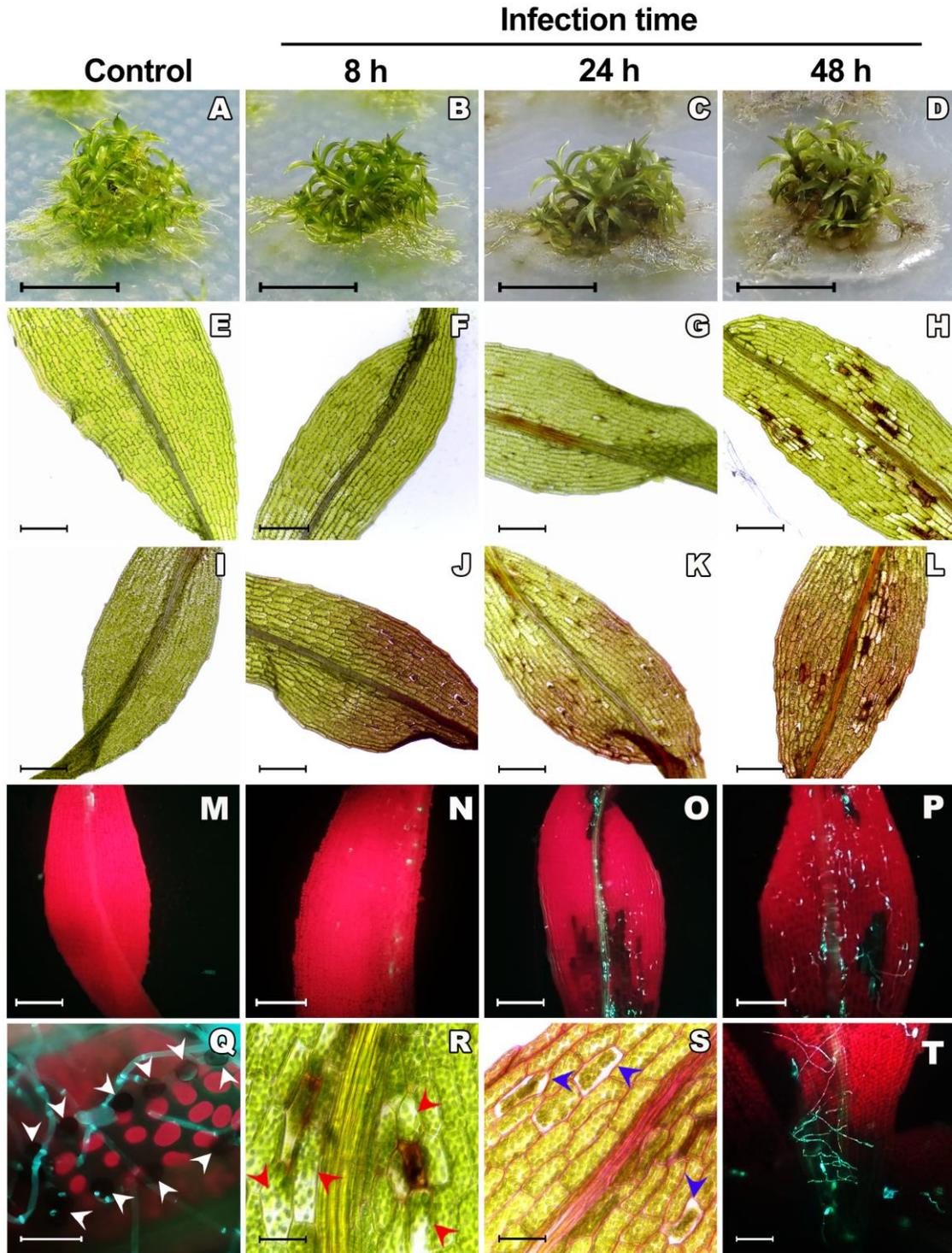


Figura 11: Desarrollo de síntomas en *P. patens* inoculado con *C. gloeosporioides*. (A-D) imágenes de colonias de *P. patens* a diferentes tiempos de infección: control inoculado con agua milliQ estéril, 8 hpi, 24 hpi y 48 hpi con *C. gloeosporioides* respectivamente. Las barras de escala representan 1 cm (E-H) imágenes de filidios de *P. patens* sin teñir a diferentes tiempos de infección: control, 8 hpi, 24 hpi y 48 hpi respectivamente. Las barras de escala representan 200 μ m. (I-L) imágenes de

filidios de *P. patens* teñidos con Safranina-O a diferentes tiempos de infección: control, 8 hpi, 24 hpi y 48 hpi respectivamente. Las barras de escala representan 200 μm . **(M-P)** imágenes de filidios de *P. patens* teñidos con Solofenil flavina a diferentes tiempos de infección: control, 8 hpi, 24 hpi y 48 hpi respectivamente. Las barras de escala representan 200 μm . **(Q)** filidio inoculado con *C. gloeosporioides* 24 hpi donde se puede apreciar la formación de apresorios (cabeza de flecha blanca). La barra de escala representa 20 μm . **(R)** filidio inoculado con *C. gloeosporioides* 24 hpi donde se puede apreciar la migración de los cloroplastos hacia el sitio de infección (cabezas de flecha rojas). La barra de escala representa 50 μm . **(S)** filidio inoculado con *C. gloeosporioides* 48 hpi teñido con Safranina-O, donde se puede apreciar la plasmólisis del citoplasma (cabezas de flecha azules) y la tinción de las paredes, lo que refleja el reforzamiento de la pared con compuestos fenólicos. La barra de escala representa 50 μm . **(T)** filidio inoculado con *C. gloeosporioides* 48 hpi teñido con Solofenil flavina, donde se puede ver el crecimiento de las hifas del hongo. La barra de escala representa 50 μm .

El reforzamiento de la pared celular es una estrategia de defensa que ya ha sido reportada en *P. patens* frente a otros patógenos (Ponce de Leon et al. 2012) y también está bien descrita en plantas vasculares como una de las principales respuestas de defensa ante el estrés biótico (Vandana et al. 2019).

Otros de los síntomas presentes en las células infectadas son el cambio de color de los cloroplastos (Figura 11, H) y, en las células circundantes a las infectadas, la migración de los cloroplastos hacia el sitio de infección, así como la plasmólisis del citoplasma (Figura 11, R y S). Estas respuestas concuerdan con las que ya habían sido reportadas en *P. patens* ante *C. gloeosporioides* y otros patógenos (Ponce de Leon et al. 2012; Reboledo et al. 2015). También han sido reportadas respuestas similares en *A. thaliana* frente a otras especies del género *Colletotrichum* (O'Connell et al. 2004), lo que sugiere que estas respuestas se han mantenido a lo largo del proceso evolutivo.

9.2. La infección con *C. gloeosporioides* provoca la disminución del rendimiento cuántico del Fotosistema II de *P. patens*

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas, algas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas convierten la energía luminosa en energía química en

forma de enlaces químicos. Durante este proceso la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos (básicamente clorofila a, b y carotenoides) de los complejos antena de la membrana fotosintética. Parte de la energía absorbida es transferida como energía de excitación y atrapada por el centro de reacción, en donde se utiliza para hacer trabajo químicamente útil, mientras que una menor parte es disipada principalmente como calor y en menor grado re-emitida como energía luminosa de menor energía (fluorescencia). Esta distribución de la energía en los tres procesos ocurre simultáneamente, de tal forma que el incremento en la eficiencia de uno de ellos, resultará en la disminución de los otros dos. Por lo tanto, a través de la medición del rendimiento de la fluorescencia de la clorofila se puede obtener información de la eficiencia fotoquímica y la disipación térmica de la energía absorbida (Moreno et al. 2008). La fluorescencia puede emplearse como una herramienta para obtener información acerca del estado fisiológico del aparato fotosintético, y la respuesta será indicadora del daño o alteración en el mismo. Varios estudios han empleado este parámetro como medida indirecta de estrés abiótico (Boureima et al. 2012; Brestic and Zivcak 2013; Leal-Delgado et al. 2019; Duarte et al. 2017) y biótico (Ivanov and Bernards 2016; Ajigboye et al. 2016; Dias et al. 2018) en plantas.

En aras de realizar una caracterización detallada de la interacción *P. patens* y *C. gloeosporioides*, se tomaron medidas de la fluorescencia de la clorofila a en colonias de *P. patens* sanas e infectadas con *C. gloeosporioides* a diferentes tiempos. Como se puede ver en la Figura 12, a las 8 hpi no existen diferencias significativas en la emisión de fluorescencia entre el control y la caja infectada con el hongo. Sin embargo, a las 24 hpi se puede ver ya una disminución en la emisión de fluorescencia (Figura 12, E y G), y a las 48 hpi la disminución es inferior al umbral que el equipo es capaz de detectar (Figura 12, F y G). Los valores de F_v/F_m mostrados en la imagen de escala de color muestran estos cambios. Esto sugiere

que, a medida que avanza la infección, ocurren cambios metabólicos importantes en el musgo que, en este caso puede estar asociado con el cambio de color que sufren los cloroplastos como consecuencia del ataque del patógeno (Figura 11, H), afectándose así la fotosíntesis.

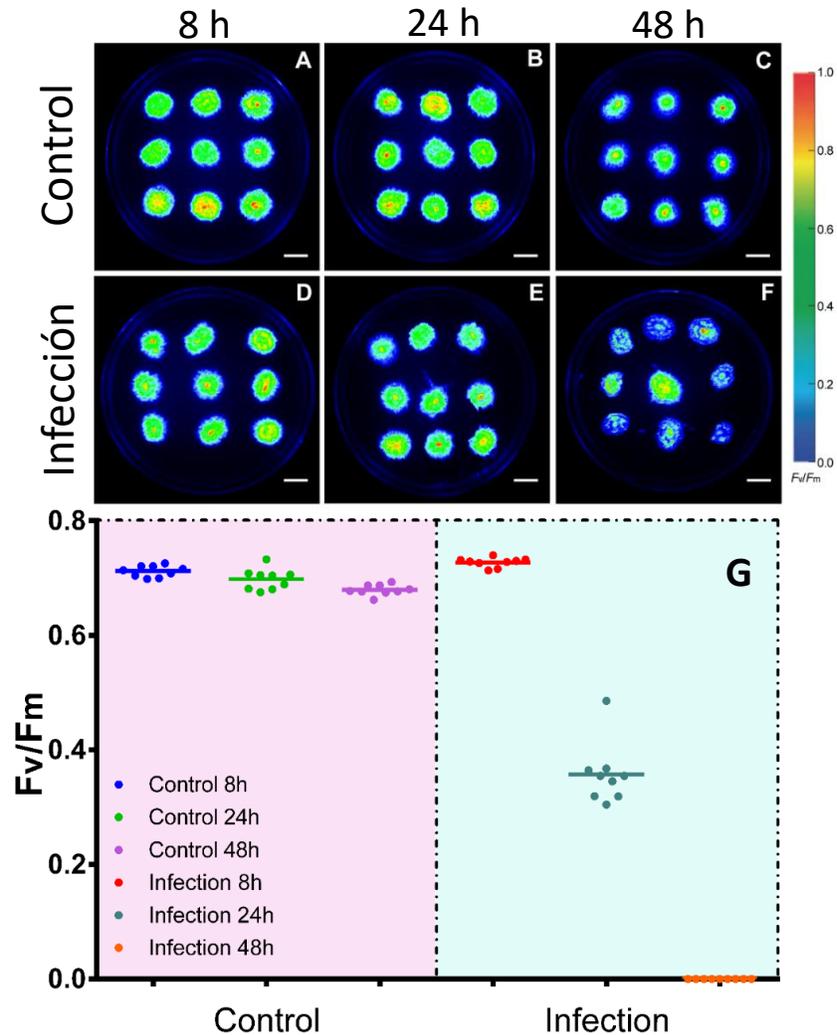


Figura 12: Rendimiento cuántico del Fotosistema II. **(A-F)** imágenes de fluorescencia de la clorofila a de colonias de *P. patens* sanas **(A-C)** e inoculadas con *C. gloeosporioides* **(D-F)**, a 8 hpi **(A y D)**, 24 hpi **(B y E)** y 48 hpi **(C y F)**. La barra de escala de color a la derecha representa la proporción del área de píxeles para cada segmento de las colonias que muestra el rendimiento cuántico del FS II (F_v/F_m); las barras de escala blancas en cada imagen representan 1 cm. **(G)** Media del rendimiento cuántico del FS II (\pm DE) de colonias de *P. patens* sanas (recuadro de la izquierda) e inoculadas con *C. gloeosporioides* (recuadro de la derecha).

9.3. La infección con *C. gloeosporioides* provoca cambios de coloración en el tejido de *P. patens*

El procesamiento de imágenes y la visión artificial resultan cada vez más útiles y necesarios en diversas aplicaciones agromóticas de gestión de cultivos y procesos agroalimentarios. Las imágenes ofrecen información muy valiosa sobre el estado de crecimiento de las plantas, la maduración de los frutales, la aparición de plagas y malas hierbas, etc. Las técnicas basadas en análisis de color son fundamentales en este dominio, al permitir clasificar y caracterizar de forma precisa, robusta y eficiente las distintas regiones de las imágenes (González-Esquivá et al. 2016). En este caso, el análisis mediante segmentación de color de las imágenes de las colonias de *P. patens* infectadas con *C. gloeosporioides* en comparación con colonias sanas, nos permite cuantificar el progreso de la infección.

Como se puede apreciar en la Figura 13, a medida que pasan las horas va aumentando el porcentaje de tejido marrón en las colonias (cuadrados de color marrón), mientras disminuye el porcentaje de tejido verde (cuadrados de color verde). En comparación, este efecto no se observa en las muestras control (círculos en la Figura 13). Este cambio de color en las colonias infectadas puede estar relacionado con el cambio de color que sufren los cloroplastos como respuesta al ataque del patógeno. Como consecuencia de la infección ocurre un desbalance en la fotosíntesis, y el transporte de electrones fotosintéticos también es un potencial proceso generador de ROS (Ravet and Pilon 2013). Cuando la luz es excesiva, o cuando la capacidad de transporte de electrones en el cloroplasto es limitada, los electrones pueden reducir directamente el oxígeno molecular, y el flujo de electrones no acoplado acumulado en la cadena de transporte de electrones también genera una cierta cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zhong et al. 2019). Esta acumulación de ROS afecta la ultraestructura de

los cloroplastos y el contenido de clorofila en ellos (Salguero-Linares and Coll 2019), lo que puede estar asociado con el cambio de coloración de los cloroplastos y del tejido en general.

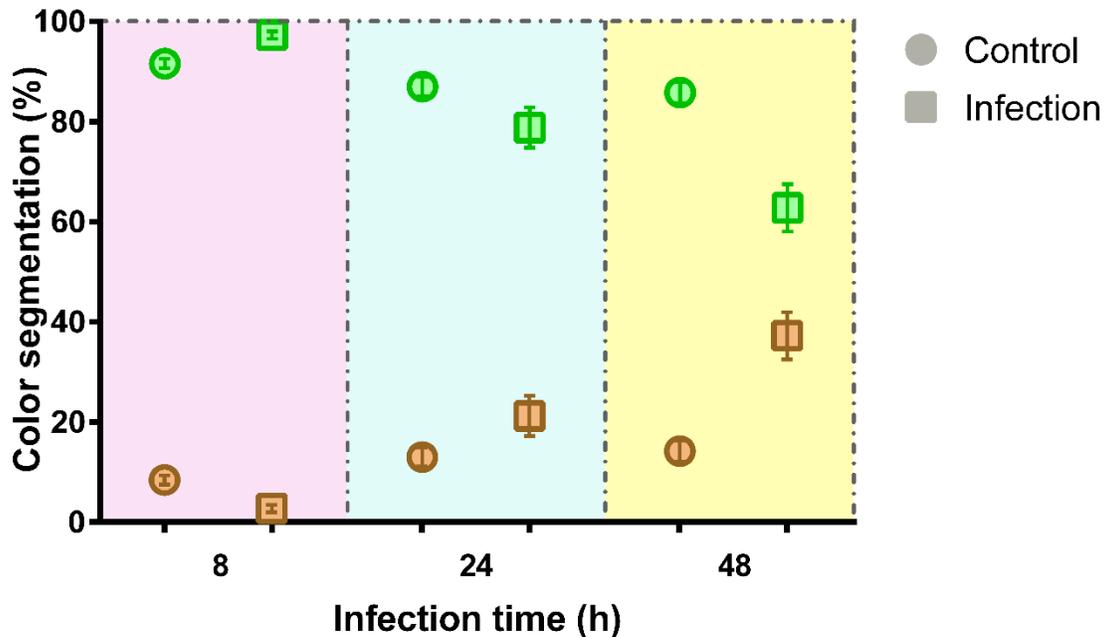


Figura 13: Efecto de la interacción entre *P. patens* y *C. gloeosporioides* en la segmentación de color en verde y marrón. Cada punto refleja la media (\pm DE) de tres imágenes con nueve colonias cada una. Los círculos representan los controles y los cuadrados las muestras infectadas con colonias inoculadas *C. gloeosporioides* (Infección). El color verde representa la porción de tejido verde y el color marrón representa el tejido marrón.

9.4. *C. gloeosporioides* provoca cambios de temperatura en *P. patens*.

Los avances recientes en los análisis no invasivos del metabolismo de las plantas incluyen técnicas de imágenes de estrés, como las de segmentación de color, presentadas anteriormente y las de termografía infrarroja (Fiorani et al. 2012). Desde hace muchos años se emplean los pequeños cambios de temperatura en las plantas para estudiar procesos metabólicos en estas. Diferentes estudios de microcalorimetría han demostrado que los flujos de calor metabólico se pueden utilizar para evaluar el metabolismo a *grosso modo* (Mourik and Bakri 1991; Edelstein et al. 2001; Qiao et al. 2005; Kranner et al. 2010).

Se tomaron termografías de colonias de *P. patens* sanas e infectadas con *C. gloeosporioides* (Figura 14). Con estas medidas se pudo apreciar un aumento de la temperatura en las colonias del musgo a medida que avanza la infección (Figura 15). Esto puede estar relacionado con el aumento de la actividad metabólica que ocurre en las células del musgo debido al desarrollo de la respuesta de defensa.

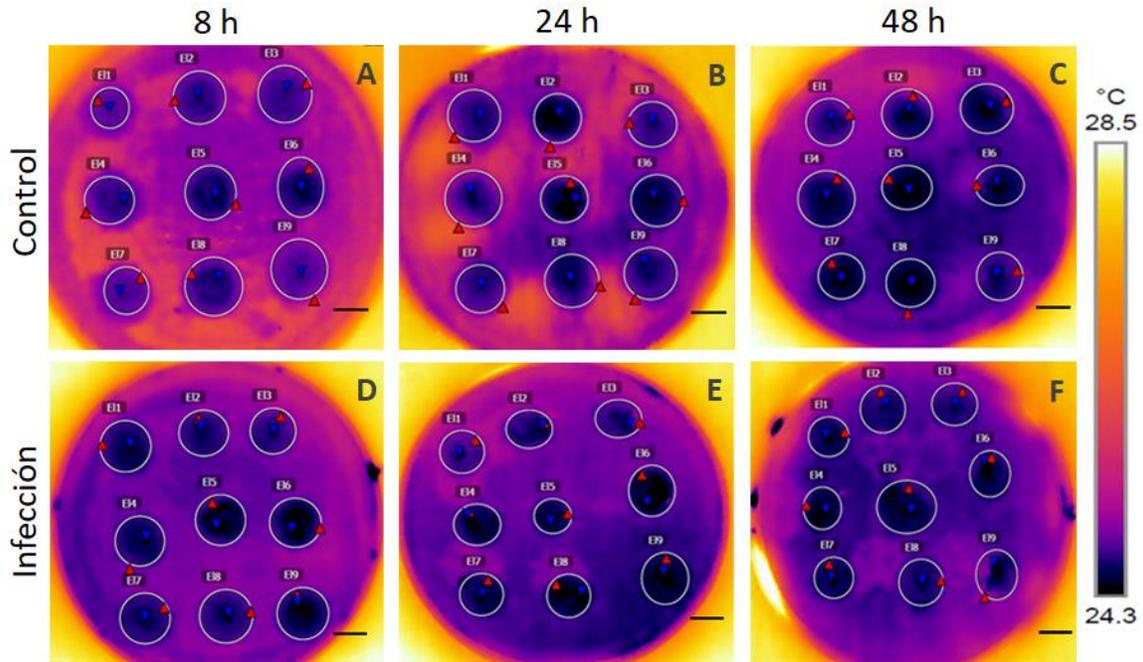


Figura 14. Termografías de cajas con colonias de *P. patens*. **(A-C)** muestras sin inocular (Control) a 8, 24 y 48 hpi respectivamente. **(D-E)** muestras infectadas con *C. gloeosporioides* (Infección) a 8, 24 y 48 hpi respectivamente. Las circunferencias en cada imagen denotan las colonias de *P. patens*, y los triángulos rojos y azules marcan las regiones de menor y mayor temperatura respectivamente. La barra de escala a la derecha representa la proporción del área de píxeles, y las barras de escala negras corresponden a 1cm.

El reconocimiento de los patógenos resulta en una reprogramación masiva de la célula vegetal para activar y desplegar respuestas de defensa. Dichas respuestas están asociadas con mayores demandas de energía, equivalentes reductores y esqueletos de carbono, los cuales son proporcionados por vías metabólicas primarias. La producción de fenilpropanoides, representa uno de los principales flujos de carbono del metabolismo primario al secundario; la síntesis de corismato

requiere de fosfoenol piruvato y eritrosa-4 fosfato, derivados de la ruta de las pentosas fosfato; y la producción de ROS requiere grandes cantidades de NADPH (Bolton 2009). Además, algunas de las enzimas involucradas en procesos del metabolismo primario regulan las respuestas de defensa en las plantas (Rojas et al. 2014).

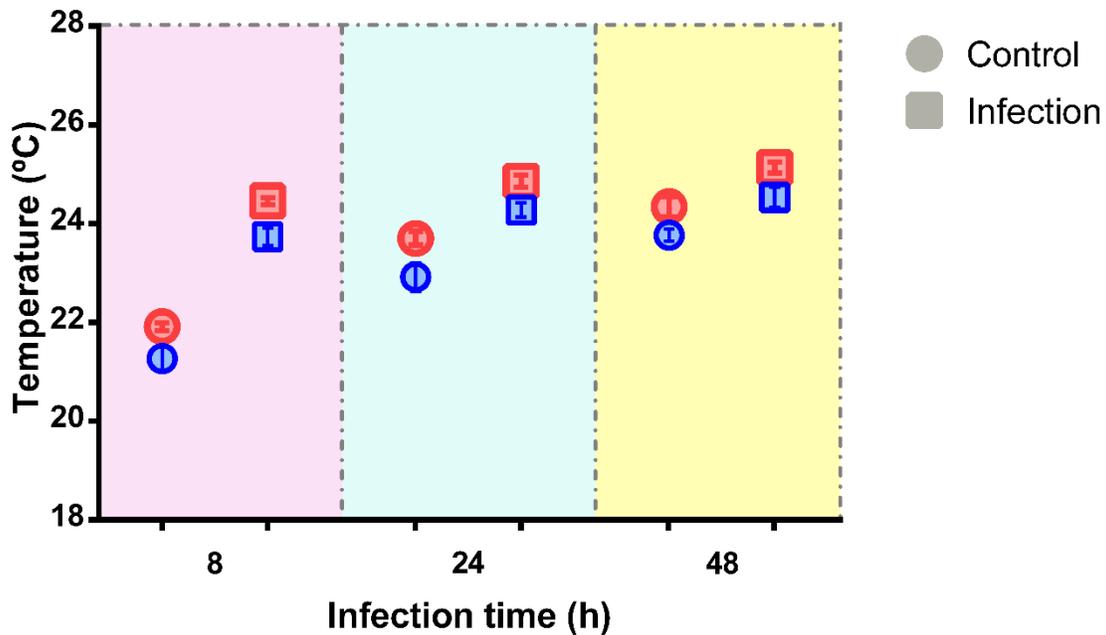


Figura 15. Variación de la temperatura en colonias de *P. patens* durante la infección con *C. gloeosporioides*. Los círculos indican los valores de los controles sin infectar y los cuadrados indican los valores de las colonias infectadas por *C. gloeosporioides*. En color azul se muestran las temperaturas mínimas y en rojo las máximas. Cada punto refleja la media (\pm DE) de tres imágenes con nueve colonias cada una.

9.5. La presencia de hormonas en el medio de cultivo mejora la resistencia de *P. patens* ante la infección con *C. gloeosporioides*.

El SA es fundamental en la regulación de las respuestas del musgo, entonces para determinar si el JA es capaz de mejorar la respuesta de defensa del musgo, se realizó una infección con *C. gloeosporioides* en colonias previamente tratadas con estas hormonas, y se determinó el daño celular a 72 hpi. Las colonias tratadas con las hormonas resisten mejor el ataque del patógeno, incluyendo las tratadas

con JA (Figura 16). Esto puede indicar que el JA exógeno tiene un efecto en *P. patens* similar al que tiene el JA producido por las plantas vasculares durante las respuestas de defensa. En el caso del SA, Vidhyasekaran (2020) plantea que el aumento de la síntesis y la acumulación de SA en las plantas da como resultado una mayor expresión de los genes de defensa, lo que se puede ver en este caso, donde la respuesta del musgo es dependiente de la concentración de la hormona.

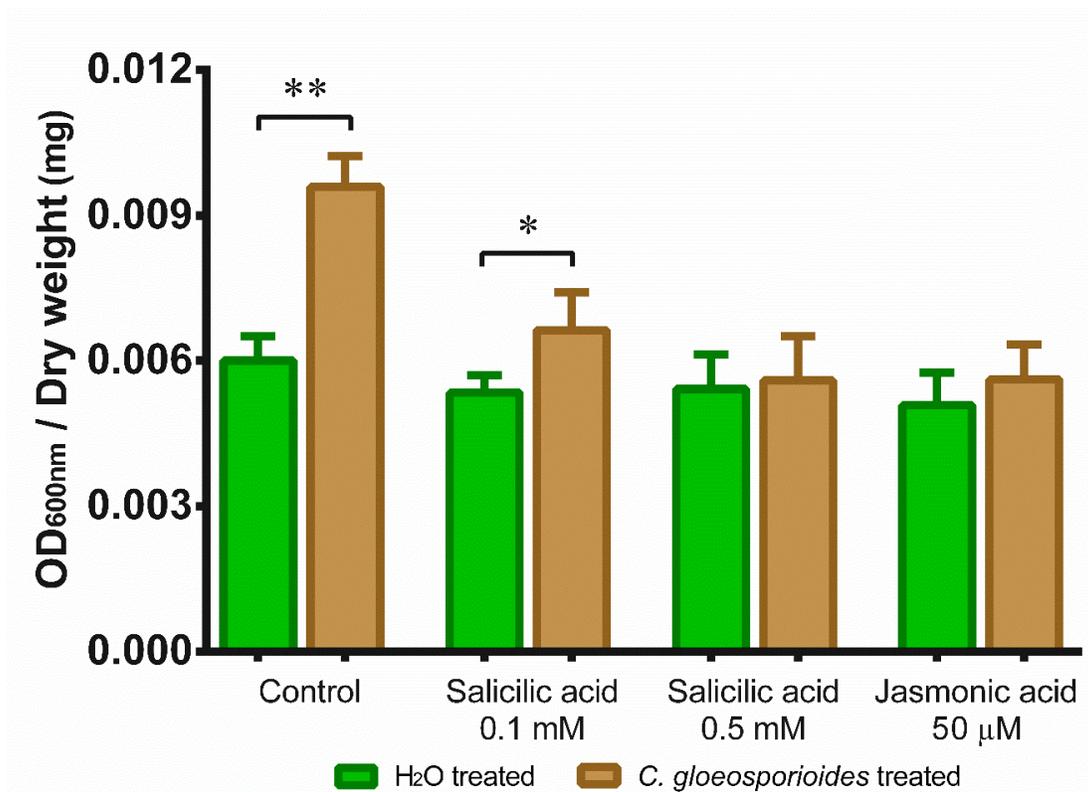


Figura 16. Medición de la muerte celular mediante tinción con azul de Evans a 72 hpi de colonias previamente tratadas con hormonas. Los datos se expresaron como la densidad óptica (DO) a 600 nm por miligramo de peso seco. Los valores en la gráfica son medias con desviaciones estándar de ocho réplicas independientes del musgo, los asteriscos sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$; $n = 8$).

La participación de diferentes hormonas en las respuestas de defensa de las plantas vasculares ha sido reportada anteriormente por varios investigadores (Luo et al. 2019; Tunsagool et al. 2019). En *P. patens* también se ha visto cómo varían los niveles hormonales durante el estrés biótico (Ponce de León and Montesano

2017). Tanto en las plantas vasculares como en *P. patens* la expresión de genes relacionados con la defensa está mediada por las hormonas. Se ha reportado que en las plantas vasculares el SA participa principalmente en la activación de la respuesta de defensa contra los patógenos biotróficos mientras que el JA y ET son responsables de la defensa contra los patógenos necrotróficos (Verma et al. 2016). Sin embargo *P. patens* no produce JA, aunque se demostró que sí es capaz de responder ante la presencia de esta hormona (Ponce de Leon et al. 2012).

9.6. Purificación y análisis de calidad del ARN

Durante el proceso de extracción se añadió DNAsa a las columnas para mejorar la pureza del ARN resultante. En la Figura 17 se puede observar el gel de agarosa 1% donde se verificó la integridad de las muestras. En todas las muestras se pueden apreciar bandas íntegras, sin smears en los carriles. Por otra parte, se estimó la concentración de las muestras de ARN y su calidad mediante cromatografía de líquidos en columna capilar para determinar el RIN. La concentración y calidad de las muestras superó los estándares requeridos para continuar con la secuenciación, como se puede apreciar en la tabla 1.

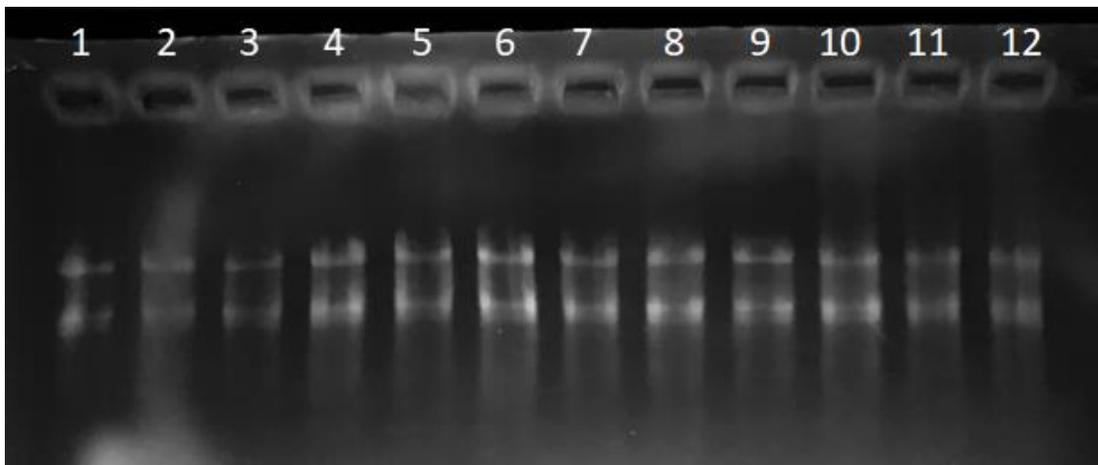


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los ARN correspondientes a las muestras del transcriptoma. **(1-3)** Control 8 h, *P. patens* inoculado con agua miliQ estéril. **(4-6)** Control 24 h. **(7-9)** *P. patens* inoculado con *C. gloeosporioides* 8 hpi. **(10-12)** *P. patens* inoculado con *C. gloeosporioides* 24 hpi.

Tabla 1. Valores de concentración y RIN de las muestras de ARN

Muestra	Concentración (ng/μL)	RIN
<i>P. patens</i> /H ₂ O (8h)-1	372,375	8,6
<i>P. patens</i> /H ₂ O (8h)-2	161,925	8,3
<i>P. patens</i> /H ₂ O (8h)-3	267,434	8,6
<i>P. patens</i> /H ₂ O (24h)-1	399,443	8,7
<i>P. patens</i> /H ₂ O (24h)-2	303,447	9,0
<i>P. patens</i> /H ₂ O (24h)-3	386,9	8,6
<i>P. patens</i> / <i>C. gloeosporioides</i> (8h)-1	441,392	8,5
<i>P. patens</i> / <i>C. gloeosporioides</i> (8h)-2	408,39	8,0
<i>P. patens</i> / <i>C. gloeosporioides</i> (8h)-3	309,451	8,6
<i>P. patens</i> / <i>C. gloeosporioides</i> (24h)-1	779,965	8,7
<i>P. patens</i> / <i>C. gloeosporioides</i> (24h)-2	532,334	8,6
<i>P. patens</i> / <i>C. gloeosporioides</i> (24h)-3	438,215	9,2

9.7. Análisis de calidad de las secuencias obtenidas de RNA-seq

El control de calidad de las lecturas obtenidas mediante RNA-seq involucra ciertos parámetros entre los que se encuentran: el análisis de calidad de las secuencias, el contenido de GC en las muestras, la presencia de adaptadores, así como de secuencias sobrerrepresentadas con el objetivo de detectar posibles errores en la secuenciación. En cuanto a la calidad de las secuencias, este análisis reveló que todas las secuencias tenían una calidad superior a 30 en la escala Phred (Figura 18), lo cual es aceptable teniendo en cuenta que el mínimo sugerido para el análisis de secuencias es 20.



Figura 18. Media de la calidad de secuencia por posición de las lecturas. Gráfica obtenida con el *software* MultiQC a partir de los datos obtenidos del FastQC.

Aunque la calidad de las secuencias recibidas fue buena, en el análisis de calidad se encontraron algunos parámetros a mejorar. Las secuencias mantenían los adaptadores (*Illumina Universal Adpater*), un alto contenido de GC y una gran cantidad de secuencias sobrerrepresentadas (más de la mitad de las muestras con más del 10% de secuencias sobrerrepresentadas) (Figura 19, A-C). Por este motivo se decidió realizar un preprocesamiento de las lecturas y así mejorar la calidad de estas para los análisis posteriores (Figura 19, D-E).

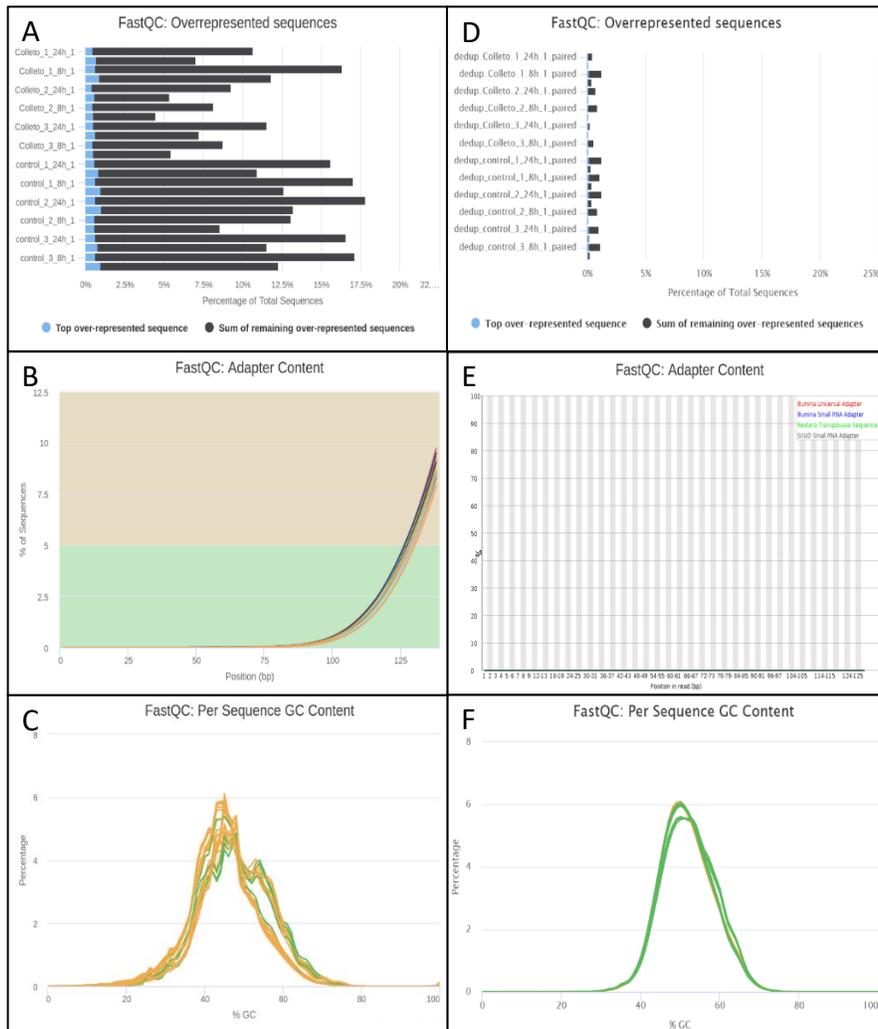


Figura 19. Resultados obtenidos del análisis de calidad con el *software* FasQC y procesados con MultiQC. **(A-C)** Resultados del análisis de calidad de las secuencias crudas. **(D-F)** Resultados del análisis de calidad de las secuencias procesadas. **(A y B)** Secuencias sobrerrepresentadas. **(C y D)** Contenido de adaptadores. **(C y D)** Contenido de GC.

9.8. Alineamiento con el genoma de referencia

Para continuar con el análisis de las secuencias se realizó el alineamiento de las lecturas con el genoma de referencia de *P. patens*. Para ello se empleó el paquete RSubread. En el caso de las lecturas correspondientes a las muestras tratadas con el hongo patógeno se puede observar un mayor porcentaje de lecturas que no se alinean con la referencia (Figura 20). Esto se debe a que en esas muestras hay lecturas que corresponden a los ARNs del patógeno, y que por tanto no se alinean con el genoma del musgo.

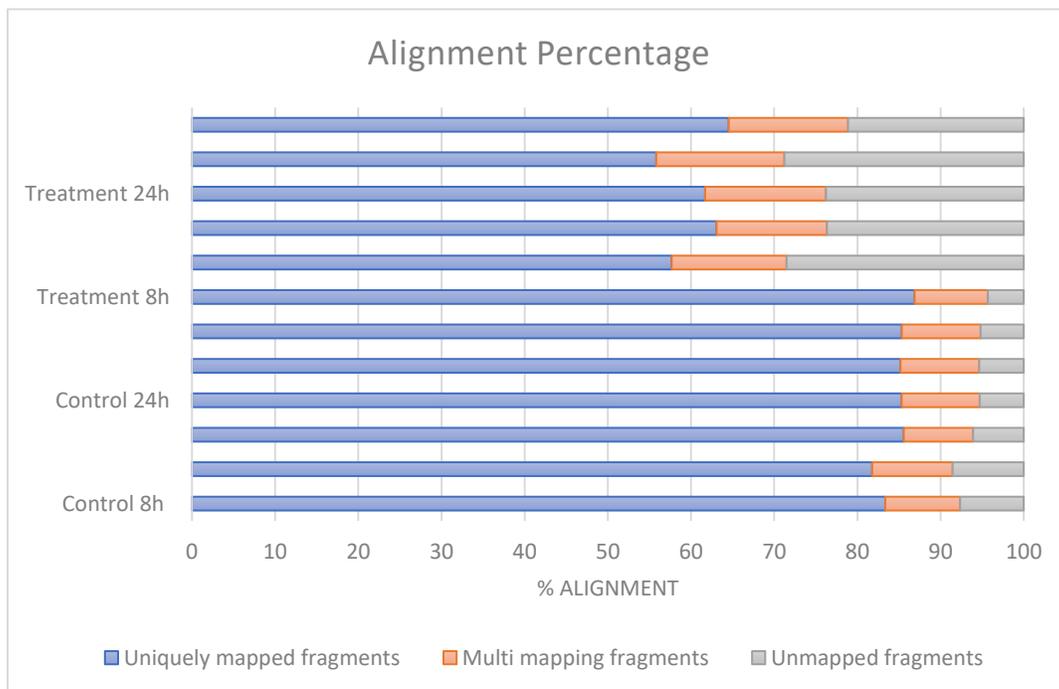


Figura 20. Porcientos de alineamiento de las lecturas del transcriptoma de *P. patens* (Control) y de *P. patens* con *C. gloeosporioides* (Treatment). Cada barra corresponde a una réplica. En azul se muestran los porcentos de lecturas que se alinearon a una sola región del genoma de referencia. En naranja se muestran los porcentos de lecturas que se alinearon con más de una región del genoma de referencia; y en gris las que no se alinean.

También se puede apreciar en la Figura 20 que las muestras presentan alrededor de un 10% de lecturas que se alinean en más de una posición del genoma. Esto se debe a que en el caso de *P. patens* el genoma se encuentra duplicado (Rensing

et al. 2007), por lo que varios genes cuentan con más de una copia, provocando que las lecturas obtenidas coincidan con más de una posición.

9.9. Análisis de expresión diferencial

Para el análisis de expresión diferencial se seleccionó el paquete DESeq2 de R. Primeramente se eliminaron los genes con valores de expresión inferiores a 0,5 conteo por millón ($CPM < 0,5$). La mayor sensibilidad de las tecnologías basadas en RNAseq a menudo conduce a que se vean reflejados en los resultados, genes que exhiben niveles de expresión muy bajos, cuya importancia biológica podría ser cuestionable (Perroud et al. 2018), además, este filtrado aumenta la fortaleza estadística de la predicción de genes diferencialmente expresados (Conesa et al. 2016). En la Figura 19 se puede apreciar el efecto de la eliminación de lecturas con bajos conteos. Este filtrado permite homogenizar los niveles de lecturas por transcrito en las muestras, reduciendo la variabilidad asociada al conteo, lo que previene la aparición de falsos positivos (Figura 19, B). La eliminación de estos transcritos no afecta los genes identificados como diferencialmente expresados por los métodos utilizados posteriormente.

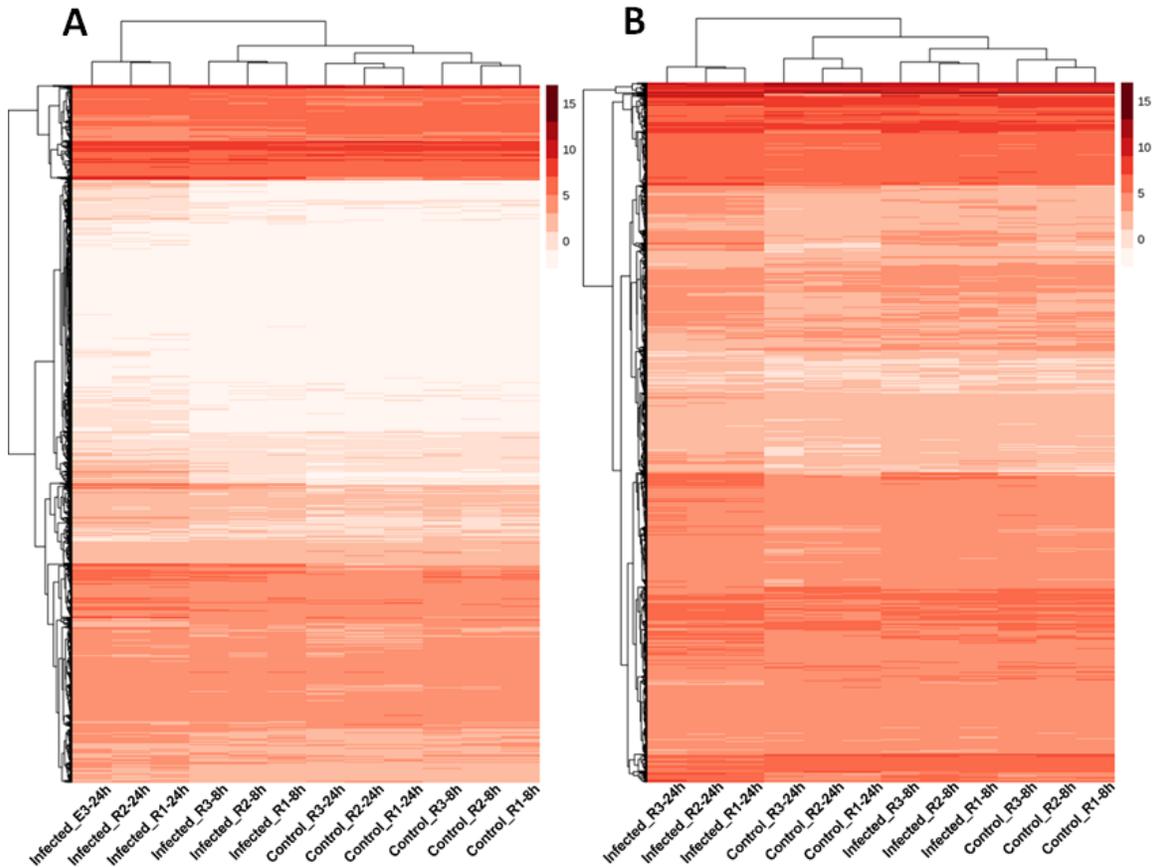


Figura 19. Efecto del filtrado de los transcritos con bajos niveles de expresión. Discriminación entre grupos experimentales mediante clustering no supervisado de las muestras sin filtrar **(A)** y filtradas respectivamente **(B)**.

El nivel de expresión esperado de cada transcrito está limitado por la profundidad de secuenciación o el número total de lecturas, que está predeterminado por el diseño experimental y el presupuesto antes de la secuenciación. Dado un recuento total de lecturas fijo, los transcritos expresados a más altos niveles tendrán una mayor proporción de lecturas totales. EL nivel de expresión de los transcritos dentro de cada muestra depende del resto de transcritos presentes (Rapaport et al. 2013), por tanto, los transcritos expresados a niveles más altos tendrán una sobrestimación de lecturas totales (Li et al. 2017). Por otra parte, dentro de cada librería los ARNs más largos van a tener asociadas más lecturas que los cortos, aunque tengan un nivel de expresión similar, debido a la

fragmentación. Todos estos factores afectan los valores de expresión diferencial. Para reducir la influencia de estos sesgos en los resultados, hay que realizar normalizaciones. En este caso, hemos utilizado el método de Upper-Quartile (UQ), pues tiene en cuenta todos los factores mencionados anteriormente y garantiza que las distribuciones de expresión de cada muestra sean similares en todo el experimento.

En la Figura 20 se puede observar el efecto de la normalización mediante el método UQ en las secuencias. Analizando los datos sin normalizar (Figura 20, A-C) se puede apreciar que las muestras presentan una buena distribución, aun así esta mejora después de la normalización (Figura 20, D-E) homogeniza siempre cuando menciones las figuras, pon siempre Figura X. Las muestras de la infección a 24 hpi sin normalizar forman un grupo bien definido y separado del resto de las muestras, sin embargo las muestras del control y la infección a 8 hpi muestran correlación entre sí (Figura 20B). Luego de la normalización se puede observar cómo se recupera el diseño experimental (Figura 20, D) y se homogeniza la distribución de expresión relativa de las muestras (Figura 20, D). En el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés *Principal Component Análisis*) se observa que las réplicas de cada muestra se agrupan entre sí mientras que las diferentes muestras se encuentran distantes unas de otras (Figura 20, C y E). Aun cuando la normalización no tiene un efecto sobre la distribución de las muestras en este caso, sí aumenta el por ciento de variabilidad que se acumula en los componentes 1 y 2 del análisis.

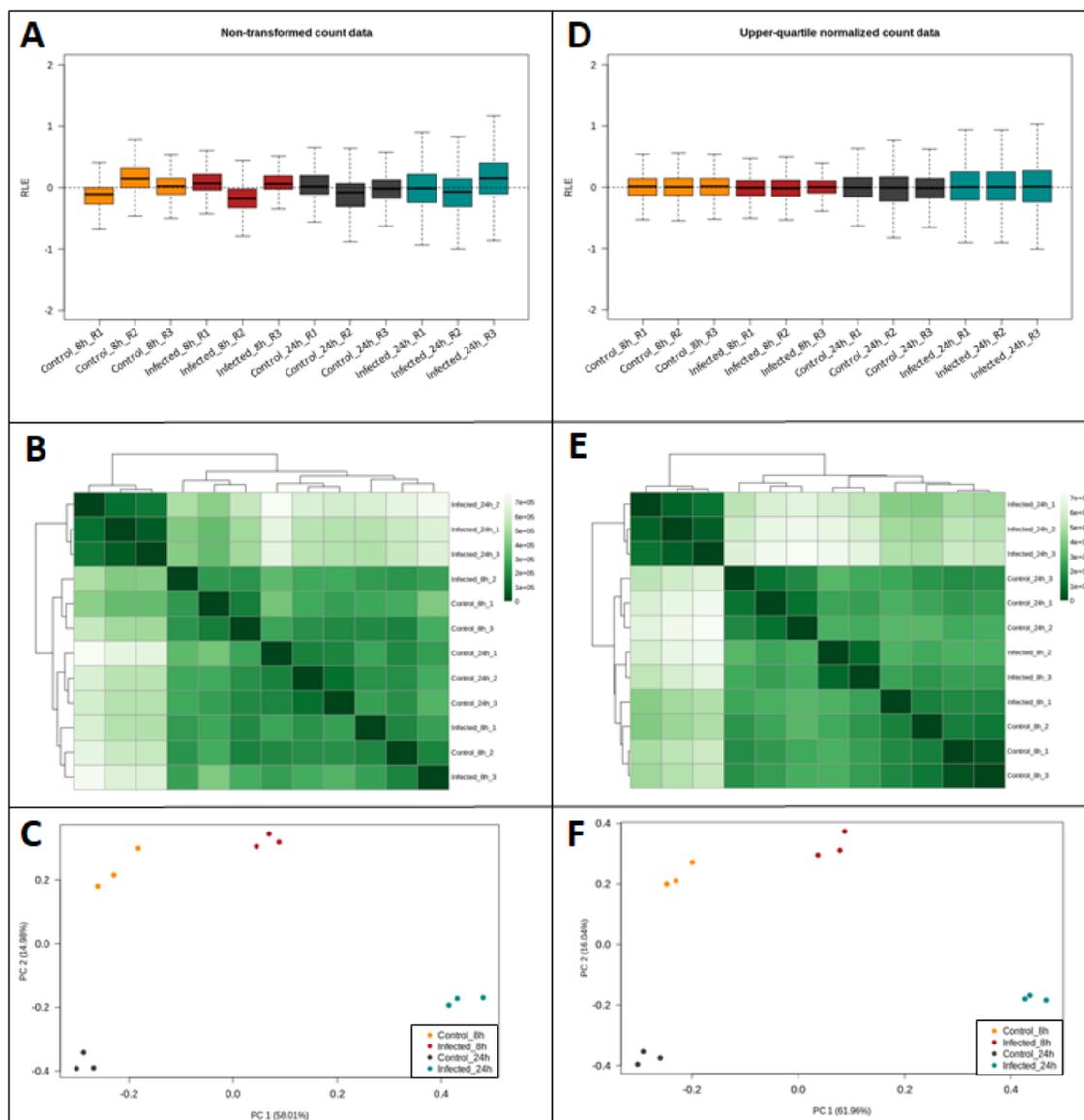


Figura 20. Efecto de la normalización con el método de upper quartile sobre las muestras. **(A-C)** muestras sin normalizar. **(D-F)** muestras normalizadas. **(A y D)** Diagrama de cajas de la expresión relativa de las muestras. **(B y E)** Clustering supervisado de los coeficientes de correlación de Pearson sobre todas las muestras. **(C y F)** Análisis de componentes principales.

Una vez normalizados los datos se realizó la expresión diferencial con el *software* DESeq2. En todas las comparaciones realizadas se encontraron transcritos expresados diferencialmente (Figura 21).

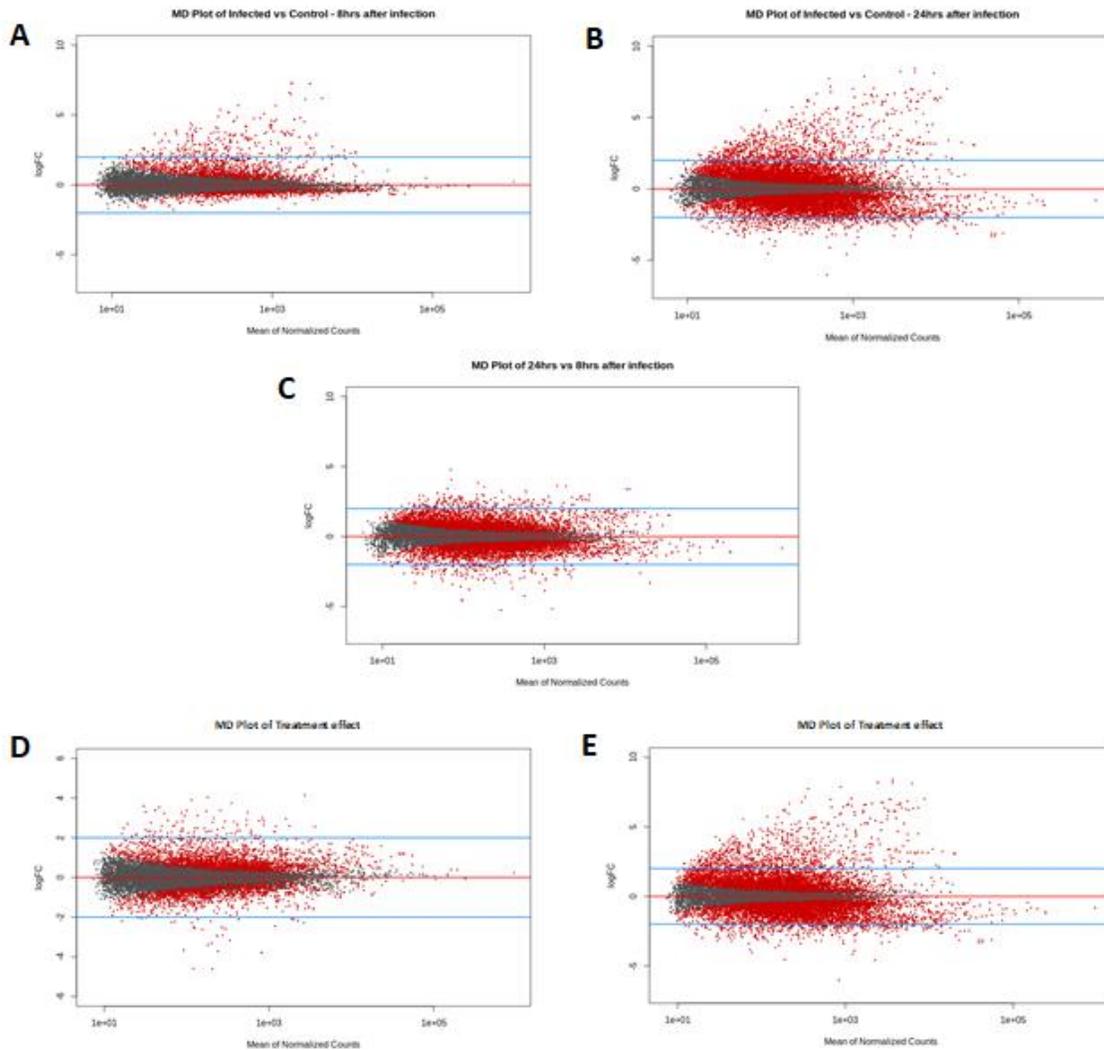


Figura 21. Gráficas de diferencia de medias (MD) para valores de expresión diferencial: $|\logFC| > 2$ (líneas azules horizontales) y $FDR < 0,05$. **(A)** Expresión diferencial a 8 hpi respecto al control. **(B)** Expresión diferencial a 24 hpi respecto al control. **(C)** Expresión diferencial a 24 hpi respecto a 8 hpi. **(D)** Expresión diferencial debido al efecto del tiempo. **(E)** Expresión diferencial debido al efecto del tratamiento.

El análisis reveló que, 8 horas después de la infección, 236 genes se regulan positivamente y ninguno negativamente. A las 24 hpi 836 genes están regulados positivamente y 400 negativamente en comparación con el control. Mientras que, al comparar las muestras infectadas a 24 hpi respecto a 8 hpi se encontraron 203

genes regulados positivamente y 160 negativamente. El análisis multivariado arrojó que la presencia de *C. gloeosporioides* provoca la regulación positiva de 837 genes y la regulación negativa de 403, mientras que la extensión de la infección en el tiempo solo es responsable de que se regulen 95 genes positivamente y 30 negativamente. En la Figura 22 se observa la distribución de los genes diferencialmente expresados entre las diferentes comparaciones.

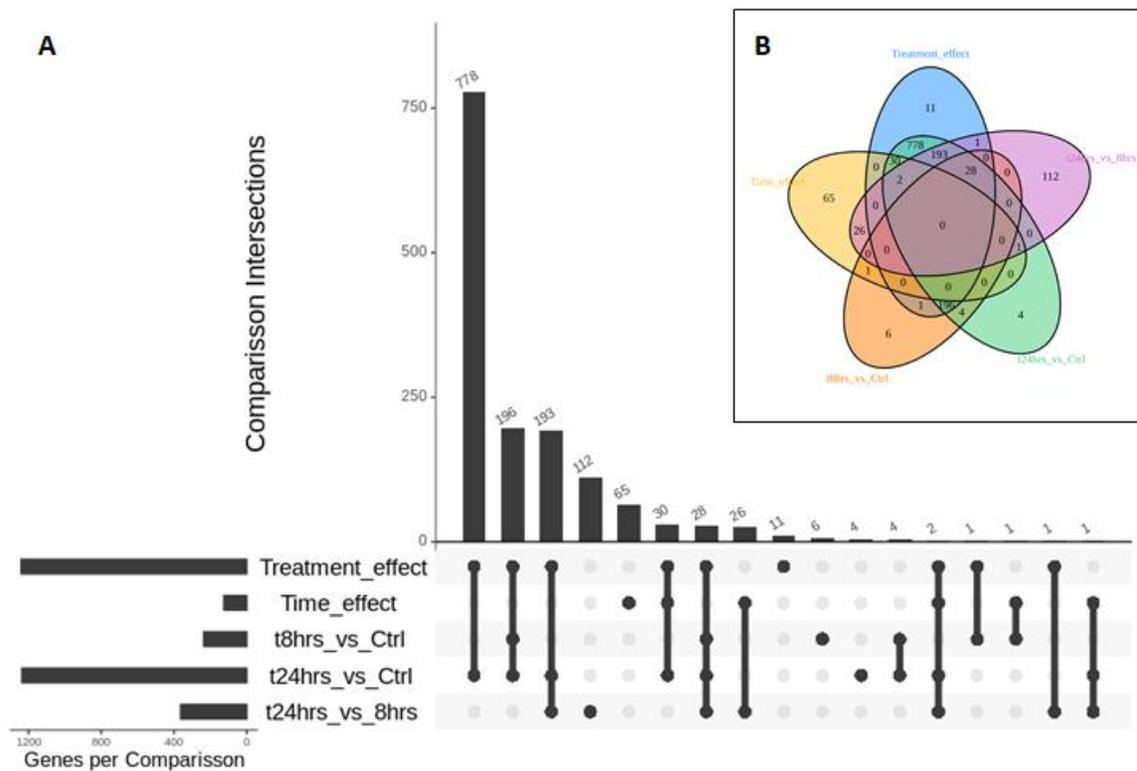


Figura 22. Distribución de los genes diferencialmente expresados entre las diferentes comparaciones. **(A)** Gráfica de la distribución de intervalos de coincidencias entre las comparaciones. **(B)** Diagrama de Venn que muestra la superposición de los genes diferencialmente expresados en cada una de las comparaciones.

Las comparaciones que arrojan mayor número de genes diferencialmente expresados son la comparación entre las muestras de la infección a 24 hpi y el control, y el análisis del efecto del tratamiento, con 1236 y 1240 genes respectivamente, sin embargo 1227 genes coinciden en ambas comparaciones.

La comparación entre las muestras infectadas (24 hpi contra 8 hpi) es la siguiente con más genes diferencialmente expresados, y aunque comparte algunos de estos genes con otras comparaciones, hay 112 genes diferencialmente expresados que solo se ven en esta comparación.

Debido a la duración de la infección se observan 125 genes diferencialmente expresados, de ellos 30 genes coinciden con los observados debido al efecto del tratamiento solamente, y 29 coinciden con los que se observan en la comparación de la infección a 24 hpi contra 8 hpi. Debido a que en este análisis se compara el efecto del transcurso del tiempo tanto en las muestras infectadas como en los controles, podemos asumir que los genes diferencialmente expresados como consecuencia del transcurso de la infección son los que coinciden con las demás comparaciones. Los 65 genes que se expresan exclusivamente en este análisis corresponden a diferencias entre los controles. Las muestras de los controles se tomaron con 16 horas de diferencia, por lo que, inevitablemente, una de las muestras, en este caso la de 8 hpi, se tomó cerca del final del período de luz. Las plantas, incluido *P. patens*, son organismos sésiles, por lo que deben adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales en constante cambio, como las causadas por los ciclos diarios de luz / oscuridad. Un mecanismo importante para anticipar y prepararse para tales cambios predecibles es el reloj circadiano (Woelfle et al. 2004). Covington et al. (2008), en un análisis integral de múltiples datos de microarreglos de *A. thaliana*, identificaron varias vías fisiológicas enriquecidas para los cambios regulados por el ciclo circadiano en la abundancia de transcritos.

Por último, en la comparación de 8 hpi contra el control se sobrepresan 236 genes, de los cuales 224 se observan también en los genes diferencialmente expresados debido al efecto del tratamiento. Del resto de los genes, solo 6 son exclusivos de esta comparación. Dada la distribución que presentan los genes

diferencialmente expresados, es posible analizar los efectos de la infección y su duración solo con los genes diferencialmente expresados en el análisis de efecto del tratamiento y de 24 hpi contra 8 hpi.

9.10. Enriquecimiento de términos GO

En la Figura 23 se observa el enriquecimiento de procesos biológicos en los conjuntos de genes diferencialmente expresados debido al efecto del tratamiento. Entre los genes sobrepresados los procesos más enriquecidos son el catabolismo de fenilalanina y la biosíntesis de ácido cinámico y corismato. Por otra parte, entre los genes regulados negativamente, entre los procesos más destacados están la descarboxilación de glicina, la fotosíntesis y procesos de biosíntesis.

Procesos como la síntesis de aminoácidos aromáticos, ácido cinámico y corismato están relacionados con la síntesis del SA, el cual se sintetiza en las células vegetales a través de dos vías (Figura 24). En una de estas vías el SA se sintetiza a partir del isocorismato con mediación de la enzima Isocorismato sintasa 1 y una amidotransferasa (Rekhter et al. 2019). La otra ruta a través de la cual se sintetiza el SA es la vía de los fenilpropanoides, una ruta muy importante en plantas, a partir de la cual se sintetizan muchas moléculas con función de señalización y protección. Los fenilpropanoides se derivan del ácido cinámico, que a su vez es el resultado de la desaminación del aminoácido fenilalanina (Phe) mediante la acción de la enzima Fenilalanina amonio liasa (PAL), una de las principales enzimas de la ruta (Francini et al. 2019), cuyo proceso metabólico también se encuentra enriquecido (Figura 23).

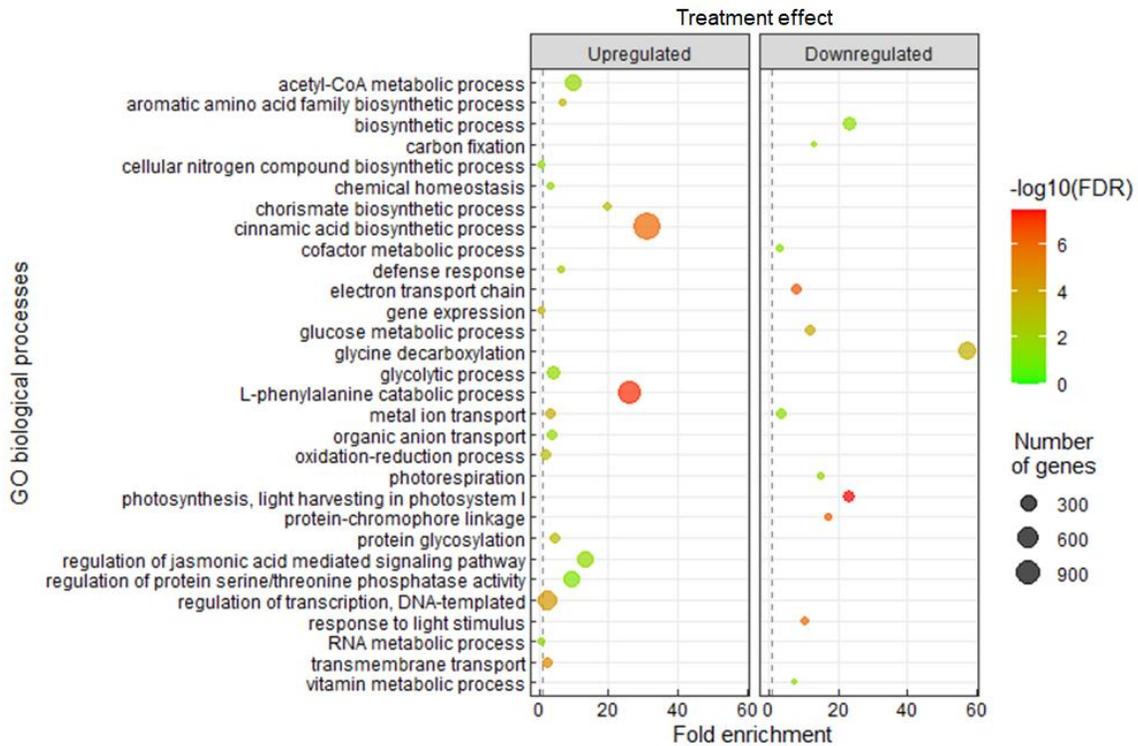


Figura 23. Procesos biológicos sobrerrepresentados en los conjuntos de genes diferencialmente expresados debido al efecto del tratamiento. Los procesos biológicos más significativos están representados y ordenados según su enriquecimiento. El tamaño del punto indica el número de genes diferencialmente expresados asociados con el proceso y el color del punto indica la importancia del enriquecimiento ($-\log_{10}$ (valores P ajustados por FDR)).

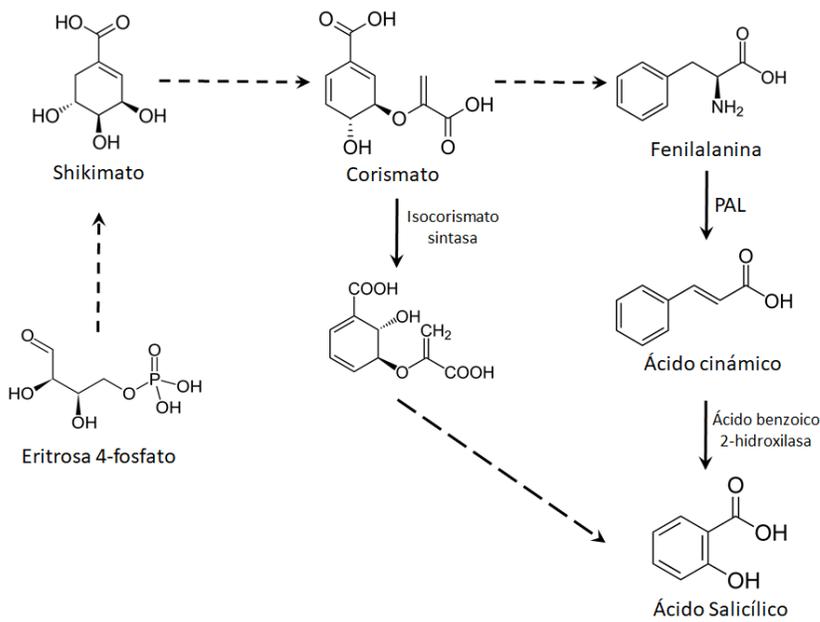


Figura 24. Rutas de síntesis de SA. Las flechas punteadas representan más de una reacción.

También se ven enriquecidos procesos como la glicólisis, metabolismo del Acetil CoA (Figura 25), síntesis de compuestos nitrogenados, transporte de iones y transporte transmembrana. Estos procesos están ligados al metabolismo primario de las células, el cual aumenta bajo condiciones de estrés para satisfacer la demanda celular de energía y metabolitos intermediarios requeridos para llevar a cabo la respuesta de defensa (Rojas et al. 2014). En *Glycine max* se ha reportado que, durante la infección con el patógeno necrótrofo *Rhizoctonia solani*, se regulan negativamente los transcritos relacionados con la fotosíntesis, mientras aumenta la abundancia de transcritos de genes involucrados en el catabolismo de almidón y carbohidratos (Copley et al. 2017). Un resultado similar se reportó para *Triticum aestivum* durante la fase necrótrofa de la interacción con el hongo hemibiótrofo *Septoria tritici* (Yang et al. 2013). Otros procesos enriquecidos son la transcripción y la expresión de genes, lo que refleja la extensa transformación que ocurre en las células del hospedero frente al estrés biótico.

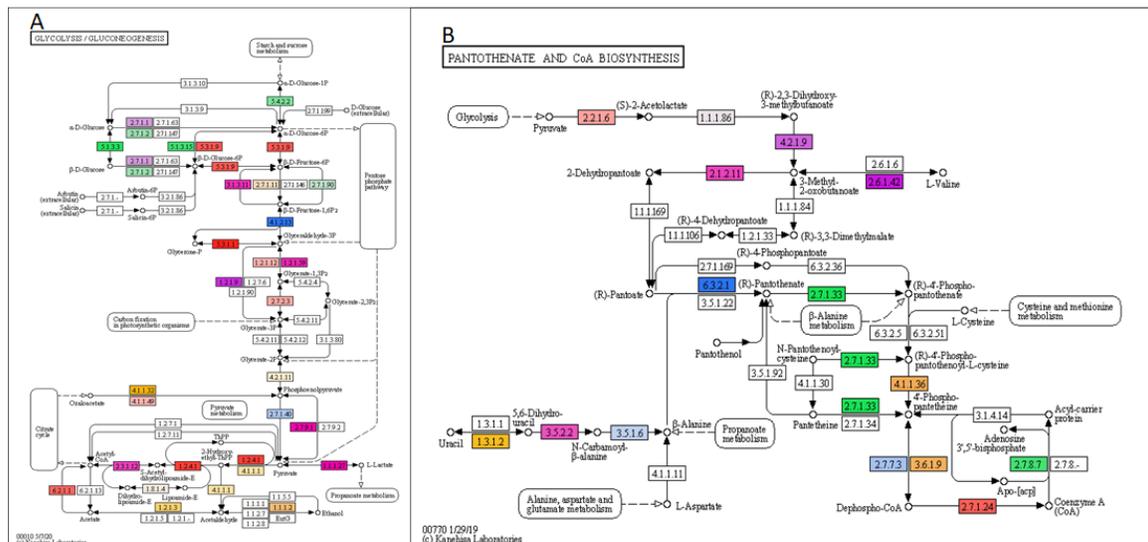


Figura 25. Representación de rutas metabólicas obtenidas mediante enriquecimiento de vías metabólicas de KEGG. **(A)** Glicólisis / gluconeogénesis. **(B)** Biosíntesis de Coenzima A y pantotenato. Los recuadros en colores representan las enzimas de la ruta que se encuentran sobrepresadas en el transcriptoma de *P. patens*.

9.11. Respuesta de *P. patens* durante la interacción con *C. Gloeosporioides*

Las respuestas de defensa se asocian con una amplia reprogramación transcripcional y hormonal en las plantas (Pieterse et al. 2014). Las fitohormonas son reguladoras centrales de este proceso (Berens et al. 2017). Entre ellas el SA es la hormona central en la respuesta de defensa de las plantas contra los patógenos hemibiotrófos. En respuesta al SA se expresan genes de defensa y relacionados con la patogénesis, se producen ROS que a su vez constituyen señales para la activación de otros procesos de defensa como la muerte celular programada (Verma and Agrawal 2017). Todos estos procesos comienzan por el reconocimiento del patógeno en la superficie celular y la transducción de esa señal hasta el núcleo, donde se producen los cambios en los patrones de expresión (Liebrand et al. 2014).

9.11.1. Ruta de fenilpropanoides y reforzamiento de la pared celular

Entre los procesos biológicos que se encuentran enriquecidos hay varios relacionados con la síntesis de fenilpropanoides. Esto tiene impacto no solo en la producción de SA como habíamos visto anteriormente, sino que esta vía también es responsable de la síntesis de lignina en plantas vasculares (Figura 26) (Muro-Villanueva et al. 2019). Enzimas como la Fenilalanina amonio liasa (PAL), chalcona sintasa (CHS), cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y 4-Coumarato CoA ligasa (4CL1) son esenciales en esta ruta y se encuentran sobrepresadas en el musgo (Figura 27). En *P. patens* no se ha reportado la presencia de lignina en la pared celular pero sí se ha reportado la presencia de lignanos como respuesta de defensa (Espiñeira et al. 2011). Además, como se puede ver en la Figura 10, las paredes celulares de las plantas infectadas se tiñen con el colorante Safranina, el cual se une a compuestos fenólicos.

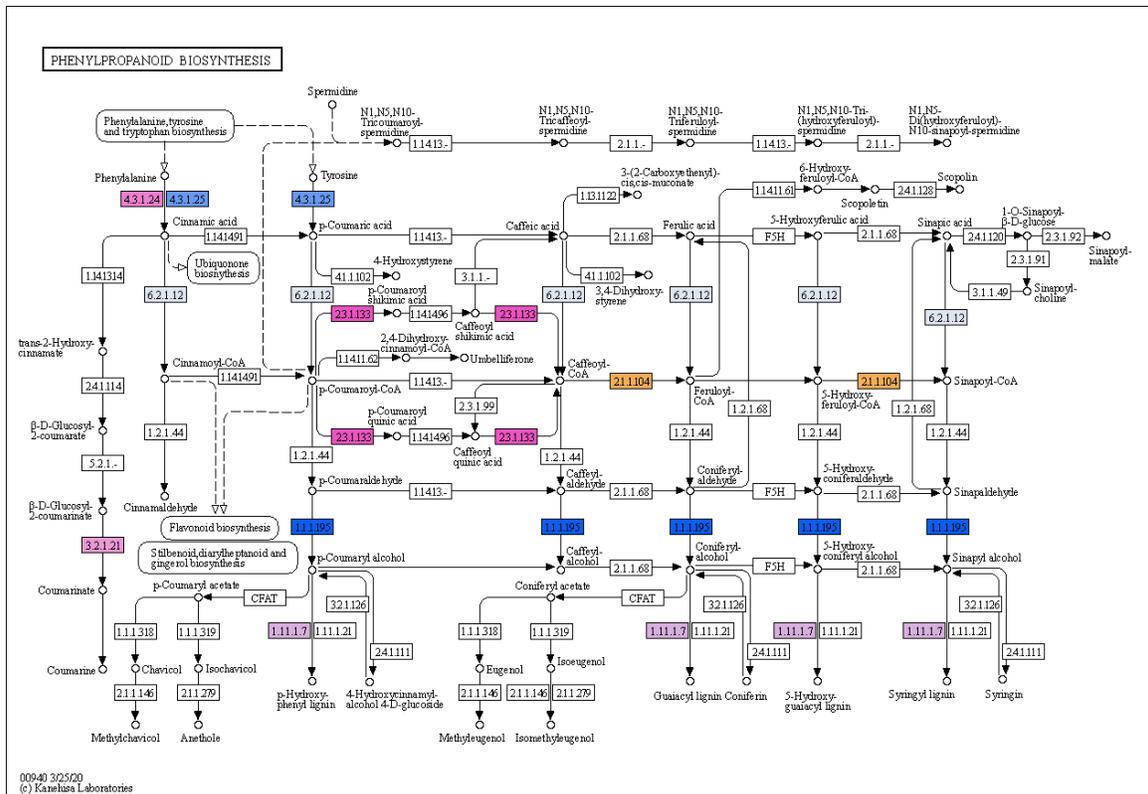


Figura 26. Representación de la ruta de biosíntesis de Fenilpropanoides obtenido mediante enriquecimiento de vías metabólicas de KEGG. Los recuadros en colores representan las enzimas de la ruta que se encuentran sobrexpresadas en el transcriptoma de *P. patens*.

También están sobrexpresados varios genes relacionados con la biogénesis y modificación de la pared celular, entre ellos los que codifican para las enzimas calosa sintasa (CALS), celulosa sintasa (CSLD), proteína relacionada con la síntesis de arabinogalactanos (PAGR) y β -manosil transferasa (BMT), entre otras (Figura 27). Las paredes celulares de *P. patens* están compuestas principalmente por celulosa, hemicelulosa (mananos principalmente), proteínas-arabinogalactano y en menor medida, pectina (homogalacturonano principalmente) (Berry et al. 2016), por lo que los genes que codifican para la síntesis de estos componente se activan para reforzar la pared celular en respuesta al ataque del patógeno. La calosa es un polímero de β -(1,3)-D-glucano, sintetizado por la enzima CALS, que

se acumula en las paredes celulares de las plantas en respuestas a diferentes tipos de estrés, incluyendo el ataque de patógenos (Wang et al. 2019). La deposición de calosa en las paredes celulares de *P. patens* ante la presencia de un patógeno ya ha sido reportada (Ponce de León and Montesano 2017). En respuesta a la penetración del patógeno en las células del musgo, este forma deposiciones locales en la pared celular llamadas papilas (Overdijk et al. 2016). Las papilas proporcionan barreras mecánicas y químicas para detener la penetración de patógenos o retrasar el proceso de infección (Chowdhury et al. 2018).

Otros genes que se encontraron diferencialmente expresados son los que codifican para la proteína birrefringente de tricoma (TBL), la enzima galactano β -1,4-galactosiltransferasa (GALS3) y pectinesterasa (PE). Las PEs son enzimas involucradas en la desesterificación de la pectina y se ha visto que pueden influir en la resistencia de plantas ante estrés biótico y abiótico (Marzin et al. 2016; Deslattes et al. 2018). La TBL es una proteína localizada en el complejo de Golgi y se encarga de acetilar polímeros de la pared celular. Esta proteína ha sido relacionada con la resistencia a la enfermedad del tizón del arroz en *Oryza sativa* (Gao et al. 2017). La GALS3 participa en la biosíntesis de β -1,4-galactano, abundantes polisacáridos en las paredes celulares de las plantas y se encuentran como cadena lateral del galacturonano, que es un componente principal de la pectina (Liwanag et al. 2012). Los altos niveles de expresión de las proteínas antes mencionadas demuestran que el reforzamiento de la pared celular es una de los mecanismos de defensa desplegados por *P. patens* ante el ataque de patógenos.

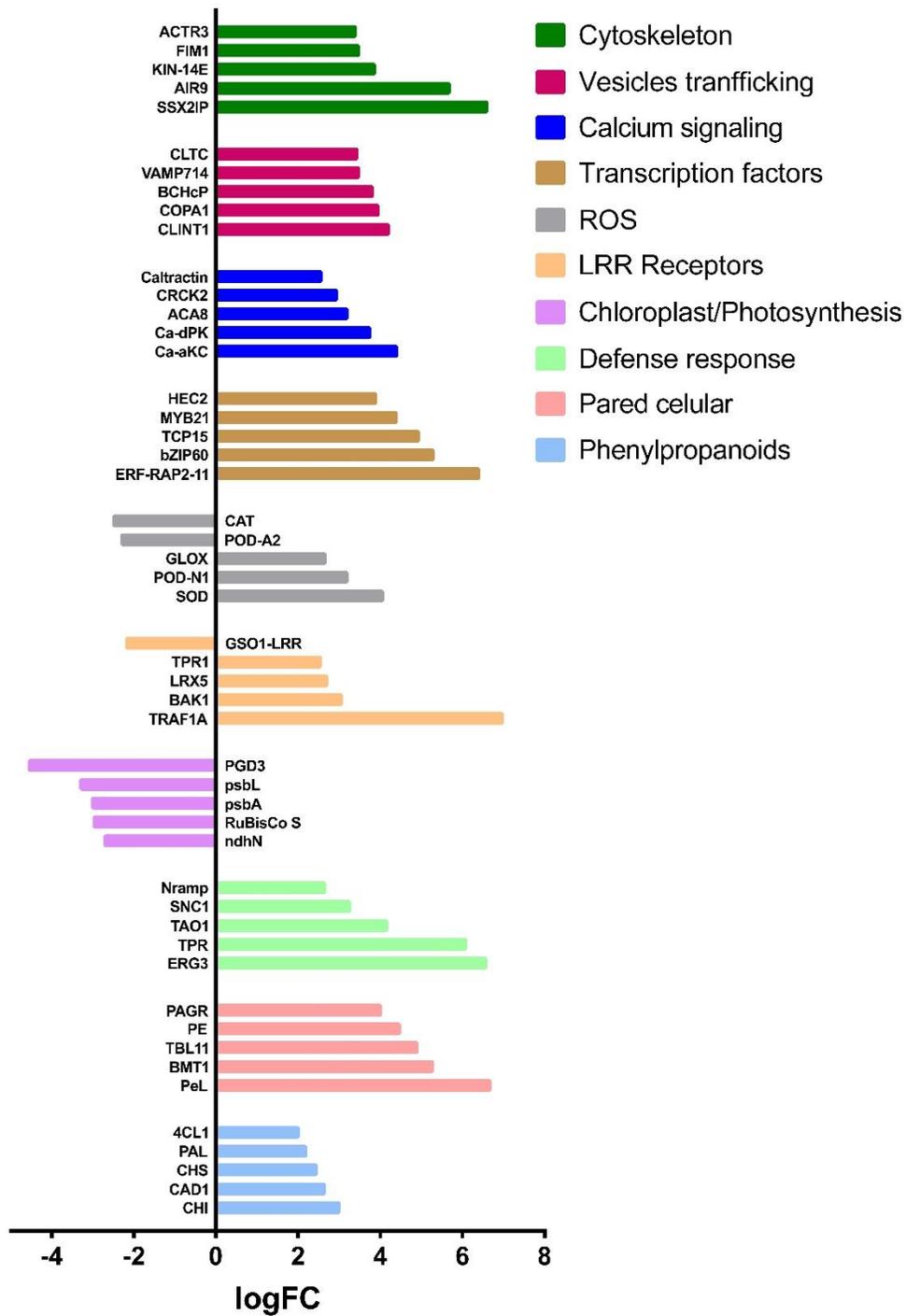


Figura 27. Selección de los cinco genes con mayor expresión diferencial debido al efecto de tratamiento, correspondientes a procesos celulares de interés.

9.11.2. Expresión de genes asociados a la respuesta de defensa

DIR1 es una proteína no específica de transferencia de lípidos que juega un papel central en la inducción de SAR (Carella et al. 2017), se requiere esta proteína para la generación y / o translocación de señales móviles de SAR (Maldonado et al. 2002). Tras la inducción de SAR, DIR1 se transporta a larga distancia desde el sitio de infección a zonas sanas de la planta donde inducen respuesta de defensa (Champigny et al. 2013). Otra de las proteínas altamente expresadas es la Proteína de respuesta a elicitores (ERG3), una proteína citosólica y soluble que presenta un dominio C2 de unión a Ca^{2+} usualmente dependiente de unión a fosfolípidos. Sin embargo se demostró que en el caso particular de ERG3, este dominio se une a Ca^{2+} independiente de fosfolípidos y pueden desempeñar diferentes funciones en la mediación de las respuestas a elicitores fúngicos y las señales de Ca^{2+} (Hamel et al. 2016).

Las proteínas TAO1 y SNC1 pertenecen a la familia de receptores del tipo TIR-NB-LRR (Receptor de Interleuquina 1 tipo Toll – Unión a Nucleótidos – Repeticiones Ricas en Leucina). Estas proteínas son reguladores esenciales de la respuesta de defensa dependiente de SA. La proteína TAO1 (*Target of AvrB Operation*) se ha reportado como el receptor de la proteína efectora AvrB de *Pseudomonas syringae*, y desencadena una respuesta de defensa efectiva contra este patógeno en *A. thaliana* (Eitas et al. 2008). Recientemente se reportó además la activación de la proteína TAO1 en varios tejidos de *A. thaliana* en respuesta al ET y sus precursores (Yang et al. 2015), por lo que esta proteína puede estar implicada en mecanismos de defensa dependientes de hormonas. Asimismo, se reportaron dos genes de *Sorghum bicolor* (*Cs1A* y *Ca1B*) relacionados con la resistencia al patógeno *Colletotrichum sublineolum*, agente causal de la antracnosis en el sorgo. Estos genes compartían similitud con la proteína TAO1 de *A. thaliana* (Biruma et al. 2012). La proteína SNC1 (*Suppressor of NPR1*,

Constitute 1) interactúa con el correpresor transcripcional TPR1 (por sus siglas en inglés *Topless Related 1*), lo que conduce a la reprogramación transcripcional de los genes de defensa. Es probable que el mecanismo de acción de estas proteínas sea la supresión de los reguladores negativos de la transcripción de los PR, en lugar de la activación directa de los reguladores positivos (Zhu et al. 2010), aunque no se encontraron estudios al respecto.

La señalización mediante SA es una de las principales respuestas de defensa en *P. patens* y en las plantas en general. El aumento de los niveles de SA en los tejidos expuestos a patógenos da como resultado la inducción de genes Relacionados con la Patogénesis (PR) (Verma and Agrawal 2017). Estos genes PR son un grupo diverso que codifica varias proteínas con actividad antimicrobiana y, por lo tanto, aumentan la resistencia a una amplia gama de patógenos (van Loon et al. 2006).

Uno de los elementos reguladores clave en la activación de los genes PR dependiente de SA, es la proteína *Non-expressor of PR gene 1* (NPR1). El SA regula la desoligomerización de NPR1 en sus formas monoméricas activas. Los monómeros de NPR1 se transportan al núcleo e interactúan con factores de transcripción bZIP (tipo TGA), que a su vez, facilitan la expresión de genes PR y la posterior respuesta de defensa (Verma et al. 2016). El mecanismo mediante el cual NPR1 induce la respuesta de defensa ha sido ampliamente descrito (Withers and Dong 2016; Chen et al. 2019; Zhang et al. 2020). Sin embargo en el transcriptoma de la interacción entre *P. patens* y *C. gloeosporioides* no encontramos evidencia de que este mecanismo se active. Al parecer la activación de los genes PR ocurre mediante una vía independiente de NPR1. La activación de los genes PR en *P. patens* ante la infección con *C. gloeosporioides* ocurre a través de la interacción entre SNC1 y TPR1. Aunque la existencia de una vía

independiente de NPR1 está establecida, su mecanismo de acción no se encuentra bien descrito en la literatura (Singh et al. 2018).

La proteína EDR2 (por sus siglas en inglés *Enhanced Disease Response*) se encuentra regulada negativamente. Esta proteína es un regulador negativo de la respuesta dependiente de SA (Vorwerk et al. 2007), por lo que al estar inhibida, promueve la respuesta de defensa que se desarrolla en este caso.

9.11.3. Receptores LRR

Las proteínas receptoras quinasas de las membranas vegetales con dominios de repeticiones ricas en leucina (LRR) forman la primera línea de defensa de las plantas y son reguladores clave del crecimiento y desarrollo de las plantas (Hamel et al. 2016). Al reconocer determinados ligandos activan las vías de señalización que conducen a la respuesta de defensa de la planta (Dubey and Singh 2018). En *P. patens* se encontraron varios genes pertenecientes a esta familia expresados diferencialmente, entre ellos se encuentra el gen que codifica para el factor asociado al receptor de TNF (TRAF1A). Esta proteína regula la respuesta inmune de la planta, mediando la renovación del dominio NB de la proteína SNC1 para evitar la hiper acumulación de esta proteína que de lo contrario podría causar fenotipos autoinmunes (Huang et al. 2016).

Se encontró también, entre los genes diferencialmente expresados, el que codifica para BAK1, una quinasa asociada a BIR1 (Receptor Insensible a Brasinoesteroides). BAK1 es una proteína de membrana con dominios LRR extracelular y quinasa intracelular. Esta proteína actúa como cofactor de otras proteínas de membrana que también presentan dominios LRR (Liebrand et al. 2014). En *S. lycopersicum* se ha reportado a BAK1 como correceptor indispensable para la activación de la respuesta inmune mediada por los receptores Ve y Cf, los cuales reconocen efectores provenientes de patógenos

(Fradin et al. 2009). Zhang et al. (2013) reportaron que, en *A. thaliana*, la función del receptor RPL30 se vio comprometida en plantas mutantes para el gen bak1.

Las extensinas (LRX5) son una clase importante de proteínas de la pared celular de las plantas. Estas podrían estar involucradas en el desarrollo de la planta como reguladores de la expansión de la pared celular, o como cadenas que conectan la pared celular con la membrana plasmática (Ringli 2010), sin embargo es probable que en este caso estén involucradas en la remodelación y reforzamiento de la pared celular del musgo. El receptor GOS1, que se encuentra regulado negativamente, está involucrado en el desarrollo de la planta (Okuda et al. 2020), es probable que, debido al estrés impuesto al musgo, las funciones normales de desarrollo y crecimiento se encuentren reguladas negativamente.

9.11.4. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Las ROS juegan un papel central en la señalización de la planta y la respuesta inmune, pues tienen un efecto antimicrobiano directo y, lo más importante, actúan como moléculas de señal local y sistémica (Waszczak et al. 2018). Las ROS incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (HO^\cdot), oxígeno singlete (1O_2) y anión superóxido (O_2^-), que se derivan de la reducción parcial de oxígeno (O_2). Estas pueden ser producidas extracelularmente mediante enzimas peroxidasas de membrana o de la pared celular (Liu and He 2017). En este trabajo encontramos reguladas positivamente varias secuencias codificadoras para la enzima aldehído oxidasa (GLOX). Esta enzima oxida aldehídos y produce H_2O_2 . La producción de ROS directamente en el medio extracelular tiene acción antimicrobiana y sirve de señalización a las células colindantes (Zhao et al. 2013). Asimismo se encontró regulada positivamente la peroxidasa N1, de localización extracelular también. Esta enzima se encarga de regular los niveles de H_2O_2 para evitar un daño por estrés oxidativo.

También se produce ROS dentro de múltiples orgánulos subcelulares, como cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias (Singh et al. 2016). Dado que las altas concentraciones de ROS altamente reactivas son tóxicas y pueden provocar estrés oxidativo, es necesario regular delicadamente el equilibrio entre la producción y la eliminación de ROS para mantener la homeostasis celular (Li et al. 2019). En este caso se encuentran sobreexpresadas también, secuencias que codifican para la enzima superóxido dismutasa, la cual oxida radicales superóxido con la consecuente producción de H_2O_2 . Generalmente, el proceso de detoxificación de las especies reactivas del oxígeno incluye la reacción de la enzima catalasa o alguna peroxidasa, que convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2 . Sin embargo, se encontró que durante la interacción entre *P. patens* y *C. gloeosporioides* la única catalasa que se encuentra diferencialmente expresada, así como la peroxidasa A2, están reguladas negativamente, lo que podría provocar que se acumule H_2O_2 en las células y se produzca un estrés oxidativo, lo que podría provocar una HR y culminar en muerte celular programada (Petrov et al. 2015).

En ocasiones la HR puede constituir una estrategia de defensa, puesto que permite confinar al agente causante de estrés, de hecho es una estrategia exitosa contra patógenos biótrosos (Choi and Hwang 2015). Sin embargo, cuando la planta se enfrenta a un patógeno necrótrofo o hemibiótrosos, como *C. gloeosporioides* en este caso, la HR solo contribuye a que el patógeno se disemine más rápido.

9.11.5. Otros genes expresados diferencialmente

Son muchísimos los genes involucrados directa o indirectamente en la reprogramación celular para desarrollar una respuesta de defensa. Para garantizar funciones como el reforzamiento de la pared celular es necesario el

transporte de moléculas desde el sitio de producción en la célula hasta la superficie celular. En muchos casos este movimiento ocurre mediante el transporte de vesículas (Lehman et al. 2017). En el transcriptoma de *P. patens* se encontraron sobrepresadas varias secuencias codificadoras para proteínas involucradas en el tráfico vesicular. Asimismo se encontraron varios genes diferencialmente expresados relacionados con la dinámica del citoesqueleto, que es fundamental para el movimiento vesicular (Moujaber and Stochaj 2019).

Las vías de señalización celular son de vital importancia en este proceso, entre ellas la señalización mediante Ca^{2+} juega un papel fundamental en las respuestas inmunes de las plantas (Yuan et al. 2018). Se han caracterizado varios sensores de calcio para transmitir y/o decodificar señales de Ca^{2+} inducidas por patógenos (Zhang et al. 2014; Yuan et al. 2017; Liu et al. 2017). Entre los genes diferencialmente expresados en *P. patens* durante la interacción con *C. gloeosporioides* hay 9 relacionados con la señalización mediante Ca^{2+} . La proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} , por ejemplo, se encuentra sobrepresada y está reportado que esta proteína está involucrada en la resistencia mediada por SA, la expresión diferencial de genes de defensa y la síntesis de ROS (Dubiella et al. 2013).

Los factores de transcripción juegan un papel importante en la regulación inducible de una variedad de genes implicados en las respuestas inflamatorias y proliferativas de las células. La expresión de estos genes está controlada por factores de transcripción, que regulan las redes transcripcionales para activar o reprimir la expresión génica en respuesta a estímulos internos y externos (Pu et al. 2020). En este caso podemos encontrar activados varios factores de transcripción pertenecientes a la familia de Factores de Transcripción en Respuesta a ET (ERF). El ET es una fitohormona que está involucrada tanto en el crecimiento y desarrollo de la planta, así como en la respuesta de defensa

(Dubois et al. 2018; Zheng et al. 2019). En *P. patens* se activa, por ejemplo, el ERF-RAP2-11, el cual se une al elemento promotor relacionado con la patogénesis *GCC-box*. El factor de transcripción MYB21 se encuentra activado en *P. patens*, este factor de transcripción regula positivamente la expresión del gen que codifica para la enzima PAL (Shin et al. 2002). También se encontraron varios factores de transcripción con motivos de dedos de Zinc, los cuales están relacionados con varios procesos celulares, incluyendo la respuesta de defensa (Wu et al. 2016).

Sorprendentemente, no se encontraron secuencias diferencialmente expresadas correspondientes a los factores de transcripción tipo WRKY. Estos factores de transcripción pertenecen a una de las mayores familias de reguladores transcripcionales en plantas, y son reguladores clave de la inmunidad en plantas (Eulgem and Somssich 2007). La regulación positiva de factores de transcripción tipo WRKY ha sido reportada en *S. lycopersicum* y *Fragaria x ananassa* frente a *C. gloeosporioides* y *C. fructicola* respectivamente (Alkan et al. 2015; Zhang et al. 2018). El hecho de que estos factores de transcripción no estén activados en *P. patens* podría ser uno de los motivos por los que el musgo es incapaz de sobrevivir a la infección del patógeno en las condiciones experimentales.

Otro detalle notorio es la fuerte regulación negativa que presentan varios genes relacionados con los cloroplastos y la fotosíntesis. Entre los genes regulados negativamente están los que codifican para la enzima Ribulosa Bifosfato Carboxilasa (RuBisCO) y otras enzimas involucradas con la fijación de carbono (Figura 27). Esta es la principal enzima del Ciclo de Calvin, mediante el cual se fija el CO₂ empleando la energía química obtenida en los fotosistemas I y II (Perdomo et al. 2017). También están regulados los genes codificadores de proteínas del PSII, apoproteínas de PSI y varias proteínas estructurales de los cloroplastos. Los cloroplastos son una fuente importante de ROS y SA durante la

comparación, y de ellos 37 genes están regulados positivamente y 75 negativamente. Aun cuando estos genes se observan exclusivamente como consecuencia de la duración de la infección, los procesos que involucran son en gran medida los mismos que se ven debido al efecto del tratamiento. Se encuentran regulados negativamente varios genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, están activados varios factores de transcripción y genes implicados en el tráfico vesicular. Lo más relevante entre los genes que se encuentran sobrepresados en este caso, es la activación de genes que codifican para las proteínas componente paraspeckle 1-like, proteína con repeticiones WD (LWD1) y proteína represora de catabolito de carbono. Estas proteínas están involucradas en la regulación del ciclo circadiano en la planta.

CONCLUSIONES

1. Durante la interacción con *C. gloeosporioides*, *P. patens* muestra síntomas de enfermedad que coinciden con algunas de las respuestas a patógenos que se observan en plantas vasculares.
2. La infección con *C. gloeosporioides* afecta el rendimiento cuántico de la fotosíntesis en *P. patens*, señal indirecta de estrés en el musgo. Además, la infección provoca el aumento de la temperatura en las colonias del musgo.
3. El tratamiento previo a la infección con hormonas involucradas en la respuesta de defensa de las plantas vasculares, mejora la respuesta de defensa de *P. patens* ante el ataque de patógenos.
4. Como consecuencia de la interacción con *C. gloeosporioides*, en *P. patens* se activan genes y procesos relacionados con la defensa similares a los que se activan en plantas vasculares, aunque se pueden apreciar diferencias como la ausencia de la proteína NPR1, elemento regulador de la respuesta de defensa en plantas. Por otra parte, tampoco se encuentran diferencialmente expresados los factores de transcripción WRKY, los cuales están relacionados estrechamente con la respuesta de defensa en plantas y han sido reportados en las respuestas de defensa de otras plantas contra *C. gloeosporioides*.

PERSPECTIVAS

Analizar el transcriptoma de *C. gloeosporioides* durante la interacción con *P. patens* para conocer lo que sucede desde ambos lados de la interacción.

Analizar los perfiles de expresión de algunas de las vías metabólicas y procesos celulares identificados como esenciales en la interacción entre el *P. patens* y *C. gloeosporioides*.

REFERENCIAS

- Ahmed, T., V. Goel, and B. Banerjee. 2018. Propoxur-induced oxidative DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells: protective effects of curcumin and α -tocopherol. *Drug and chemical toxicology* 41 (2):128-134.
- Ainsworth, G. 1973. Introduction and keys to higher taxa. *The fungi, vol. IV A*:1-7.
- Ajigboye, O. O., L. Bousquet, E. H. Murchie, and R. V. Ray. 2016. Chlorophyll fluorescence parameters allow the rapid detection and differentiation of plant responses in three different wheat pathosystems. *Functional plant biology* 43 (4):356-369.
- Alkan, N., G. Friedlander, D. Ment, D. Prusky, and R. Fluhr. 2015. Simultaneous transcriptome analysis of *C olletotrichum gloeosporioides* and tomato fruit pathosystem reveals novel fungal pathogenicity and fruit defense strategies. *New Phytologist* 205 (2):801-815.
- Altman, J. 2018. *Pesticide interactions in crop production: Beneficial and deleterious effects*: CRC Press.
- Alvarez, A., M. Montesano, E. Schmelz, and I. Ponce de León. 2016. Activation of shikimate, phenylpropanoid, oxylipins, and auxin pathways in *Pectobacterium carotovorum* elicitors-treated moss. *Frontiers in Plant Science* 7:328.
- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data: Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Axtell, M. J., C. Jan, R. Rajagopalan, and D. P. Bartel. 2006. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell* 127 (3):565-577.
- Axtell, M. J., J. A. Snyder, and D. P. Bartel. 2007. Common functions for diverse small RNAs of land plants. *The Plant Cell* 19 (6):1750-1769.
- Bashir, K., A. Matsui, S. Rasheed, and M. Seki. 2019. Recent advances in the characterization of plant transcriptomes in response to drought, salinity, heat, and cold stress. *F1000Research* 8.
- Beike, A. K., D. Lang, A. D. Zimmer, F. Wüst, D. Trautmann, G. Wiedemann, P. Beyer, E. L. Decker, and R. Reski. 2015. Insights from the cold transcriptome of *Physcomitrella patens*: global specialization pattern of conserved transcriptional regulators and identification of orphan genes involved in cold acclimation. *New Phytologist* 205 (2):869-881.
- Berens, M. L., H. M. Berry, A. Mine, C. T. Argueso, and K. Tsuda. 2017. Evolution of hormone signaling networks in plant defense. *Annual review of phytopathology* 55:401-425.
- Berry, E. A., M. L. Tran, C. S. Dimos, M. J. Budziszek Jr, T. R. Scavuzzo-Duggan, and A. W. Roberts. 2016. Immuno and affinity cytochemical analysis of cell wall composition in the moss *Physcomitrella patens*. *Frontiers in Plant Science* 7:248.
- Bezanilla, M., P. F. Perroud, A. Pan, P. Klueh, and R. S. Quatrano. 2005. An RNAi system in *Physcomitrella patens* with an internal marker for silencing allows for rapid identification of loss of function phenotypes. *Plant Biology* 7 (3):251-257.

- Biruma, M., T. Martin, I. Fridborg, P. Okori, and C. Dixelius. 2012. Two loci in sorghum with NB-LRR encoding genes confer resistance to *Colletotrichum sublineolum*. *Theoretical and applied genetics* 124 (6):1005-1015.
- Bolger, A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15):2114-2120.
- Boller, T., and G. Felix. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology* 60:379-406.
- Bolton, M. D. 2009. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular plant-microbe interactions* 22 (5):487-497.
- Bost, J., N. Smith, and J. Crane. 2013. History, distribution and uses. *The avocado: botany, production and uses*. CABI Publ., Wallingford, UK:10-30.
- Boudsocq, M., M. R. Willmann, M. McCormack, H. Lee, L. Shan, P. He, J. Bush, S.-H. Cheng, and J. Sheen. 2010. Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* 464 (7287):418.
- Boureima, S., A. Oukarroum, M. Diouf, N. Cisse, and P. Van Damme. 2012. Screening for drought tolerance in mutant germplasm of sesame (*Sesamum indicum*) probing by chlorophyll a fluorescence. *Environmental and Experimental Botany* 81:37-43.
- Bressendorff, S., R. Azevedo, C. S. Kenchappa, I. P. de León, J. V. Olsen, M. W. Rasmussen, G. Erbs, M.-A. Newman, M. Petersen, and J. Mundy. 2016. An innate immunity pathway in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell:tpc*. 00774.02015.
- Brestic, M., and M. Zivcak. 2013. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In *Molecular stress physiology of plants*: Springer, 87-131.
- Bullard, J. H., E. Purdom, K. D. Hansen, and S. Dudoit. 2010. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC bioinformatics* 11 (1):94.
- Burketova, L., L. Trda, P. G. Ott, and O. Valentova. 2015. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology advances* 33 (6):994-1004.
- Cacciola, S., R. Faedda, F. Sinatra, G. Agosteo, L. Schena, S. Frisullo, and G. M. di San Lio. 2012. Olive anthracnose. *Journal of Plant Pathology* 94 (1):29-44.
- Caplan, J. L., A. S. Kumar, E. Park, M. S. Padmanabhan, K. Hoban, S. Modla, K. Czymmek, and S. P. Dinesh-Kumar. 2015. Chloroplast stromules function during innate immunity. *Developmental cell* 34 (1):45-57.
- Carella, P., C. J. Kempthorne, D. C. Wilson, M. Isaacs, and R. K. Cameron. 2017. Exploring the role of DIR1, DIR1-like and other lipid transfer proteins during systemic immunity in *Arabidopsis*. *Physiological and molecular plant pathology* 97:49-57.
- Carels, N. 2015. A history of genomic structures: the big picture. In *Plant Biology and Biotechnology*: Springer, 131-178.
- Carrasco Carrasco, S. 2015. Técnicas de análisis de expresión diferencial basada en coteos para el estudio de datos de Ran-Seq usando R y bioconductor.

- Carvalho, F. P. 2017. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6 (2):48-60.
- Carvalho, M., P. Simões-Lopes, and M. Monteiro da Silva. 2004. Influence of different olive infection rates of *Colletotrichum acutatum* on some important olive oil chemical parameters. Paper read at V International Symposium on Olive Growing 791.
- Chakraborty, N., K. Mukherjee, A. Sarkar, and K. Acharya. 2019. Interaction between Bean and *Colletotrichum gloeosporioides*: Understanding Through a Biochemical Approach. *Plants* 8 (9):345.
- Champigny, M. J., M. Isaacs, P. Carella, J. Faubert, P. R. Fobert, and R. K. Cameron. 2013. Long distance movement of DIR1 and investigation of the role of DIR1-like during systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 4:230.
- Chang, C.-Y., W.-D. Lin, and S.-L. Tu. 2014. Genome-wide analysis of heat-sensitive alternative splicing in *Physcomitrella patens*. *Plant physiology*:pp. 113.230540.
- Chen, J., R. Mohan, Y. Zhang, M. Li, H. Chen, I. A. Palmer, M. Chang, G. Qi, S. H. Spoel, and T. Mengiste. 2019. NPR1 promotes its own and target gene expression in plant defense by recruiting CDK8. *Plant physiology* 181 (1):289-304.
- Chen, Y.-R., Y.-s. Su, and S.-L. Tu. 2012. Distinct phytochrome actions in nonvascular plants revealed by targeted inactivation of phytyl biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (21):8310-8315.
- Cheon, W., Y. S. Kim, K. Balaraju, B.-S. Kim, B.-H. Lee, and Y. Jeon. 2016. Postharvest disease control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium expansum* on stored apples by gamma irradiation combined with fumigation. *The plant pathology journal* 32 (5):460.
- Choi, H. W., and B. K. Hwang. 2015. Molecular and cellular control of cell death and defense signaling in pepper. *Planta* 241 (1):1-27.
- Chowdhury, J., B. R. Coad, and A. Little. 2018. Cell Wall Responses to Biotrophic Fungal Pathogen Invasion. *Annual Plant Reviews online* 2 (4):1001-1030.
- Conesa, A., P. Madrigal, S. Tarazona, D. Gomez-Cabrero, A. Cervera, A. McPherson, M. W. Szczesniak, D. J. Gaffney, L. L. Elo, and X. Zhang. 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology* 17 (1):13.
- Conrath, U. 2011. Molecular aspects of defence priming. *Trends in plant science* 16 (10):524-531.
- Copley, T. R., K. A. Aliferis, D. J. Kliebenstein, and S. H. Jabaji. 2017. An integrated RNAseq-1 H NMR metabolomics approach to understand soybean primary metabolism regulation in response to *Rhizoctonia foliar* blight disease. *BMC Plant Biology* 17 (1):84.
- Coruh, C., S. H. Cho, S. Shahid, Q. Liu, A. Wierzbicki, and M. J. Axtell. 2015. Comprehensive annotation of *Physcomitrella patens* small RNA loci reveals that the heterochromatic short interfering RNA pathway is largely conserved in land plants. *The Plant Cell*:tpc. 15.00228.
- Cove, D. 2005. The moss *Physcomitrella patens*. *Annu. Rev. Genet.* 39:339-358.
- Cove, D. J., P.-F. Perroud, A. J. Charron, S. F. McDaniel, A. Khandelwal, and R. S. Quatrano. 2009. The moss *Physcomitrella patens*: a novel model system for plant development and genomic studies. *Cold Spring Harbor Protocols* 2009 (2):pdb. emo115.

- Covington, M. F., J. N. Maloof, M. Straume, S. A. Kay, and S. L. Harmer. 2008. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome biology* 9 (8):R130.
- Daines, B., H. Wang, L. Wang, Y. Li, Y. Han, D. Emmert, W. Gelbart, X. Wang, W. Li, and R. Gibbs. 2011. The *Drosophila melanogaster* transcriptome by paired-end RNA sequencing. *Genome research* 21 (2):315-324.
- Damm, A., J. Elbers, A. Erler, B. Gioli, K. Hamdi, R. Hutjes, M. Kosvancova, M. Meroni, F. Miglietta, and A. Moersch. 2010. Remote sensing of sun-induced fluorescence to improve modeling of diurnal courses of gross primary production (GPP). *Global Change Biology* 16 (1):171-186.
- Dann, E., R. Ploetz, L. Coates, and K. Pegg. 2013. 13 Foliar, Fruit and Soilborne Diseases. *The avocado: botany, production and uses*:380.
- Davin, L. B., and N. G. Lewis. 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant physiology* 123 (2):453-462.
- Dean, R., J. A. Van Kan, Z. A. Pretorius, K. E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P. D. Spanu, J. J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, and J. Ellis. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 13 (4):414-430.
- Deboever, E., M. Genva, M. Deleu, L. Lins, and M.-L. Fauconnier. 2018. Oxylipins are involved in plant protection processes and are potential biocontrol agents.
- Demko, V., P.-F. Perroud, W. Johansen, C. F. Delwiche, E. D. Cooper, P. Remme, A. E. Ako, K. G. Kugler, K. F. Mayer, and R. Quatrano. 2014. Genetic analysis of DEK1 loop function in three-dimensional body patterning in *Physcomitrella patens*. *Plant physiology*:pp. 114.243758.
- Deslattes, A., M. H. A. Van Hulten, S. A. Dixit, D. Martin, J. D. Munkvold, and M. V. Dileo. 2018. Drought resistance in plants: pectinesterase: Google Patents.
- Dias, C. S., L. Araujo, J. A. A. Chaves, F. M. DaMatta, and F. A. Rodrigues. 2018. Water relation, leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence imaging of soybean leaves infected with *Colletotrichum truncatum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 127:119-128.
- Duarte, B., S. Pedro, J. C. Marques, H. Adão, and I. Caçador. 2017. *Zostera noltii* development probing using chlorophyll a transient analysis (JIP-test) under field conditions: Integrating physiological insights into a photochemical stress index. *Ecological Indicators* 76:219-229.
- Dubey, N., and K. Singh. 2018. Role of NBS-LRR proteins in plant defense. In *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*: Springer, 115-138.
- Dubiella, U., H. Seybold, G. Durian, E. Komander, R. Lassig, C.-P. Witte, W. X. Schulze, and T. Romeis. 2013. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (21):8744-8749.
- Dubois, M., L. Van den Broeck, and D. Inzé. 2018. The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends in plant science* 23 (4):311-323.

- Edelstein, M., K. J. Bradford, and D. W. Burger. 2001. Metabolic heat and CO₂ production rates during germination of melon (*Cucumis melo* L.) seeds measured by microcalorimetry. *Seed Science Research* 11 (3):265-272.
- Eitas, T. K., Z. L. Nimchuk, and J. L. Dangl. 2008. Arabidopsis TAO1 is a TIR-NB-LRR protein that contributes to disease resistance induced by the *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (17):6475-6480.
- Espiñeira, J., E. N. Uzal, L. G. Ros, J. Carrión, F. Merino, A. R. Barceló, and F. Pomar. 2011. Distribution of lignin monomers and the evolution of lignification among lower plants. *Plant Biology* 13 (1):59-68.
- Eulgem, T., and I. E. Somssich. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current opinion in plant biology* 10 (4):366-371.
- Farr, D., and A. Rossman. *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. 2013 [cited. Available from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>].
- Fiorani, F., U. Rascher, S. Jahnke, and U. Schurr. 2012. Imaging plants dynamics in heterogenic environments. *Current opinion in biotechnology* 23 (2):227-235.
- Fox, H., A. Doron-Faigenboim, G. Kelly, R. Bourstein, Z. Attia, J. Zhou, Y. Moshe, M. Moshelion, and R. David-Schwartz. 2018. Transcriptome analysis of *Pinus halepensis* under drought stress and during recovery. *Tree physiology* 38 (3):423-441.
- Fradin, E. F., Z. Zhang, J. C. J. Ayala, C. D. Castroverde, R. N. Nazar, J. Robb, C.-M. Liu, and B. P. Thomma. 2009. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato Ve1. *Plant physiology* 150 (1):320-332.
- Francini, A., A. Giro, and A. Ferrante. 2019. Biochemical and Molecular Regulation of Phenylpropanoids Pathway Under Abiotic Stresses. In *Plant Signaling Molecules*: Elsevier, 183-192.
- Frank, W., D. Ratnadewi, and R. Reski. 2005. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta* 220 (3):384-394.
- Fukase, E., and W. Martin. 2017. Economic growth, convergence, and world food demand and supply: The World Bank.
- Gaidatzis, D., L. Burger, M. Florescu, and M. B. Stadler. 2015. Analysis of intronic and exonic reads in RNA-seq data characterizes transcriptional and post-transcriptional regulation. *Nature biotechnology* 33 (7):722.
- Gan, P., K. Ikeda, H. Irieda, M. Narusaka, R. J. O'Connell, Y. Narusaka, Y. Takano, Y. Kubo, and K. Shirasu. 2013. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *New Phytologist* 197 (4):1236-1249.
- Gan, Q., I. Chepelev, G. Wei, L. Tarayrah, K. Cui, K. Zhao, and X. Chen. 2010. Dynamic regulation of alternative splicing and chromatin structure in *Drosophila* gonads revealed by RNA-seq. *Cell research* 20 (7):763.
- Gao, Q.-m., A. Kachroo, and P. Kachroo. 2014. Chemical inducers of systemic immunity in plants. *Journal of experimental botany* 65 (7):1849-1855.

- Gao, Y., C. He, D. Zhang, X. Liu, Z. Xu, Y. Tian, X.-H. Liu, S. Zang, M. Pauly, and Y. Zhou. 2017. Two trichome birefringence-like proteins mediate xylan acetylation, which is essential for leaf blight resistance in rice. *Plant physiology* 173 (1):470-481.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205-227.
- Glime, J. 2013. Meet the Bryophytes. . In *Bryophyte Ecology*, 1 –10
- González-Esquiva, J., J. Hernández-Hernández, G. García-Mateos, A. Ruiz-Canales, and J. Molina-Martínez. 2016. Estudio y comparación de técnicas de segmentación por color para la estimación de la fracción de cobertura vegetal. Paper read at II Simposio Nacional de Ingeniería Hortícola, Almería.
- Gozzo, F., and F. Faoro. 2013. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. *Journal of agricultural and food chemistry* 61 (51):12473-12491.
- Greenberg, J. T., and N. Yao. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Cellular microbiology* 6 (3):201-211.
- Hamel, L.-P., K.-T. Sekine, T. Wallon, Y. Sugiwaka, K. Kobayashi, and P. Moffett. 2016. The chloroplastic protein THF1 interacts with the coiled-coil domain of the disease resistance protein N' and regulates light-dependent cell death. *Plant physiology* 171 (1):658-674.
- Harries, P. A., A. Pan, and R. S. Quatrano. 2005. Actin-related protein2/3 complex component ARPC1 is required for proper cell morphogenesis and polarized cell growth in *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* 17 (8):2327-2339.
- Harrison, C. J. 2017. Development and genetics in the evolution of land plant body plans. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372 (1713):20150490.
- Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk, and R. Lücking. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research* 111 (5):509-547.
- Hong, K., D. Gong, L. Zhang, H. Hu, Z. Jia, H. Gu, and K. Song. 2016. Transcriptome characterization and expression profiles of the related defense genes in postharvest mango fruit against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Gene* 576 (1):275-283.
- Huang, S., X. Chen, X. Zhong, M. Li, K. Ao, J. Huang, and X. Li. 2016. Plant TRAF proteins regulate NLR immune receptor turnover. *Cell host & microbe* 19 (2):204-215.
- Ivanov, D. A., and M. A. Bernards. 2016. Chlorophyll fluorescence imaging as a tool to monitor the progress of a root pathogen in a perennial plant. *Planta* 243 (1):263-279.
- Jithesh, M., P. S. Shukla, P. Kant, J. Joshi, A. T. Critchley, and B. Prithiviraj. 2019. Physiological and transcriptomics analyses reveal that *Ascophyllum nodosum* extracts induce salinity tolerance in *Arabidopsis* by regulating the expression of stress responsive genes. *Journal of Plant Growth Regulation* 38 (2):463-478.
- Jung, S. C., A. Martinez-Medina, J. A. Lopez-Raez, and M. J. Pozo. 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of chemical ecology* 38 (6):651-664.
- Kaewsuan, S., E. B. Cahoon, P.-F. Perroud, C. Wiwat, N. Panvisavas, R. S. Quatrano, D. J. Cove, and N. Bunyaphatsara. 2006. Identification and functional characterization of the

- moss *Physcomitrella patens* Δ 5-desaturase gene involved in arachidonic and eicosapentaenoic acids biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*.
- Kamisugi, Y., J. W. Whitaker, and A. C. Cuming. 2016. The transcriptional response to DNA-double-strand breaks in *Physcomitrella patens*. *PLoS one* 11 (8):e0161204.
- Khandelwal, A., D. Chandu, C. M. Roe, R. Kopan, and R. S. Quatrano. 2007. Moonlighting activity of presenilin in plants is independent of γ -secretase and evolutionarily conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (33):13337-13342.
- Kranner, I., G. Kastberger, M. Hartbauer, and H. W. Pritchard. 2010. Noninvasive diagnosis of seed viability using infrared thermography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (8):3912-3917.
- Kumar, P., A. K. Misra, and D. R. Modi. 2011. Current status of mango malformation in India. *Asian Journal of Plant Sciences* 10 (1):1.
- Kumari, A., G. M. Preston, and K. J. Gupta. 2017. Measurement of Oxygen Status in Arabidopsis Leaves Undergoing the Hypersensitive Response During *Pseudomonas* Infection. In *Plant Respiration and Internal Oxygen*: Springer, 71-76.
- Lang, D., K. K. Ullrich, F. Murat, J. Fuchs, J. Jenkins, F. B. Haas, M. Piednoel, H. Gundlach, M. Van Bel, and R. Meyberg. 2018. The *Physcomitrella patens* chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. *The Plant Journal* 93 (3):515-533.
- Lavy, M., M. J. Prigge, S. Tao, S. Shain, A. Kuo, K. Kirchsteiger, and M. Estelle. 2016. Constitutive auxin response in *Physcomitrella* reveals complex interactions between Aux/IAA and ARF proteins. *Elife* 5:e13325.
- Lawton, M., and H. Saidasan. 2009. Pathogenesis in mosses. *Annu. Plant Rev* 36:298-339.
- Leal-Delgado, R., C. B. Peña-Valdivia, R. García-Nava, A. García-Esteva, E. Martínez-Barajas, and D. Padilla-Chacón. 2019. Phenotypical, physiological and biochemical traits of the vegetative growth of wild tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) under restricted water conditions. *South African Journal of Plant and Soil*:1-10.
- Lehman, T. A., A. Smertenko, and K. A. Sanguinet. 2017. Auxin, microtubules, and vesicle trafficking: conspirators behind the cell wall. *Journal of experimental botany* 68 (13):3321-3329.
- Li, Q., G. Ai, D. Shen, F. Zou, J. Wang, T. Bai, Y. Chen, S. Li, M. Zhang, and M. Jing. 2019. A phytophthora capsici effector targets ACD11 binding partners that regulate ROS-mediated defense response in arabidopsis. *Molecular plant* 12 (4):565-581.
- Li, X., G. N. Brock, E. C. Rouchka, N. G. Cooper, D. Wu, T. E. O'Toole, R. S. Gill, A. M. Eteleeb, L. O'Brien, and S. N. Rai. 2017. A comparison of per sample global scaling and per gene normalization methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *PLoS one* 12 (5).
- Liao, Y., G. K. Smyth, and W. Shi. 2019. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic acids research* 47 (8):e47-e47.
- Liebrand, T. W., H. A. van den Burg, and M. H. Joosten. 2014. Two for all: receptor-associated kinases SOBIR1 and BAK1. *Trends in plant science* 19 (2):123-132.

- Lima, W. G., M. B. Spósito, L. Amorim, F. P. Gonçalves, and P. A. M. de Filho. 2011. Colletotrichum gloeosporioides, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *European Journal of Plant Pathology* 131 (1):157.
- Liu, N., K. Hake, W. Wang, T. Zhao, T. Romeis, and D. Tang. 2017. CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE5 associates with the truncated NLR protein TIR-NBS2 to contribute to exo70B1-mediated immunity. *The Plant Cell* 29 (4):746-759.
- Liu, Y., and C. He. 2017. A review of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plants. *Redox biology* 11:192-204.
- Liwanag, A. J. M., B. Ebert, Y. Verhertbruggen, E. A. Rennie, C. Rautengarten, A. Oikawa, M. C. Andersen, M. H. Clausen, and H. V. Scheller. 2012. Pectin biosynthesis: GAL51 in Arabidopsis thaliana is a β -1, 4-galactan β -1, 4-galactosyltransferase. *The Plant Cell* 24 (12):5024-5036.
- Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15 (12):550.
- Lu, J., Z.-X. Du, J. Kong, L.-N. Chen, Y.-H. Qiu, G.-F. Li, X.-H. Meng, and S.-F. Zhu. 2012. Transcriptome analysis of Nicotiana tabacum infected by Cucumber mosaic virus during systemic symptom development. *PloS one* 7 (8).
- Luo, J., W. Xia, P. Cao, Z. a. Xiao, Y. Zhang, M. Liu, C. Zhan, and N. Wang. 2019. Integrated transcriptome analysis reveals plant hormones jasmonic acid and salicylic acid coordinate growth and defense responses upon fungal infection in poplar. *Biomolecules* 9 (1):12.
- Maher, C. A., C. Kumar-Sinha, X. Cao, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Jing, L. Sam, T. Barrette, N. Palanisamy, and A. M. Chinnaiyan. 2009. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature* 458 (7234):97.
- Maizel, A., M. A. Busch, T. Tanahashi, J. Perkovic, M. Kato, M. Hasebe, and D. Weigel. 2005. The floral regulator LEAFY evolves by substitutions in the DNA binding domain. *Science* 308 (5719):260-263.
- Maldonado, A. M., P. Doerner, R. A. Dixon, C. J. Lamb, and R. K. Cameron. 2002. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature* 419 (6905):399-403.
- Marella, H. H., Y. Sakata, and R. S. Quatrano. 2006. Characterization and functional analysis of ABSCISIC ACID INSENSITIVE3-like genes from Physcomitrella patens. *The Plant Journal* 46 (6):1032-1044.
- Marzin, S., A. Hanemann, S. Sharma, G. Hensel, J. Kumlehn, G. Schweizer, and M. S. Röder. 2016. Are PECTIN ESTERASE INHIBITOR genes involved in mediating resistance to Rhynchosporium commune in barley? *PloS one* 11 (3).
- Mauch-Mani, B., I. Baccelli, E. Luna, and V. Flors. 2017. Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annual review of plant biology* 68:485-512.
- Menand, B., K. Yi, S. Jouannic, L. Hoffmann, E. Ryan, P. Linstead, D. G. Schaefer, and L. Dolan. 2007. An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science* 316 (5830):1477-1480.

- Mi, H., A. Muruganujan, D. Ebert, X. Huang, and P. D. Thomas. 2019. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic acids research* 47 (D1):D419-D426.
- Moral, J., and A. Trapero. 2012. Mummified fruit as a source of inoculum and disease dynamics of olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *Phytopathology* 102 (10):982-989.
- Moral, J., J. C. Xavier, L. F. Roca, W. Moreda, and A. Trapero. 2014. La Antracnosis del olivo y su efecto en la calidad del aceite.
- Morel, J.-B., and J. L. Dangl. 1997. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell death and differentiation* 4 (8):671.
- Moreno, S. G., H. P. Vela, and M. O. S. Alvarez. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica* 27 (4):119-129.
- Mortazavi, A., B. A. Williams, K. McCue, L. Schaeffer, and B. Wold. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods* 5 (7):621.
- Moujaber, O., and U. Stochaj. 2019. The Cytoskeleton as Regulator of Cell Signaling Pathways. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Mourik, J., and A. Bakri. 1991. Application of microcalorimetry to plant technology: germination and initial growth. *Thermometric Application Note* 22017.
- Muro-Villanueva, F., X. Mao, and C. Chapple. 2019. Linking phenylpropanoid metabolism, lignin deposition, and plant growth inhibition. *Current opinion in biotechnology* 56:202-208.
- Nagalakshmi, U., Z. Wang, K. Waern, C. Shou, D. Raha, M. Gerstein, and M. Snyder. 2008. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* 320 (5881):1344-1349.
- Nieto-López, E. H., S. Everhart, V. Ayala-Escobar, M. Camacho-Tapia, N. B. Lima, R. Nieto-Angel, and J. M. Tovar-Pedraza. 2018. First Report of *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Anthracnose of Tejocote (*Crataegus gracilior*) Fruits in Mexico. *Plant Disease* (ja).
- O'Connell, R., C. Herbert, S. Sreenivasaprasad, M. Khatib, M.-T. Esquerré-Tugayé, and B. Dumas. 2004. A novel *Arabidopsis-Colletotrichum* pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions. *Molecular plant-microbe interactions* 17 (3):272-282.
- Okuda, S., S. Fujita, A. Moretti, U. Hohmann, V. G. Doblaz, Y. Ma, A. Pfister, B. Brandt, N. Geldner, and M. Hothorn. 2020. Molecular mechanism for the recognition of sequence-divergent CIF peptides by the plant receptor kinases GSO1/SGN3 and GSO2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (5):2693-2703.
- Oliver, J. P., A. Castro, C. Gaggero, T. Cascón, E. A. Schmelz, C. Castresana, and I. Ponce de León. 2009. *Pythium* infection activates conserved plant defense responses in mosses. *Planta* 230 (3):569-579.
- Ortiz-Ramírez, C., M. Hernandez-Coronado, A. Thamm, B. Catarino, M. Wang, L. Dolan, J. A. Feijó, and J. D. Becker. 2016. A transcriptome atlas of *Physcomitrella patens* provides insights into the evolution and development of land plants. *Molecular plant* 9 (2):205-220.
- Overdijk, E. J., J. De Keijzer, D. De Groot, C. Schoina, K. Bouwmeester, T. Ketelaar, and F. Govers. 2016. Interaction between the moss *Physcomitrella patens* and *Phytophthora*: a novel

- pathosystem for live-cell imaging of subcellular defence. *Journal of microscopy* 263 (2):171-180.
- Peng, Z., Y. Cheng, B. C.-M. Tan, L. Kang, Z. Tian, Y. Zhu, W. Zhang, Y. Liang, X. Hu, and X. Tan. 2012. Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. *Nature biotechnology* 30 (3):253.
- Penzig, O. A. J. 1882. *Funghi agrumicoli: contribuzione allo studio dei funghi parassiti degli agrumi*: P. Fracanzani.
- Perdomo, J. A., S. Capó-Bauçà, E. Carmo-Silva, and J. Galmés. 2017. Rubisco and rubisco activase play an important role in the biochemical limitations of photosynthesis in rice, wheat, and maize under high temperature and water deficit. *Frontiers in Plant Science* 8:490.
- Perfect, S. E., H. B. Hughes, R. J. O'Connell, and J. R. Green. 1999. Colletotrichum: a model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. *Fungal genetics and Biology* 27 (2-3):186-198.
- Perroud, P. F., F. B. Haas, M. Hiss, K. K. Ullrich, A. Alboresi, M. Amirebrahimi, K. Barry, R. Bassi, S. Bonhomme, and H. Chen. 2018. The Physcomitrella patens gene atlas project: large-scale RNA-seq based expression data. *The Plant Journal*.
- Perroud, P. F., and R. S. Quatrano. 2006. The role of ARPC4 in tip growth and alignment of the polar axis in filaments of Physcomitrella patens. *Cell motility and the cytoskeleton* 63 (3):162-171.
- Petrov, V., J. Hille, B. Mueller-Roeber, and T. S. Gechev. 2015. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science* 6:69.
- Pickrell, J. K., J. C. Marioni, A. A. Pai, J. F. Degner, B. E. Engelhardt, E. Nkadori, J.-B. Veyrieras, M. Stephens, Y. Gilad, and J. K. Pritchard. 2010. Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. *Nature* 464 (7289):768.
- Pieterse, C. M., C. Zamioudis, R. L. Berendsen, D. M. Weller, S. C. Van Wees, and P. A. Bakker. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology* 52.
- Ponce de León, I. 2011. The moss Physcomitrella patens as a model system to study interactions between plants and phytopathogenic fungi and oomycetes. *Journal of pathogens* 2011.
- Ponce de León, I., M. Hamberg, and C. Castresana. 2015. Oxylipins in moss development and defense. *Frontiers in Plant Science* 6:483.
- Ponce de León, I., and M. Montesano. 2013. Activation of defense mechanisms against pathogens in mosses and flowering plants. *International journal of molecular sciences* 14 (2):3178-3200.
- . 2017. Adaptation mechanisms in the evolution of moss defenses to microbes. *Frontiers in Plant Science* 8:366.
- Ponce de León, I., J. P. Oliver, A. Castro, C. Gaggero, M. Bentancor, and S. Vidal. 2007. Erwinia carotovora elicitors and Botrytis cinerea activate defense responses in Physcomitrella patens. *BMC Plant Biology* 7 (1):52.
- Ponce de Leon, I., E. A. Schmelz, C. Gaggero, A. Castro, A. Alvarez, and M. Montesano. 2012. Physcomitrella patens activates reinforcement of the cell wall, programmed cell death

- and accumulation of evolutionary conserved defence signals, such as salicylic acid and 12-oxo-phytodienoic acid, but not jasmonic acid, upon *Botrytis cinerea* infection. *Molecular plant pathology* 13 (8):960-974.
- Ponte, J. d. 1996. Clínica de doenças de plantas. *Fortaleza: Universidade Federal do Ceará*.
- Prigge, M. J., and M. Bezanilla. 2010. Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development* 137 (21):3535-3543.
- Pu, X., L. Yang, L. Liu, X. Dong, S. Chen, Z. Chen, G. Liu, Y. Jia, W. Yuan, and L. Liu. 2020. Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in *Physcomitrella patens*. *International journal of molecular sciences* 21 (3):975.
- Pujari, J. D., R. Yakkundimath, and A. S. Byadgi. 2013. Grading and classification of anthracnose fungal disease of fruits based on statistical texture features. *International Journal of Advanced Science and Technology* 52 (1):121-132.
- Qiao, Y., R. Wang, Y. Bal, and L. D. Hansen. 2005. Characterizing critical phases of germination in winterfat and malting barley with isothermal calorimetry. *Seed Science Research* 15 (3):229-238.
- Rabari, V. P., K. S. Chudashama, and V. S. Thaker. 2018. In vitro Screening of 75 Essential Oils Against *Colletotrichum gloeosporioides*: A Causal Agent of Anthracnose Disease of Mango. *International Journal of Fruit Science* 18 (1):1-13.
- Rahman, K., F. Guozhou, and D. Zhang. 2017. Agricultural Consumption Culture and Ecological Transformation: Bangladesh Perspective. *Asian Development Policy Review* 5 (4):243-252.
- Ramos-Guerrero, A., R. R. González-Estrada, G. Hanako-Rosas, S. Bautista-Baños, G. Acevedo-Hernández, M. E. Tiznado-Hernández, and P. Gutiérrez-Martínez. 2018. Use of inductors in the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* isolated from soursop fruits: in vitro tests. *Food Science and Biotechnology* 27 (3):755-763.
- Rapaport, F., R. Khanin, Y. Liang, M. Pirun, A. Krek, P. Zumbo, C. E. Mason, N. D. Socci, and D. Betel. 2013. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. *Genome biology* 14 (9):3158.
- Ravet, K., and M. Pilon. 2013. Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 19 (9):919-932.
- Reboledo, G., R. del Campo, A. Alvarez, M. Montesano, H. Mara, and I. Ponce de León. 2015. *Physcomitrella patens* activates defense responses against the pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *International journal of molecular sciences* 16 (9):22280-22298.
- Rekhter, D., D. Lüdke, Y. Ding, K. Feussner, K. Zienkiewicz, V. Lipka, M. Wiermer, Y. Zhang, and I. Feussner. 2019. Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science* 365 (6452):498-502.
- Renault, H., A. Alber, N. A. Horst, A. B. Lopes, E. A. Fich, L. Kriegshauser, G. Wiedemann, P. Ullmann, L. Herrgott, and M. Erhardt. 2017. A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nature communications* 8:14713.
- Rensing, S. A., J. Ick, J. A. Fawcett, D. Lang, A. Zimmer, Y. Van de Peer, and R. Reski. 2007. An ancient genome duplication contributed to the abundance of metabolic genes in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC evolutionary biology* 7 (1):130.

- Rensing, S. A., D. Lang, A. D. Zimmer, A. Terry, A. Salamov, H. Shapiro, T. Nishiyama, P.-F. Perroud, E. A. Lindquist, and Y. Kamisugi. 2008. The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319 (5859):64-69.
- Reza Salgado, J., M. Ginéz Rodríguez, and L. Rodríguez Peláez. 2017. El Negocio De Abono Orgánico Con Enfoque Sustentable (Business with an Organic Fertilizer Sustainable Approach).
- Riera, N., D. Ramirez-Villacis, N. Barriga-Medina, J. Alvarez-Santana, K. Herrera, C. Ruales, and A. Leon-Reyes. 2018. First Report of Banana Anthracnose Caused by Colletotrichum gloeosporioides in Ecuador. *Plant Disease* (ja).
- Ringli, C. 2010. The hydroxyproline-rich glycoprotein domain of the Arabidopsis LRX1 requires Tyr for function but not for insolubilization in the cell wall. *The Plant Journal* 63 (4):662-669.
- Roberts, A. W., E. M. Roberts, and C. H. Haigler. 2012. Moss cell walls: structure and biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* 3:166.
- Rodríguez-López, É. S., E. Cárdenas-Soriano, S. Hernández-Delgado, A. Gutiérrez-Diez, and N. Mayek-Pérez. 2013. Analysis of Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc. infection of avocado fruits. *Revista Brasileira de Fruticultura* 35 (3):898-905.
- Rohr, J. R., C. B. Barrett, D. J. Civitello, M. E. Craft, B. Delius, G. A. DeLeo, P. J. Hudson, N. Jouanard, K. H. Nguyen, and R. S. Ostfeld. 2019. Emerging human infectious diseases and the links to global food production. *Nature Sustainability* 2 (6):445-456.
- Rojas, C. M., M. Senthil-Kumar, V. Tzin, and K. Mysore. 2014. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science* 5:17.
- Rousseau, C., E. Belin, E. Bove, D. Rousseau, F. Fabre, R. Berruyer, J. Guillaumès, C. Manceau, M.-A. Jacques, and T. Boureau. 2013. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant methods* 9 (1):17.
- Salguero-Linares, J., and N. S. Coll. 2019. Plant proteases in the control of the hypersensitive response. *Journal of experimental botany* 70 (7):2087-2095.
- Sarkar, P., E. Bosneaga, and M. Auer. 2009. Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. *Journal of experimental botany* 60 (13):3615-3635.
- Schulte, J., A. Erxleben, G. Schween, and R. Reski. 2006. High throughput metabolic screen of Physcomitrella transformants. *The Bryologist* 109 (2):247-256.
- Shah, J., and J. Zeier. 2013. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* 4:30.
- Sharma, M., and S. Kulshrestha. 2015. Colletotrichum gloeosporioides: an anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 12 (2):1233-1246.
- Sharma, R., G. Singh, S. Bhattacharya, and A. Singh. 2018. Comparative transcriptome meta-analysis of Arabidopsis thaliana under drought and cold stress. *PloS one* 13 (9).

- Shin, B., G. Choi, H. Yi, S. Yang, I. Cho, J. Kim, S. Lee, N. C. Paek, J. H. Kim, and P. S. Song. 2002. AtMYB21, a gene encoding a flower-specific transcription factor, is regulated by COP1. *The Plant Journal* 30 (1):23-32.
- Siddiqui, Y., and A. Ali. 2014. Colletotrichum gloeosporioides (Anthracnose). In *Postharvest Decay*: Elsevier, 337-371.
- Singh, N., S. Swain, A. Singh, and A. K. Nandi. 2018. AtOZF1 positively regulates defense against bacterial pathogens and NPR1-independent salicylic acid signaling. *Molecular plant-microbe interactions* 31 (3):323-333.
- Singh, R., S. Singh, P. Parihar, R. K. Mishra, D. K. Tripathi, V. P. Singh, D. K. Chauhan, and S. M. Prasad. 2016. Reactive oxygen species (ROS): beneficial companions of plants' developmental processes. *Frontiers in Plant Science* 7:1299.
- Soltis, N. E., C. Caseys, W. Zhang, J. A. Corwin, S. Atwell, and D. J. Kliebenstein. 2020. Pathogen genetic control of transcriptome variation in the Arabidopsis thaliana–Botrytis cinerea pathosystem. *Genetics* 215 (1):253-266.
- Song, L., D. S. Shankar, and L. Florea. 2016. Rascaf: Improving genome assembly with RNA sequencing data. *The plant genome* 9 (3).
- Spies, D., and C. Ciaudo. 2015. Dynamics in transcriptomics: advancements in RNA-seq time course and downstream analysis. *Computational and structural biotechnology journal* 13:469-477.
- Stevenson, S. R., Y. Kamisugi, C. H. Trinh, J. Schmutz, J. W. Jenkins, J. Grimwood, W. Muchero, G. A. Tuskan, S. A. Rensing, and D. Lang. 2016. Genetic analysis of Physcomitrella patens identifies ABSCISIC ACID NON-RESPONSIVE (ANR), a regulator of ABA responses unique to basal land plants and required for desiccation tolerance. *The Plant Cell:tpc*. 00091.02016.
- Talhinhas, P., J. Neves-Martins, H. Oliveira, and S. Sreenivasaprasad. 2009. The distinctive population structure of Colletotrichum species associated with olive anthracnose in the Algarve region of Portugal reflects a host–pathogen diversity hot spot. *FEMS Microbiology Letters* 296 (1):31-38.
- Thelander, M., T. Olsson, and H. Ronne. 2004. Effect of the energy supply on filamentous growth and development in Physcomitrella patens. *Journal of experimental botany* 56 (412):653-662.
- Tunsagool, P., W. Jutidamrongphan, N. Phaonakrop, J. Jaresitthikunchai, S. Roytrakul, and W. Leelasuphakul. 2019. Insights into stress responses in mandarins triggered by Bacillus subtilis cyclic lipopeptides and exogenous plant hormones upon Penicillium digitatum infection. *Plant cell reports* 38 (5):559-575.
- Van der Ent, S., A. Koornneef, J. Ton, and C. M. Pieterse. 2018. Induced resistance—orchestrating defence mechanisms through crosstalk and priming. *Annual Plant Reviews online*:334-370.
- Van Doorn, W., E. Beers, J. Dangl, V. Franklin-Tong, P. Gallois, I. Hara-Nishimura, A. Jones, M. Kawai-Yamada, E. Lam, and J. Mundy. 2011. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell death and differentiation* 18 (8):1241.

- van Loon, L. C., M. Rep, and C. M. Pieterse. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-162.
- Vandana, V., R. S. Bhai, R. R. Nair, and S. Azeez. 2019. Role of cell wall and cell membrane integrity in imparting defense response against *Phytophthora capsici* in black pepper (*Piper nigrum* L.). *European Journal of Plant Pathology* 154 (2):359-375.
- Verma, K., and S. Agrawal. 2017. Salicylic Acid-Mediated Defence Signalling in Respect to Its Perception, Alteration and Transduction. In *Salicylic Acid: A Multifaceted Hormone*: Springer, 97-122.
- Verma, V., P. Ravindran, and P. P. Kumar. 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology* 16 (1):86.
- Vidali, L., R. C. Augustine, K. P. Kleinman, and M. Bezanilla. 2007. Profilin is essential for tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* 19 (11):3705-3722.
- Vidhyasekaran, P. 2020. Bioengineering and Molecular Manipulation of Salicylic Acid Signaling System to Activate Plant Immune Responses for Crop Disease Management. In *Plant Innate Immunity Signals and Signaling Systems*: Springer, 169-221.
- von Arx, J. A. 1970. A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. *A revision of the fungi classified as Gloeosporium*.
- Vorwerk, S., C. Schiff, M. Santamaria, S. Koh, M. Nishimura, J. Vogel, C. Somerville, and S. Somerville. 2007. EDR2 negatively regulates salicylic acid-based defenses and cell death during powdery mildew infections of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 7 (1):35.
- Wang, D., K. Pajerowska-Mukhtar, A. H. Culler, and X. Dong. 2007. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology* 17 (20):1784-1790.
- Wang, F., F. Zhang, M. Chen, Z. Liu, Z. Zhang, J. Fu, and Y. Ma. 2017. Comparative transcriptomics reveals differential gene expression related to *Colletotrichum gloeosporioides* resistance in the octoploid strawberry. *Frontiers in Plant Science* 8:779.
- Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics* 10 (1):57.
- Wang, Z., X. Li, X. Wang, N. Liu, B. Xu, Q. Peng, Z. Guo, B. Fan, C. Zhu, and Z. Chen. 2019. *Arabidopsis* endoplasmic reticulum-localized UBAC2 proteins interact with PAMP-INDUCED COILED-COIL to regulate pathogen-induced callose deposition and plant immunity. *The Plant Cell* 31 (1):153-171.
- Waszczak, C., M. Carmody, and J. Kangasjärvi. 2018. Reactive oxygen species in plant signaling. *Annual review of plant biology* 69:209-236.
- Wharton, P. S., and J. Diéguez-Urbeondo. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. Paper read at Anales del jardín botánico de Madrid.
- Withers, J., and X. Dong. 2016. Posttranslational modifications of NPR1: a single protein playing multiple roles in plant immunity and physiology. *PLoS pathogens* 12 (8).
- Woelfle, M. A., Y. Ouyang, K. Phanvijhitsiri, and C. H. Johnson. 2004. The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in cyanobacteria. *Current Biology* 14 (16):1481-1486.

- Wu, Z., J. Cheng, J. Cui, X. Xu, G. Liang, X. Luo, X. Chen, X. Tang, K. Hu, and C. Qin. 2016. Genome-wide identification and expression profile of Dof transcription factor gene family in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Frontiers in Plant Science* 7:574.
- Xiao, L., H. Wang, P. Wan, T. Kuang, and Y. He. 2011. Genome-wide transcriptome analysis of gametophyte development in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology* 11 (1):177.
- Yan, J., L. Yu, J. Xuan, Y. Lu, S. Lu, and W. Zhu. 2016. De novo transcriptome sequencing and gene expression profiling of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves under heat stress. *Scientific reports* 6:19473.
- Yang, F., W. Li, and H. J. Jørgensen. 2013. Transcriptional reprogramming of wheat and the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici* during two phases of the compatible interaction. *PLoS one* 8 (11).
- Yang, J., L. Yan, Y. Song, C. Chai, L. Song, L. Guan, and S. Hou. 2015. New roles for the Arabidopsis TAO1 gene besides disease resistance. *Russian journal of plant physiology* 62 (4):542-550.
- Yuan, P., E. Jauregui, L. Du, K. Tanaka, and B. Poovaiah. 2017. Calcium signatures and signaling events orchestrate plant-microbe interactions. *Current opinion in plant biology* 38:173-183.
- Yuan, P., K. Tanaka, L. Du, and B. Poovaiah. 2018. Calcium signaling in plant autoimmunity: A guard model for ATSR1/CAMTA3-mediated immune response. *Molecular plant* 11 (5):637-639.
- Zhang, J., J. Gao, Z. Zhu, Y. Song, X. Wang, X. Wang, and X. Zhou. 2020. MKK4/MKK5-MPK1/MPK2 cascade mediates SA-activated leaf senescence via phosphorylation of NPR1 in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*:1-13.
- Zhang, L., L. Du, C. Shen, Y. Yang, and B. Poovaiah. 2014. Regulation of plant immunity through ubiquitin-mediated modulation of Ca²⁺-calmodulin-AtSR1/CAMTA3 signaling. *The Plant Journal* 78 (2):269-281.
- Zhang, L., X. Huang, C. He, Q.-Y. Zhang, X. Zou, K. Duan, and Q. Gao. 2018. Novel fungal pathogenicity and leaf defense strategies are revealed by simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum fructicola* and strawberry infected by this fungus. *Frontiers in Plant Science* 9:434.
- Zhang, W., M. Fraiture, D. Kolb, B. Löffelhardt, Y. Desaki, F. F. Boutrot, M. Tör, C. Zipfel, A. A. Gust, and F. Brunner. 2013. Arabidopsis receptor-like protein30 and receptor-like kinase suppressor of BIR1-1/EVERSHED mediate innate immunity to necrotrophic fungi. *The Plant Cell* 25 (10):4227-4241.
- Zhao, H., X. Guan, Y. Xu, and Y. Wang. 2013. Characterization of novel gene expression related to glyoxal oxidase by agro-infiltration of the leaves of accession Baihe-35-1 of *Vitis pseudoreticulata* involved in production of H₂O₂ for resistance to *Erysiphe necator*. *Protoplasma* 250 (3):765-777.
- Zhao, Y., K. Bi, Z. Gao, T. Chen, H. Liu, J. Xie, J. Cheng, Y. Fu, and D. Jiang. 2017. Transcriptome analysis of Arabidopsis thaliana in response to *Plasmodiophora brassicae* during early infection. *Frontiers in microbiology* 8:673.

- Zheng, X., J. Xing, K. Zhang, X. Pang, Y. Zhao, G. Wang, J. Zang, R. Huang, and J. Dong. 2019. Ethylene response factor ERF11 activates BT4 transcription to regulate immunity to *Pseudomonas syringae*. *Plant physiology* 180 (2):1132-1151.
- Zhong, J., J. Gu, Y. Guo, S. You, F. Liao, W. Chen, and W. Guo. 2019. Blueberry VcLon1 protease increases iron use efficiency by alleviating chloroplast oxidative stress. *Plant and Soil* 445 (1-2):533-548.
- Zhu, Z., F. Xu, Y. Zhang, Y. T. Cheng, M. Wiermer, X. Li, and Y. Zhang. 2010. Arabidopsis resistance protein SNC1 activates immune responses through association with a transcriptional corepressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (31):13960-13965.
- Zimmer, A. D., D. Lang, K. Buchta, S. Rombauts, T. Nishiyama, M. Hasebe, Y. Van de Peer, S. A. Rensing, and R. Reski. 2013. Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions. *BMC genomics* 14 (1):498.
- Zimmermann, P., O. Laule, J. Schmitz, T. Hruz, S. Bleuler, and W. Gruissem. 2008. Genevestigator transcriptome meta-analysis and biomarker search using rice and barley gene expression databases. *Molecular plant* 1 (5):851-857.