

Análisis de expresión de genes que modifican su
expresión en el biótrofo *Claviceps paspali* y su
hospedero *Paspalum dilatatum* cv ‘Estanzuela Chirú’

Lic. Bq. Héctor Luis Oberti

Programa de Posgrado en Biotecnología

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Montevideo – Uruguay

Mayo 2020

Análisis de expresión de genes que modifican su expresión en el biótrofo *Claviceps paspali* y su hospedero *Paspalum dilatatum* cv ‘Estanzuela Chirú’

Lic. Bq. Héctor Luis Oberti

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención de título de Magister en Biotecnología.

Tutor: Dr. Ing. Agr. Marco Dalla Rizza

Cotutores: Dr. Ing. Agr. Rafael Reyno, Dr. Matías Feijoo

Director Académico: Dra. Sabina Vidal

Laboratorio de Proteínas, Unidad de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Estación Las Brujas, Canelones, Uruguay

Montevideo – Uruguay

Mayo 2020

INTEGRANTES TRIBUNAL DEFENSA DE TESIS

Dr. Pablo Speranza

Dr. Facundo Giorello

Dra. Sabina Vidal

“... resulta curioso que no lo cultivemos en su patria original”

Bernardo Rosengurtt

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, agradecer a mi tutor Marco Dalla Rizza, fue un proceso largo pero provechoso, gracias por la oportunidad de formar parte de este proyecto, por el apoyo, ideas y correcciones.

A Rafael Reyno y Matías Feijoo por sus correcciones y ayuda.

Al tribunal evaluador, Facundo, Pablo y Sabina, gracias por tomarse el tiempo y por las sugerencias.

A Eduardo Abreo por sus grandes aportes, enseñanzas y correcciones.

A Sara Murchio por su incansable asistencia en todos los momentos.

A todos mis compañeros del Bioterio: Claudia Schwartzman, Wanda Iriarte, Matías Maidana, Rafael Narancio, Pablo Peraza, Beatriz Carracelas, Silvia Garaycochea, Lucia Sessa.

A las agencias financiadoras: INIA (proyecto BT-19) y a las alícuotas de Posgrado en Biotecnología. Un especial agradecimiento al Programa de Becas INIA, sin ese apoyo económico fundamental hoy no podría estar terminando esta etapa.

A mis padres, por haberme dado la posibilidad de estudiar y seguir mis sueños, sin duda hoy no sería lo que soy si no fuera por ellos.

A mi familia y amigos, a los que están hoy y a los que partieron.

¡A todos los nombrados, GRACIAS! ¡Sin ustedes esto no podría haber salido así!

RESUMEN

El hongo fitopatógeno *Claviceps paspali* es el agente causal de la “enfermedad azucarada” en *Paspalum* spp. y presenta una amenaza para la comercialización de cultivares susceptibles de gran potencial forrajero como es el caso de *P. dilatatum* cv 'Estanzuela Chirú' (Chirú). *C. paspali* tiene una interacción específica con su hospedero en donde únicamente infecta el ovario de inflorescencias inmaduras y la vía de entrada son los estigmas receptivos donde no ocurrió la polinización. A pesar de las implicancias económicas de la “enfermedad azucarada” en la producción forrajera, actualmente, no existen estudios de interacción entre ninguna especie del género *Paspalum* frente a *C. paspali*. Generar información sobre las interacciones en este patosistema puede ayudar a formular aproximaciones para determinar medidas de control frente a este patógeno.

Para abordar el estudio del patosistema *C. paspali*-Chirú, esta tesis se dividió en dos capítulos. En el primer capítulo, se analizó el patosistema mediante una aproximación bioinformática. Primeramente, analizamos al hospedero mediante la secuenciación de ARNm de diferentes tejidos de Chirú. Con estos se ensambló *de novo* y se anotó funcionalmente el primer transcriptoma de Chirú utilizando diferentes metodologías. Usando este ensamblado *de novo* como referencia se analizaron los transcriptomas de estigmas-estilos (EE) de Chirú post-antesis sin infectar, 1 y 4 días post infección (dpi) con *C. paspali*. Con esto se buscó examinar la respuesta del hospedero durante estas primeras etapas de infección. Los resultados obtenidos demuestran una red compleja de comunicación, transducción de señales y regulación génica durante el inicio de la infección, con un claro reconocimiento y respuesta de defensa primaria por parte de Chirú a la colonización con *C. paspali*. De todas formas, la persistencia de la infección demuestra que esta respuesta es insuficiente, lo que podría reflejar procesos relacionados con la inhibición de los mecanismos de defensa por parte del hongo. Debido a la importancia del EE como vía de entrada para el hongo, también se realizó la determinación de transcriptos específicos del EE post-antesis, así como también transcriptos diferencialmente expresados entre el EE pre y post-antesis. Para ello se realizó la secuenciación de ARNm de hojas en diferentes estados de maduración, estambres post antesis, y EE pre-antesis, para facilitar la identificación de genes específicos del estigma-estilo mediante la desestimación de secuencias comunes a estos otros tejidos. Con este análisis se identificó la presencia de familias de proteínas relacionadas con la patogénesis y otras proteínas relacionadas con la defensa en los transcriptomas de este tejido. La polinización comparte sorprendentes similitudes con la respuesta a la infección por hongos en términos de respuestas biológicas.

A esto se le sumo un análisis genómico y basado en ARN-seq del huésped *C. paspali*. Para ello se anotó el genoma de referencia de *C. paspali* disponible en base de datos públicas, y se identificó mediante análisis de secuencia *in silico* la presencia de proteínas secretadas y posibles factores de patogenicidad presentes en el genoma. También se identificó genes de *C. paspali* expresados *in planta* durante la infección a Chirú en base a los datos de ARN-seq dual previamente obtenidos de EE 1 y 4 dpi. Se comparó la expresión génica del patógeno *C. paspali* durante estos puntos de la infección y se demostró la expresión de posibles efectores. Dentro de estos efectores tanto a nivel de genoma como los expresados se encontró un alto número sin anotación funcional, y sin homología a secuencias conocidas, punto característico de los efectores fúngicos y que puede estar relacionado a la especificidad que tiene el hongo con su hospedero. Además, se validaron mediante RT-qPCR la expresión de cuatro proteínas secretadas, dando sustento a los datos obtenidos mediante ARN-seq. En conclusión, en este capítulo, utilizando herramientas de análisis de ARN-seq, predicciones *in silico* y análisis de secuencias por primera vez se aborda el patosistema *C. paspali*-Chirú desde una aproximación “ómica”. Generada así información de relevancia que ayude a entender lo que ocurre en las primeras etapas de la infección de esta interacción compleja, específica y compatible.

El segundo capítulo aborda el estudio del patosistema desde otro ángulo, buscando aumentar los conocimientos de diversidad genética de *C. paspali* en base a diferentes hospederos del género *Paspalum* en Uruguay. Para ello, se realizó la primera caracterización genética de varios aislamientos uruguayos de esta especie mediante el análisis de secuencias parciales de los genes que codifican la segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa subunidad II (*RPB2*), factor de elongación de traducción 1- α (*TEF1*), β -tubulina (*TUB2*) y la subunidad nuc rDNA 28S (28S). La diversidad se analizó mediante el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y presencia/ausencia de genes biosintéticos de alcaloides del Ergot y de indol-diterpenos. Se obtuvo que existe una gran diversidad genética entre los aislamientos de *C. paspali* en Uruguay, así como la presencia de posibles nuevos linajes en la especie. En conclusión, se proporciona por primera vez información sobre la diversidad genética y genotípica de *C. paspali* presente en *P. dilatatum* y sugieren que los aislamientos de *P. plicatulum* podrían considerarse una subespecie ecológica o una variante especializada de *C. paspali*.

Palabras clave: Ergot; interacción planta-patógeno; ARN-seq; diversidad genética; filogenia;secretoma.

ABSTRACT

The plant pathogenic fungus *Claviceps paspali* is the causal agent of Ergot in *Paspalum* spp. and it presents a threat to the commercialization of susceptible cultivars with great forage potential, such as *P. dilatatum* cv 'Estanzuela Chirú' (Chirú). *C. paspali* has a specific interaction with its host where it only infects the ovary of immature inflorescences through the receptive stigmas where pollination did not occur. Despite the economic implications of Ergot in forage production, currently, there are no interaction studies between any species of the genus *Paspalum* against *C. paspali*. Generating information on the interactions in this pathosystem can help formulate approaches to determine control measures against this pathogen.

To address the *C. paspali*-Chirú pathosystem, this thesis was divided into two chapters. In the first chapter, the Chirú-*C. paspali* pathosystem was analyzed using a bioinformatic approach. Firstly, we analyzed the host by sequencing mRNA from different Chirú tissues. With these, the first Chirú transcriptome was *de novo* assembled using different methodologies and functionally annotated. To examine the host response during early stages of infection we analyzed three tissues sequencing data (post-anthesis uninfected Chirú stigma-style (SS) transcripts, and SS after 1 and 4 days post infection (dpi) with *C. paspali*), using the *de novo* assembly of Chirú as reference. The results obtained demonstrate a complex network of communication, signal transduction and gene regulation during the beginning of the infection in Chirú, with a clear recognition and primary defense response to colonization with *C. paspali*. Persistence of the infection shows that response is insufficient, which could reflect processes related to the inhibition of the defense mechanisms by the fungus. Also, due to the importance of SS as a route of entry for the fungus, the determination of specific transcripts of the SS post-anthesis was also performed, as well as differentially expressed transcripts between the SS pre and post-anthesis. Sequencing of mRNA from leaves in different stages of maturation, post anthesis stamens, and pre-anthesis SS were performed, to facilitate the identification of stigma-style-specific genes by rejecting sequences common to these other tissues. This analysis identified the presence of families of proteins related to pathogenesis and other defense-related proteins in the transcripts of this tissue. Pollination shares striking similarities with the response to fungal infection in terms of biological responses.

Also, a comprehensive genomic, RNA-seq based analysis of *C. paspali* was performed. For this, the reference genome of *C. paspali* available in public databases was annotated, and the presence of secreted proteins and possible effectors were predicted by *in silico* sequence analysis. *C. paspali* genes expressed during Chirú infection were also identified based on the previously obtained dual RNA-seq data from SS 1 and 4 dpi. The gene expression of the pathogen *C. paspali*

during these infection points was compared and the expression of possible effectors was demonstrated. Among these effectors, both at the genome and expressed level, a high number was found without functional annotation, and without homology to known sequences. This may be related to the specificity of the fungus with its host. In addition, the expression of four secreted proteins were validated by RT-qPCR, supporting the data obtained using RNA-seq. In conclusion, in this chapter, using an “omic” approach based on RNA-seq analysis, *in silico* predictions and sequence analysis we generate relevant information to start to understand what happened in the early stages of infection of this complex, specific and compatible interaction.

The second chapter is focused on increasing the knowledge of genetic diversity of *C. paspali* in Uruguay. For this, the first genetic characterization of several Uruguayan isolates of this species was carried out. Isolates were phylogenetically identified using partial sequences of genes encoding the second largest subunit of RNA polymerase subunit II (*RPB2*), translation elongation factor 1- α (*TEF1*), β -tubulin (*TUB2*) and the nuc subunit 28S rDNA (*28S*). Diversity was analyzed based on haplotype definition, random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, presence/absence of biosynthetic genes of the Ergot alkaloids and indole-diterpenes pathways. It was demonstrated that there is a great diversity among *C. paspali* isolates in Uruguay, as well as the presence of possible new lineages in the species as well as new alkaloid production genotypes. In conclusion, information is provided for the first time on the genetic and genotypic diversity of *C. paspali* present in *P. dilatatum* and suggest that *P. plicatulum* isolates could be considered an ecological subspecies or a specialized variant of *C. paspali*.

Keywords: Ergot; plant-pathogen interaction, RNA-seq; genetic diversity, phylogeny; secretome.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1.1. <i>Paspalum dilatatum</i>	2
1.1.1.1. El cultivar “Estanzuela Chirú”	4
1.1.1.2. Importancia de <i>P. dilatatum</i> como forrajera	5
1.1.1.3. Limitaciones para el uso de <i>P. dilatatum</i> como forrajera.....	6
1.1.2. <i>Claviceps paspali</i>	7
1.1.2.1. Ciclo de vida y especificidad.....	10
1.1.2.2. Toxicidad e importancia económica de la infección	11
1.1.2.3. Mejoramiento genético de plantas enfocado a resistencia a <i>Claviceps spp.</i> y antecedentes en <i>Paspalum spp.</i>	12
2. OBJETIVOS	16
2.1.1. Objetivo General	17
2.1.2. Objetivos Específicos.....	17
3. CAPITULO I	18
3.1. INTRODUCCIÓN.....	19
3.1.1. ¿Qué es la secuenciación del ARN?	20
3.1.1.1. Secuenciación, transcriptómica y <i>Paspalum dilatatum</i>	22
3.1.1.2. ARN-seq y las interacciones planta-patógeno.....	23
3.1.2. Interacciones planta-hongo: el secretoma, efectores de virulencia y la respuesta de defensa vegetal.....	24
3.1.2.1. <i>C. paspali</i> y la interacción con su hospedero	27
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	31
3.2.2. Inoculación con <i>C. paspali</i>	31
3.2.3. Recolección de material vegetal	32
3.2.4. Extracción de ARN total	34
3.2.5. Generación de librerías y secuenciación del ARNm	34

3.2.6.	Control de calidad de <i>reads</i> obtenidos y recorte de secuencias por calidad	35
3.2.7.	Ensamblado <i>de novo</i> de transcritos de Chirú	36
3.2.8.	Estadísticas del ensamblado <i>de novo</i> y evaluación de su integridad.	37
3.2.9.	Una mejora en el ensamblado <i>de novo</i>	37
3.2.10.	Obtención de genes codificantes de proteínas del genoma de <i>C. paspali</i>	38
3.2.11.	Predicción de proteínas secretadas en el genoma de <i>C. paspali</i>	38
3.2.12.	Predicción de factores de patogenicidad en el secretoma de <i>C. paspali</i>	39
3.2.13.	Anotación del ensamblado <i>de novo</i> de Chirú y del secretoma de <i>C. paspali</i>	40
3.2.14.	Expresión diferencial	41
3.2.15.	Validación de genes seleccionados mediante RT-qPCR.	41
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
3.3.1.	Extracción de ARN	44
3.3.2.	Control de calidad y recorte de secuencias	45
3.3.3.	Ensamblado <i>de novo</i> del transcriptoma de Chirú.....	46
3.3.4.	Estrategia multi <i>k-mer</i> para ensamblado <i>de novo</i> del transcriptoma de Chirú.....	50
3.3.5.	Anotación funcional del transcriptoma ensamblado <i>de novo</i> de Chirú.	53
3.3.6.	Anotación del genoma de <i>C. paspali</i> y determinación de posibles proteínas secretadas y efectoras	57
3.3.7.	Análisis de expresión diferencial	64
3.3.7.1.	Transcritos diferencialmente expresados durante infección con <i>C. paspali</i> en el estigma-estilo de Chirú.	65
3.3.7.2.	Los cambios de expresión a 0 dpi en el estigma-estilo de Chirú en comparación con los momentos de infección con <i>C. paspali</i>	76
3.3.7.3.	Diferencias de expresión entre estigmas-estilos pre y post antesis. Receptividad, polinización, desarrollo y transcritos específicos.	78
3.3.7.4.	Expresión de posibles factores de patogenicidad de <i>C. paspali</i> durante la infección del estigma-estilo de Chirú	82
3.3.8.	Validación mediante RT-qPCR	86
3.4.	CONCLUSIONES.....	89
3.5.	PERSPECTIVAS	91

3.6.	BIBLIOGRAFÍA.....	93
4.	CAPITULO II:.....	129
4.1.	ABSTRACT	130
4.2.	INTRODUCTION.....	130
4.3.	MATERIALS and METHODS	133
4.3.1.	Sampling and fungal isolates	133
4.3.2.	DNA extraction, PCR amplification and sequencing	135
4.3.3.	Phylogenetic analysis.....	135
4.3.4.	Haplotype analysis	137
4.3.5.	RAPD fingerprinting.....	137
4.3.6.	Detection of <i>EAS</i> and <i>IDT</i> cluster genes.....	138
4.3.7.	Genotypic diversity based on RAPD fingerprinting and presence of alkaloid genes	140
4.4.	RESULTS.....	140
4.4.1.	Phylogenetic análisis.....	140
4.4.2.	Haplotype analysis	144
4.4.3.	RAPD fingerprinting.....	146
4.4.4.	<i>EAS</i> and <i>IDT</i> analysis and potential alkaloid production.....	148
4.4.5.	Diversity based on RAPD and presence/absence of <i>EAS</i> and <i>IDT</i> genes	151
4.5.	DISCUSSION	153
4.6.	BIBLIOGRAPHY	155
5.	ANEXOS	161

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1.1. *Paspalum dilatatum*

Paspalum dilatatum Poir, pata de gallina o pasto miel, es una gramínea perteneciente al grupo Dilatata del género *Paspalum*. Este género se encuentra dentro de la familia *Poaceae*, subfamilia *Panicoideae*, tribu *Paspaleae* y comprende un alto número de especies, principalmente de regiones tropicales y subtropicales del continente americano (Clayton y Renvoize, 1986). Distintas revisiones taxonómicas para las especies de *Paspalum* en América del Sur estiman su número en aproximadamente 350-400 (Chase, 1929; Zuloaga y Morrone, 2005; Rua *et al.*, 2010). Su diversidad morfológica es amplia, siendo desde muy robustas, rastreras, estoloníferas o rizomatosas, de hojas tiernas a muy duras. Es uno de los géneros de *Paniceae*s más importantes dentro del tapiz natural de Uruguay (Pizarro, 2002) y el género más representativo del ecosistema campo en Uruguay (Millot, Risso y Methol, 1987). La importancia del género radica no sólo en su abundancia de especies, sino también por su amplia distribución, su relevancia en diversos ecosistemas y fundamentalmente por el interés económico que tienen muchas de sus especies (sobre todo por su buena calidad como forrajeras) (Venuto *et al.*, 2007). El grupo *Dilatata* es un complejo de especies poliploides que comprende varias formas tetraploides sexuales y tetraploides apomícticos, pentaploides, hexaploides y heptaploides (Speranza, 2009) que han sido clasificados en varias categorías formales e informales. Comúnmente se asignan tres especies al grupo además de *P. dilatatum*: *P. urvillei* Steud., *P. pauciciliatum* Hert. y *P. dasyleurum* Kuntze ex Desv (Vaio *et al.*, 2007).

P. dilatatum es una especie nativa de Sudamérica originaria del área del noreste de Argentina, Uruguay y sur de Brasil (Burson y Watson, 1995). Siete biotipos poliploides se han identificado en esta especie basados en morfología y distribución (**Tabla 1**). Estos biotipos incluyen alotetraploides sexuales ($2n=4x=40$) y alopenta- ($2n=5x=50$) y alohexaploides ($2n=6x=60$) apomícticos (Burson, Correa y Potts, 1978; Burson, 1991; Burson, Voigt y Evers, 1991; Speranza, 2009).

Tanto las relaciones entre biotipos, como entre especies del grupo Dilatata, han sido abordadas desde un punto de vista citogenético, en donde se determinó, que existen tres formulas genómicas para *P. dilatatum*: IIJJ, IIJX y IIJXX (Bashaw y Holt, 1958; Fernandes-Moraes, Barreto y Salzano, 1968; Burson y Bennett, 1971; Burson, Lee y Bennet, 1973; Burson, 1991, 1995; Burson, Voigt y Evers, 1991; Burson y Quarín, 1992). También se ha abordado estas relaciones

utilizando marcadores moleculares como RAPDS, AFLPs y microsatélites (Casa *et al.*, 2002; Speranza, 2005, 2009; Miz y De Souza-Chies, 2006; Souza-Chies *et al.*, 2006; Speranza y Malosetti, 2007; Sandro, Gutiérrez y Speranza, 2019). Se ha teorizado que especies de *Paspalum* diploides como *P. intermedia*, *P. juergensii* o *P. paniculatum* son los probables donantes de los genomas II y JJ, respectivamente (Burson, Lee y Bennet, 1973), mientras que el progenitor del genoma X es desconocido (Bennett, Burson y Bashaw, 1969). Debido a que los penta y hexaploide son apomícticos, se ha propuesto que la apomixis pudiera estar asociada con la presencia del genoma X en estos biotipos (Burson, 1995).

El biotipo más común y con más distribución geográfica (Evers y Burson, 2004) de *P. dilatatum* es *P. dilatatum* spp. *dilatatum* el cual es un biotipo pentaploide apomíctico (Bashaw y Forbes, 1958). Se ha sugerido que se originó a partir de un evento de hibridación entre *P. dilatatum* ssp. *flavescens* y un biotipo hexaploide uruguayo (Burson, 1991; Burson, Voigt y Evers, 1991). Este biotipo predominante tiene anteras moradas y está muy extendido en América del Sur y se naturalizó en otras partes del mundo, incluyendo China, EE. UU., India, Japón, Nueva Zelanda, Australia y Sudáfrica (Giordano, Cogan, *et al.*, 2014). Está constituido por un clon dominante y una serie de genotipos recombinantes mayoritariamente originados por hibridaciones del clon dominante con especies relacionadas sexualmente compatibles. Los genotipos recombinantes están relacionados geográficamente con las contrapartes sexuales involucradas que funcionaron en algún momento como progenitores (Speranza, 2005).

Tabla 1. Biotipos de *Paspalum dilatatum* con su fórmula genómica y modo de reproducción.

Ploidía	Biotipo	Formula genómica	Reproducción
4x	<i>P. dilatatum</i> “Virasoro”	IIJJ	Sexual
	<i>P. dilatatum</i> spp. <i>flavescens</i>	IIJJ	Sexual
	<i>P. dilatatum</i> “Vacaria”	IIJJ	Sexual
5x	<i>P. dilatatum</i> spp. <i>Dilatatum</i>	IIJJX	Apomíctico
6x	<i>P. dilatatum</i> “Chiru”	IIJJXX	Apomíctico
	<i>P. dilatatum</i> “Uruguaiana”	IIJJX ₁ X ₂	Apomíctico
	<i>P. dilatatum</i> “Torres”	-	Apomíctico

1.1.1.1. El cultivar “Estanzuela Chirú”

P. dilatatum cv 'Estanzuela Chirú' (Chirú), es un cultivar hexaploide ($2n=6x=60$) con un valor de Cx de 582 Mb (Vaio *et al.*, 2007). Presenta una reproducción apomíctico facultativo y ha producido descendientes fuera de tipo (fenotípicamente diferentes) ocasionalmente (Milot, 1977). Pertenece al biotipo “Uruguayo” o “Chirú” con una fórmula genómica de IIJXX. La distribución natural de su biotipo es en locaciones aisladas en el noroeste y el centro norte de Uruguay y el oeste de Rio Grande del Sur (Fernandes-Moraes, Barreto y Salzano, 1968; Burson, Voigt y Evers, 1991). El biotipo Chirú, parecería ser el resultado de la hibridación de algún clon *P. dilatatum* ssp. *dilatatum* y otro progenitor desconocido probablemente relacionado con *P. quadrifarum* (Speranza, 2009). Esto último se evidencia por la similitud en el hábito de crecimiento, forma piramidal de las panojas y pelos dispersos en la parte posterior del raquis de las espigas; a su vez también existe evidencia molecular que demuestra esta relación (Speranza, 2009).

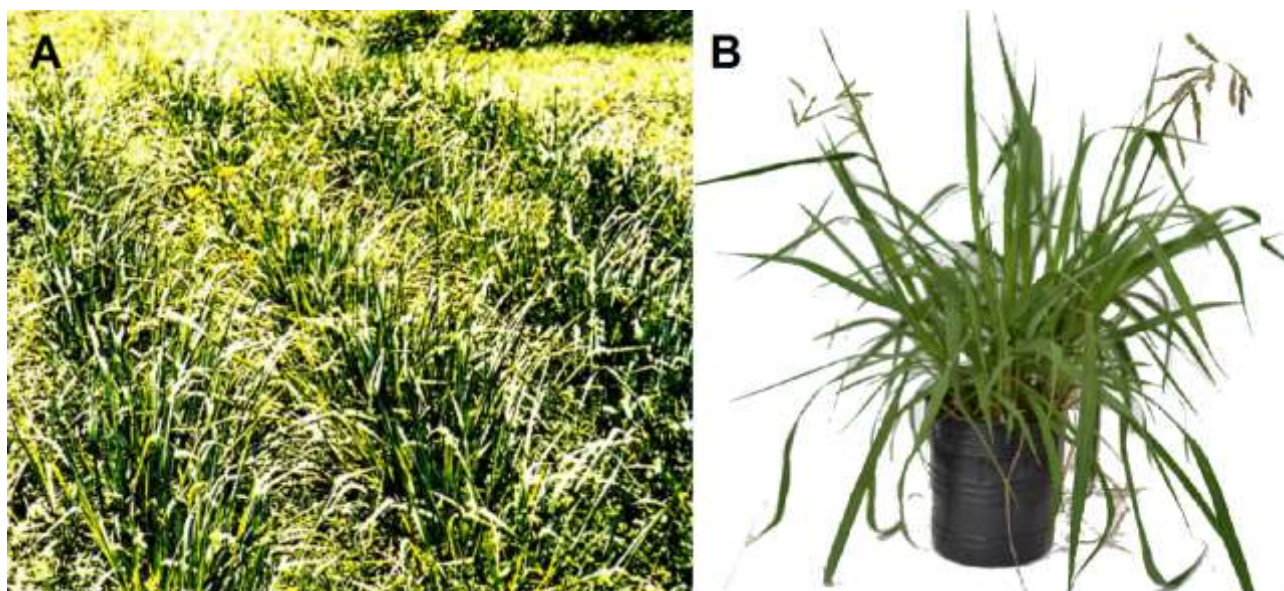


Figura 1. Aspecto de *Paspalum dilatatum* cv ‘Estanzuela Chirú’ en (A) Semilleros en INIA La Estanzuela y (B) en invernáculo de INIA Las Brujas en donde se observa su porte erecto y presencia de 6 a 12 espigas. Imagen (A) obtenida de Coll, (1991).

Específicamente este cultivar fue seleccionado en el Centro de Investigaciones Agrícolas ‘Alberto Boerger’ CIAAB/INIA La Estanzuela a partir de ecotipos hallados en el departamento de Paysandú (Millot, 1969). Presenta un ciclo más largo y alta producción primaveral, factible de utilizar como reserva de forraje en pie en el verano, pero muy susceptible al hongo *C. paspali* (Millot, 1969) Tiene un porte erecto, Sus panojas se mantienen erectas hasta la madurez y tienen 6 a 12 espigas por panoja con anteras violetas y fuerte pigmentación antociánica (**Fig. 1**), con espiguillas menores que las de *P. dilatatum* tipo común. Ha sido propuesto y evaluada como integrante de mezclas forrajeras dirigidas a la obtención de pasturas de mayor producción estival y una vida útil más prolongada (Santiñaque y Carámbula, 1981). El cultivar ha sido evaluado con otras especies del género como *P. urvillei* y *P. notatum* así como contra diferentes accesiones de *P. dilatatum*. En estos trabajos se ha demostrado la mayor producción de forraje, hojas más grandes (Alonso y Monterubbianesi, 2006), así como su alta tasa de producción de forraje y de crecimiento inicial, incluso mayores a las de festuca con un manejo y suelo similar (Speranza *et al.*, 2017). La alta producción de forraje es común para los cultivares hexaploides, así como la resistencia a bajas temperaturas y su alta persistencia (Burson, 1991; Venuto *et al.*, 2003)

1.1.1.2. Importancia de *P. dilatatum* como forrajera

Numerosas especies del género *Paspalum* son consideradas excelentes forrajeras naturales, entre las que podemos encontrar a *P. dilatatum*, *P. notatum* Flüggé y *P. vaginatum* L., siendo *P. dilatatum* la cuarta especie de este género en términos de cantidad de cultivares liberados (Acuña *et al.*, 2019). Actualmente existen 9 y se cultiva mayormente en Australia, Estados Unidos y Uruguay. La mayoría de los cultivares en EE. UU., Argentina, Japón y Australia son pentaploides, mientras que en Uruguay y Estados Unidos también hay hexaploides resultando todos de la selección por ecotipo (Acuña *et al.*, 2019), como es el caso de Chirú. Tienen un gran potencial de producción primavero-estivo-otoñal, y si se logra un correcto manejo se obtiene forraje de buena calidad capaz de cubrir los requerimientos de diferentes producciones animales (Santiñaque y Carámbula, 1981; Carámbula, 2007). Las gramíneas forrajeras como *P. dilatatum* solas o como componentes de las

mezclas serían capaces de aprovechar recursos disponibles en el período estival, como la radiación y las precipitaciones, que en la situación actual son poco aprovechados por las pasturas perennes, ofreciendo forraje en época de deficiencia como la estival (Pizarro, 2002; Speranza *et al.*, 2017).

Es una especie C4 con hábito de crecimiento rizomatosa a cespitosa y reúne todas las características deseables de una planta forrajera (Pizarro, 2002). Presenta una alta productividad y eficiencia de uso de agua y nitrógeno, alta calidad forrajera, y buena adaptación a pastoreo intenso (Robinson *et al.*, 1988; Davies y Cohen, 1992; Acosta, Deregibus y Hammar Aldatz, 1996, 2003; García, Arturi y Ansín, 2000; Couso *et al.*, 2010). Además, es una especie que se adapta bien a diferentes condiciones edáficas, es tolerante a la humedad excesiva y al mismo tiempo resiste sequías moderadas (Rosengurtt, Arrillaga de Maffei y Izaguirre de Artucio, 1970; Carámbula, 2007). Estas propiedades se deben principalmente a su extenso y profundo sistema radicular (Pizarro, 2002). Esta característica le confiere además, desde el punto de vista productivo para la sustentabilidad de los sistemas pastoriles, un potencial extra frente a los posibles escenarios de cambio climático debido a su capacidad superior de tolerancia a la sequía y la eficiencia del uso del agua en comparación con pastos C3 comúnmente utilizados (Couso *et al.*, 2010). Además, se puede cultivar en latitudes más altas que cualquier otra especie de *Paspalum* (Evers y Burson, 2004). Dada su excelente persistencia brinda a las praderas longevidad y un mejor equilibrio entre gramíneas y leguminosas. Esto limita la competencia desarrollada por parte de las leguminosas en la primavera y el verano, lo cual tiende a estabilizar las praderas disminuyendo la infestación de malezas (Carámbula, 2007). Por último, no cubre totalmente el suelo lo que lo hace compatible con otras especies, y la gran mayoría de los rebrotes se produce desde yemas ubicadas por debajo del nivel del suelo, lo cual la hace resistente al pisoteo y a pastoreos intensos (Carámbula, 2007).

1.1.1.3. Limitaciones para el uso de *P. dilatatum* como forrajera

Si bien ha sido una de las primeras gramíneas de ciclo estival que se han utilizado como forrajeras (Skerman y Riveros, 1992), según Pizarro (2002) el uso comercial de *P. dilatatum* en nuestro país está limitado por varios puntos. Entre ellos encontramos el escaso conocimiento de su potencial forrajero, falta de continuidad de las investigaciones en el género, escasa difusión de los

cultivares más promisorios, así como falta de una producción estable de semillas de buena calidad. Sobre este último punto, la disponibilidad de semilla, está limitada por las condiciones ambientales durante la floración, su prolongado periodo de floración, madurez asincrónica de las semillas en los racimos individuales, baja germinación y ruptura de semillas (Ej: Burson, Correa y Potts, 1978; Coll, 1991; Rios *et al.*, 2015; Acuña *et al.*, 2019). A esto hay que sumarle la alta susceptibilidad e infección con el hongo *Claviceps paspali* (Ej: Luttrell, 1977; Hampton, 1984; Schrauf *et al.*, 2003).

Todas estas características son aspectos del mejoramiento genético para la especie, constituyendo la susceptibilidad a *C. paspali* una de las limitaciones más importante para su desarrollo comercial. El sistema reproductivo apomíctico de algunos biotipos como Chirú constituye una dificultad extra para la aplicación de metodologías clásicas de mejoramiento genético para superar algunos de estos problemas (Schrauf *et al.*, 2003). Aunque, se ha determinado que esta desventaja para el mejoramiento clásico es una ventaja para la transgénesis. Este sistema reproductivo permite la producción de una progenie de semillas uniforme y pueden prevenir la dispersión transgénica no intencionada en contraste con los citotipos sexuales de *Paspalum* (Zhang, Lomba y Altpeter, 2007) . Esto debido a que esta forma de reproducción disminuiría las posibilidades de segregación en las semillas del gen de interés y sería un modo de controlar el flujo génico por polinización cruzada en esta especie. Para reafirmar este punto, en Sandhu *et al.* (2010) observaron la transferencia de genes de *P. notatum* tetraploide apomíctico transgénicos a *P. notatum* diploide y tetraploide no transgénicos, en donde a pesar de las condiciones favorables para el flujo de genes, la frecuencia observada fue baja (0 a 0,05%). Por lo tanto, las barreras de apomixis como de ploidía parecen suprimir drásticamente el flujo de genes mediado por polen en *P. notatum* apomíctico y transgénico, siendo datos potencialmente promisorios para Chirú.

1.1.2. *Claviceps paspali*

Las especies del género *Claviceps* son los agentes causales de la “enfermedad azucarada” (Fig. 2) y pertenecen a la familia Clavicipitaceae del orden Hypocreales. Existen 59 especies reportadas de este hongo filamentoso llamadas Ergot en general (Tenberge, 1999; Píchová *et al.*,

2018), y todas se caracterizan por ser especies biotróficas que comparten un estilo de vida no sistémico y especializados en colonizar el ovario de sus hospederos (Píchová *et al.*, 2018). Las especies de este género en total parasitan más de 600 plantas monocotiledóneas de las familias *Poaceae*, *Juncaceae* y *Cyperaceae*, incluidos pastos forrajeros y los principales cereales del mundo: trigo, arroz, maíz, cebada, sorgo, avena, centeno, mijo (Tenberge, 1999; Pažoutová *et al.*, 2002). Filogenéticamente se dividen en cuatro secciones (*Citrinae*, *Claviceps*, *Paspalorum*, *Pusillae*) en base a combinaciones de filogenia, morfología, producción de metabolito secundarios, distribución geográfica y espectro de hospederos (Píchová *et al.*, 2018).

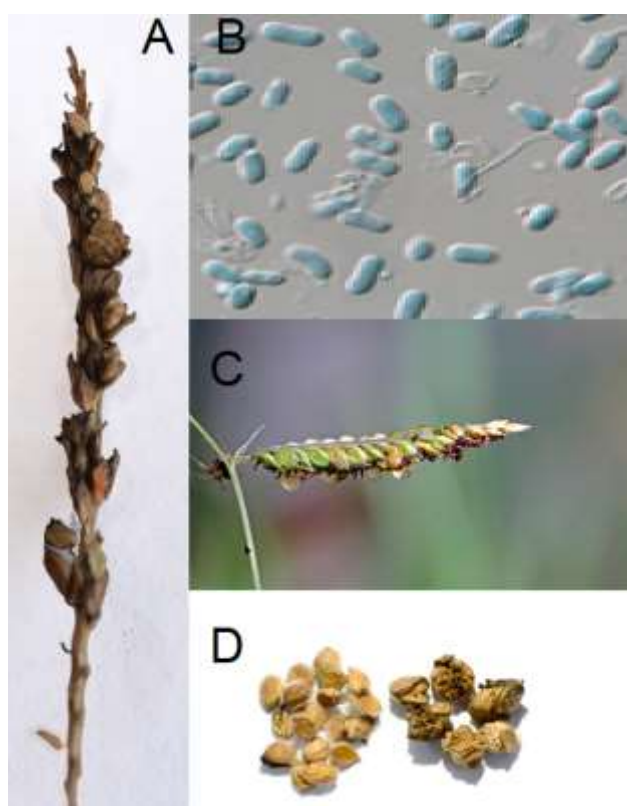


Figura 2. Síntomas del Ergot producido por *C. paspali* en *P. dilatatum*. A- Panoja de *P. dilatatum* en la etapa tardía de infección en donde se ve la formación de esclerotos. B- Conidios de *C. paspali* obtenidos a partir de mielecilla. C- Panoja de *P. dilatatum* con mielecilla, el primer síntoma visibles de la infección con *C. paspali*. D- Comparación entre semillas de Chirú y esclerotos de *C. paspali*.

La “enfermedad azucarada” en *Paspalum* spp. es causado principalmente por *Claviceps paspali* descrito por Stevens & Hall (1910). Es la única especie integrante de la sección *Paspalorum* dentro del género y debido a que la evolución, y diversidad taxonómica del género está vinculada a

la evolución de sus plantas hospederas se postuló que esta especie es originaria de América del Sur al igual que el género *Paspalum* (Pažoutová y Parbery, 1999). El estudio sobre esta especie en particular es limitado. Se han investigado las propiedades de crecimiento y las características morfológicas de algunos aislamientos (Řiřicová, Pokorný y Řeháček, 1986; Rylko *et al.*, 1988), pero en su mayoría, los estudios se han basado en la identificación de aislamientos con propiedades biotecnológicas como la producción de alcaloides (Tscherter y Hauth, 1974; Icovx, Flieger y Ek, 1982; Řiřicová, Pokorný y Řeháček, 1986; Gaberc-Porekar *et al.*, 1987), mientras que escasos estudios se han realizado sobre su biología (Brown, 1916; Luttrell, 1977; D' Esposito y Lopez, 2001). Su única presencia dentro de la sección *Paspalorum* puede deberse al escaso estudio que se ha realizado de esta especie desde un punto de vista filogenético. A diferencia de *C. paspali* en especies cercanas como *Claviceps purpurea* o *Claviceps fusiformis*, si se han realizado prospecciones de aislamiento (Ej: Pažoutová y Tudzynski, 1999; Fisher, Gordon y Ditomaso, 2005) así como diversos estudios de diversidad basados en análisis de secuencias de regiones de genes conservados y microsatélites (Ej: Pažoutová *et al.*, 2015; Gilmore *et al.*, 2016; Pířhová *et al.*, 2018).

C. paspali al igual que todas las especies del género *Claviceps* muestra estricta especificidad de órganos, atacando exclusivamente los ovarios de gramíneas jóvenes. La infección con estos hongos produce aborto de flores y reemplazo de la semilla por sus esclerotos (masa grisácea del hongo que reemplaza la semilla y adquiere una configuración semejante a la misma, pero de mayor tamaño, coloración oscura y consistencia dura). Se ha mostrado que las esporas de *Claviceps paspali* (al igual que las de otras especies relacionadas como *C. purpurea*) no son capaces de penetrar a través de las glumas, por lo que la vía de entrada es mediante los estigmas y estilo (Luttrell, 1977, 1980; Tenberge, 1999). En el caso particular de la infección en *P. dilatatum*, se documentó que los estigmas son eficientes en la captura tanto de polen y así como de las esporas del hongo en donde las esporas son el inóculo primario que germina e infecta el ovario luego de 1 a 4 días (Luttrell, 1977). Esta germinación de la espora en el estigma se ha propuesto que se realiza simulando la polinización (Tenberge *et al.*, 1999) y evitando así el reconocimiento de la hifa por parte del hospedero. Según observaciones de campo realizadas por Wali *et al.*, (2013) la infección con la “enfermedad azucarada” puede algunas veces representar efectos benéficos indirectos para la planta hospedante. Por lo tanto, *Claviceps* spp. puede servir como un microorganismo mutualista defensivo condicional para su pasto huésped, y la interacción patógena puede variar desde antagónica hasta mutualista dependiendo de la situación (Tenberge, 1999; Oeser *et al.*, 2002; Wali *et al.*, 2013; Miedaner y Geiger, 2015).

1.1.2.1. Ciclo de vida y especificidad

Como se describe en la **Figura 3**, el ciclo de vida cuenta con una fase sexual y una asexual. Su ciclo asexual comienza con ascosporas transportadas por el viento aterrizando en huéspedes susceptibles en primavera. Todas las etapas que surgen de su ciclo de vida se pueden desarrollar a partir de una sola espora, por lo tanto, se denominan homotálicos (Esser y Tudzynski, 1978). Típicamente, las esporas se unen y germinan en las superficies del pistilo de flores receptivas del huésped e inician un patrón de patogénesis. El hongo penetra en los pelos estigmáticos y por el estilo creciendo hacia el tejido transmisor del ovario. Durante esta fase, *C. paspali* crece principalmente de forma intercelular (Luttrell, 1977; D' Esposito y Lopez, 2001). Una vez que el hongo llega a la base del ovario, se introduce en el sistema vascular de la planta para ganar nutrientes y reemplaza progresivamente el tejido vegetal con masa fúngica. Consigue mantener vivas las células de la planta durante un período de tiempo prolongado y, por lo tanto, se clasifica como un biótrofo, así como un patógeno ecológicamente obligado ya que obtiene los nutrientes solo de los tejidos del huésped. Las hifas de *C. paspali* en general invaden y colonizan exclusivamente el ovario, creciendo hasta la punta del eje del ovario (raquilla), estableciendo una interacción huésped-patógeno muy específica. Esta interacción específica se caracteriza en que el hongo nunca invade ninguna parte más abajo del ovario, pero si proliferan por encima de él (Luttrell, 1977; Tenberge, 1999; D' Esposito y Lopez, 2001). Durante los primeros días de infección el hongo crece profusamente en el ovario, produciendo masas de esporas anamórficas que se exudan en una secreción densa, pegajosa de color ámbar, caracterizada por una alta presencia de conidios (**Fig. 2**). La presencia de esta exudación es la primera evidencia de la infección con el hongo (signo de la enfermedad). Estos conidios se transfieren a otras flores, mediante contacto espiga-espiga o por vectores como los insectos. De este modo se propagan espacialmente en el campo empleando el hospedero para su propia proliferación (Luttrell, 1977; D' Esposito y Lopez, 2001).

El escleroto funciona como su estructura de la reproducción sexual (Luttrell, 1977; D' Esposito y Lopez, 2001), y entre los 15 o 20 días se comienza a notar la formación de esta estructura ocupando el lugar correspondiente a la semilla. Este escleroto es su forma de supervivencia fuera de su hospedero y la necesita para comenzar la infección en la próxima floración (D' Esposito y Lopez, 2001). La fase sexual del ciclo se desarrolla en la superficie del suelo, y comienza con el escleroto, que después de pasar el invierno sobre la tierra inicia su fructificación estimulado por la humedad, la temperatura superior a 25°C y un fotoperiodo que va aumentando (Cunfer y Marshall, 1977; Cunfer y Seckinger, 1977). La germinación produce

estromas que terminan liberando esporas que son llevadas nuevamente por los insectos hasta las inflorescencias, generando así el inóculo primario y dando lugar a nuevos focos de infección (Lutrell, 1977; D' Esposito y Lopez, 2001).

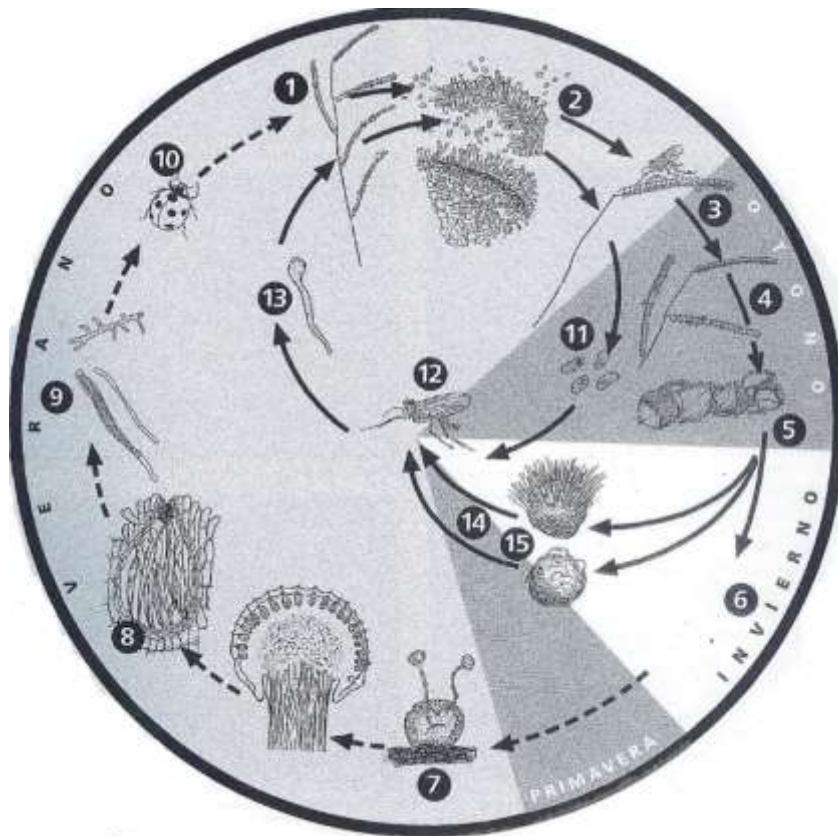


Figura 3. Diagrama del ciclo biológico de *C. paspali*. Las flechas continuas representan el ciclo asexual mientras que las discontinuas el sexual. Obtenido de D' Esposito y Lopez (2001).

1.1.2.2. Toxicidad e importancia económica de la infección

C. paspali no tiene un efecto fitopatológico directo en su hospedero, sino que los mayores problemas generados por la infección son la producción de alcaloides como alcaloides del Ergot (AE) y los índol diterpenos (IDT), que son tóxicos para los mamíferos, incluidos los humanos (Cole *et al.*, 1977; Cawdell-Smith, Scrivener y Bryden, 2010; Kozák *et al.*, 2019), y por tener también un gran impacto en la producción de semillas en los cultivos afectados (Pizarro, 2002). Su rápida diseminación por insectos (Feldman, O'Brien y Arnold, 2008) y la alta susceptibilidad de cultivares de importancia, representa un problema de relevancia. Desde la década del 60 distintos países entre ellos Italia, Inglaterra, Francia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Argentina y Brasil han comunicado casos de intoxicación por toxinas de *C. paspali* (Ej: Hampton, 1984; Cawdell-Smith, Scrivener y Bryden, 2010). Los animales intoxicados presentan síntomas característicos de las afecciones del sistema nervioso central, con un índice de morbilidad entre el 15 y 30%, y una mortalidad casi nula (Cole *et al.*, 1977; D'Esposito y Lopez, 2001; Cawdell-Smith, Scrivener y Bryden, 2010). De todas formas, de las especies de *Claviceps* que afectan a *Paspalum*, solo se ha informado que los esclerotos de *C. paspali* contienen alcaloides como AE y IDT (Cole *et al.*, 1977; Píchová *et al.*, 2018, Schardl *et al.*, 2013), a diferencia de los de *C. clavispora* que no producen AE (Pichova *et al.*, 2018). La alimentación con forrajes contaminados con Ergot, en particular, los IDT como *paspalinina* (PNE) y *paspalitrem* A (PTMA) y B (PTMB) (Cole *et al.*, 1977; Uhlig *et al.*, 2009), resulta en síntomas como sacudidas involuntarias, temblores y también puede provocar convulsiones y afectar el rendimiento del ganado, siendo la pérdida de peso muy significativa en dichos animales (Cawdell-Smith, Scrivener y Bryden, 2010; Coufal-Majewski *et al.*, 2016). Aunque *C. paspali* también produce AE, su concentración es menos problemática para el ganado (Evans y Gupta, 2018).

1.1.2.3. Mejoramiento genético de plantas enfocado a resistencia a *Claviceps* spp. y antecedentes en *Paspalum* spp.

Característicamente, el proceso de infección de *Claviceps* spp. es tejido-específico ya que sólo las flores de las espigas de gramíneas en flor se infectan. Las características de la planta que reducen la infección con *Claviceps* spp. incluyen la polinización inmediata de los estigmas

receptivos, la floración cerrada (cleistogamia) y la resistencia fisiológica (Miedaner y Geiger, 2015).

Para una enfermedad de trigo y cebada que tiene un modo de infección similar a *Claviceps* spp., causado por *Fusarium graminearum*, se ha buscado desarrollar líneas de trigo totalmente cleistógamas para mejorar la resistencia a la enfermedad. Debido a que las flores de trigo generalmente se abren por un corto tiempo, las líneas de trigo con flores permanentemente cerradas podrían tener una mejor resistencia a *Claviceps* spp. y la Fusariosis porque las esporas no podrían entrar en las flores para aterrizar en el estigma. La cleistogamia en este caso actuaría esencialmente como una barrera a las esporas durante el tiempo en que la infección podría ocurrir (Kubo *et al.*, 2010).

Los fungicidas comerciales tienen una eficacia limitada en el control del Ergot y su aplicación depende mucho del clima. En general, el control por fungicidas es más efectivo con baja presión de inóculo, en condiciones secas y cuando la pulverización ocurre antes del inicio de la enfermedad (Miedaner y Geiger, 2015; Rios *et al.*, 2015; Dung *et al.*, 2018). Sin embargo, la necesidad de pulverizar varias veces antes de la antesis hace que la aplicación de fungicidas en los campos de los agricultores sea económicamente inviable (Alderman, 2006). Hampton (1977) demostró que la aplicación de fungicidas en la antesis media y temprana para prevenir la infección secundaria de conidios, reduciendo significativamente la cantidad de esclerotos de *Claviceps* spp. en la semilla cosechada en comparación con los controles no tratados, pero no controla el patógeno.

Existen reportes de especies que son menos susceptibles y hasta inmunes a este hongo en el género *Paspalum*. Especies como *P. urvillei* (Schrauf *et al* 2003), *P. notatum* (Burton 1955, Mackowiak, Kenworthy y Quesenberry, 2015), han demostrado ser menos susceptibles a la infección con *C. paspali*. *P. malacophyllum* Trin. ha sido reportada al día de hoy como la única especie inmune al Ergot (Bennet y Bashow., 1960; Bennett y Bashaw, 1966). Esta especie es altamente fértil y se reproduce principalmente por apomixis facultativa y produce una alta cantidad de semillas. Su distribución natural se extiende desde México hasta Argentina (Hojsgaard *et al.*, 2016). Aunque *P. malacophyllum* tiene buena palatabilidad como pasto forrajero, no persiste bien bajo pastoreo (Burton 1940; Stephens 1941). Cultivares de *P. malacophyllum* resistente se cruzaron con *P. urvillei* (Burton, 1945) y con *P. dilatatum* (Burton, 1943; Atwood, 1947; Bennett, Burson y Bashaw, 1969). Los híbridos mostraron una transmisión de la resistencia y se hipotetizó que la resistencia podría ser dominante. Sin embargo, no se ha detectado la presencia de genes de resistencia (genes R), así como no se han dilucidado los mecanismos moleculares detrás de esta resistencia. Esto es contrario a lo que ha ocurrido en trigo en donde se han detectado cuatro QTLs relacionados con la resistencia parcial al Ergot en el cultivar cv Greenshank producido por *C.*

purpurea (Gordon *et al.*, 2015). Estos tienen efectos sobre la reducción de la producción de mielecilla y en la reducción en la biomasa de esclerotos. Esto sugeriría que estos QTL actúan a través de un mecanismo que impacta directamente en la capacidad de *C. purpurea* para crecer y completar su ciclo de vida dentro de la flor de trigo pero no de prevenir la infección (Gordon *et al.*, 2020). Estas resistencias parciales pueden ser una estrategia para reducir el inóculo y la propagación secundaria de la enfermedad, así como disminuir el tamaño de los esclerotos que limitan el inóculo primario ya que la producción de las ascosporas está directamente relacionado al tamaño del escleroto (Gordon *et al.*, 2020, Cooke y Mitchell, 1966).

Dentro de las especies de *Paspalum* menos susceptibles a la enfermedad se ha informado que los genotipos diploides de *P. notatum*, como "Pensacola", son más resistentes al Ergot en comparación con los cultivares tetraploides (Burton, 1955). Según Rios *et al* (2015) esto puede estar relacionado a la mayor producción de semillas de los genotipos diploides que los tetraploides (Knight y Bennett, 1953). Esta es una razón potencial para la reducción de la infección encontrada en los genotipos diploides, ya que la infección del Ergot se correlacionó negativamente con la fertilidad (Burton y Lefebvre, 1948). Se ha propuesto que esta menor susceptibilidad se puede deber a métodos de escape presentes en las especies como la rápida polinización (Burton y Lefebvre 1948, Schrauff *et al*, 2003). Estos métodos de escape como el momento de floración y a la rapidez con que se da la germinación pueden estar relacionados a los ya documentados en otras especies susceptibles a *Claviceps* spp. como sorgo, mijo y trigo (Ej: Mantle y Swan, 1995; Chakraborty y Ryley, 2008; Cisneros-López *et al.*, 2010; Eugenia Cisneros-López, Mendoza-Onofre y González-Hernández, 2012). Esto ya que el período de susceptibilidad de una planta para la infección con Ergot depende del tiempo que sus flores permanezcan abiertas y sin fertilizar (Montes-garcía *et al.*, 2008; Cisneros-López *et al.*, 2010; Miedaner y Geiger, 2015).

Otra estrategia para obtener resistencia a *Claviceps* spp podría ser mediante métodos de ingeniería genética como la transgénesis o edición génica (Diaz *et al.*, 2004). Una ventaja para la transgénesis en *P. dilatatum* apomíctico, sería que una vez hallado un material sobresaliente el mismo no segregaría, siendo además su forma de reproducción asexual un modo de controlar el flujo génico. Además, se ha logrado un protocolo eficiente de transformación para esta especie mediante biolística (Giordano, Liu, *et al.*, 2014; Viñas, 2015). En trigo se realizó la prueba de acumular un mayor nivel de proteínas inhibitoras de la poligalacturonasa (PGIP) o un alto grado de metil esterificación de la pectina de la pared celular para afectar la infección por patógenos y el desarrollo de síntomas de la "enfermedad azucarada" producida por el Ergot (Volpi *et al.*, 2013). Con este fin, se seleccionaron líneas de trigo transgénicas que expresaban el gen del frijol PvPGIP2 o el inhibidor de pectina metil esterasa de *Actinidia chinensis* (AcPMEI) que causó un aumento en

el nivel de esterificación de metilo de la pectina de la pared celular. Se había demostrado previamente que ambas líneas de trigo transgénicas tienen una resistencia mejorada contra los hongos necrotizantes patógenos *F. graminearum* y *B. sorokiniana*. Las plantas transgénicas de trigo que poseen un alto grado de metil-esterificación de la pectina mostraron reducción en los síntomas de Ergot en la etapa temprana del desarrollo de la enfermedad. Esto sugiere la posibilidad de explotar genotipos con un alto grado de esterificación de metilpectina para mejorar la resistencia del trigo contra la enfermedad (Volpi *et al.*, 2013) que podría ser utilizada también en especies de *Paspalum*. Otra estrategia que ha sido planteada es la expresión de proteínas antifúngicas como método de control para *C. paspali* (Diaz *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

Como presentamos, Chirú es una gramínea con un alto potencial forrajero pero que en gran medida no se ha podido expandir su uso debido a su alta susceptibilidad a *C. paspali*. Sin embargo, no existe ninguna información desde un punto de vista molecular disponible sobre el patosistema *C. paspali*-*P. dilatatum*, por lo tanto, en este trabajo nos proponemos:

2.1.1. Objetivo General

Determinar la variación de la expresión génica en etapas tempranas de la infección en la interacción *Paspalum dilatatum* cv ‘Estanzuela Chirú’-*C. paspali*.

2.1.2. Objetivos Específicos

- Construir una referencia de las secuencias codificantes de *P. dilatatum* cv ‘Estanzuela Chirú’ mediante el ensamblado *de novo* del transcriptoma
- Determinar genes específicos de estigma y estilo en *P. dilatatum* cv ‘Estanzuela Chirú’ y aquellos genes que presentan una expresión diferencial significativa en el estadio receptivo y no receptivo al polen.
- Determinar posibles proteínas candidatas a ser secretadas y factores de patogenicidad en el genoma de *C. paspali*.
- Determinar posibles factores de patogenicidad de *C. paspali* que efectivamente se expresen durante la primera etapa de infección del estigma de *P. dilatatum* cv ‘Estanzuela Chirú’
- Validar mediante RT-qPCR la expresión de factores de patogenicidad involucrados durante la infección de *C. paspali* en *P. dilatatum* cv ‘Estanzuela Chirú’.
- Generar una colección de *C. paspali* nacional, caracterizarla molecularmente y estudiar su diversidad.

3. CAPITULO I

El patosistema *Paspalum dilatatum-Claviceps paspali*: una primera visión de su interacción utilizando el estudio de expresión con ARN-seq

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. ¿Qué es la secuenciación del ARN?

La secuenciación del ARN o ARN-seq es una estrategia para obtención de perfiles transcriptómicos que usa tecnologías de secuenciación profunda (Wang, Gerstein y Snyder, 2009). La creación de estos perfiles transcriptómicos con ARN-seq se ha convertido en una poderosa herramienta para analizar los niveles de expresión génica entre múltiples muestras, ya que proporciona información y una medida digital de la abundancia y presencia de transcritos de genes nuevos y conocidos (Mortazavi *et al.*, 2008). A diferencia de los microarrays y otras técnicas, el ARN-seq no requiere información previa sobre el transcriptoma que se está estudiando (Ballouz, Verleyen y Gillis, 2015). Esto sumado su poder de resolución, la eficiencia y las ventajas de la disminución de los costos ha llevado que sea una de las técnicas más utilizadas para este tipo de análisis (Marioni *et al.*, 2008; Finotello y Di Camillo, 2015).

El protocolo estándar del ARN-seq comienza con la extracción de ARN celular de una muestra biológica. Luego, el ARN se transcribe inversamente en ADNc, se amplifica y luego se añaden secuencias de adaptadores en cada extremo de la molécula de ADNc para que sea compatible con la tecnología de secuenciación respectiva. Existen protocolos de generación de librerías hebra específica y sin hebra específica (Ozsolak *et al.*, 2009). El método más utilizado para la secuencia de ARN es hebra específica, especialmente cuando se usa secuenciación de pares (paired-end, ambos extremos del fragmento). Este método se basa en la incorporación de dUTP durante la síntesis de ADNc de la segunda cadena seguida de la degradación de la cadena sin dUTP (Levin *et al.*, 2010). La secuenciación de la biblioteca final de ADNc da como resultado la generación de "lecturas" (*reads*) de secuenciación, que son tramos de secuencia de una longitud definida (dependiendo de la tecnología NGS pueden variar entre 50 y 250 nucleótidos) que corresponden al ADNc de entrada. El ARN-seq se basa en el principio de que, mediante la secuenciación de moléculas de ADNc, la expresión de cualquier transcripto de ARN celular puede deducirse del recuento de *reads* asignado a él. En los análisis posteriores a la secuenciación, las lecturas son asignadas por homología a secuencias de genes conocidos (propia especie si hay datos disponibles o cercanas) en bases de datos libres. Esto permite, por último, enumerar las lecturas que se corresponden con cada gen identificado pudiendo así determinar su nivel de expresión relativo en la condición muestreada. Luego, el uso más común y popular de ARN-seq es el análisis de

expresión diferencial de genes o la abundancia de transcripción de perfiles entre muestras (Marioni *et al.*, 2008).

De hecho, la investigación transcriptómica fue revolucionada por la introducción de tecnologías de Nueva Generación de Secuenciación (NGS por sus siglas en inglés) que permitió el análisis de ARN a través de secuenciación de ADNc a escala masiva (Metzker, 2010; Oszolak y Milos, 2011). Los métodos de secuenciación más nuevos que se desarrollaron después del método automatizado de Sanger se denominan colectivamente NGS, y emplean una combinación de estrategias que incluyen preparación de librerías, secuenciación e imagen, ensamblaje y anotación (Metzker, 2010). Inicialmente aplicado a la genómica, las tecnologías NGS se han adaptado para la secuenciación masivamente paralela de ADNc. Uno de los principales beneficios de estas plataformas NGS es la producción de enormes volúmenes de datos a bajo costo. Illumina / Solexa, Roche / 454 (también conocido como Pirosecuenciado) o ABI / SOLiD fueron las primeras tecnologías NGS en ingresar al mercado y hoy en día ya se pueden encontrar secuenciadores de tercera generación desarrollados más recientemente (Pacific Biosciences y Oxford Nanopore) (Metzker, 2010; Quail *et al.*, 2012). Aunque estos sistemas tienen principios de funcionamiento muy diferentes, todos comparten un aumento dramático en la velocidad en comparación con la secuenciación convencional de Sanger: largos tramos de ADN o incluso genomas completos podrían secuenciarse en varias horas (Metzker, 2010). Las diversas características y ventajas técnicas de las diferentes plataformas NGS en aplicaciones particulares han sido ampliamente revisadas (Branton *et al.*, 2008; Metzker, 2010; Liu *et al.*, 2012; Quail *et al.*, 2012; Hodkinson y Grice, 2015).

El ARN-seq permitió la obtención de transcriptomas completos y generó una nueva era en el campo de la transcriptómica (Wang, Gerstein y Snyder, 2009). Además, las secuencias de ARN no requieren (necesariamente) una anotación previa del genoma correspondiente (aunque se beneficie de él), es independiente del organismo y tiene el potencial de capturar todas las transcripciones celulares (codificantes y no codificantes). Los enfoques basados ARN-seq han proporcionado una comprensión progresivamente completa de los aspectos cualitativos y cuantitativos de las transcripciones expresadas en genomas procariotas y eucariotas (Mortazavi *et al.*, 2008; Oszolak y Milos, 2011). Es importante destacar que no solo se puede obtener información cuantitativa sobre la expresión génica (por ejemplo, expresión diferencial), sino también información cualitativa ya que permite la detección de polimorfismos, la identificación de UTR, sitios de procesamiento e isoformas en eucariotas, entre otras aplicaciones (Oszolak y Milos, 2011).

3.1.1.1. Secuenciación, transcriptómica y *Paspalum dilatatum*

A pesar de la importancia como forrajeras hay pocos recursos genéticos disponibles para el género *Paspalum*. Se han generado secuencias genómicas completas para solo unas pocas gramíneas (Giordano, Cogan, *et al.*, 2014), entre las cuales no encontramos ninguna del género *Paspalum*. A pesar de los avances tecnológicos realizados en los últimos años, la tarea de producir una secuencia completa del genoma de una planta superior sigue siendo una tarea importante que requiere considerables recursos. Las secuencias de genoma de importancia económica al estudiar especies de *Paspalum* son *Sorghum bicolor* L. y *Setaria itálica* (Qi *et al.*, 2019). Estas especies representan dos genomas altamente relevantes para mejorar cualquier dato generado y usar como referencias que podrían ayudar en la anotación de secuencia de *P. dilatatum*.

P. dilatatum tiene un genoma relativamente chico con valores aproximados de Cx entre 579 y 609 Mb (Vaio *et al.*, 2007), sin embargo, no se han ensamblado genomas de ningún biotipo de esta especie seguramente debido a las complejidades de llevar a cabo ensamblados de genomas poliploides. Los recursos genómicos y transcriptómicos para *P. dilatatum* están limitados a 428 secuencias de nucleótidos y 346 proteínas disponibles en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI), un set de datos de ARN-seq de *P. dilatatum* cv Primo (Giordano, Cogan, *et al.*, 2014) y una secuencia completa del plastosoma (Burke *et al.*, 2016). En términos generales, en el género *Paspalum*, el número de secuencias de nucleótidos disponibles es de 5523 (NCBI 02/12/2019). Los diferentes trabajos relacionados al análisis transcriptómico de especies del género *Paspalum* han utilizado tecnologías de NGS como Roche 454 Life Sciences GS FLX *sequencing platform* y más recientemente con Illumina (Jia *et al.*, 2015; Ortiz *et al.*, 2019; de Oliveira *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020). La gran mayoría de los datos de secuenciación en este género se han obtenido a partir de trabajos relacionados a la identificación de genes involucrados en la apomixis (Laspina *et al.*, 2008; Podio *et al.*, 2014; Ortiz *et al.*, 2017; de Oliveira *et al.*, 2020) y la detección de SSR (Giordano *et al.*, 2015). Recientemente las secuencias de datos genómicos sin procesar de *P. simplex* (Galla *et al.*, 2019) y *P. virgatum* (Qi *et al.*, 2019) se depositaron en el NCBI (número de acceso SRA SRX1149360 y SRA PRJNA514362 respectivamente), aunque no se ha publicado un ensamblado de estos datos aún.

3.1.1.2. ARN-seq y las interacciones planta-patógeno

La aplicación de tecnologías de NGS ha producido importantes avances en nuestra comprensión de los procesos biológicos. La alta resolución del ARN-seq permite un análisis en paralelo de diferentes organismos que interactúan entre sí, por ejemplo, durante los procesos de infección (Westermann, Barquist y Vogel, 2017). Las interacciones huésped-patógeno son intercambios dinámicos donde la heterogeneidad transcripcional tanto del huésped como del patógeno puede conducir a muchos resultados diversos a través de distintas vías moleculares (Naidoo *et al.*, 2014). Hasta hace poco, los enfoques transcriptómicos se habían aplicado en el huésped y el patógeno por separado para obtener el perfil de expresión génica de cada organismo y obtener información sobre la biología de la infección o los mecanismos de defensa del huésped (Westermann, 2014). Un protocolo de un solo paso para el perfil simultáneo de los transcriptomas del huésped y el patógeno es muy atractivo por obtener el perfil de la expresión del gen del patógeno dentro de su nicho de células huésped, junto con la respuesta del huésped correspondiente sin interrumpir esta estrecha interacción proporcionando una visión sin precedentes y sin perturbaciones del proceso de infección (Westermann y Vogel, 2018; O’Keeffe y Jones, 2019). Relacionar directamente los cambios en la expresión génica en un organismo con las respuestas en el respectivo contra jugador podría revelar nuevos mecanismos de cómo interactúan estos organismos. (Westermann *et al.*, 2012). La técnica conocida como ARN-seq dual, *in planta* ARN-seq, ARN-seq simultánea o ARN-seq comparativa, es una técnica relativamente nueva en el campo vegetal, que permite el estudio de las interacciones planta-patógeno en cultivos herbáceos (Ej: Zhu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Serba *et al.*, 2015; Oeser *et al.*, 2017), así como en árboles (Hayden *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). Ayuda a obtener información de los mecanismos de defensa complejos que pueden volverse ineficaces cuando los patógenos interfieren con uno o más de los diversos procesos necesarios para la defensa del huésped. También, la obtención de un perfil global de la expresión génica del patógeno durante la infección permitiría caracterizar la expresión de genes que tienen supuestos roles clave durante la infección y el crecimiento dentro de los tejidos del huésped, el cual es diferente al perfil expresado durante su cultivo axénico (Ej: Oeser *et al.* 2009, Lanver *et al.* 2018). Todo esto, proporciona valiosos recursos de investigación y herramientas para comprender la dinámica de las interacciones entre el patógeno y su hospedero en diferentes etapas de infección y tejidos específicos.

Específicamente la plataforma de secuenciación Illumina ha sido utilizada previamente para

estudios de interacción planta-*Claviceps* (Kind *et al.*, 2017; Oeser *et al.*, 2017). Los estudios moleculares más recientes en *Claviceps spp.* y la expresión *in planta* se han centrado en investigar efectores secretados producidos por *C. purpurea* durante la infección de centeno (Oeser *et al.*, 2017), así como de mostrar como el hongo es reconocido por el hospedero y como este altera ciertas vías como la señalizaciones por fitohormonas. También, el uso del análisis transcriptómico ha ayudado a identificar efectores secretados y su importancia en la infección. Por ejemplo, varios genes identificados *in silico* como efectores secretados se encuentran subexpresados en cepas con virulencia atenuada de *C. purpurea*. (Oeser *et al* 2017).

En cuanto a las interacciones *Paspalum*-patógenos hoy en día no se han publicados trabajos realizados basados en ARN-seq. En parte debido a su complejo genoma, y por estar pobremente caracterizado a nivel molecular, especialmente con respecto a las respuestas del transcriptoma relacionadas, por ejemplo, a estrés biótico, señalización hormonal y metabolismo. Esto sin dudas ha obstaculizado la caracterización de la interacción *Claviceps-Paspalum*, ya que la caracterización de ambos, tanto del patógeno como del huésped es importante para dilucidar los mecanismos de infección de patógenos biotróficos exitosos como *Claviceps* (Kind *et al* 2017). Una combinación única de varias características (biotrófica, órgano-restringida, restringido al género *Paspalum*) caracteriza la infección de *C. paspali*, lo que indica una estrategia que difiere de la de otros patógenos. Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos de infección específicos de *C. paspali* contribuirá a la comprensión del sistema de defensa de la planta.

3.1.2. Interacciones planta-hongo: el secretoma, efectores de virulencia y la respuesta de defensa vegetal.

Para establecer una interacción compatible que conduzca a la proliferación, los hongos deben evitar la respuesta de inmunidad promovida por el reconocimiento del patógeno por la planta o bien hacer frente a ella o suprimirla. La teoría clásica del modelo del Zig-Zag dice que el sistema de detección está compuesto por proteínas que se encuentran en diferentes compartimentos subcelulares (Adachi y Tsuda, 2019). Uno de estos compartimientos es la membrana celular, en

donde se encuentran receptores de transmembrana de reconocimiento de patrones (PRR) que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Boutrot y Zipfel, 2017). Los patógenos pueden dañar la pared celular, liberando patrones moleculares asociados al daño (DAMP) y que también son reconocidos por estos receptores (Boller y Felix, 2009). Los PRR perciben PAMP extracelulares para activar la inmunidad activada por PAMP/DAMP (PTI). La PTI constituye la primera línea de defensa de la planta, es patógeno inespecífico y se reconocen PAMPs ampliamente conservados a través de todos los hongos que colonizan plantas (Lo Presti *et al.*, 2015). Sin embargo, los patógenos son capaces de evitar este mecanismo mediante la secreción de las llamadas proteínas efectoras (Jonge, Bolton y Thomma, 2011). Estas proteínas impiden la PTI, por ejemplo, suprimiendo los mecanismos de defensa, causando una interacción susceptible (ETS o susceptibilidad inducida por efectores). Las plantas han evolucionado la superficie celular y los receptores intracelulares para detectar la presencia de estas proteínas secretadas que funcionan como efectores de virulencia (Boutrot y Zipfel, 2017). En base a estas, una segunda línea de defensa presente en la planta son los receptores de resistencia intracelular y a veces extracelulares (Stotz *et al.*, 2014), que reconocen directamente efectores específicos o indirectamente sus efectos de interacción en los componentes de la célula hospedera. Esto activa una respuesta conocida como inmunidad activada por efector (ETI) (Lolle, Stevens y Coaker, 2020). Estos receptores o genes de resistencia son los que normalmente se emplean en los programas clásicos de mejoramiento (Lacombe *et al.*, 2010; Jubic *et al.*, 2019; Lolle, Stevens y Coaker, 2020). Los receptores más abundantes caracterizados hasta la fecha comprenden una sola familia que codifica proteínas del receptor multidominio intracelular que llevan un sitio de unión a nucleótidos (NBS) y un dominio de repetición rico en leucina (LRR). Estos se conocen como receptores inmunes NLR (Borrelli *et al.*, 2018; Araújo *et al.*, 2020; Lolle, Stevens y Coaker, 2020). Es importante también tener en cuenta que excepciones a la regla y que no todos los efectores, son translocados dentro del citoplasma celular y algunos podrían ser reconocidos en el apoplasto por receptores extracelulares estructuralmente similares a PRRs (Kanyuka y Rudd, 2019; Wan *et al.*, 2019). La activación de esta vía induce una respuesta inmune robusta, que a menudo se acompaña de una respuesta de hipersensibilidad (HR) que genera muerte celular en el sitio de la infección que especialmente dificulta la propagación de patógenos biótros y hemibiótrofos (Schwessinger y Zipfel, 2008). A su vez, la selección natural en los hongos lleva a evitar la ETI, ya sea perdiendo/alterando el efector de avirulencia o ganando efectores adicionales (Stergiopoulos y de Wit, 2009; Zipfel, 2009). Curiosamente, aunque los PRR y los NLR son estructuralmente diferentes y se localizan en compartimentos subcelulares distintos, la respuesta que desencadenan comparte vías de señalización como las del Ca^{+} , proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), especies

reactivas de oxígeno (ROS) y la señalización por fitohormonas (Derksen, Rampitsch y Daayf, 2013; Birkenbihl, Liu y Somssich, 2017; Kadota *et al.*, 2019; Lolle, Stevens y Coaker, 2020).

La colonización por hongos biótrofos con interacción compatible con su huésped se rigen por cientos de moléculas efectoras secretadas (Lo Presti *et al.*, 2015; Selin *et al.*, 2016). Estas proteínas se secretan al apoplasto o a interfaces biotróficas especializadas como haustorios, así como también se pueden translocar dentro de las células huésped (Zipfel, 2009). Consisten entre otras de enzimas hidrolíticas, proteínas tóxicas y moléculas pequeñas, con la función de suprimir las respuestas de defensa de las plantas y modular la fisiología de las plantas para acomodar a los invasores fúngicos y proporcionarles nutrientes (Stotz *et al.*, 2014). Entre otras, lo logran mediante la inhibición de las enzimas líticas secretadas por el huésped, la modulación del sistema de ubiquitinación de la planta, la autofagia y el bloqueo de la exposición de la quitina (una de las principales PAMP fúngica) a su receptor correspondiente (Irieda *et al.*, 2019). En general, los efectores se expresan sólo después del contacto con la planta. Su perfil de expresión está estrechamente ligado a los diferentes estadios de infección y puede verse afectado por el tipo de célula y/u órgano que se está infectando. El repertorio fúngico de las proteínas secretadas que participan en la interacción hongo-planta probablemente influye el estilo de vida del hongo y el nivel de especialización del huésped (Lo Presti *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016). Si bien la identificación de proteínas secretadas generalmente no es un problema mediante análisis *in silico* del genoma fúngico, la clasificación de las proteínas efectoras secretadas a menudo implica diferentes criterios y enfoques bioinformáticos que evitan las comparaciones directas. El punto de partida para las investigaciones sobre la evolución y la actividad molecular de los genes efectores fúngicos a menudo comienza con el análisis del genoma fúngico y la predicción de las proteínas secretadas. Esto incluye tanto proteínas que se liberan en el medio circundante, así como las que permanecen unidas a la membrana o la pared celular (Sperschneider, Peter N. Dodds, *et al.*, 2015; Derbyshire *et al.*, 2017). La aproximación de la predicción *in silico* del secretoma ofrece la oportunidad de predecir proteínas que pueden secretarse antes de realizar análisis más costosos y complejos (Sonah, Deshmukh y Bélanger, 2016). La predicción del secretoma se basa en la identificación de señales de secreción en la secuencia N-terminal (péptido señal, SP) en las proteínas correspondientes a modelos de genes que se anotan automáticamente en una secuencia del genoma (Sonah, Deshmukh y Bélanger, 2016). A su vez la secuencia SP en proteínas secretadas puede usarse para predecir la ubicación subcelular de una proteína mediante métodos *in silico*. Otros puntos importantes para la predicción es determinar la presencia de dominios transmembrana y la capacidad de generar anclajes glicosilfosfatidil inositol (*GPI-anchor*) (Girard *et al.*, 2013; Lo Presti *et al.*, 2015).

Con frecuencia, las proteínas efectoras se definen como pequeñas proteínas secretadas (menores a 300 aa) con estructuras terciarias estabilizadas mediante puentes disulfuro y ricas en cisteínas. Sin embargo, proteínas más grandes también pueden actuar como proteínas efectoras y, por lo tanto, 300 aa es un criterio bastante arbitrario (Lo Presti *et al.*, 2015). Debido a estas ambigüedades en la definición de proteínas efectoras, hasta se podría considerar que cualquier proteína fúngica secretada puede actuar potencialmente como efectora (Lo Presti *et al.* 2015). Una de las características de las proteínas efectoras, es la falta de similitud de secuencia clara con proteínas de función conocida (Stotz *et al.*, 2014; Vincent, Rafiqi y Job, 2020). Se cree que esto es la consecuencia de la presión evolutiva que impulsa la rápida diversificación de las actividades efectoras en las células huésped para optimizar la función y/o evitar el reconocimiento por parte del sistema inmune innato (Plissonneau *et al.*, 2017; Benevenuto *et al.*, 2018). La dificultad frecuente para reconocer motivos comunes que indican la función o actividad de los efectores puede deberse a que pocos de ellos tienen actividad enzimática o la ausencia de dominios conocidos para la interacción directa con factores del huésped (Lo Presti *et al.*, 2015). Además, muchos efectores son proteínas pequeñas y por lo tanto, su rápida diversificación daría como resultado una pérdida de similitud de secuencia (Franceschetti *et al.*, 2017). Muchos genes que codifican para efectores estudiados son específicos de cada especie o incluso cepas-específicos (Ej: Heard, Brown y Hammond-Kosack, 2015; Anderson *et al.*, 2017; Molin *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2019). Sin embargo, varios efectores también se conservan a lo largo de varias especies de hongos y tienen roles aparentemente similares en la patogénesis en plantas (Jonge, Bolton y Thomma, 2011; de Jonge, 2012; Díaz-Triviño *et al.*, 2017). Los hongos biotróficos tienen una mayor proporción de efectores predichos específicos de la especie, así como menor número de enzimas activas en carbohidratos (CAZymes) que los hongos hemibiotróficos y necrotróficos (Lo Presti *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016; Plissonneau *et al.*, 2017).

3.1.2.1. *C. paspali* y la interacción con su hospedero

Específicamente, *C. paspali* es clasificado como un biótrofo facultativo (Lo Presti *et al.*, 2015) y su colonización no muestra un modo de crecimiento necrotrófico en ninguna fase de la

infección temprana, causando una "enfermedad de reemplazo de tejido". Esto se debe a que no mata las células huésped durante la colonización, aunque la muerte celular se induce inevitablemente después de un tiempo durante el desarrollo del escleroto (Tudzynski y Scheffer, 2004; Hinsch *et al.*, 2015). Durante la fase de penetración de *C. paspali* al igual que *C. purpurea*, crece principalmente intercelularmente (Luttrell, 1977; D' Esposito y Lopez, 2001). Por lo tanto, una secreción de efectores en el apoplasto de la planta, así como la translocación en la célula huésped podría ser posible en esta etapa. De hecho, al menos una proteína secretada ha sido determinada como apoplastica en *C. purpurea* (Oeser *et al.*, 2017). No se ha documentado que *C. paspali* produzca estructuras intracelulares especializadas, como haustorios, lo que sugiere que la interacción con la planta puede ser predominantemente a través del apoplasto. Aunque, se ha demostrado que *C. purpurea* tiene hifas que crecen intracelularmente cubiertas por la membrana plasmática del huésped, y podrían tener funciones de haustorios (Tudzynski y Tenberge, 2003).

La interacción de *C. paspali* con sus hospederos no se ha abordado hasta el día de hoy, sin embargo, en *C. purpurea* si se ha abordado recientemente con una aproximación transcriptómica, en donde se estudió la expresión de genes luego de la infección con este hongo en ovarios jóvenes de *Secale cereale* (Oeser *et al.* 2017) y *Brachipodium distachyon* (Kind *et al.* 2017). En estos trabajos se demostró que ambos hospederos desarrollan la infección, pero a su vez reconocen la presencia del hongo. Esto se determinó ya que los genes relacionados con la defensa en la planta están regulados positivamente, especialmente varios genes relacionados con la patogénesis (PR) como PR-1, PR-2 y PR-5, así como también genes involucrados en la señalización de fitohormonas como auxinas y citoquininas. Sin embargo, no existe una reacción efectiva de defensa de la planta por lo que se apunta a un papel de los efectores en la modulación de esta respuesta. En *C. paspali*, el primer informe sobre la predicción *in silico* del secretoma y efectores fue realizado por Lo Presti *et al.* (2015). Los autores predijeron 474 proteínas secretadas basadas en la versión del genoma de este hongo publicada por Schardl *et al.* (2013). El secretoma predicho *in silico* incluyó el 7,6% del total de las proteínas predichas en el genoma y 407 de estas proteínas secretadas podrían clasificarse como glicosil-hidrolasas (GH), oxidorreductasas, peptidasas y esterasas-lipasas (Lo Presti *et al.*, 2015). Sin embargo, este número de proteínas podría ser una sobreestimación del número real de proteínas secretadas debido a que los autores usaron únicamente una herramienta para cada uno de los puntos a tener en cuenta para la predicción (Oeser *et al.*, 2017). Hoy en día no existen datos experimentales sobre el secretoma en esta especie que corroboren los datos predichos *in silico*, así como tampoco hay datos de expresión *in planta* del hongo, que podrían a dar luz cuáles de estas proteínas predichas efectivamente pueden estar siendo expresadas durante la infección.

Numerosos trabajos se han realizado en *C. purpurea* para la determinación de factores de patogenicidad importantes para la virulencia de esta especie. El proceso de infección de *C. purpurea* en flores de centeno se acompaña de una degradación de la pectina de la pared celular y la actividad de la poligalacturanasa *cpgg1/2* ha sido demostrado como un factor de patogenicidad en esta especie (Oeser *et al.*, 2002). La actividad de enzimas hidrolíticas como las enzimas degradantes de la pared celular vegetal (EDPCV) y peptidasas son otros factores ampliamente reportados en hongos biótrofos. En el primer paso de la invasión, los patógenos necesitan EDPCV para facilitar la penetración. Muchos biótrofos patógenos usan una combinación de presión de turgencia y EDPCV para romper la pared celular sin afectar la viabilidad de la célula huésped, mientras que los biótrofos beneficiosos dependen en gran medida de las enzimas que “aflojan” la pared celular del huésped (Lo Presti *et al.*, 2015). *C. paspali* al igual que los hongos biotróficos tiene repertorios limitados de enzimas para la degradación de los polisacáridos de las plantas en comparación con otros patógenos fúngicos como los necrotrófos (Christian P Kubicek, Starr y Glass, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Lo Presti *et al.*, 2015; Ah-Fong, Shrivastava y Judelson, 2017). En el caso de *C. purpurea* la penetración directa de las paredes de las células en numerosas gramíneas demuestran que este hongo se adapta bien al hábitat de las paredes celulares de las monocotiledóneas, e indican que el patógeno utiliza EDPCV secretadas de forma bien controlada (Oeser *et al.*, 2002; Mey *et al.*, 2003). Las gramíneas han desarrollado un tipo especial de pared celular del ovario que contiene bajas cantidades de pectinas y cantidades considerablemente altas de glucuronoarabino-xilanos (GAX) además de la mayor porción de polisacáridos de la celulosa (Carpita y Gibeaut, 1993). Se prevé que xilanasas y celulasas, pero también pectinasas, sean necesarias para descomponer los principales componentes de la pared celular durante la infección. Además de las EDPCV y las enzimas que degradan la pectina, varios componentes de señalización como MAP quinasas (Oeser *et al.*, 2002; Mey *et al.*, 2003), la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) que generan las NADPH oxidasas (Schürmann *et al.*, 2013), así como las citoquininas producidas por el hongo (Kind *et al.*, 2018), han demostrado ser esenciales para una infección exitosa por parte de *C. purpurea*. Además, dos factores resultaron ser de especial interés para la interacción *C. purpurea*-centeno. Estos son el factor de transcripción *Cptf1* (un homólogo de la proteína *Ap1* de levadura) y la GTPasa *Cpcdc42*. También se ha determinado que el sistema de efectores es altamente redundante, siendo difícil determinar genes de importancia para su patogenicidad. Además, algunos de los genes efectores son altamente expresados durante la infección, entre los que se incluyen pequeñas proteínas secretadas que podrían estar involucradas en enmascarar el ataque fúngico o interferir con las reacciones de defensa del huésped en donde al menos una ha sido demostrada como una proteína apoplástica (Oeser *et al.*, 2017).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las plantas de Chirú fueron provistas por Dr. Ing. Agr. Rafael Reyno en el mes de abril de 2017 provenientes de INIA Tacuarembó. Estas plantas fueron utilizadas como fuente de material vegetal para todos los experimentos. Plantas individuales se cultivaron en cámara (**Fig. 4**) en condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo controlado (30°C, 16hrs luz / 27°C, 8hrs oscuridad) según descrito por Giordano *et al.* (2014).

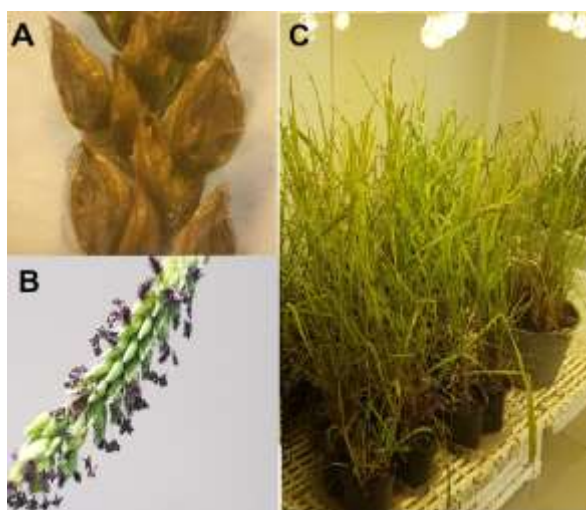


Figura 4. Material vegetal utilizado de Chirú. A - Espiguillas pre-antesis, con estigmas ubicados por dentro de las glumas. B – Espiguillas post-antesis con estigmas y estambres por fuera de las glumas. C – Chirú en cámaras de crecimiento con fotoperíodo controlado.

3.2.2. Inoculación con *C. paspali*

Durante el verano 2017-18, las inflorescencias de estas plantas se inocularon con conidios de *C. paspali*, utilizando técnicas similares a las reportadas por Luttrell (1977) y Schrauf y Cornaglia (2003). Se preparó una suspensión de conidios de *C. paspali* a partir de la mielecilla diluida en agua de plantas infectadas naturalmente en el campo. Esto se realizó de esta forma y no a partir de un cultivo en placa monospórico debido a que no se contaba con aislamientos que tuvieran la capacidad de esporular *in vitro*. Además, se ha reportado que la infección a partir de esporas provenientes de diferentes cepas ayuda a una mejor evaluación de infección por parte de los cultivares (Darlington, Mathre y Johnston, 1977; Menzies *et al.*, 2017). Temprano en la mañana (08.00 a 09.00 h), las inflorescencias aproximadamente un día después de la antesis fueron inoculadas mediante pulverización varias veces con la suspensión de conidios total ajustada a 10^6 conidios/ml. Para evitar la contaminación cruzada y mantener una humedad relativa alta para beneficiar el desarrollo de la infección (Luttrell, 1977), las panojas infectadas se cubrieron con bolsas de plástico humedecidas con agua, directamente después de la inoculación (**Fig. 5**).



Figura 5. Proceso de inoculación e infección. A - Inoculación y embolsado para mantener humedad relativa alta y evitar infección cruzada. B – Infección en Chirú luego de 10 dpi donde se puede ver la formación de miel característica de la infección con *C. paspali*.

3.2.3. Recolección de material vegetal

Debido a que el estigma es el órgano crítico para el ingreso de las esporas de *C. paspali*, y donde la infección toma el primer contacto con su huésped, se seleccionó este tejido para su muestreo durante la infección. Para ello se realizó un pool de aproximadamente 400-450 estigma-estilo (EE) en un periodo aproximado de 1 a 4 días post-antesis que servirían como control negativo de infección. Estas estaban en su mayoría en las etapas 3 y 4 definidas por Burton (1942). Estos EE se podían encontrar con o sin polen ya que en algunos casos se apreciaba la presencia de este en el estigma. Las muestras de EE durante la infección con *C. paspali* se recolectaron en dos momentos en la etapa temprana de infección, 1 y 4 días después de la inoculación (dpi), cuando todavía no ha ocurrido la producción de mielecilla (**Fig. 6**). Para ello también se recolectaron aproximadamente 400-450 EE por tiempo.

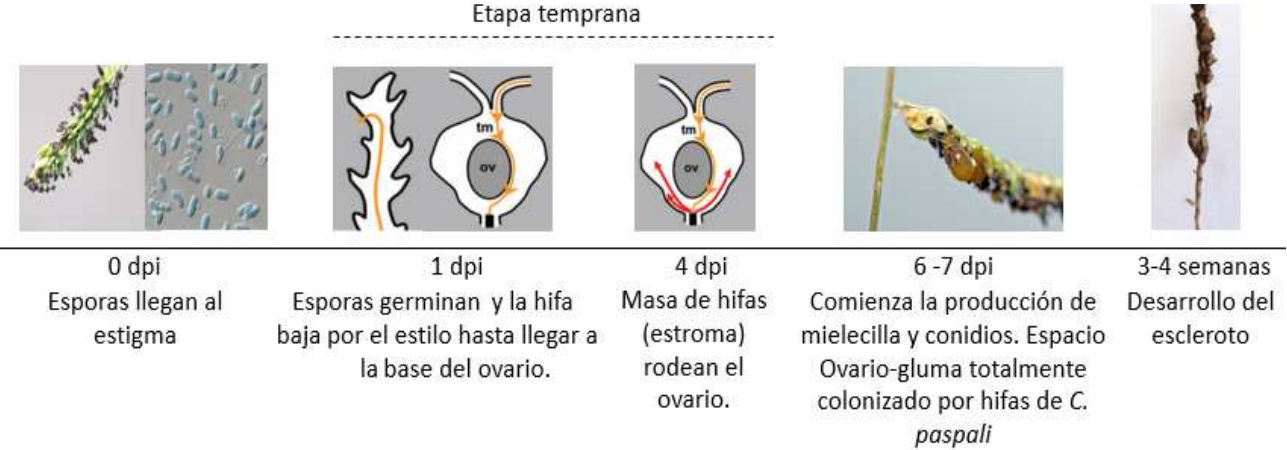


Figura 6. Esquema del desarrollo de la infección de *C. paspali* en *P. dilatatum* en base a lo descrito por Luttrell (1977) y D' Esposito (2001). dpi: días post-infección. Esquemas tomado y modificado de Rolke y Tudzynski (2008).

A su vez para la identificación de transcritos específicamente expresados en el EE se recogieron muestras de 400-450 EE pre-antesis, que todavía se encontraban dentro de las glumas (**Fig. 4**). Asimismo, se colectaron muestras de aproximadamente 400-450 estambres sanos 1 a 4 días después de la antesis y pool de 4 hojas a diferentes a etapas de maduración.

Todas las muestras se colocaron en ARNstable inmediatamente luego de ser recolectadas y se almacenaron a 4° C hasta su posterior uso. Cada repetición de tejido muestreado corresponde a una planta individual. Para las muestras de EE infectado se utilizó 1 racimo como testigo por panoja infectada para corroborar que la infección se desarrolle con normalidad.

3.2.4. Extracción de ARN total

La extracción se realizó con el kit de extracción RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Alemania) de acuerdo con especificaciones del proveedor. Los tejidos (no más de 1 mg) fueron desintegrados en presencia de bolas de sílica pretratadas con agua con 0.1% DEPC (Sigma, Alemania) y nitrógeno líquido para evitar la degradación del ARN. Luego se le añadió Buffer de lisis de ARN para su homogenización utilizando un TissueLyzer durante 30s a 30Hz. Posteriormente, la solución resultante se pasó a través de columnas QIAshredder™, las cuales retuvieron moléculas biológicas grandes, permitiendo el paso del ARN. La muestra de ARN se diluyó con etanol al 50%, esta mezcla fue transferida a una nueva columna RNeasy Mini spin™. Se realizaron 2 lavados posteriores de la columna y finalmente el ARN fue suspendido en agua libre de DNasa y ARNsas tratada con DEPC en un volumen de 40 µL.

La concentración de ARN y la calidad se determinaron utilizando el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Se seleccionaron muestras con un Número de Integridad del ARN (RIN por sus siglas en inglés) superior a 6 para su posterior secuenciación (**Tabla 2**).

3.2.5. Generación de librerías y secuenciación del ARNm

El ARN total extraído se precipitó utilizando ARNstable (Biomatrica, España) y se envió a

Agribio Center en la Universidad de La Trobe, Melbourne, Australia para la generación de librerías de ARNm y posterior secuenciado como parte de la colaboración con el Dr. German Spangenberg. Allí, la preparación de las bibliotecas se realizó utilizando el kit Illumina TruSeq (Illumina, San Diego CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. A partir del ARN total se procedió a la purificación de los ARNm mediante perlas magnéticas cubiertas de estreptavidina, este proceso purifica las moléculas de ARNm conteniendo extremos terminales poli-A usando oligo-dT unido a las perlas mediante 2 rondas de purificación. Durante el segundo ciclo de elución del ARN atrapado, este es fragmentado y preparado para la síntesis de ADNc. Se generó una biblioteca para cada muestra de tejido sano e infectado, con el fin de que cada muestra quede con un adaptador diferente. Se prepararon 18 bibliotecas con sentido individuales. La posterior secuenciación se realizó utilizando la tecnología HiSeq 3000 de Illumina (Illumina, Inc., San Diego, CA). Se secuenciaron tres réplicas biológicas de cada tejido y se generaron lecturas de ambos extremos (*paired-end*) de 150 pb.

3.2.6. Control de calidad de *reads* obtenidos y recorte de secuencias por calidad

Una vez obtenidas las lecturas de secuencias (*reads* crudos) se empleó el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) versión 0.11.2, el cual permite evaluar la distribución de valores de calidad asociados a los nucleótidos en un formato resumido y graficado de la información. El rango de calidad por base se encuentra entre 0 y 30 (phred score), donde a mayor valor será menor la probabilidad de error. Para análisis posteriores es importante recortar bases con mala calidad, y posibles adaptadores que no se hayan eliminado. Los parámetros utilizados en Trimmomatic V0.33 (Bolger, Lohse y Usadel, 2014) para recortar los *reads* crudos, así como para eliminar los adaptadores, se configuraron de la siguiente manera: ILLUMINACLIP: 2: 25: 10, LEADING: 3, TRAILING: 3, VENTANA DESLIZANTE: 4:15, MINLEN: 75. Los resultados de métricas de calidad de los *reads* se obtuvieron de todas las muestras en un solo informe para una comparación fácil con qQCReport de QuasR (Gaidatzis *et al.*, 2015). A su vez se

examinó la presencia de contaminación por ARNr mediante la búsqueda de homología contra bases de datos de ARNr SILVA (Quast *et al.*, 2013) utilizando la herramienta de mapeo Bowtie2 v2.2.5 (Langmead y Salzberg, 2013).

3.2.7. Ensamblado *de novo* de transcriptos de Chirú

Para capturar la mayor cantidad de transcriptos y complejidad del transcriptoma de Chirú se agruparon todas las muestras (**Tabla 2**) post filtrado por calidad. Para separar los *reads* provenientes de la planta y los provenientes de *C. paspali* en las muestras post-infección con *C. paspali* se procedió a mapear todos los *reads* de estas muestras con el borrador de genoma de *C. paspali* cepa RRC-1481 (NCBI Número de Acceso GCA_000223175.2). Para el mapeo se utilizó el paquete STAR (Dobin *et al.*, 2016). Se generó un archivo “.bam” con los *reads* mapeados y los *reads* no alineados (con ambos PE *reads* sin alinear) que pertenecerían a Chirú se mantuvieron en FASTQ.

Posteriormente a este filtrado, todos los *reads* pertenecientes a Chirú fueron ensamblados para generar una referencia *de novo*, ya que hoy en día no se cuenta con un genoma secuenciado disponible en bases de datos públicas para esta especie, ni de ninguna especie del género *Paspalum*. El ensamblado *de novo* del transcriptoma se realizó con el software Trinity (Haas *et al.*, 2013) y CLC Workbench 11 (Qiagen, Alemania). En el caso de Trinity se utilizaron tres *k-mer* diferentes 15, 24 y 25 para realizar el ensamblado. La normalización *in silico* de los *reads* se utilizó debido a la gran cantidad de *reads* de entrada, para mejorar la eficiencia del ensamblaje y reducir los tiempos de ejecución. En el caso de CLC Workbench 11 se utilizaron los valores de ensamblado por defecto.

3.2.8. Estadísticas del ensamblado *de novo* y evaluación de su integridad.

Se utilizaron enfoques diferentes para evaluar la calidad de cada transcriptoma ensamblado. Las estadísticas generales del ensamblaje se determinaron usando el script 'TrinityStats.pl' provisto con el paquete Trinity, así como los paquetes Transrate (<http://hibberdlab.com/transrate/>) y la herramienta RSEM-Eval de Detonate (<http://deweylab.biostat.wisc.edu/detonate/>). A su vez, se determinó el porcentaje de precisión de cada ensamblado, que se evaluó determinando el porcentaje *reads* que podrían asignarse de nuevo a las transcritos ensamblados. Para esto, se generaron índices usando Bowtie2-build y Bowtie2 v2.2.5 (Langmead y Salzberg, 2013). para mapear las lecturas contra cada ensamblado y proporcionar la métrica de precisión. Finalmente, evaluamos la integridad de cada transcriptoma ensamblado en términos de genes esperados con BUSCO v3.0.1 (Simão *et al.*, 2015) y utilizando "Embryophyta_odb9" como base de datos del grupo BUSCO con 1440 genes.

3.2.9. Una mejora en el ensamblado *de novo*

Para obtener un transcriptoma ensamblado *de novo* con el mayor número de transcritos representativos de la especie, se procedió a realizar un BLASTx (Camacho *et al.*, 2009) contra la base de datos UniRef90 de Swissprot de *Viridiplantae*. Se seleccionó la referencia ensamblada *de novo* con mejores valores obtenidos por los paquetes para evaluar su completitud (BUSCO, Detonate RSEM-EVAL, Transrate) y se le agregó a esta los transcritos de las otras referencias con BLAST-hits que no estaban presentes en la referencia ensamblada seleccionada. Luego se procedió a eliminar transcritos redundantes utilizando el paquete CD-HIT-EST (Li y Godzik, 2006), utilizando una similitud del 95%.

El ensamblado final resultante se verificó adicionalmente para detectar la contaminación con

secuencias de bacterias, hongos e insectos. Para ello se realizó un BLASTx contra una base de datos obtenida de UniRef90 SwissProt de: Taxid: *Bacteria*, Taxid: *Insecta*, Taxid: *Fungi*. Los *contigs* que tienen una similitud de secuencia significativa (*cut-off* E-valor $\leq 10e^{-5}$) y que presentaran un E-valor menor a un BLAST *hit* contra la base de datos de *Viridiplantae* se eliminaron del transcriptoma final.

3.2.10. Obtención de genes codificantes de proteínas del genoma de *C. paspali*

Para la determinación de los genes que codifican proteínas en el genoma de *C. paspali*, se utilizó el protocolo FunGAP (Min, Grigoriev y Choi, 2017). La predicción génica con el protocolo FunGAP se usó con una combinación de predicciones *ab initio*, el ensamble *de novo* de los transcriptos y proteínas de tres Clavicipitaceae relacionadas: *C. purpurea* cepa 20.1, *Metarhizium rileyi* (GCA_000223055.1) y *Pochonia chlamydosporia* cepa 123 (GCA_000411695. 2). AUGUSTUS (Hoff y Stanke, 2013) fue entrenado en un conjunto de genes de alta confianza predichos para *Fusarium graminearum*. Se utilizaron las lecturas de ARN-seq mapeadas al genoma de *C. paspali* RRC-1481 para el ensamble *de novo* de los transcriptos. Todo el protocolo se realizó según lo especificado en la documentación de FunGAP. La completitud de la predicción también se analizó con BUSCO v3.0.1.

3.2.11. Predicción de proteínas secretadas en el genoma de *C. paspali*

Para la predicción de péptidos señal de secreción (SP), se utilizó el servidor web Phobius (Krogh, Sonnhammer y Ka, 2007) y SignalP v5.0 (Armenteros *et al.*, 2019). Para excluir las proteínas de membrana, se utilizó el servidor web TMHMM v2.0 (máx. 1 PredHel dentro de los primeros 60 aminoácidos) (Krogh, Sonnhammer y Ka, 2007) en combinación con la predicción del dominio transmembrana (TM) por Phobius (no se predijo TM). Hay que tener en cuenta que las predicciones de dominio TM por TMHMM dentro de los últimos 70 residuos de aminoácidos del extremo N-terminal de una secuencia de proteína no se consideraron ya que TMHMM a veces puede predecir péptidos señal como dominios TM como falsos positivos. Para excluir secuencias que contienen un SP, pero permanecen en el retículo endoplásmico, todas las secuencias secretadas predichas se escanearon en busca de motivos de retención de la base de datos PROSITE (PS00014 ER_Targeting) con el servidor web ScanProsite (de Castro *et al.*, 2006). Se usaron versiones web de WolfPSort (tipo de organismo: hongos) (Horton *et al.*, 2007), TargetP 2.0 (Armenteros *et al.*, 2019) y ProtComp (Softberry) para predecir la localización subcelular de las proteínas. El servidor de predicción PredGPI (modelo general) (Pierleoni, Martelli y Casadio, 2008) se usó para predecir proteínas secretadas que contienen un ancla GPI. Debido al uso de al menos dos herramientas para inferir la presencia de péptido señal, dominio TM y localización subcelular, la decisión de presencia o ausencia se toma en base a que la predicción sea positiva o negativa en al menos 2 de las herramientas.

Para la predicción de proteínas secretadas de manera de no convencional o clásica (PSNC), se utilizó un protocolo basado en Vivek-Ananth *et al.* (2018) con ligeras modificaciones. Se realizó un BLASTp (*cut-off* Evalor $\leq 10e^{-5}$) de todas las proteínas sin dominios SP, TM, señal ER y anclaje GPI de *C. paspali* RRC-1481 contra una base de datos de proteínas secretadas determinadas experimentalmente. Esta base de datos se realizó a partir de todos los fitopatógenos presentes en la base de datos FunSecKB2 (Meinken *et al* 2014). Las proteínas que cumplieran estas características eran determinadas como PSNC.

3.2.12. Predicción de factores de patogenicidad en el secretoma de *C. paspali*

Usando el secretoma predicho *in silico* de *C. paspali*, se definieron los efectores de cuatro formas para abarcar diferentes características previamente descritas (Ellis *et al.*, 2009; Stergiopoulos y de Wit, 2009; Sperschneider *et al.*, 2015; Sperschneider *et al.*, 2018). I) Proteínas pequeñas (PP) menores a 300 aminoácidos (aa); II) PP ricas en cisteínas (PPRC) (más de 4 cisteínas en la secuencia y más del 3% total de la secuencia aminoacídica); III) Proteínas con motivos de efectores de hongos u oomicetos conocidos (DEER, RXLR, RXLX [EDQ], [KRHQSA] [DENQ] EL, [YW] XC y RSIVEQD) (Vivek-Ananth *et al.* 2018) usando el paquete FIMO de MEME con un *cut-off* del Evalor de $\leq 1e^{-4}$; IV) EffectorP (<http://effectorp.csiro.au/>).

Algunas CAZyme son importantes durante la infección ya que son las encargadas de descomponer los componentes de la pared celular de la planta, así como los carbohidratos complejos, permitiendo que los hongos accedan al huésped y faciliten la infección (Kubicek, Starr y Glass, 2014). Se utilizó dbCAN2 (<http://cys.bios.niu.edu/dbCAN2/>) con un *cut-off* en el Evalor de $10e^{-10}$ usando HMMER, Hotpep, DIAMOND para identificar todas las CAZymes dentro de las posibles proteínas secretadas. Para ser determinado como CAZyme, al menos tiene que ser determinado en dos de los modelos de búsqueda.

3.2.13. Anotación del ensamblado *de novo* de Chirú y del secretoma de *C. paspali*

El programa Blast2go (B2G) versión 2.5 con los parámetros por default (Conesa *et al.* 2005) se usó para asignar a los *contigs* ensamblados *de novo* a una descripción funcional. Para encontrar homologías de proteínas, los *contigs* ensamblados de Chirú y los genes codificantes para proteínas predichas para *C. paspali* cepa RRC-1481 se anotaron mediante BLASTx (*cut-off* E-valor de 10^{-5}) y BLASTp (*cut-off* E-valor $\leq 10^{-5}$) respectivamente, contra la base de datos de NCBI nr/Swissprot/TreEMBL y se clasificaron utilizando InterProScan v.5.19. Las familias de proteínas Pfam, los dominios InterPro, la clasificación de ontología génica (GO) y las rutas metabólicas se recuperaron de las proteínas identificadas por BLAST utilizando el sistema de anotación B2G. El

mapeo y la anotación se realizaron en Blast2GO utilizando los parámetros predeterminados.

La ontología génica describe el conocimiento del dominio biológico con respecto a tres aspectos: *Función molecular* que son actividades a nivel molecular realizadas por productos genéticos. *Componente celular* que son las ubicaciones relativas a las estructuras celulares en las que un producto genético realiza una función, ya sea compartimentos celulares (p. Ej., Mitocondria) o complejos macromoleculares estables de los que forman parte (p. Ej., El ribosoma). Por último, *Proceso biológico* que son los procesos más grandes, o "programas biológicos" logrados por múltiples actividades moleculares.

3.2.14. Expresión diferencial

Los *reads* provenientes de las muestras inoculadas con *C. paspali* se mapearon en el genoma de *C. paspali* cepa RRC-1481 utilizando STAR guiados por el archivo GFF3 de anotación obtenido mediante el protocolo FunGAP. En el caso de los *reads* de Chirú se realizó el mapeo a los transcritos de la referencia final utilizando Bowtie2 con los parámetros por defecto.

Luego se procedió a realizar el conteo utilizando RSEM (Li y Dewey, 2014). El análisis de expresión diferencial se realizó con EdgeR (Robinson, McCarthy y Smyth, 2009). EdgeR implementa un rango de metodología estadística basada en la distribución binomial negativa, incluyendo estimaciones empíricas de Bayes, pruebas exactas y modelos lineales generalizados (Robinson *et al.*, 2010). Se tomó una línea de corte de FDR o qvalor de 0.05 bajo el modelo "glm". Para evitar genes de baja expresión en las diferentes condiciones, en los análisis con EdgeR solo los transcritos con valores de CPM mayores de uno en al menos tres muestras se retuvieron para los análisis. Se normalizó en todas las condiciones mediante el método TMM. El análisis de enriquecimiento del término GO se realizó utilizando B2G con un límite de FDR de 10⁻³.

3.2.15. Validación de genes seleccionados mediante RT-qPCR.

La transcripción reversa (RT) PCR se realizó utilizando el Superscript IV (Invitrogen) y 2 µg de ARN total como molde, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones qPCR se realizaron con SYBR Green Supermix y Quant Studio 3 Cyclor (Applied Biosystems). La programación, recopilación de datos y los análisis se realizaron con el software QuantStudio Design & Analysis versión 1.5.0 (Applied Biosystems). Se seleccionaron 4 genes predichos como efectores al azar y se diseñaron *primers* específicos (**Anexo 1**). La expresión de todos los genes fúngicos probados se normalizó en base a un gen de referencia, seleccionado posteriormente de analizar tres candidatos γ -actina (*ACT*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y el factor de transcripción 1-alfa (*TEF*) mediante RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>), una herramienta web que integra los principales programas informáticos disponibles actualmente (geNorm, Normfinder, BestKeeper y el método comparativo Δ Ct). La expresión relativa se realizó en base al método de 2DeltaDeltaCt (Livak y Schmittgen, 2001).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Extracción de ARN

Se realizaron un total de 80 extracciones de las cuales 18 muestras fueron seleccionadas para su posterior secuenciación (**Tabla 2**). De estas, 14 presentan una calidad moderada (RIN >6), 4 no se pudo obtener un valor de RIN pero sus electroferogramas mostraban poca degradación en los picos correspondientes al ARN ribosomal (ARNr) 26S y 16S (**Anexo 2**). Si bien un valor óptimo de RIN para la generación de librerías y posterior secuenciación sería un RIN más elevado (>7), la difícil obtención de material como eran los estambres y estigmas y el buen perfil de los electroferogramas de las muestras seleccionadas nos llevó a tomar la decisión de enviar a secuenciar con estos valores.

Tabla 2. Diferentes muestras enviadas a secuenciar con su concentración y RIN.

Tejido	ID	Concentración (ng/ul)	RIN
Estambres	Pasp-22	254	6.6
Estambres	Pasp-26	63	7
Estambres	Pasp-30	545	6.9
EE post-antesis	Pasp-24	258	7.6
EE post-antesis	Pasp-31	96	7.1
EE post-antesis	Pasp-79	175	n/a
EE pre-antesis	Pasp-5	94	7.8
EE pre-antesis	Pasp-25	109	n/a
EE pre-antesis	Pasp-9	98	n/a
EE pre-antesis	Pasp-83	185	n/a
Hoja	Pasp-80	145	n/a
Hoja	Pasp-81	140	6.5
EE 1 dpi	Pasp-61	235	7
EE 1 dpi	Pasp-66	233	7.2
EE 1 dpi	Pasp-67	216	7.1
EE 4 dpi	Pasp-42	302	7
EE 4 dpi	Pasp-70	621	7
EE 4 dpi	Pasp-72	245	7

3.3.2. Control de calidad y recorte de secuencias

Se determinó el número total de *reads* y métricas de calidad de cada una de las 18 muestras utilizando el programa FastQC. En total se obtuvieron 775.362.969 *reads* pareados de 150pb de longitud sin procesar (*reads* crudos), con un promedio de 43.075.720 de *reads* por muestra. Posteriormente al filtrado de calidad descripto previamente se obtuvieron un total de 739528742 *reads* limpios o filtrados. En la **Tabla 2** se muestra un resumen general de datos pre y post filtrado.

Tabla 3. Muestras y tejidos con sus respectivos *reads* pre y post filtrado

Tejido	ID	<i>Reads</i> crudos	<i>Reads</i> filtrados
Estambres	Pasp-22	18139687	18041624
Estambres	Pasp-26	10345503	10179551
Estambres	Pasp-30	13342419	13159609
EE post-antesis (0 dpi)	Pasp-24	26547833	26405679
EE post-antesis (0 dpi)	Pasp-31	29929829	29743555
EE post-antesis (0 dpi)	Pasp-79	17262126	16987737
EE pre-antesis	Pasp-5	22878473	22699348
EE pre-antesis	Pasp-25	9721884	9639975
EE pre-antesis	Pasp-9	8168556	7889433
EE pre-antesis	Pasp-83	99448155	93651104
Hoja	Pasp-80	15657549	15459367
Hoja	Pasp-81	16379003	16245806
EE 1 dpi	Pasp-61	17262126	16265497
EE 1 dpi	Pasp-66	22878473	21955140
EE 1 dpi	Pasp-67	9721884	9300962
EE 4 dpi	Pasp-42	15657549	14845060
EE 4 dpi	Pasp-70	165371156	155648812
EE 4 dpi	Pasp-72	99448155	93651104

3.3.3. Ensamblado *de novo* del transcriptoma de Chirú.

Previo al ensamblado *de novo* del transcriptoma de Chirú se procedió a eliminar los *reads* pertenecientes a *C. paspali* de las muestras post-infección. En total se alinearon 229452322 *reads* de a pares al genoma de *C. paspali* de la cepa RRC-1481 (**Tabla 4**), representando un promedio de 38242054 *reads* por muestra. Los *reads* de a pares no alineados al genoma de *C. paspali* en este paso asumimos que representan parte del transcriptoma de Chirú.

Tabla 4. Resultados de alineamiento al genoma de *C. paspali* de los *reads* de las muestras de EE de Chirú post-infección.

Tejido	ID	<i>Reads</i> alineados	% <i>reads</i> alineados	% <i>reads</i> alineados en pares
EE 1 dpi	Pasp-61	864185856	53.13%	49.04
EE 1 dpi	Pasp-66	403315922	18.37	16.3
EE 1 dpi	Pasp-67	166673239	17.92	15.7
EE 4 dpi	Pasp-42	286509658	19.30	17.06
EE 4 dpi	Pasp-70	8342776323	53.6	43.82
EE 4 dpi	Pasp-72	33377253,47	35.64	32.04

El escenario más sencillo para estudios de expresión mediante ARN-seq son plantas diploides con un genoma de referencia disponible. Las implicaciones de las decisiones de análisis de datos se entienden con menos claridad en situaciones donde, por ejemplo, la especie de interés es un poliploide, o la especie de interés no tiene un genoma de referencia (Payá-Milans *et al.*, 2018). En nuestro caso, nos presentamos ante un sistema con un organismo poliploide, sin genoma de referencia y con tres genomios IJX (Burson, Voigt y Evers, 1991), para lo cual tenemos dos

opciones, o realizar un ensamblado *de novo* del transcriptoma o utilizar una especie cercana como referencia. Al no contar tampoco con ninguna especie cercana con un genoma de referencia, se eligió realizar un ensamblado *de novo* del transcriptoma de Chirú. Para esto se utilizaron dos softwares de ensamblado *de novo* con diferentes parámetros y como *input* se utilizaron todos los *reads* de las 12 muestras sanas y los *reads* no alineados al genoma de *C. paspali* obtenidos anteriormente de las 6 muestras post-infección.

Los diferentes paquetes de ensambladores emplean diferentes algoritmos en la construcción de *contigs*, por lo tanto, incluso cuando usan parámetros similares, producen ensamblados diferentes (Rana *et al.*, 2016; Hölzer y Marz, 2019). La comparación de diferentes resultados obtenidos en Trinity con resultados obtenidos con CLC Workbench 11 ya han sido publicados en diferentes especies vegetales (Ej: Jain *et al.*, 2016; Hoang *et al.*, 2018). Como se puede ver en la **Tabla 5** los cambios en el tamaño de *k-mer* utilizado en el ensamblado con Trinity afectaron las estadísticas de los *contigs* ensamblados y las métricas de calidad. La influencia del tamaño de los *k-mer* en los conjuntos de *contigs* ensamblados en plantas ha sido ampliamente estudiada en estudios previos en diferentes ensambladores, incluidos Trinity (Ej: Chopra *et al.*, 2014; Nakasugi *et al.*, 2014; He *et al.*, 2015; Cerveau y Jackson, 2016; Rana *et al.*, 2016). El número de *contigs* ensamblados con Trinity más bajo fue de 818505 obtenido con un *k-mer* 24. Un aumento del tamaño de *k-mer* de 15 a 24, generó menos *contigs* ensamblados, mientras que los N50 y el promedio la longitud del *contigs* aumentaron. Sin embargo, el ensamblado por defecto (*k-mer*=25) obtuvo el mayor número de *contigs* generados (incluso mayor al de *k-mer* 15) y un N50 menor al de *k-mer* 24. En comparación con los resultados obtenidos con CLC con la configuración por defecto, el número total de *contigs* del conjunto de CLC fue 539905 (N50: 519 pb), por lo que todos los ensamblados con Trinity tenían un mayor número de *contigs* que este. De todas formas, CLC presentó el tercer N50 más bajo solo debajo del ensamblado con *k-mer* 15 de Trinity. La longitud de los *contigs* y el N50 se pueden aumentar utilizando diferentes ensambladores o ajustando la configuración del ensamblado, sin embargo, estas métricas no reflejan la calidad real del ensamblado *de novo* del transcriptoma (Rana *et al* 2016, O'Neil *et al* 2013, Hoang *et al* 2018). Todos estos resultados son diferentes a los previamente reportados para un ensamblado *de novo* utilizando Trinity para especies de *Paspalum* (Jia *et al.*, 2015; de Oliveira *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020). Entre ellos encontramos resultados de *P. vaginatum* se ensambló un transcriptoma de hoja y espiguillas y se obtuvo un total de 342,165 transcriptos con una longitud promedio de 784 pb y un N50 de 1339 pb, mientras que en *P. notatum* se obtuvieron 203808 transcriptos con una longitud promedio de 750.5pb y un N50 de 906pb a partir de muestras de hoja, tallos y raíces. El contenido de GC de *P. dilatatum* es de aproximadamente 50.6% similar a la composición de otros *Paspalum*

(entre 47.6-53.4%).

Aproximadamente 800000 *contigs* es un número alto que puede no reflejar la realidad del transcriptoma de Chirú. Si bien es más una regla que una excepción el alto número de *contigs* ensamblados sobre todo con Trinity, esto podría llevar a pensar en una alta fragmentación de los *contigs* ensamblados. Este alto número de transcriptos ensamblados por Trinity se puede deber a dos razones: i) la dificultad que puede traer ensamblar transcriptos de un organismo poliploide como es Chirú, II) alto número de reconstrucciones falsas positivas ensambladas por Trinity. En el primer caso, los genomas poliploides como el de Chirú, que tiene 3 subgenomas (IJX) es de esperar tres transcriptos para un mismo gen (al menos en los de copia única con 1 alelo que se derivan de cada subgenoma). Esto, hay que sumarle que también existen transcriptos obtenidos a partir de *splicing* alternativo (isoformas). Estos puntos generan un gran desafío tratándose de un ensamblado *de novo* (Ungaro *et al.*, 2017), lo puede llevar a que los ensambladores no puedan distinguir entre *reads* que provienen de diferentes isoformas que llevan los mismos exones. Esto podía generar un colapso de los homólogos, que es cuando se ensamblan varios homólogos en un solo transcrito híbrido. También se puede dar la combinación aleatoria de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) que ocurre cuando los SNP específicos de cada homólogo se ensamblan en un homólogo al que no pertenece (Kain, 2005). En general, esto lleva a que los ensamblados *de novo* de *reads* cortos normalmente terminen identificando más transcriptos de las esperadas, lo que puede atribuirse no solo a la diversidad de ARN y la diversidad de isoformas en el transcriptoma, sino que también a la limitación en la recuperación de transcriptos por parte del ensamblador (Chopra *et al.*, 2014; Payá-Milans *et al.*, 2018). La segunda razón, puede ser debido a que Trinity usa un algoritmo de enumeración exhaustivo para buscar caminos que representen isoformas en el gráfico *de Bruijn*, que hace que el algoritmo sea muy sensible a las isoformas por *splicing* pero sufre de tener altos falsos positivos (Chang *et al.*, 2015; Saggese *et al.*, 2018). Estos altos falsos positivos pueden ser *contigs* mal ensamblados que se agregan al transcriptoma aumentando también el número de *contigs*.

Una forma más acertada de evaluación de los ensamblados es utilizar métricas en base a los paquetes RSEM-EVAL y TransRate (Hölzer y Marz, 2019). Para obtener los puntajes de RSEM-EVAL, el paquete precisa usar como referencia los tamaños de los transcriptos de especies cercanas (ya que no existen estos datos para *P. dilatatum*) y el resultado de mapeo de los *reads* a los *contigs* ensamblados. En nuestro caso, se utilizaron las medidas de los transcriptos de las gramíneas más cercanas disponibles (*Setaria itálica* y *Panicum hallii*) para la evaluación con RSEM-EVAL. Cuanto más alto sea el puntaje RSEM-EVAL, mejor se considerará el ensamblado, aunque este puntaje siempre sea negativo (Li *et al* 2014). Los ensamblados variaron su puntaje entre -

36134081648.62 a -4167484684962 (**Tabla 5**). Estos se ordenaron en función de su puntaje de RSEM-EVAL de menor a mayor, de la siguiente manera: CLC Workbench 11 > Trinity *k-mer* 15 > Trinity *k-mer* 24 > Trinity *k-mer* 25. Con ambas evaluaciones (con el tamaño de transcriptos de *S. itálica* y de *P. hallii*) los resultados variaron mínimamente en valor numérico, pero no a la hora de ordenar los valores de cada ensamblado de mayor a menor.

Tabla 5. Resultados de la evaluación de cada ensamblado *de novo* realizado con Trinity y CLC Workbench 11

	Trinity <i>k-mer</i> =15	Trinity <i>k-mer</i> =24	Trinity <i>k-mer</i> =25	CLC
Estadísticas ensamblado				
N° de <i>contigs</i>	878725	818505	937217	539905
N50 (pb)	271	1264	1090	519
Promedio (pb)	277.56	752.57	701.66	452.11
Contenido GC	50.7	50.5	50.6	50.5
Métricas Calidad ensamblado				
RSEM-EVAL (modelo <i>S. itálica</i>)	-38390225341.54	-41590892273.84	-41674846849.62	-36134082390.95
RSEM-EVAL (modelo <i>P. hallii</i>)	-38390227341.22	-41590886943.73	-41674840296.25	-36134081648.62
Transrate	0.061	0.0978	0.0997	0.0907
Métricas alineado de a pares				
Alineamiento total	70.3	77.6	79.66	18.6
Alineados 1 vez	30.1	16.9	21.9	13.6
Alineados múltiples veces	40.2	60.7	57.8	5
Análisis BUSCO				
Completo y copia única	46	248	152	400
Completo y duplicado	20	1094	1178	115
Fragmentado	508	62	75	461
Ausente	866	36	35	464
Transcriptos completos				
>90% Swissprot (Taxid:Viridiplantae)	318	7350	7333	2726

El puntaje de TransRate examina un ensamblado y lo compara con evidencia experimental como las lecturas sobre las que se construyó el ensamblaje. El puntaje óptimo de TransRate

obtenido sin referencias utiliza solo las lecturas que se usaron para generar el ensamblaje como evidencia. Este puntaje captura la confianza que uno puede tener en lo *contigs* que se ensamblaron, así como la cobertura del ensamblaje. El puntaje mínimo posible es 0.0, mientras que 1.0 es el puntaje máximo. En nuestra evaluación, los ensamblados variaron su puntaje entre 0.0997 a 0.061 (**Tabla 5**). Los ensamblados se ordenaron en función de su Transrate score de menor a mayor, de la siguiente manera: Trinity *k-mer* 15 > CLC Workbench 11 > Trinity *k-mer* 24 > Trinity *k-mer* 25.

Se determinó que a medida que el tamaño de *k-mer* usado en el ensamblado con Trinity aumentó, los puntajes obtenidos con Detonate RSEM-EVAL, TransRate y el porcentaje de *reads* mapeados a la referencia ensamblada aumentó (**Tabla 5**). Los resultados de RSEM-EVAL y TransRate variaron de forma que el ensamblado con peor valor de RSEM-EVAL fue CLC y el de peor valor de Transrate fue Trinity *k-mer* 15. Sin embargo, si hubo una concordancia entre el ensamblado que tuvo la mayor puntuación en ambas evaluaciones (Trinity *k-mer* 25).

Otro método común para evaluar la precisión de un ensamblaje *de novo* sin un genoma de referencia es determinar el porcentaje de *reads* que pueden ser mapeadas nuevamente a los *contigs* generados por el ensamblador. Los resultados para los cuatro ensamblados van desde 18.6 % a 79.66% (**Tabla 5**). Según esta métrica, el ensamblado con Trinity *k-mer* 25 tuvo el mayor porcentaje de mapeo (79.66%) y el ensamblaje de CLC tuvo el más bajo (18.6%).

En cuanto al análisis en base a la alineación de BUSCO contra 1440 proteínas conservadas en el orden *Embryophyta*, mostró que no en todos los casos se exhibía un alto nivel de integridad (>90%) como son los casos del ensamblado con Trinity *k-mer* 15 (40%) y de CLC Workbench 11 (78%). El ensamblado de Trinity con *k-mer* 25 obtuvo el mejor rendimiento, con la presencia de 1405 (97.6%) de ortólogos BUSCO, mientras que el ensamblaje de Trinity *k-mer* 15 mostró el peor desempeño ya que ensambló únicamente 574 (39.9%). El ensamblador detectó muchos genes BUSCO completos, aunque más del 70% de la cantidad de genes completos se incluye varias veces (completo y duplicado) en el ensamblaje. Esto podría ser el resultado de los sub-grafos en los que Trinity se basa para detectar diferentes isoformas de una transcripción (Grabherr *et al* 2011).

3.3.4. Estrategia multi *k-mer* para ensamblado *de novo* del transcriptoma de Chirú.

Se aplicaron diferentes configuraciones (tamaño *k-mer*) y el uso de diferentes ensambladores para maximizar el contenido de genes y transcriptos a incorporar en el transcriptoma final, como lo sugieren varios estudios previos (Surget-Groba y Montoya-Burgos, 2010; Cerveau y Jackson, 2016). Esta estrategia puede ser particularmente útil para muchas especies de cultivos poliploides (Hoang *et al.*, 2018), como es el *Paspalum*. Esto muestra el efecto de usar diferentes enfoques para procesar *contigs*, ya que los conjuntos de datos resultantes son diferentes, partiendo del mismo set de *reads*. Para el ensamblado de un transcriptoma, en el que la cobertura no es uniforme, el uso de una mayor longitud de *k-mer* teóricamente dará como resultado un ensamblaje más contiguo de transcriptos altamente expresados, permitiendo la recuperación de fragmentos de transcriptos más largos, pero a costa de la diversidad de transcripción. Por el contrario, los transcriptos con baja expresión se ensamblan mejor si se usan *k-mer* más chicos, que conducirá al ensamblaje de fragmentos de transcripción numerosos y altamente fragmentados (Zerbino y Birney, 2008; Gibbons *et al.*, 2009). Dadas las diferentes características de los transcriptos ensamblados con diferentes longitudes de *k-mer*, combinar los resultados obtenidos con varias longitudes de *k-mer* en un ensamblado final parece ser una forma prometedora de mejorar el ensamblaje de secuencias *de novo* con niveles de cobertura muy variables (Surget-Groba y Montoya-Burgos 2010, Chopra *et al.*, 2014).

Asumiendo las premisas anteriores, que cada *k-mer* y ensamblado puede beneficiar la formación de ciertos *contigs* y con esto proteínas diferentes, se procedió a agregar los *contigs* que codifican para proteínas que no estaban presentes en la referencia que se usó como base. Esta fue la referencia ensamblada con Trinity con un *k-mer* de 25 que obtuvo los mejores valores de puntajes de Transrate y RSEM-eval y métricas de alineamiento. En base a esto, de los 937217 *contigs* iniciales del ensamblado, se le agregaron 8728 del ensamblado Trinity *k-mer* 15, 5487 de Trinity *k-mer* 24 y 3879 del ensamblado con CLC Workbench 11. Se hizo esto en vez de agrupar todos los *contigs* ensamblados por cada ensamblador para eliminar la posibilidad de agregar *contigs* artefactos que puedan haber sido ensamblados con cada uno de los parámetros. Luego de esto se usó CD-HIT-EST con el fin de eliminar secuencias redundantes con un 95% de similaridad. Al final de este proceso, se obtuvieron 828459 *contigs*. La eliminación de secuencias redundantes solo modificó ligeramente la longitud promedio de *contigs* y el N50 (**Tabla 5**), pero el número de *contigs* disminuyó. Además, la agrupación de *contigs* mejoró la evaluación del ensamblado en todos los sentidos como se puede ver en la **Tabla 5**. Esto está de acuerdo con trabajos anteriores en planta, como el de Surget-Groba y Montoya-Burgos (2010), Chopra *et al.*, (2014) y Nakasugi *et al.*, (2014). También se mejoró la cantidad de genes BUSCO que debían estar como copia única, lo cual

es esperable sobre todo porque estamos eliminando secuencias redundantes. A su vez, se disminuyó la cantidad de genes fragmentados y los genes ausentes pasando de 35 a 31.

Tabla 6. Resultados de la evaluación del ensamblado realizado con Trinity *k-mer* 25 y el ensamblado multi *k-mer* de Chirú

	Trinity <i>k-mer</i> 25	Ensamblado final (con contaminantes)
Estadísticas ensamblado		
<i>Contigs</i>	937217	828459
N50	1090	1014
Mediana	389	371
Promedio	701.66	680
Contenido GC	50.6	50.6
Métricas Calidad ensamblado		
RSEM-EVAL (modelo <i>Setaria italica</i>)	- 4167484684962	-41684998828.97
RSEM-EVAL (modelo <i>Panicum hallii</i>)	- 41674840296.2 5	-4168489345.86
Transrate score	0.0997	0.0999
Métricas alineado		
Alineamiento total	79.66	83
Alineados 1 vez	21.9	22.1
Alineados múltiples veces	57.8	60.9
Análisis BUSCO		
Completo y copia única	152	501
Completo y duplicado	1178	861
Fragmentado	75	47
Ausente	35	31
Transcriptos completos		
>90% Swissprot (Taxid:Viridiplantae)	7333	7563

Por último, para obtener la referencia final también se procedió a eliminar posibles secuencias contaminantes procedentes de hongos, insectos y bacterias que puedan haberse ensamblado realizando un BLASTx contra la base de datos UniRef90 armada únicamente con

secuencias de estos organismos. Con esto se eliminaron 88335 *contigs* dando un resultado final de 740234 *contigs* totales únicamente de Chirú.

3.3.5. Anotación funcional del transcriptoma ensamblado *de novo* de Chirú.

Del total de 740234 *contigs*, 206114 secuencias coincidieron con la base de datos de proteínas UniRef90 Swissprot (Taxid: *Viridiplantae*), y 339256 con la base de datos UniRef90 TrEMBL (Taxid: *Viridiplantae*). En total fueron 344679 (46.7% de total) las secuencias que tuvieron al menos un BLASTx positivo (*hits*). Esto es similar a lo obtenido en previos reportes en *P. notatum* y *P. vaginatum* en donde 30.40% (de Oliveira *et al.*, 2020) y 58.2% (Jia *et al.*, 2015) de los *contigs* ensamblados presentan similaridad con la UniProtKB/Swiss-Prot, y significativamente menor a lo reportado en otro ensamblado de *P. vaginatum* en donde los *hits* fueron del 79.3% (Wu *et al.*, 2020). En total, 395555 *contigs* permanecieron sin resultados después de la búsqueda en ambas bases de datos de proteínas. Entre estos, se encontraron marcos de lectura abiertos (ORF) completos mediante Transdecoder (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>, tamaño mínimo 100 aa) en 14491 *contigs*. Las secuencias que mostraron ORF completos sin anotación requieren una mayor investigación ya que estas secuencias pueden representar genes que aún no se han descrito exclusivos de Chirú.

La mayoría de los *hits* (180768) y principales *hits* (48496) se atribuyeron a Brassicaceae, familia a la que no pertenece el *Paspalum* (familia *Poaceae*). Mientras que las especies de los géneros *Sorghum*, *Panicum* y *Setaria* que previamente en anotaciones del transcriptoma de *P. virginatum* (Wu *et al.*, 2020) mostraron ser las especies con mayores *hits* principales ocuparon los puestos 8, 9 y 14 respectivamente en el total de *hits* y 8, 10 y 13 respectivamente en los principales *hits* (Fig. 7). La razón de esto puede deberse a que al usar la UniRef90 como base de datos, es importante tener en cuenta que esta base de datos toma las secuencias más largas de cada *cluster* de proteínas presente, y tal vez las de este grupo (Brassicaceae) sean las más larga en varios de estos *cluster* y por lo tanto de ahí su sobrerrepresentación y no la de especies más cercanas. También hay

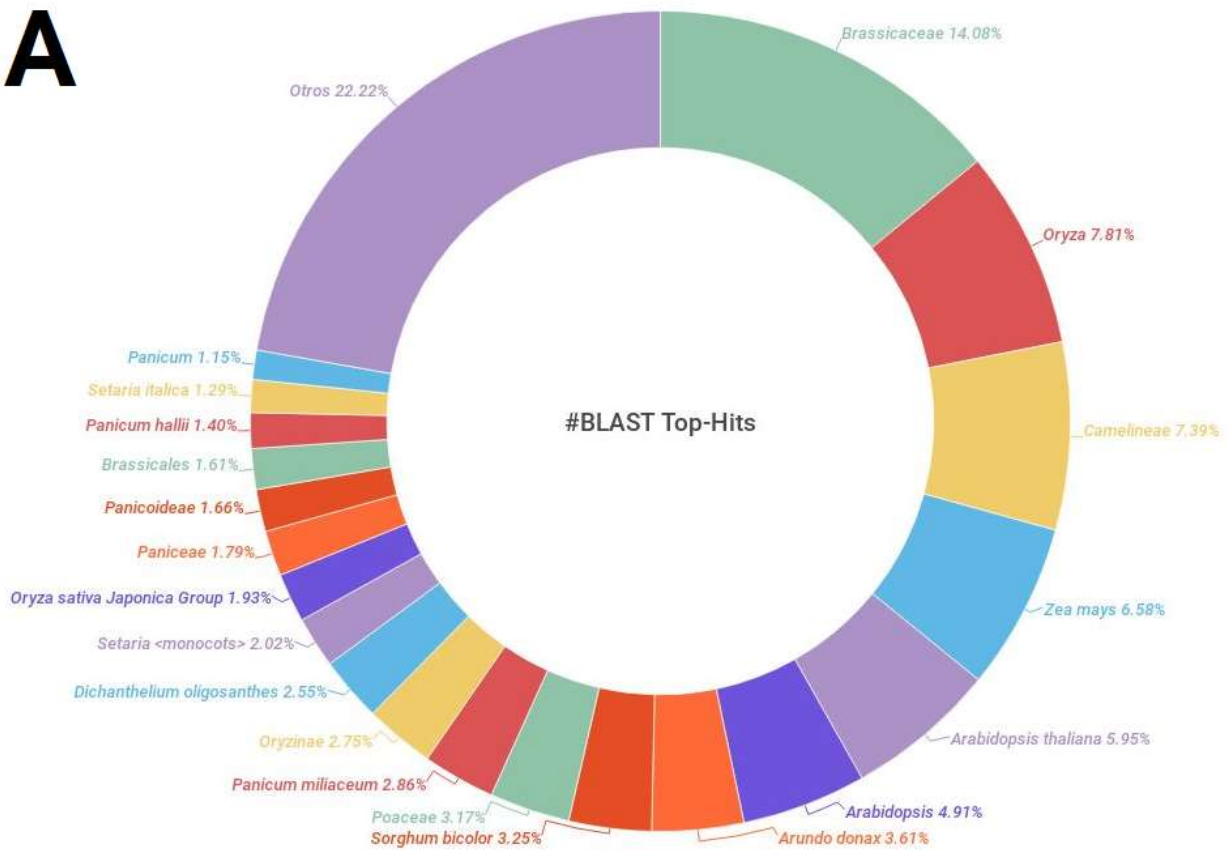
que tomar en cuenta que esto no es un análisis filogenético y si de homología contra una base de datos dada y no necesariamente el grupo más cercano filogenéticamente sean las más representadas.

Los E-valores oscilaron entre $1e-5$ y $1e-50$ (77%), seguidos por 13% de valores de $10e-50$ a $10e-100$, 10% de *hits* con E-valores de $1e-100$ a $10e-180$. Los resultados entre $1e-5$ y $1e-50$ son diferentes al 51%, 56.6% y 29.0% reportado por Wu *et al* (2020), Jia *et al* (2015) y Ortiz *et al.*, (2017) respectivamente. Esta menor similaridad de Chirú con relación a otras especies de *Paspalum* podría deberse a una divergencia evolutiva de esa especie que realizó un gran número de cambios en las secuencias y con esto disminuyo el grado de similaridad entre secuencias homologas de las especies representadas en la base de datos usada.

La anotación funcional del ensamblado final se realizó utilizando los resultados de BLASTx contra la base de datos Uniref90 Swissprot agregando los *hits* de Uniref90 de TrEMBL. También el programa EggNOG asignó un total de 74,618 contigs a 11,853 grupos ortólogos que se agregaron a las anotaciones.

La **Figura 8** muestra la distribución de términos GO para los 203815 (27.5% del total) *contigs* anotados por B2G, en donde los términos GO más abundantes fueron procesos metabólicos del ADN (proceso biológico), unión ATP (función molecular); y componente integral de membrana (componente celular). Esto es bastante menor al 41.5% de transcriptos anotados en *P. notatum* (de Oliveira *et al.*, 2020).

A



B

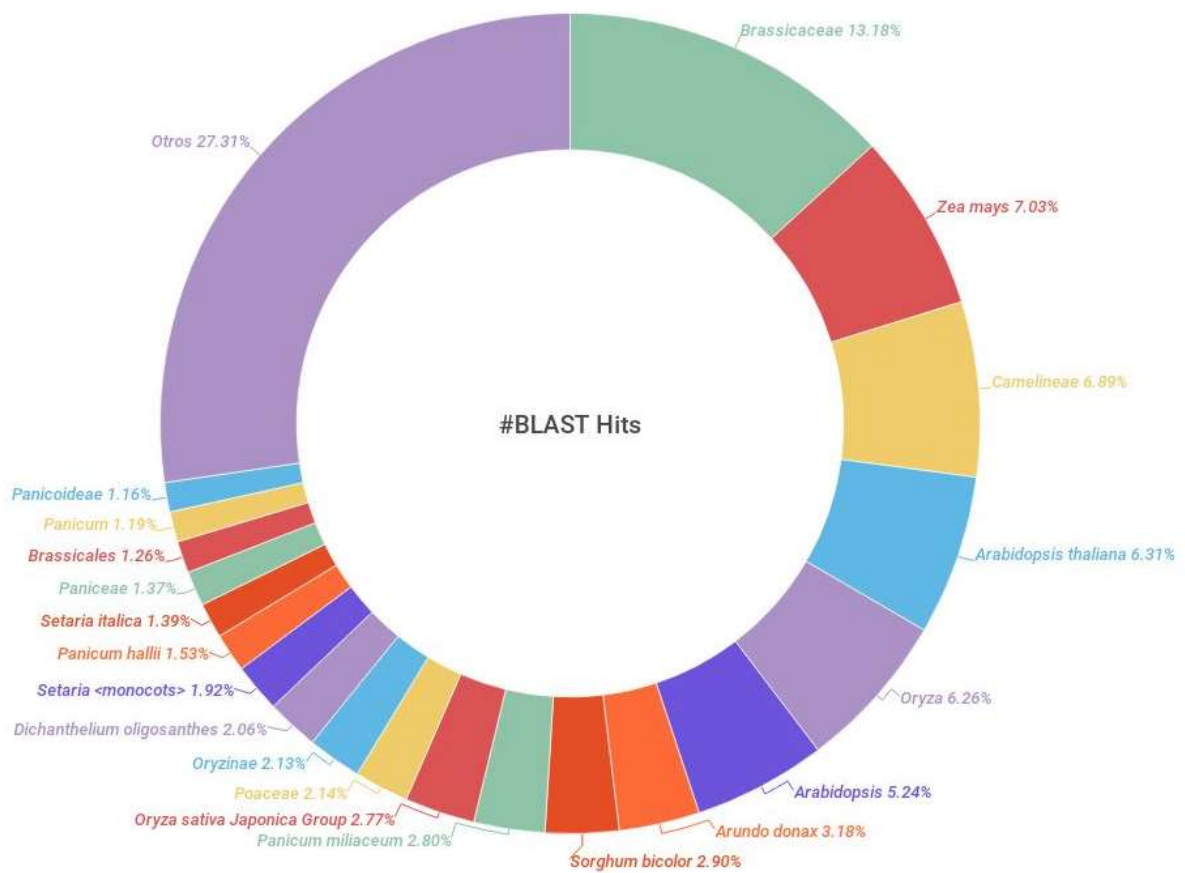


Figura 7. Gráficos de resultados del BLASTx del ensamblado *de novo* del transcriptoma de Chirú. (A) Distribución de especies de los mejores *hits* y (B) de las especies con mayores *hits*. Las especies de mejores *hits* se calcularon en base a alineamientos de secuencia con el E-valor más bajo obtenido.

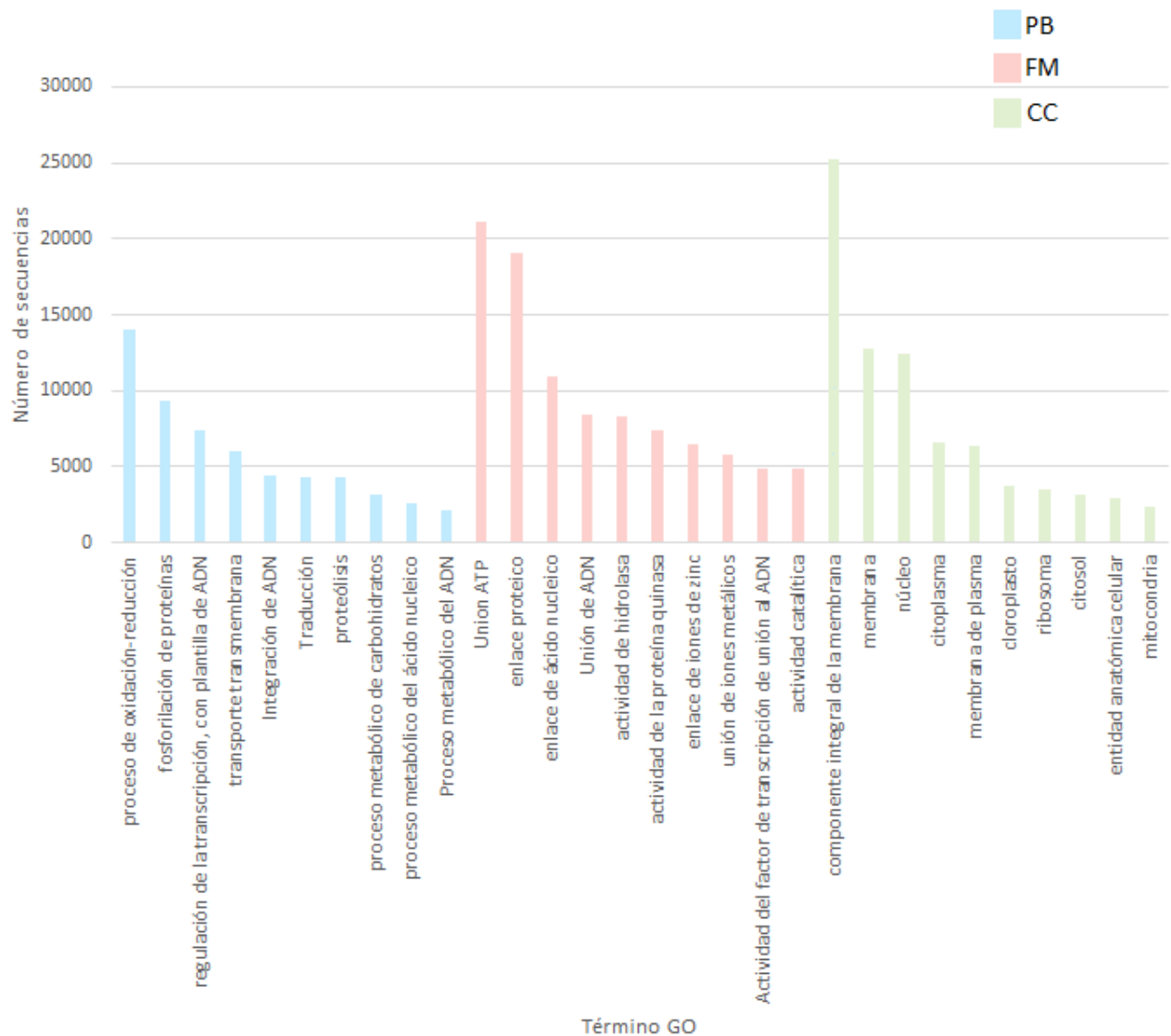


Figura 8. Los 10 términos GO por categoría funcional con mayor número de secuencias en la referencia final de Chirú. Proceso biológico (PB), función molecular (FM) y componente celular (CC).

3.3.6. Anotación del genoma de *C. paspali* y determinación de posibles proteínas secretadas y factores de patogenicidad

Se predijeron 8122 genes que codifican proteínas en el genoma borrador de la cepa RRC-1481 de *C. paspali* con el protocolo de FunGAP (**Tabla 7**). Este genoma contaba con 1128 *contigs* con un tamaño total aproximado de 30Mb. Previamente en base al borrador de genoma de *C. paspali* publicado por Scharld *et al* (2013) se habían predicho 8830 posibles proteínas y puestas a disposición en <http://csbio-l.csr.uky.edu/cpas2011/>.

Tabla 7. Resumen de anotación del genoma de *C. paspali* RRC-1481

Atributo	Valores
Tamaño genoma (Mb)	29.8
Regiones repetidas (% genoma)	22.2%
Genes codificantes de proteínas	8122
Promedios transcriptos (pb)	1587.3
Tamaño promedio CDS (pb)	1384.1
Tamaño promedio proteínas (aa)	461.4
Tamaño promedio exón (pb)	557.1
Tamaño promedio intrón (pb)	136.8
Densidad de gene (genes/Mb)	280.32
BUSCO	S 87.75%, D:1.0% F 5.93% M 5.32%

S = Genes copia única completos; D= Genes copia única duplicados; F = Genes copia única fragmentados; M = Genes copia única faltantes

Nuestra nueva anotación suma nuevos paquetes para la anotación como es el caso de BRAKER (Hoff *et al.*, 2016) y evidencia en base a los datos de ARN-seq de expresión *in planta*. En comparación con la anterior anotación, se compartieron 5887 proteínas (con un BLASTp E-valor < 10^{-180}). Se realizó un análisis BUSCO de la anotación dando como resultado la presencia del 88,75% de los grupos BUSCO completos (copia única o duplicada), mientras que el 5,93% solo se recupera parcialmente y falta el 5,32%. La presencia de más de un 90% de homólogos a los genes BUSCO (entre completos y fragmentados) puede dar una idea de que se recuperó una buena proporción de los genes presentes en el genoma, a pesar de que este está bastante fragmentado.

Tabla 8. Términos GO enriquecidos en el secretoma predicho para *C. paspali* RRC-1481

GO ID	Nombre GO	Categoría	N° de secuencias
GO:0016787	Actividad hidrolasa	FM	88
GO:0005975	Procesos metabólicos de los carbohidratos	PB	33
GO:0004553	Actividad hidrolasa, hidrólisis de compuestos O-glicosil	FM	32
GO:0016798	Actividad hidrolasa, actuando en uniones glicosil	FM	32
GO:0008233	Actividad peptidasa	FM	26
GO:0070011	Actividad peptidasa, actuando en L-amino péptidos ácidos	FM	25
GO:0006508	Proteólisis	PB	24
GO:0004175	Actividad endopeptidasa	FM	15
GO:0016825	Actividad hidrolasa, actuando en uniones fosforo-nitrogenados ácidos	FM	12
GO:0008236	Actividad peptidasa del tipo serina	FM	12
GO:0017171	Actividad hidrolasa serina	FM	12
GO:0005576	Región extracelular	CC	11
GO:0000272	Procesos catabólicos de los polisacáridos	PB	8
GO:0005976	Procesos metabólicos de los polisacáridos	PB	8
GO:0004252	Actividad endopeptidasas de tipo serina	FM	8
GO:0004190	Actividad endopeptidasas de tipo aspártico	FM	6
GO:0070001	Actividad peptidasa del tipo aspártico	FM	6
GO:0030247	Uniones polisacáridos	FM	4
GO:0030248	Uniones celulasa	FM	3

FM = Función molecular; PB = Proceso biológico; CC = Componente celular.

Un total de 6727 proteínas aproximadamente el 82% del total de las proteínas predichas mostraron resultados de homología (E-valor < 10^{-5}) en una búsqueda contra la base de datos UniRef90, y a 5320 se les asignó al menos un término de ontología génica (GO). La distribución de

las especies de mayor éxito de BLASTp mostró que la mayor homología es con proteínas de *C. purpurea* (43%). Este resultado es esperado ya que *C. purpurea* es la especie más cercana con la que se cuenta la mayor información de secuencia.

Las 8122 proteínas predichas fueron la base para la predicción del secretoma (a partir de ahora se asumirá como secretoma a todas las proteínas predichas que cumplan con las condiciones marcadas en el punto 3.2.11). Utilizamos una aproximación para la determinación del secretoma *in silico* en donde la combinación de programas de predicción en cada paso del proceso aumenta la especificidad, pero disminuye la sensibilidad. Esto hace que se excluyan falsos positivos y se pierdan verdaderos positivos debido a la rigurosidad de la predicción (Min, 2010). Al final vamos a lograr tener un set menor de proteínas, pero con una alta probabilidad de ser secretadas (**Fig. 9**).

Las proteínas pronosticadas para tener un péptido señal, sin anclaje GPI y dominio TM y sin señal de retención ER con una localización subcelular pronosticada como extracelular se clasificaron como secretadas por la ruta clásica. Del conjunto completo de proteínas predichas para el aislamiento de *C. paspali* RCC-1481, 364 de estas proteínas se determinaron como secretadas por la vía clásica. Por último, el subconjunto de la segunda categoría de proteínas que carecen de péptido señal, anclaje GPI y dominio TM, se evaluó la presencia de homólogos en la lista de proteínas secretadas con evidencia experimental en otros hongos patógenos de plantas. A continuación, las proteínas en el subconjunto que son homólogos de proteínas secretadas identificadas experimentalmente en otros hongos se evaluaron para detectar una señal de retención ER y su localización subcelular pronosticada, y aquellas sin una señal de retención ER y localización subcelular pronosticada como extracelular se clasificaron como proteínas extracelulares secretadas a través de una vía de secreción no clásica. Solo se encontraron 3 proteínas mediante este método. En conjunto, 367 proteínas (4,5% del proteoma total) se predijo como proteínas secretadas. Varios estudios han informado que el tamaño del secretoma fúngico se correlaciona con el estilo de vida (Lowe y Howlett, 2012; Meinken *et al.*, 2014; Lo Presti *et al.*, 2015). El estricto método de predicción del secretoma utilizados aquí no permiten la comparación directa con las predicciones de secretoma realizadas previamente para otras especies de hongos. Pero, el tamaño del secretoma predicho está de acuerdo con los datos obtenidos de varios otros biótrofos facultativos en Lo Presti (2015) donde aproximadamente del 5% al 8% del proteoma era parte del secretoma. *C. paspali* tiene como rango de huéspedes el género *Paspalum* con más de 300 especies de plantas, en base a esto, su genoma codifica un secretoma relativamente pequeño. Esto podría sugerir que el amplio rango de hospedadores no se logra mediante la adquisición de una gran cantidad de proteínas secretadas, y que los pequeños secretomas pueden minimizar el potencial de desencadenar la inmunidad de la planta (Anderson *et al.*, 2017). En *C. paspali* su capacidad de

infección se puede deber a la amplitud de las funciones de las proteínas secretadas, o la alta especialización de estas para inhibir las respuestas de las especies del género *Paspalum*. Estos resultados son similares, además, al bien estudiado biótrofo del maíz *Ustilago maydis* donde aproximadamente el 7% de los genes predichos codifican proteínas secretadas (429 en total) y de los cuales 70% son de función desconocida (Kämper *et al.*, 2006). En el caso de *C. paspali*, el secretoma predicho *in silico* contiene 230 proteínas que no tienen dominios Pfam conservados. Lo Presti (2015) identificó que los hongos biotróficos, incluido *C. paspali*, contienen un gran número de proteínas secretadas sin anotaciones funcionales, que se puede deber en gran medida a la especificidad de estas proteínas con su hospedero. En total, los términos GO se asignaron a 120 secuencias, y los resultados de InterproScan se asignaron a 190. Esta información se utilizó para análisis de enriquecimiento utilizando el *test* exacto de Fisher implementada en el software B2G para comparar la composición del secretoma con la del proteoma completo. Este análisis mostró que hay 19 GO enriquecidos (**Tabla 8**).

La actividad hidrolasa (GO:0016187) es el GO que tiene el mayor número de secuencias representadas con 88, seguido por los procesos metabólicos de los carbohidratos (GO:0005975). Esta descripción funcional del secretoma muestra similitudes con el análisis de todos los secretomas fúngicos registrados en FunSecKB2 (Meinken *et al.*, 2014) así como en el previamente reportado para *C. purpurea* (Oeser *et al.*, 2017). Estas enzimas podrían ser necesarias para la descomposición de la pared celular de la planta y el proceso de penetración-colonización. Sin embargo se ha demostrado que en los hongos biotróficos como *C. paspali* se han determinado repertorios pequeños y específico de estas enzimas (Lo Presti *et al.*, 2015; Poppe *et al.*, 2015; Haueisen y Stukenbrock, 2016; Ah-Fong, Shrivastava y Judelson, 2017). Para comprender mejor la capacidad del secretoma para degradar la pared celular de la planta, se realizó una búsqueda con la base de datos CAZyme, con el fin de encontrar homólogos a enzimas que degradan la pared celular de las plantas. La anotación CAZyme basada en dbCAN v3.0 identificó 46 proteínas tipo CAZyme con asignación a 24 familias. De todas nuestras proteínas anotadas como CAZyme, 39 se agruparon en 20 familias de glicosil-hidrolasas (GH). De las restantes 5 proteínas, tres pertenecen a dos familias de enzimas redox que actúan en conjunto con CAZymes (AA) y las otras dos proteínas a dos familias de carbohidratos esterasas (CE) (**Anexo 4**). Un total de dos proteínas cuentan con más de un dominio de CAZyme. Las principales familias de GH son GH16 (β -1,3-glucanasa), GH43, GH55 (alfa/ β -1,3-glucanasa), que contienen 4, 4 y 3 proteínas respectivamente. De estas 18 contienen motivos de degradadoras de la pared celular (Lo Presti *et al* 2015), lo que podría indicar que estas proteínas pueden ser factores de virulencia, y por lo tanto también de interés. La mayoría de estas enzimas anotadas están involucradas en la degradación de la hemicelulosa. La hemicelulosa

es una mezcla de polisacáridos que contienen diferentes azúcares, que incluyen xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y ramnosa. Por lo tanto, se necesitan diferentes enzimas para descomponer este componente de la pared celular. En el secretoma de *C. paspali* encontramos homólogos a 3 xilanasas, 4 arabinasas, 3 galactasas. Además de esta mezcla de enzimas, otras podrían estar involucradas en la degradación de la celulosa y la pectina, que son los componentes principales de la pared celular primaria y la lámina media. En mutantes de *C. purpurea* sin actividad poligalacturonasa (*cpgg1/cpgg2*) se observó la reducción de la patogenicidad de más del 98% en el sistema *C. purpurea*-centeno (Oeser *et al.*, 2002). Esto debido a que el pistilo y el tejido transmisor del ovario contienen pectina (Tenberge *et al.* 1996). En *C. paspali* encontramos 1 pectinesterasa involucrada en la actividad pectidasa, 1 beta-glucosidasa y 2 glucanasas y 1 celulasa. En general, estas enzimas pueden tener las siguientes funciones: facilitar el crecimiento intercelular a través de la lámina media siguiendo el ‘rastro de pectina’, es decir, el tejido transmisor rico en pectina ‘guía’ a las hifas, comparable al crecimiento del tubo de polen (Oeser *et al.*, 2002). Además, podrían proporcionar al hongo directamente nutrientes (función saprófita), así como liberar iones de calcio unidos a la pectina necesaria para la polaridad hifal y el crecimiento apical (Tenberge, 1999). También podría contribuir a la liberación de elicitors (oligogalacturónidos) que causan reacciones de defensa y muerte celulares generando poros en la pared celular y aumentando la accesibilidad a la pared celular de otras enzimas degradadoras de pared celular del hongo (Kubicek *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014).

Curiosamente, no se vieron sobrerrepresentados términos GO como unión a quitina (GO:0008061). Las proteínas de unión a quitinas son parte importante de los secretomas de los hongos biótropos (Pusztahelyi, 2018). Las células vegetales albergan receptores inmunes que perciben la quitina de la pared celular de los hongos y trabajan para detener la infección (Sánchez-Vallet, Mesters y Thomma, 2015). Sin embargo, los hongos fitopatógenos liberan proteínas de unión a quitina que perturban la inmunidad desencadenada por quitina como es el caso de las que contienen el dominio LysM (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013; Sánchez-Vallet, Mesters y Thomma, 2015). En el secretoma de *C. paspali* se detectó únicamente una proteína con este dominio de unión a quitina. Esta única candidata puede ser de particular interés porque las interacciones de efectores con quitina para suprimir la respuesta de defensa inducida por quitina es un mecanismo utilizado por proteínas efectoras conocidas como Avr4 o Ecp6 (van den Burg *et al.*, 2006; Jonge *et al.*, 2010).

Dentro del secretoma fúngico, PPs con una longitud de secuencia inferior a 300 aminoácidos han sido ampliamente estudiadas por su papel en la patogénesis fúngica y vegetal (Ej: Van Der Does y Rep, 2007; Stukenbrock *et al.*, 2011; Beckerson *et al.*, 2019). Se ha descubierto que algunos de las PPs actúan como efectores que juegan un papel central en el establecimiento de la infección

de las plantas (Krijger *et al.*, 2014; Lo Presti *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016). Típicamente, las proteínas efectoras fúngicas no comparten dominios conservados, lo que hace que la predicción efectora sea un desafío. Aun así, los efectores fúngicos a menudo comparten ciertas características de secuencia, como el tamaño, el contenido de cisteína o los pequeños motivos identificados en los hongos (Sonah, Deshmukh y Bélanger, 2016). Sin embargo, el papel de los PPs y las proteínas de tipo efector en la patogénesis de *Claviceps-Paspalum* sigue sin respuesta. En este sentido, hemos identificado un set de PPS y proteínas de tipo efector dentro de los secretoma de *C. paspali* para permitir el descubrimiento de potenciales proteínas putativas de virulencia (**Anexo 3**).

Usando un enfoque de diferentes criterios, identificamos al 68% del secretoma predicho como posibles genes de virulencia en la cepa RRC-1481 de *C. paspali*. Dentro del secretoma fúngico, los PPS y proteínas PPRC han sido ampliamente estudiados por su papel en la patogénesis fúngicas, particularmente para los efectores que funcionan en el espacio apoplástico (Lo Presti *et al.* 2015, Lo Presti y Kahmann 2017, Sperschneider *et al.* 2018). Sin embargo, el papel de las secretadas y las proteínas similares a los efectores en la patogénesis de *Claviceps-Paspalum* sigue sin respuesta. RRC-1481 tiene aproximadamente 245 (66%) y 114 (31%) de PPs y PPRC respectivamente. Estos números son más altos que los contenidos promedio de PPs (52%) y PPRC (23%) determinados en hongos patógenos de plantas por Krijger *et al.* (2014), pero son similares a los resultados obtenidos por Kim *et al.* (2016) para biótrophos. Esto podría llevar a la teoría de que los biotrófos probablemente codifican más y diversas proteínas similares a efectores para suprimir la defensa del huésped en comparación con los necrótrofos, que generalmente usan enzimas y fitotoxinas que degradan la pared celular para matar a los huéspedes. Además, aproximadamente más de la mitad de los PPRC carecen de homología con proteínas en otras especies, como se informó anteriormente para hongos y oomicetos de plantas, en donde se han descrito varios efectores apoplásticos PPRC que carecen de homología con proteínas en otras especies (Lo Presti *et al.*, 2015).

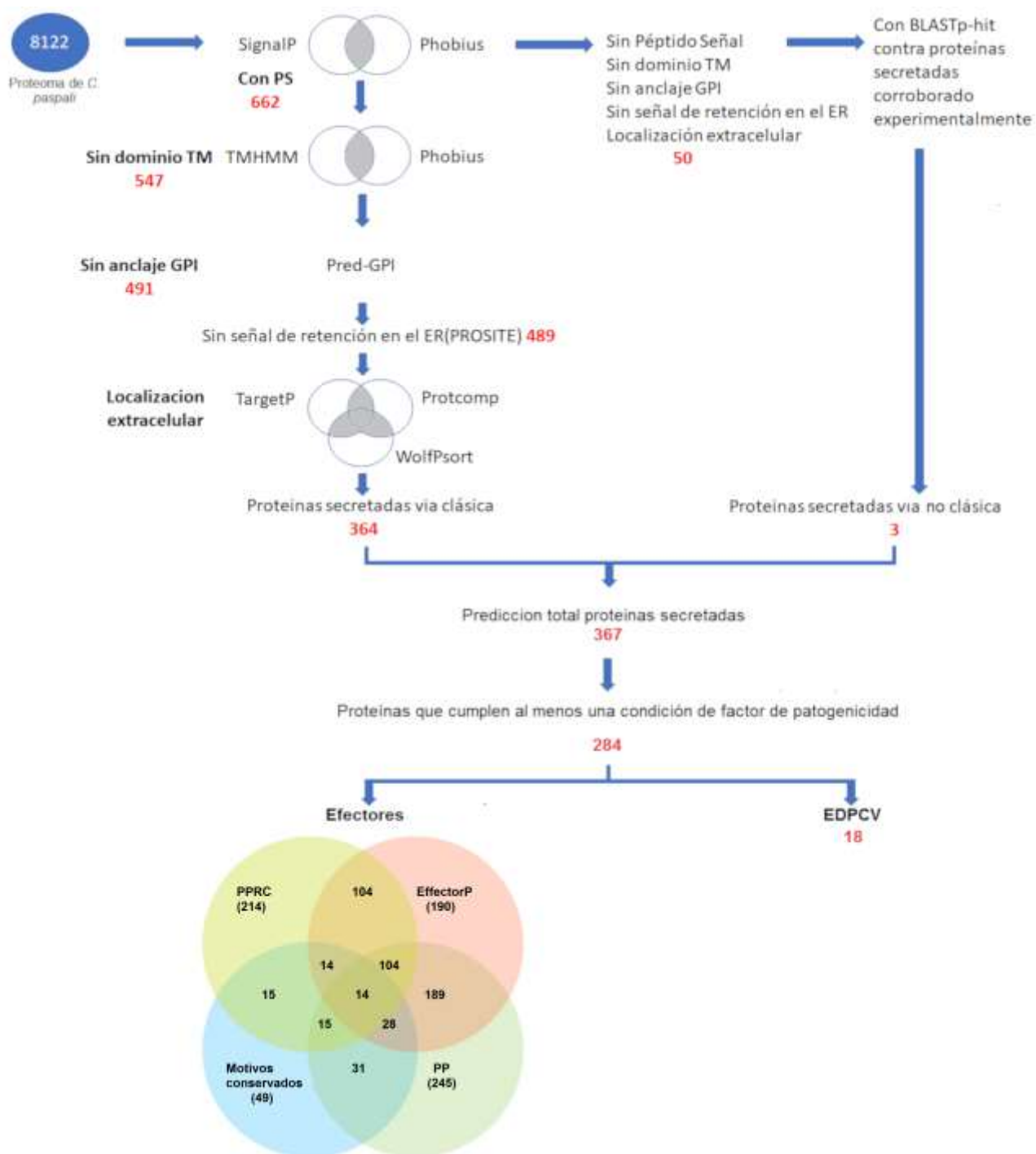


Figura 9. Flujo de trabajo para la predicción del secretoma de *C. paspali* utilizando herramientas bioinformáticas. En gris las proteínas utilizadas en el siguiente punto del flujo. En rojo número de proteínas después de cada metodología aplicada. PRS=Proteínas ricas en cisteínas; >300aa= Proteínas menores a 300aa. EDPCV = Enzimas degradadoras de la pared celular vegetal.

El resumen de los resultados de la predicción de efectores se resume en la **Figura 9**. La predicción con el software EffectorP predijo 190 proteínas posibles de los cuales 14 ya habían sido predichas tanto como PPRC como por contener motivos conservados de efectores fúngicos. De los 237 posibles efectores, 135 no obtuvieron un resultado según BLASTp contra nr NCBI. Lo que podría indicar que estas secuencias son específicas para el genoma de *C. paspali*. Además, de los 14 efectores más probables debido a que fueron predichos por las cuatro condiciones, únicamente tres de estas proteínas tienen BLASTp contra proteínas en la base de datos nr NCBI. De estas, dos son proteínas no caracterizadas de *C. purpurea* y una proteína extracelular de *Passalora fulva*. Este hecho de que casi un 50% de los posibles efectores no tuvieron resultado de BLASTp podría no ser sorprendente porque la evolución de los efectores está estrechamente vinculada a la evolución de la respuesta inmune del huésped. Por lo tanto, cada patógeno necesita un conjunto específico de efectores altamente especializados para las interacciones con su planta huésped (Neu y Debener, 2019). La ausencia de éxitos BLAST a veces se toma como un parámetro de predicción para posibles proteínas efectoras (Syme *et al.*, 2013; Bowen *et al.*, 2009), lo que indica que estas secuencias no anotadas podrían ser las secuencias más interesantes para un análisis posterior. Esto podría indicar que los efectores más probables de *C. paspali* son además únicos de esta especie, que además es coherente desde un punto de vista de la especialización de hospederos que tiene *C. paspali*. Además, cabe destacar también que los resultados de EffectorP y las características de PPS se superponen en gran medida (189 PPS en 190 EffectorP), lo que podría deberse al hecho de que varias características que utiliza EffectorP para la construcción de modelos están estrechamente relacionadas con los criterios definidos para las PPS. Las características más discriminatorias utilizadas por EffectorP son el peso molecular, la longitud de la secuencia, la carga neta de proteínas y los porcentajes de cisteínas, serinas y triptófanos en la secuencia (Sperschneider *et al.*, 2016). Además, la mayoría de las proteínas que EffectorP utiliza como conjunto de datos de entrenamiento se identificaron mediante el uso de las características de los PPS (Neu y Debener, 2019).

3.3.7. Análisis de expresión diferencial

3.3.7.1. Transcritos diferencialmente expresados durante infección con *C. paspali* en el estigma-estilo de Chirú.

Para evaluar las diferencias de expresión entre EE sano e infectado, se estableció un experimento para investigar la expresión diferencial entre dos tiempos de infección contra un control sin infectar (pool de EE de 1 y 4 días post antesis). Las muestras infectadas representaron las siguientes etapas de desarrollo de *C. paspali* en *P. dilatatum*: fase de penetración del EE (1 dpi), hifas ya establecidas (4 dpi). Para cada punto de tiempo, se generaron tres réplicas biológicas, en total fueron 9 muestras, 3 sin infección, 6 post-infección (1 y 4 dpi).

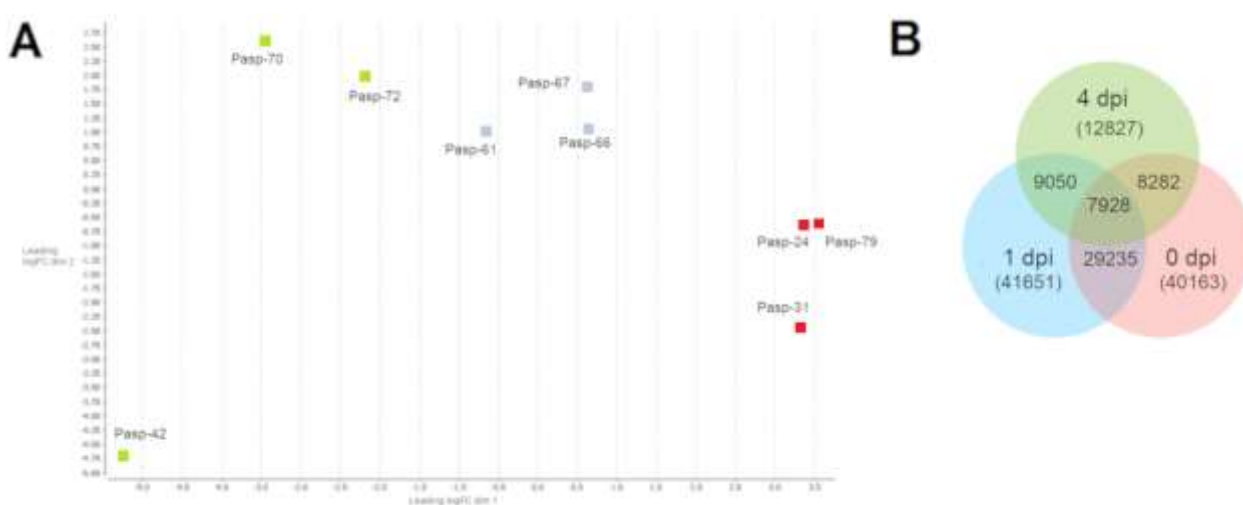


Figura 10. Análisis de expresión del transcriptoma en tres tejidos de Chirú durante la infección con *C. paspali*. A - MDS para los tres tejidos de Chirú. Se realizó un análisis de expresión de los transcritos dentro de cada tejido, y se utilizaron datos de abundancia de transcripción para comprender las relaciones dentro de cada tiempo post infección. B - Diagrama de Venn de la distribución de transcritos expresados TPM > 1 en todas las muestras por tejido de EE de Chirú según el tiempo post infección con *C. paspali*. Rojo = 0 dpi; Azul = 1 dpi; verde = 4 dpi.

El mapeo promedio de las 9 muestras contra el ensamblado final *de novo* fue del 78% (**Anexo 5**), lo que sugiere que esta referencia es adecuada para el análisis de perfiles de transcripción en este cultivar. Sin embargo, también 57% de los *reads* mapearon a esta referencia más de 1 vez, lo que puede indicar la alta redundancia de transcritos, o también relacionada a la alta presencia de homólogos de un mismo gen como se discutió previamente, debido a la poliploidía del cultivar Chirú. La disminución de mapeo en base a la referencia final con los *contigs* contaminantes 83% vs 78% (**Tabla 6**) se puede deber a que en las muestras hay un número de *reads* correspondientes a contaminación externa (hongos, insectos, bacterias).

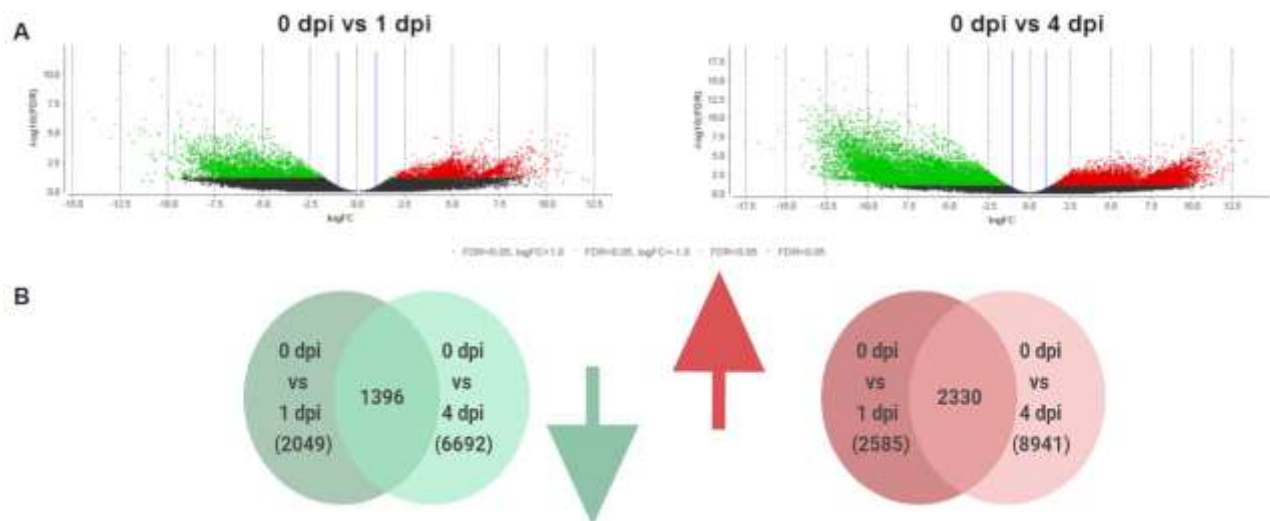


Figura 11. Gráficas de expresión diferencial en la comparación EE control (0 dpi) vs EE infectado de Chirú con *C. paspali*. A - Diagrama de volcán de la expresión diferencial entre las comparaciones 0 dpi vs 1 dpi y 0 dpi vs 4 dpi. La línea vertical indica el umbral de significancia ($|\log_2\text{FoldChange}| > 1$). Los TDE sobreexpresados en cada comparación se muestran con puntos rojos y los subexpresados en verdes, mientras que los que no son TDE están en negro. B -Diagrama de Venn con los TDE sub y sobreexpresados compartidos en cada comparación.

Se realizó un análisis para visualización y comparación de la expresión entre los tres grupos de muestras. Incluimos solo los *contigs* en donde las 3 réplicas de cada condición presentan un $\text{TPM} > 1$. Se observó que las muestras de 1 dpi tenían un mayor nivel de expresión de transcritos

(41039), mientras que el tejido 4 dpi muestra la menor expresión (12030) (**Fig. 10**), observándose una reducción de casi una tercera parte. Esto puede deberse a la hipótesis de que el hongo al colonizar el EE, mediante la inducción de auxinas y citoquinas, genera una pérdida de la homeostasis en las vías de las auxinas/citoquinas (Hinsch *et al.*, 2015; Hinsch, Galuszka y Tudzynski, 2016), algunas de las cuales están involucradas en vías de la senescencia y nutrición de la planta (Oeser *et al* 2017). Esto podría generar la disminución de la expresión de gran parte de la maquinaria de la planta, cesando o disminuyendo ciertos procesos metabólicos. En análisis de *multi dimensional scaling* (MDS) en base a los valores de expresión de los tres tratamientos, en donde se puede ver una separación clara entre las tres condiciones, y a su vez una relación entre las muestras infectadas que las separa de la condición sin infectar. Hubo una alta reproducibilidad del transcriptoma entre las muestras, ya que se puede ver poca dispersión entre muestras de un mismo estadio, siendo la muestra Pasp-42 (4 dpi) la única excepción.

Utilizando la condición 0 dpi como referencia, se realizó la expresión diferencial entre las diferentes muestras en base a un FDR < 0.05 y un $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ en donde se determinó que en la comparación 0 dpi vs 1 dpi, se identificaron 4634 transcritos diferencialmente expresados (TDE), que incluyen 2049 genes regulados hacia arriba o sobreexpresados (1920 anotados) y 2589 regulados hacia abajo o subexpresados. Mientras que en 0di vs 4dpi, se identificaron 15633 TDE, 6692 transcritos regulados hacia arriba (6172 anotados) y 8941 (8571 anotados) regulados hacia abajo (**Fig. 11**). A los 4 dpi, el número de transcritos con niveles de transcripción significativamente alterados aumentó notablemente en comparación con 1 dpi (**Fig. 11**). Es importante mencionar que los transcritos sobreexpresados en las comparaciones de a pares con 0 dpi, podrían ser en realidad transcritos que estarían sobreexpresados durante la maduración y recepción del polen, procesos comunes del EE post-antesis. Por otra parte, los transcritos subexpresados en las comparaciones son en realidad los sobreexpresados en la condición infectada (1 o 4 dpi) los cuales podríamos inferir que son transcritos relacionados a la respuesta a la infección.

En base a los resultados de TDE realizó un análisis de enriquecimiento (Fisher *exact test*) usando como set de referencia todos los transcritos anotados funcionalmente en la referencia ensamblada *de novo*. En total, 226 y 210 términos GO fueron enriquecidos en base a los transcritos sobreexpresados en la condición sana. Mientras que un total de 252 y 516 GO se enriquecieron significativamente respectivamente en base a los transcritos sobreexpresados en las condiciones de infección. De estos, 112 eran compartidos entre ambas comparaciones en base a los transcritos sobreexpresados y 229 compartidos por las comparaciones de los transcritos

subexpresados. Los procesos biológicos y funciones moleculares fueron las dos mayores categorías enriquecidas respectivamente en ambas comparaciones.

Algo interesante en los resultados obtenidos, es que se puede ver el término GO de respuesta de defensa a hongos (GO:0050832) pasa de no estar entre los términos GO enriquecidos en 1 dpi a estar entre los 20 términos más enriquecidos en 4 dpi (**Anexo 6**). Esto podría indicar que posiblemente, Chirú está generando una respuesta de defensa mayor a medida que avanza la infección. Para que esto ocurra previamente, hay que reconocer la presencia del hongo por parte de la planta. Para esto los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) realizarían un primer reconocimiento percibiendo PAMPs y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Monaghan y Zipfel, 2012). La estimulación de los PRR en la membrana celular es un paso clave en las primeras etapas de la PTI (Macho y Zipfel, 2014). Según Franco-Orozco *et al.*, (2017) el PAMP fúngico más conocido es la quitina, y otros PAMPs fúngicos caracterizados incluyen endopoligalacturonasas (PG) (Zhang *et al.*, 2014), ergosterol (Klemptner *et al.*, 2014) y la proteína Ave1 (Avirulencia en tomate Ve1), que se conservan en múltiples fitopatógenos (Thomma, Nürnberger y Joosten, 2011; De Jonge *et al.*, 2012). En nuestro set de datos sobreexpresados identificamos varios transcritos homólogos a proteínas PRR en ambos tiempos de infección y en la condición sana (0 dpi) (**Fig. 12**). Entre los posibles receptores de membrana a 1 dpi, hay transcritos homólogos con receptores similares a quinasas (RLKs). Estas son un grupo de receptores de membrana que participan en muchos procesos de señalización importantes, incluido el crecimiento de las plantas y desarrollo, señalización hormonal y respuestas a estrés (Zhou *et al.*, 2014). Entre las RLK sobreexpresados encontramos homólogos de *CRK5* y *CRK6* de *Arabidopsis thaliana* y *CRK10* de *Oryza sativa* que han sido reportados como importantes en la señalización en respuestas de PTI (Idänheimo *et al.*, 2014; Yadeta *et al.*, 2017). Estas pertenecen a una de las subfamilias más grandes de RLK, la proteína receptor quinasa tipo receptor rica en cisteína (CRK) que se ha demostrado su sobreexpresión frente a tratamientos con O₃, ácido salicílico (SA), PAMP y agentes patógenos (Du y Chen, 2000; Wrzaczek *et al.*, 2010). También se encontraron sobreexpresados homólogos al receptor quinasa con motivo de lisina (LysM) 4 (*LYK4*) de *Arabidopsis thaliana* la cual funciona como un receptor de quitina en la superficie célula (Wan *et al.*, 2012) y homólogos de la RLK quinasa receptora asociada a la pared celular (WAK). En *Arabidopsis*, la percepción de oligogalacturónidos (OG) derivados de PAMPs son mediados por *WAK1* y *WAK2* (Brutus *et al.*, 2010; Kohorn y Kohorn, 2012), siendo *WAK2* una de las WAK sobreexpresadas a 1 dpi y 4 dpi. La sobreexpresión de estos transcritos sugeriría que los PAMPs de *C. paspali* y los DAMPs provocados por su infección podrían ser percibidos por los PRR de Chirú, desencadenando así una respuesta de la PTI. Curiosamente no se identificó un transcritor

con homología a la proteína de Brassinosteroid insensitive 1-asociado (*BAK1*) tanto en 1 como 4 dpi. El *BAK1* es un co-regulador central de la PTI, y tiene un papel regulador general en los complejos de receptores asociados a la membrana plasmática como los con dominios ricos en leucina (LRR)-RLK (Franco-Orozco *et al.*, 2017; Irieda *et al.*, 2019). Es necesario para la activación completa de las respuestas de defensa inducidas por patógenos, como la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno 6 (*MPK6*) y producción de ROS (Chinchilla *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011). Sin embargo, si se encontraron transcritos sobreexpresados a 4 dpi con homología al receptor quinasa de embriogénesis somática 1 (*SERK1*) de *A. thaliana*. Este gen también es inducible por moléculas de señalización como SA, JA y ácido abscísico (ABA) (Lewis *et al.*, 2010; Podio *et al.*, 2014), importantes durante la defensa a patógenos. Esta proteína puede parcialmente mediar la transducción de señales de defensa además de su papel básico en la embriogénesis somática (Hu, Xiong y Yang, 2005). Se buscó también, en los transcritos sobreexpresados durante la etapa de infección la presencia de receptores citoplasmáticos específicos de reconocimiento de patógenos. Esta búsqueda se lleva a cabo con la herramienta DRAGO2 (Osuna-Cruz *et al.*, 2018) de la *Plant Resistance Genes database* (prgdb.org). Esta herramienta busca dominios conservados en estas proteínas como LRR, quinasa, NBS y receptores Tol/interleuquina- 1 (TIR) usando HMMER v3. En base a esto se detectaron un total de 122 secuencias (45 en 1 dpi y 113 en 4 dpi) que contenían dominios conservados de receptores. Nos centramos en los que tenían dominios NBS-LRR y TIR-NBS-LRR que son los dos tipos más comunes de receptores citoplasmáticos (Pusztahelyi, 2018; Jubic *et al.*, 2019). Únicamente dos transcritos cumplían con esta condición ambos sobreexpresados en 4 dpi, homólogos al Disease resistance protein *PIK6-NP* y *Pik-2* de *Oryza sativa* que reconocen el factor de virulencia *AVR-Pik* del biótrofo *Magnaporthe oryzae*. Esto podría indicar la presencia de receptores involucrados en la ETI en esta interacción, pero sin saber exactamente que rol pueden cumplir en el reconocimiento de *C. paspali*, ya que este no contiene proteínas homólogas a este factor de virulencia en su repertorio de proteínas secretadas.

Después del reconocimiento por parte de los diferentes receptores de membrana que censan la región extracelular, ocurriría una cascada de señalizaciones que llevarían a que la planta modulara la expresión de los genes de defensa, así como también iniciaría los reordenamientos metabólicos y activando la resistencia basal a patógenos (Bigeard, Colcombet y Hirt, 2015). Las respuestas intracelulares relacionadas con PTI incluyen respuestas tempranas como la inducción de flujos iónicos, la señalización por proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK), la biosíntesis de etileno, la activación transcripcional de los genes de defensa y la deposición de calosa para el refuerzo de las paredes celulares como una respuesta tardía (Zhu *et al.*, 2013; Macho y Zipfel, 2014;

Boutrot y Zipfel, 2017). Los genes asociados a la defensa normalmente están regulados positiva o negativamente de manera dinámica por factores de transcripción que son objetivos directos o indirectos de diversas vías de transducción de señales, así como, es probable que múltiples vías de señalización de PTI activen las defensas a través de la convergencia en cascadas de MAPK superpuestas y factores de transcripción (TF) (Schwessinger y Zipfel, 2008; Zipfel, 2009). Específicamente, a 1dpi y 4 dpi se sobreexpresan varios posibles TF como TFs de respuesta a etileno (ERFs), dedos de Zinc (ZF), proteínas WRKY y diversas MAPK. Entre estas MAPK encontramos la *MAPK3* clave en la activación de las respuestas de la planta al estrés biótico, y *MAPK4* involucrada en la señalización de defensa a patógenos (Pitzschke, Schikora y Hirt, 2009; Meng y Zhang, 2013). *MAPK3* y *MPK6* juegan papeles críticos en la señalización PTI y ETI, y es probable que estas MAPK fosforilen de manera similar proteínas involucradas en la señalización durante la PTI y ETI (Medeiros *et al.*, 2009; Bigeard, Colcombet y Hirt, 2015; Danquah *et al.*, 2015). Sin embargo, *MPK6* no se expresa diferencialmente en los estadios enfermos. Interesantemente, en *Arabidopsis*, *MPK4* reprime la resistencia dependiente del ácido salicílico (SA) (Bressendorff *et al.*, 2016), importante en la defensa contra biótiro ya que a menudo resulta en una HR. Entre los WRKY sobreexpresados encontramos homólogos a *WRKY22* y *WRKY46* de *A. thaliana* que ha sido demostrada su participación en cascadas de señalización de *MAPK3/MAPK6* como mecanismo de control en la defensa activada por PAMPs (Sheikh *et al.*, 2016). Curiosamente, existen dos factores de transcripción relacionados con la represión de la inducción de defensa como son el *WRKY11* (Journot-Catalino *et al.*, 2006) y *WRKY51* (Gao *et al.*, 2011). En ambos casos se ha demostrado en *A. thaliana* que estos están inducidos por el SA, y que reprimen la defensa inducida por el ácido jasmónico (JA) mediante mecanismos que aún se desconocen. Entre las ZF sobreexpresados encontramos la ZF YY1 de *A. thaliana* que se ha reportado que regula respuesta de defensa, especialmente durante la infecciones con patógenos necrotróficos como *Botrytis cinerea*, interactuando en promotores genes de susceptibilidad reprimiendo su expresión (Lai *et al.*, 2014). Entre los ERFs encontramos homólogos de *ERF5* (Hao, Ohme-Takagi y Sarai, 1998) y *ERF1b* (Lorenzo *et al.*, 2003) de *A. thaliana*. Estos se ha reportado que actúan como activadores transcripcionales, uniéndose a promotores relacionado con la patogénesis de la caja de GCC, y participa en la regulación de la expresión génica mediada por factores de estrés y por componentes de las vías de transducción de señales de estrés (Hao, Ohme-Takagi y Sarai, 1998). *ERF1b* parece ser un integrador clave de las señales de etileno (ET) y JA en la regulación de las defensas dependientes de estas moléculas (Lorenzo *et al.*, 2003). Como resultado de la sobreexpresión de estos TF y MAPK, se puede explicar la sobreexpresión de diversas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), y también de transcriptos homólogos a enzimas modificadoras de la pared celular como la pectinesterasa y calosa sintasa (solo 4 dpi) y celulosa sintasa (Oide *et al* 2013). Entre estas

MAPK encontramos un transcripto homólogo a la proteína quinasa activada por mitógeno 1a (*MAPKK1a*) de *Physcomitrella patens* que está involucrada en la defensa frente a patógenos mediante la inducción de deposición de calosa en la pared celular y acumulación de transcripciones relacionadas con la defensa. Esta proteína es necesaria en la cadena de señalización tras el reconocimiento de quitina fúngica (Bressendorff *et al.*, 2016). La inducción de enzimas que modifican la pared celular podría implicar un mecanismo compensatorio de mantenimiento de la integridad de la pared celular cuando se perturba la integridad por la invasión del patógeno (Hamann, 2012; Zhang *et al.*, 2018) así como un endurecimiento de la pared mediante la calosa podría ayudar a evitar la subsecuente penetración por parte de *C. paspali*. En particular las pectinesterasas también están involucradas tanto en el “relajamiento” de la pared celular, al hacer que los poligalacturonanos sean accesibles a la degradación por las poligalacturonasas, así como en el fortalecimiento de la pared celular, al aumentar la disponibilidad de poligalacturonanos para unión por Ca²⁺ (Haile *et al.*, 2019).

En el GO respuesta a hongos encontramos transcriptos en su mayoría homólogos de la superfamilia de proteínas PR. Las respuestas de defensa basal de la planta incluyen la inducción de PRs, proteínas que comprenden un grupo de 17 familias que forman parte de los mecanismos de defensa inducibles por las plantas contra los patógenos (van-Loon *et al.*, 2006). En nuestro set de datos sobreexpresados durante la infección con *C. paspali* encontramos transcriptos con homología a genes que codifican miembros de *PR-1*, *PR-2* (b-1-3-glucanasa), *PR-3* (quitinasa), *PR-5* (taumatina), *PR-6* (inhibidor de la proteasa), *PR-9* (peroxidasa) y *PR-11* (endoquitinasa). Similar a esto, pero con una respuesta menor en número de familias PRs presente (únicamente *PR-1*, *PR-2*, *PR-3*, *PR-5*) había sido reportado como respuesta en la interacción *B. distachyon* (Kind *et al.*, 2017) y *Secale cereale* (Oeser *et al.*, 2017) a la infección con *C. purpurea*. También encontramos homólogos de la familia de Wheatwin 1, proteínas *PR-4* antifúngicas con conocida acción contra *Fusarium graminearum* y *Botrytis cinerea* en trigo (Bertini *et al.*, 2009). Entre los GO enriquecidos en ambos tiempos de infección, encontramos los relacionados con el metabolismo de chitinas como es unión a chitina (GO:0008061), actividad chitinasa (GO:0004568) y procesos catabólicos de la chitina (GO:0006032). Las quitinasas y especialmente las que tienen un dominio de unión a quitina juegan un papel importante en la defensa contra hongos patógenos hidrolizando la quitina componente de la pared celular fúngica (Jashni *et al.*, 2015). También encontramos el término GO muerte de células de otros organismos (GO:0031640) enriquecido en ambos tiempos de infección. En este se encuentran *contigs* con homología a PRs como proteínas similares a taumatina que pertenecen a la familia de proteínas *PR-5*, bien conocida por inhibir el crecimiento de hongos (Ng, 2004; Ali *et al.*, 2018).

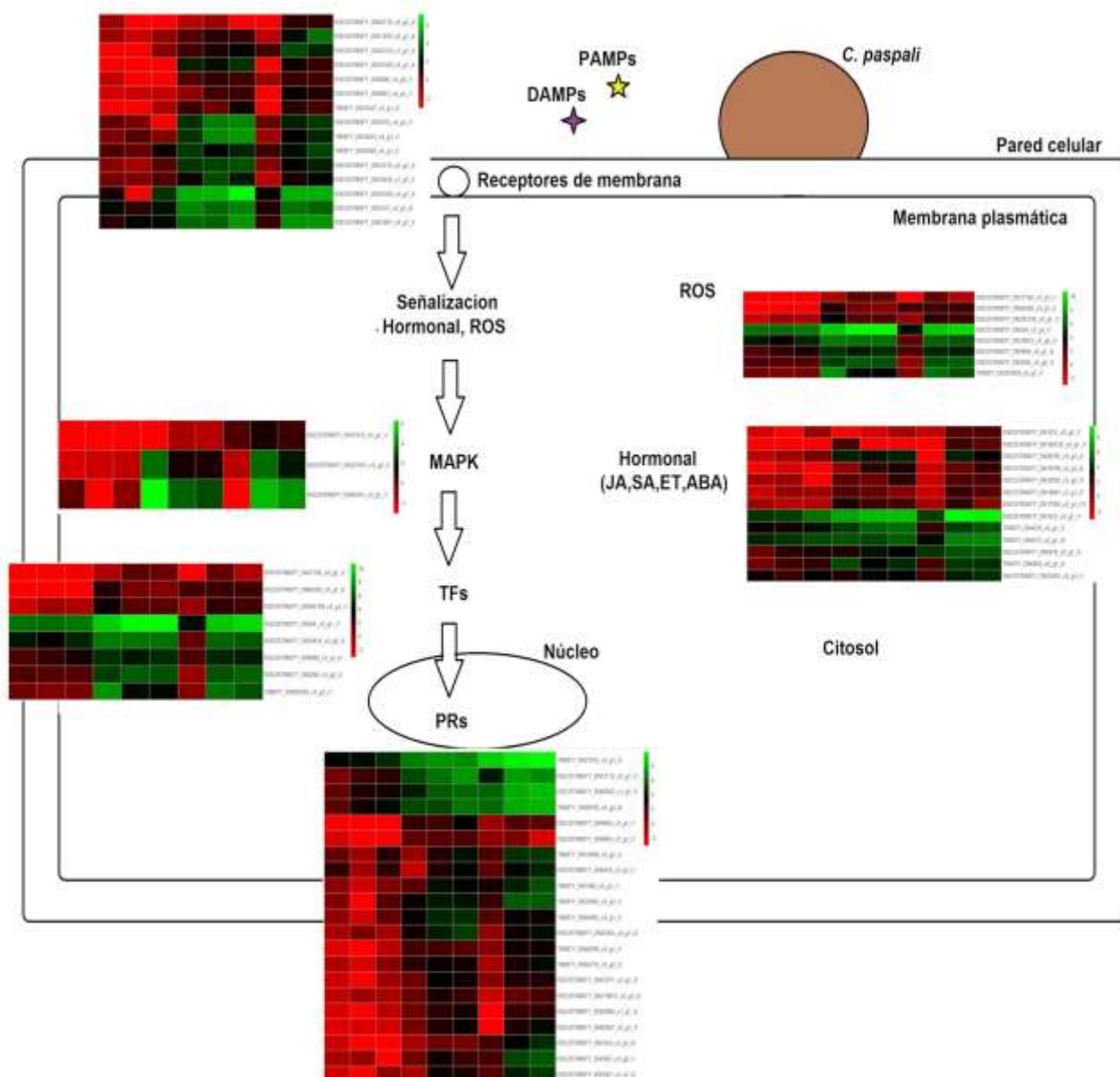


Figura 12. Esquema general que se propone para reconocimiento de *C. paspali* por el EE de Chirú con *heatmaps* de transcritos de interés diferencialmente sobreexpresados transformados por log2CPM. Después de la invasión de *C. paspali*, los PAMP del hongo y posteriormente DAMPs son detectados por los PRR de la membrana plasmática. Luego de esto, la planta inicia la PTI activando la producción de ROS, y con esto la señalización por fitohormonas como SA, JA, ET, ABA. Los ROS seguramente también activen la fosforilación de diferentes MAPK como la *MAPK3* que a su vez activan varios TF, como WRKY, ZF que estimulan la inducción de genes PRs entre otros. No es un modelo estático ya que por ejemplo el ET a través de los ERF/APA2 también induce la transcripción de PRs. La coloración verde indica mayor expresión, la coloración roja indica no expresión. El orden en todos los *heatmap* es 3 repeticiones 0 dpi, 3 repeticiones 1 dpi, 3 repeticiones 4 dpi. La escala de color: rojo = baja o no expresión, verde = alta expresión. IDs de los transcritos, descripción y números de acceso a homólogos se enumeran en **Anexo 7**.

En las paredes de las células de gramíneas el principal polisacárido hemicelulósico es el xilano. Típicamente, los xilanos de gramíneas constituyen entre el 20 y el 30% de la pared celular total (Hatfield, Rancour y Marita, 2017). Las enzimas como la endo-(1-4)- β -xilanasas, β -D-xilosidasa y α -L-ara-binofuranosidasa que degradan la pared celular de las plantas y con esto la primera línea física de defensa con la que cuentan estas (Misas-Villamil y van der Hoorn, 2008; Chmelová *et al.*, 2019). La alteración del xilano en las primeras etapas de la infección con *C. purpurea* en centeno sugiere fuertemente la secreción de actividad xilanolítica por el hongo (Oëser *et al.* 2017). Por lo tanto, es fundamental la producción de inhibidores de este tipo de enzimas para combatir este mecanismo de infección (Chmelová *et al.*, 2019). Entre estos inhibidores encontramos los inhibidores de xilanasas. Transcritos con homología a estas enzimas también fueron expresados en ambos tiempos de infección, lo que podría indicar que de alguna manera Chirú está intentando inhibir estas enzimas para evitar la colonización por el hongo.

Entre las primeras respuestas celulares a la señalización intracelular de PTI son cambios en la concentración de calcio citoplasmático, la activación de proteínas quinasas, o la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Romeis *et al.*, 2001). Estas respuestas rápidas son un requisito previo para la posterior reprogramación transcripcional y alteraciones en el estado hormonal que finalmente conduce a la defensa frente a patógenos (Dubiella *et al.*, 2013). Para esto se requiere un circuito de activación de la proteína quinasa dependiente de calcio (CPDK) y NADPH oxidasas para la propagación rápida de la señal de defensa (Kim, 2012). Estos también han sido involucrados como señalización de procesos reproductivos de las plantas, como el crecimiento del tubo polínico y las interacciones polen-estigma (Zhou *et al.*, 2014). La producción de ROS durante el estrés puede representar una amenaza para las células, pero también se cree que actúan como señales para la activación de las vías de respuesta al estrés y de defensa. Por lo tanto, ROS puede verse como indicadores celulares de estrés y como mensajeros secundarios involucrados en la vía de transducción de señales de respuesta al estrés (Dodds y Rathjen, 2010). Coherentemente con esto, algunos de los transcritos sobreexpresados en los estadios enfermos, presentan homologías con la oxidasa de explosión respiratoria (*RBOH*), MAPKs, peroxidasas (*PRX*), superóxido dismutasa (*SOD*), y glutatión-S-transferasa (*GST*) y CPKs. Las CPDK, que tienen una combinación de sensor de calcio y proteína calmodulina y el dominio efector de la quinasa, son candidatos atractivos para la traducción de los cambios en las concentraciones de calcio intracelulares en distintas respuestas de defensa inducidos por PAMP (Dubiella *et al.*, 2013). En nuestro caso encontramos transcritos con homología a *CPDK19*, la cual presenta estos tres dominios. Su sobreexpresión puede ir en consonancia con la sobreexpresión de NADPH oxidasas como las de la familia homólogos de *RBOH*. Estas proteínas se localizan en la membrana plasmática, y están involucradas en la

producción de superóxido y otros ROS, incluyendo H_2O_2 que puede causar peroxidación de lípidos, reticulación de proteínas de la pared celular y lignificación (Pusztahelyi, 2018; Adachi y Tsuda, 2019). No se encontraron homólogos por ejemplo de la *RBOHD*, descrita por activarse durante la PTI y ETI, y por ser un punto convergente de señal entre las PRR y la señalización NLR (Adachi y Tsuda, 2019; Kadota *et al.*, 2019). Una vez producido el H_2O_2 por las *RBOH*, la sobreexpresión de PRX como la *PRX1* y *PRX11* podría indicar la reducción de este a través de estas enzimas a H_2O . En particular las *SOD* son metaloenzimas que constituyen la primera línea de defensa contra las ROS, siendo uno de los principales componentes enzimáticos de la desintoxicación de los radicales superóxidos generados en el sistema biológico al catalizar su dismutación a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 es permeable a la membrana y puede ingresar al citosol y a los diferentes orgánulos funcionando a su vez como señal para otras vías de respuesta como la inducción de PRs a través de la señalización por fitohormonas (García-Limones *et al.*, 2002). También se requiere H_2O_2 para la reticulación de componentes de la pared celular de la planta como parte de la respuesta de defensa estructural respuesta así como para desarrollar un ambiente antimicrobiano dentro del apoplasto (Schaffer y Bronnikova, 2012). Por lo tanto, la sobreexpresión de estas puede deberse a una señal de la activación de la PTI, así como también deberse a una inducción normal durante el proceso de polinización. Otro de los términos GO enriquecido tanto a 1 como 4 dpi es el proceso catabólico de toxinas (GO:0009407). Los transcritos que pertenecen a este término son homólogos de proteínas *GST*. Esta enzima es responsable de degradar ROS (García-Limones *et al.*, 2002; Schaffer y Bronnikova, 2012). Su expresión puede reflejar la mayor carga de estrés oxidativo que la planta tiene que enfrentar durante la infección por *C. paspali* o la polinización, así como la presencia toxinas. También fueron identificados transcritos que posiblemente codifican para *GST* inducidos a 1 dpi y 4 dpi. Se ha demostrado que los niveles elevados de glutatión (GSH) (compuesto que el GST degrada) coinciden con la inducción de genes PRs en *A. thaliana* (Senda y Ogawa, 2004). Además, el GSH, desempeña un papel importante en la síntesis secundaria de metabolitos, principalmente mediante la regulación de enzimas clave como fenilalanina amonio liasa y chalcona sintasa (Loyall *et al.*, 2000; Gomez *et al.*, 2004) de las cuales encontramos homologas sobreexpresadas durante la infección a 1 dpi y 4 dpi. Estos resultados son similares a los obtenidos durante la infección con el biotrofo *U. maydis* en maíz (Doehlemann *et al.*, 2008). A su vez, el peróxido de hidrógeno producido por las NADPH oxidasas, puede viajar al citoplasma de las células vegetales sirviendo como molécula de señalización de otra respuesta de defensa que incluye la biosíntesis de etileno (ET) (Bronnikova, 2012). En base a esto también vemos la sobreexpresión de transcritos con homología a factores de transcripción relacionados a la respuesta con ET, como los *ERFs* y *Apetala 2 (AP2)*. La superfamilia AP2/ERF es una de las mayores superfamilias de factores de transcripción en cultivos (Singh, Foley y Oñate-Sánchez, 2002). Las interacciones entre

etileno y esta superfamilia pueden jugar un papel importante en la regulación de los procesos fisiológicos en condiciones normales y de estrés (Abiri *et al.*, 2017).

La peroxidación lipídica de la membrana plasmática ocasionada por los ROS seguida de la lixigenación de ácidos grasos puede conducir a la biosíntesis de oxilipinas, precursor de JA (García-Limones *et al.*, 2002; Ho, Murthy y Park, 2020). En concordancia con esto, hay una sobreexpresión en ambos tiempos de infección de transcritos con homología a la 12-oxofitodienoate reductasa (12-OPR) 4 que puede estar involucrada en el metabolismo de las moléculas de señalización de oxilipina (Scalschi *et al.*, 2013). La activación de la vía de señalización del JA fue reportada previamente como regulada diferencialmente en interacciones compatibles (Makandar *et al.*, 2010; Blümke *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2019), entre ellas en la interacción *C. purpurea-Brachypodium distachyon* mediante *LOX2* (Kind *et al.*, 2017). Algunos transcritos con homología a lipoxigenasas como *LOX1* y *LOX3* de *A. thaliana* que aumentan su expresión a 1 (*LOX3*) y 4 dpi (*LOX1* y *LOX3*). *LOX1* podría estar involucrada en la vía de señalización del JA en Chirú como respuesta a la infección con patógenos como ha sido previamente reportado en otros sistemas (Windram *et al.*, 2012; Kazan y Lyons, 2014; Guo *et al.*, 2016). *LOX3* se induce en respuesta a OG (Windram *et al.*, 2012), lo que podría indicar de que los OG pueden ser los responsable de la respuesta temprana con JA, asociada también con los receptores WAK ya mencionados. La activación temprana y sobreexpresión de estos genes involucrados en la biosíntesis de JA y ET sugeriría que su expresión está mediada por el reconocimiento PAMP/DAMP ocasionados por *C. paspali*. La regulación de la señalización de JA generalmente se asocia con una inducción de genes de defensa de plantas frente a hongos como las previamente nombradas quitinasas (Glazebrook, 2005; Quandt *et al.*, 2016).

De igual forma, detectamos sobreexpresados transcritos con homología a proteínas involucradas en la síntesis de SA, como es la metilestarasa 7 (*MES7*). Esta se requiere para convertir el salicilato de metilo (MeSA) en SA como parte de las vías de transducción de señales que activan la resistencia en plantas (Dempsey *et al.*, 2011). SA es una molécula de señal de defensa crucial contra los invasores biotróficos (Beckers y Spoel, 2006; Lu, 2009). Induce la expresión de genes como *PR-1*, *PR-2*, *PR-5* en otras interacciones de *Claviceps* (Kind *et al.*, 2017), siendo *PR-1* uno de los principales genes marcadores en la señalización de esta vía en general (Morris *et al.*, 1998)

Otros genes relacionados con vías de señalización de fitohormonas que son sobreexpresados durante la infección con *C. paspali* son los asociados a la vía de las auxinas. La hormona vegetal auxina se distribuye a través del transporte intercelular y es encargada de inducir diferentes respuestas celulares desde respuesta a la luz y desarrollo vascular hasta crecimiento en cultivo de tejidos (Woodward y Bartel, 2005). Entre ellas encontramos el ácido indol-3-acético (IAA) el cual

es una de las principales auxinas en las plantas, controlando muchos procesos fisiológicos importantes, incluidos crecimiento y división celular, diferenciación de tejidos y respuesta a la luz (Woodward y Bartel, 2005; Rodrigues *et al.*, 2013). Existen reportes de que las auxinas también se asocian con una mayor susceptibilidad a los microorganismos biotróficos (Han y Kahmann, 2019). Varios patógenos vegetales producen hormonas vegetales como auxina, ABA y citoquininas (CK), que contribuyen a su virulencia. Parte de su objetivo es desbalancear la homeostasis de estas vías (Spallek *et al.*, 2018). La estrategia de interferir con la vía de la auxina de la planta se ha demostrado que ocurre durante la infección con *C. purpurea* en centeno y *B. distachyon* (Oeser *et al.*, 2009, 2017; Hinsch *et al.*, 2015; Kind *et al.*, 2018). En nuestros resultados, se determinó la inducción de varios transcritos que podrían estar involucrados en la activación de la vía de señalización de auxina después de la infección con *C. paspali* incluidos homólogos a IAA. A altas concentraciones, la auxina promueve una asociación entre Auxina/IAA (Aux/IAA) y una proteína F-box conocida como respuesta inhibidora del transporte 1 (*TIR1*). Este complejo activa la ligasa E3 que conduce a la degradación de Aux/IAA, permitiendo la liberación de factores sensibles a auxina (*ARF*) del complejo (Han y Kahmann, 2019). En total cuatro transcritos homólogos a E3 ubiquitin ligasas con GO respuesta a ABA (GO:0009737) fueron sobreexpresados a los 4 dpi, así como diferentes proteínas de respuesta a auxinas, entre ellas *IAA1* y *IAA9*. La participación de las auxinas en el desarrollo de la enfermedad y la susceptibilidad a los patógenos puede incluir el alargamiento rápido de los tejidos de las plantas al aumentar la extensibilidad de la pared celular (Rodrigues *et al.*, 2013), y con esto hacer más fácil la penetración de la pared por parte de los patógenos. Las proteínas que participan en la extensión de la pared celular inducida por auxinas son las endo- β -1,4-glucanasas, las endotransglicosilasas de xiloglucano y las expansinas (solo a 4 dpi) (Rodrigues *et al.*, 2013), de las cuales encontramos homólogos sobreexpresados en ambos tiempos de infección

3.3.7.2. Los cambios de expresión a 0 días post infección en el estigma-estilo de Chirú en comparación con los momentos de infección con *C. paspali*

Como ya se dijo previamente, los transcriptos sobreexpresados a los 0 dpi podrían ser transcriptos involucrados en procesos normales del desarrollo del estigma post-antesis y polinización. En ambas comparaciones, 0 dpi vs 1 dpi y 0 dpi 4 dpi, el término GO más enriquecido en 0 dpi fue la unión a ATP. Este término ya previamente había sido reportado como el más enriquecido en otros procesos de polinización (Rao *et al.*, 2017). También encontramos en ambas comparaciones enriquecidos los términos GO: reproducción sexual (GO:00199953), modificaciones de la pared celular (GO:0042545), actividad pectinoesterasa (GO:0030599), crecimiento del tubo polínico (GO:0009860), tubo polínico (GO:0040906), términos que previamente han sido reportados como sobreexpresados durante la polinización (Zhang *et al.*, 2017). Entre estos términos encontramos transcriptos homólogos a expansinas y pectinoesterasas las cuales han sido previamente reportadas como enzimas que probablemente faciliten la entrada del tubo polínico en el estigma al ‘aflojar’ la pared celular papilar y/o modificar la pared del tubo polínico durante su crecimiento (Zhou *et al.*, 2014; Glazinska *et al.*, 2017; Rao *et al.*, 2017). Términos como modificaciones de la pared (GO:0042545) han sido previamente reportados que disminuían su expresión durante infección con patógenos fúngicos (Solano-De La Cruz *et al.*, 2019). Se detectó la sobreexpresión de transcriptos en la condición sana homólogos de diversas RLKs, en concordancia con otros trabajos que han reportado que hay RLKs involucrados en diversos estadios de la interacción polen-estigma como el reconocimiento del polen, relacionados con la compatibilidad de este con el estigma (Tax y Kemmerling 2012), siendo uno de estos casos el de receptores de polen (*PRK*). También hay una sobreexpresión de arabinogalactanos (AGP). Estas proteínas han sido reportadas que se secretan específicamente al estigma concomitantemente con la adquisición de receptividad (Losada y Herrero, 2012) y cumplen un papel de apoyo a la germinación del polen (Fowler y Endress, 2016). Su secreción podría ser un proceso conservado en plantas con flores y su expresión podría marcar la receptividad estigmática (Fowler y Endress, 2016). Las proteasas similares a la subtilisina sobreexpresadas en el estadio sano también podrían estar involucradas en las respuestas de defensa local y sistémica, incluida la respuesta contra el polen incompatible (van der Hoorn, 2008). Otras transcriptos identificados como sobreexpresados en el EE a 0 dpi, como los homólogos a inhibidores de EDPCV entre ellos inhibidores de poligalacturonasa y xilanasas, así como de enzimas desintoxicantes de ROS como la GSH también podrían funcionar en respuesta a la polinización (Wilkins *et al.*, 2011). La sobreexpresión de *MAPK*, proteína quinasas serina/treonina y varios TF como las familias *WRKY* y *MYB* es coherente ya que han sido también reportadas en el proceso de polinización e importantes durante los cambios transcripcionales que ocurren en este tejido durante dicho proceso (Zhou *et al.*, 2014; Glazinska *et al.*, 2017).

Existe una interconexión entre las vías que regulan el estrés/defensa y las respuestas de

polinización en el estigma (incluyendo sinergismo en coexistencia), lo cual ha sido previamente identificado por Rejón *et al.*, (2013). En nuestro caso, se sabe que existe una relación entre la receptividad al polen y la susceptibilidad al hongo. Los exudados de estigma enriquecidos en azúcar son particularmente susceptibles a la infección por hongos y bacterias (Yi *et al.*, 2006; Rejón *et al.*, 2013). Este hecho puede explicar la presencia de varias familias de proteínas relacionadas con la patogénesis y otras proteínas relacionadas con la defensa en los transcriptomas de este tejido. Sin embargo, estos genes relacionados con la defensa también podrían funcionar en respuesta a la polinización. Por ejemplo, las quitinasas (*PR-3*) podrían estar involucradas en la degradación de los AGP, y los carbohidratos liberados de esta degradación como los OG podrían funcionar como moléculas de señalización del proceso de polinización, así como de respuesta a patógenos (Van Hengel y Roberts, 2002; Rejón *et al.*, 2013).

3.3.7.3. Diferencias de expresión entre estigmas-estilos pre y post antesis. Receptividad, polinización, desarrollo y transcriptos específicos.

Como se ha reportado anteriormente para otros *Claviceps* como *C. purpurea* (Shaw y Mantle, 1980; Tenberge, 1999; Miedaner y Geiger, 2015), el EE receptivo al polen es tejido por donde la espora de *C. paspali* germina y coloniza la flor de *P. dilatatum* (Brown, 1916; Luttrell, 1977; D' Esposito y Lopez, 2001). Como ya se mencionó, la receptividad del EE y la posterior polinización están estrechamente relacionados con la susceptibilidad al Ergot. Es importante aclarar que, aunque Chirú es un cultivar apomíctico, es también pseudogamo (Milot, 1977) en donde la polinización es necesaria para el desarrollo del endospermo en la semilla (Bashaw y Holt, 1958). Por lo tanto, obteniendo los perfiles únicos de expresión de este tejido durante y previo a su estadio “susceptible”, podríamos generar información pertinente para entender más sobre este órgano tan importante para la colonización del hongo. Para esto, se procedió primero a determinar transcriptos que están diferencialmente expresados entre el tejido EE pre (EEPre) y post antesis (EEPost), el primero siendo el EE no receptivo al polen y el segundo siendo el receptivo al polen. Es importante aclarar que, durante la pre-antesis, no ocurre la infección con *C. paspali*, aunque no se ha

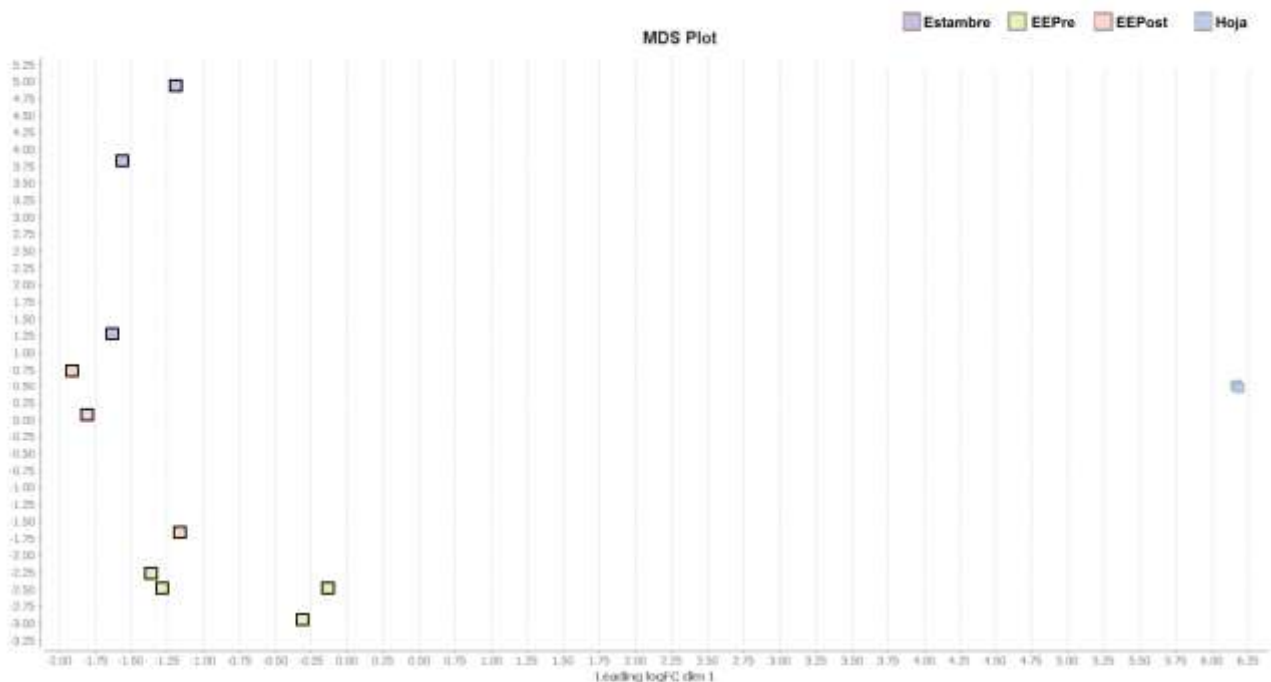
determinado si es debido al no contacto espóra-estigma (debido a que el estigma está dentro de las glumas) o si realmente no puede ocurrir la infección en esta etapa. También, se pretende determinar los cambios de expresión que se dan durante el proceso de desarrollo de un estadio a otro. Para determinar transcritos únicos del EEPPost se obtuvieron muestras de estambres y hojas para eliminar transcritos de expresión común con estos tejidos. En este análisis, incluimos solo transcritos en donde las 3 réplicas de cada condición presentan un TPM > 1 para la visualización y comparación entre los cuatro grupos de muestras (EEPost, EEPPre, hoja y estambres).

En la comparación EEPPre vs EEPPost, en base a un FDR < 0.05 y $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ se identificaron un total de 7633 TDE, que incluyen 4812 transcritos (2929 anotados) sobreexpresados en el EEPPre y 2821 (1613 anotados) sobreexpresados en el EEPPost (**Fig. 14**). En base a estos TDE determinados en la comparación se procedió también a realizar un test de enriquecimiento de Fisher. En total en el EEPPre se vieron sobrerrepresentados 320 términos GO, mientras que en el EEPPost 421. En ambos la actividad catalítica (GO:0003824) fue el término con más transcritos (**Anexo 8**). Nuestro interés se centró en los transcritos sobreexpresados en el EEPPost. Algunos GO sobreexpresados durante este estadio en este tejido son esperables por la función que cumple como es el caso de: polinización, reproducción y proceso reproductivo. Además, la respuesta al estímulo o el estrés y la comunicación celular se mostraron sobrerrepresentados en el EEPPost. Los dos primeros términos podrían implicar que la función del estigma en este estadio sería responder a un estímulo (granos de polen) y reconocer los granos de polen compatibles. Cuando los granos de polen se adhieren al estigma, se desarrolla una comunicación y posiblemente factores de reconocimiento, como las glicoproteína s-locus-específica (SLG). Se determinaron transcritos homólogos a esta proteína sobreexpresados en el estadio EEPPost. Se ha descrito que esta proteína forma parte en la adhesión del polen y están mediadas por sus interacciones con las proteínas de la cubierta de polen (SLG se une a PCP-A1) (Nasrallah, Nishio y Nasrallah, 1991; Dzelzkalns *et al.*, 1993; Qin *et al.*, 2009).

Las hormonas vegetales y la posterior transducción de señales provocados por estas son muy importante para los cambios bioquímicos que ocurren durante el crecimiento de las plantas, el desarrollo y las vías de procesamiento de la información ambiental, así como durante la polinización (Ej: Quiapim *et al.* 2009, Zhao *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2017). En concordancia con esto encontramos algunos GO sobrerrepresentados en este tejido como respuesta a hormona (GO:0009725), respuesta a estímulos endógenos (GO:0009719), respuesta celular a estímulo hormonal (GO:0032870), vías de señalización mediadas por hormonas (GO:0009755). Para esto también es necesario previamente la síntesis de estas hormonas, y efectivamente se observaron enriquecidos GO como biosíntesis del JA (GO:0009695). Algunas vías enriquecidas como la

respuesta a etileno (GO:0009723), respuesta celular a estímulo de etileno (GO:0071396), vía de señalización activada por ET (GO:0009873) hace pensar que la síntesis de ET está activada, aunque no esté enriquecida como GO. Varios factores de transcripción formaron parte de estos GO, entre ellos encontramos el *MYB4* que ya ha sido reportado como involucrado en respuesta al estrés (Glazinska *et al.*, 2017), y diferentes ERF. De igual manera pasa con el SA y ABA ya que está enriquecida la transducción de señal de SA (GO:0009863) y la de ABA (GO:0009738). Todo esto puede indicar que la transducción de señales de estas hormonas vegetales juega un papel importante en la maduración del estigma y posterior polinización.

A



B

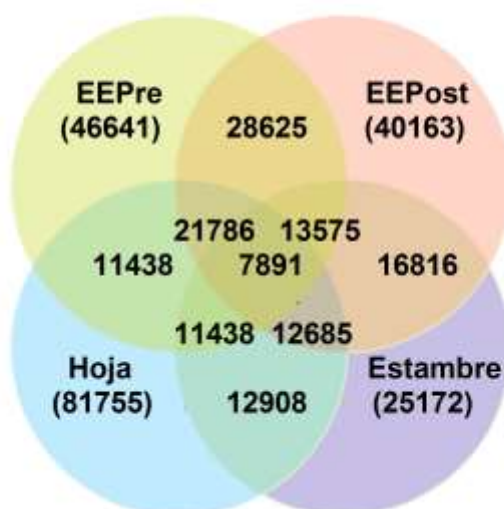


Figura 13. Análisis de expresión del transcriptoma de las muestras de cuatro tejidos de Chirú. A - Gráfico de escalado multidimensional para los cuatro tejidos de Chirú. B - Diagrama de Venn de la distribución de transcritos expresados TPM > 1 en todas las muestras por tejido de Chirú.

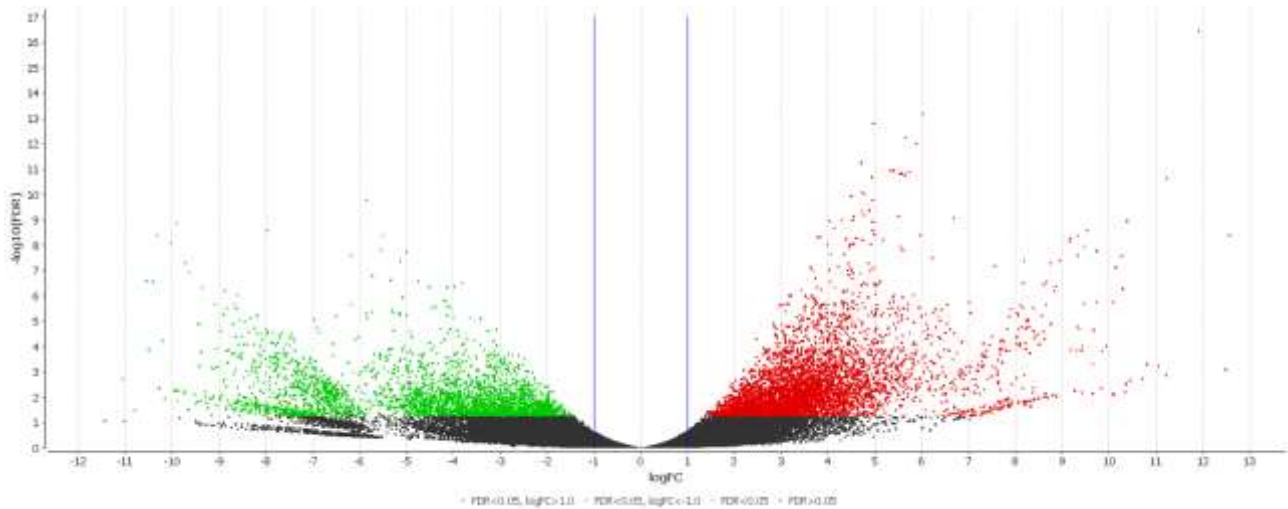


Figura 14. Diagrama de volcán de la expresión diferencial entre EEPre y EEPost. La línea vertical indica el umbral de significancia ($|\log_2\text{FoldChange}| > 1$). Los TDE sobreexpresados en cada comparación se muestran con puntos rojos y los subexpresados en verdes, mientras que los que no son TDE están en negro

Como ya ha sido previamente reportado, la polinización comparte sorprendentes similitudes con la respuesta a la infección por hongos en términos de respuestas biológicas (Elleman y Dickinson, 1999; Sollapura, 2015; Zhao, Zhang y Zhao, 2015). El análisis de enriquecimiento de GO identificó varios términos GO importantes involucrados en las respuestas de invasión de patógenos, como la respuesta a hongos, respuesta a otros organismos, respuesta a estrés (GO:0006950), este último estando entre los 10 términos GO más enriquecidos. Este resultado es consistente con otros estudios de polinización compatible de plantas (Zhao, Zhang y Zhao, 2015).

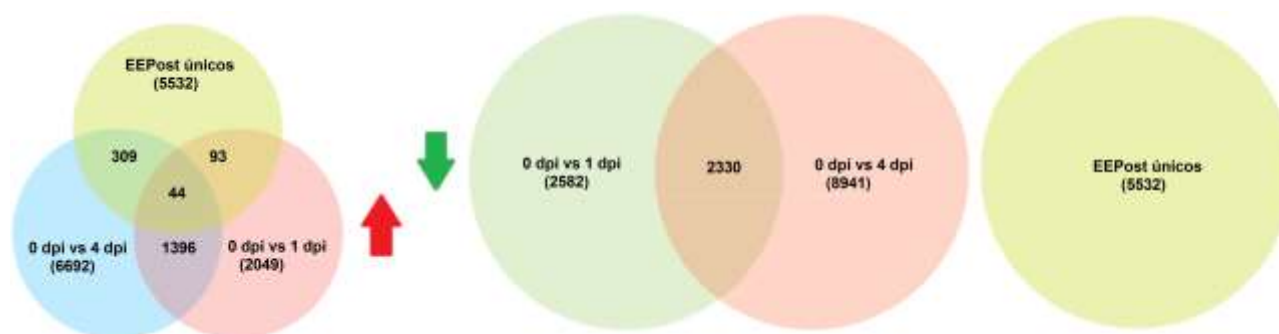


Figura 15. Diagrama de Venn que muestra la cantidad de transcritos en cada una de las expresiones diferenciales de EE de Chirú durante la infección con *C. paspali* que son transcritos únicos de EEPPost. A la izquierda de la flecha roja los transcritos sobreexpresados en cada comparación, a la derecha de la flecha verde, los transcritos subexpresados en cada comparación

Para determinar genes específicos del EEPPost se consideraron todos los transcritos con $TPM > 1$ en cada una de las tres repeticiones de cada uno de los cuatro tejidos (**Fig. 13**). En base a esto se obtuvieron 5532 transcritos específicos de EEPPost que tenían una expresión mayor a 1 TPM en EEPPost pero menor a 1 TPM en todas las repeticiones de los demás tejidos (**Fig. 13**). En base a estos transcritos, se intentó determinar cuáles estaban sobreexpresados en el EE a 1 o 4 dpi con *C. paspali*. En base a esto no se obtuvo un resultado con respecto a estos transcritos con cambios significativos durante la infección, pero si en el tiempo 0 dpi (**Fig. 15**). Esto último es de esperar ya que estos transcritos específicos probablemente están involucrados en procesos propios del EE durante el desarrollo post-antesis como la polinización que ya fue discutido previamente. Es interesante y deja la interrogante, sobre por qué ninguno de los transcritos específicos del tejido está sobreexpresado durante la infección, lo cual podría indicar que no cumplen un rol importante en esta etapa.

3.3.7.4. Expresión de posibles factores de patogenicidad de *C. paspali* durante la infección del estigma-estilo de Chirú

Luego de mapear los reads totales al genoma de *C. paspali* se obtiene una correlación con el aumento teórico de la biomasa fúngica con un aumento en los *reads* mapeados al genoma durante los dos puntos de tiempo post infección alcanzando un promedio de 29.8% a 1 dpi a un 36.2% en 4 dpi (**Tabla 4**).

Los genes efectores a menudo son inducidos durante la interacción con plantas, por lo tanto, los datos de expresión presentados son una herramienta útil para diferenciar qué candidatos son los más prometedores para un análisis posterior. En 1dpi se obtiene que hay 6624 genes expresados con TPM > 1, mientras que a 4 dpi hay 5319. Se comparten en ambas condiciones 5238 genes (**Fig. 16**). En total, 180 de los 237 candidatos a factores de patogenicidad se expresaron durante al menos uno de los dos puntos temporales en las primeras etapas de la infección. De estos 177 (16 son EDCPV) se da en 1 dpi y 119 (11 EDCPV) a 4 dpi. La disminución del número de genes y de efectores expresados a 4 dpi, se puede deber en que a 1 dpi se está dando el comienzo de la infección donde podría ser necesaria expresar un mayor número de genes relacionados con el metabolismo general y efectores debido a una interacción planta-hongo más intensa en respuesta a la colonización por parte de la planta. Esto podría explicar que luego de establecida la infección no sería tan necesario gran parte de todos estos genes. Hay un alto número de EDCPV expresado variando del 88% al 61% del total de estas enzimas presentes en el secretoma predicho. Esto podría indicar que casi toda la batería de EDCPV presentes son necesarias durante la colonización de biótrofo, de forma similar a lo que ha sido reportado en otros biótrofo (Liu *et al.*, 2015, Hamann, 2012), y en la interacción *C. purpurea*-*S. secale* (Oeser *et al.*, 2017) en donde aproximadamente el 80% de estas enzimas eran expresadas. De igual manera, la disminución del número de EDPCV expresadas entre 1 y 4 dpi podría indicar la necesidad de solo algunas de estas durante la entrada y colonización, pero no luego de establecida la infección.

Para analizar la expresión diferencial de genes, comparamos la expresión entre 1dpi vs 4dpi al no tener una condición control con la cual comparar como puede ser la expresión en cultivo axénico. Este análisis reveló que en total 318 genes se expresaron diferencialmente ($|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ y FDR > 0.05) entre ambas condiciones, 93 de estos están sobreexpresados a 1 dpi y 225 a 4 dpi (**Fig. 16**). De estos genes, 3 fueron determinados como posibles efectores sobreexpresados a 1 dpi y 13 a 4 dpi. Ninguno de estos resultó ser EDPCV. Esto representa que un 3.3% y 5.5% respectivamente de los genes diferencialmente expresados corresponden a efectores lo que está en consonancia con la proporción de efectores predichos en el genoma (2.9%). Este aumento de expresión de posibles efectores a 4 dpi y tomando en cuenta que en realidad se

disminuyó el número de efectores expresados totales en ese tiempo podría indicar la importancia de estos sobreexpresados que pueden estar involucrados en mitigar la respuesta de defensas de Chirú. En total tres (dos anotados funcionalmente) y 5 (uno anotado funcionalmente) efectores candidatos diferencialmente expresados tenían resultados en BLASTp en 1 y 4 dpi respectivamente (**Tabla 8**). En 1 dpi encontramos sobreexpresadas el gen *gene_06642* homólogo a una tirosinasa. Se ha reportado que la mayor expresión de tirosinasas ayudaría a romper las conexiones entre células vegetales, facilitando la penetración de hifas fúngicas y el establecimiento de la infección (Plett y Martin, 2011). En 4 dpi, el gen *gene_08004.t1*, homólogo de una carboxipeptidasa puede estar involucrado en la digestión externa de nutrientes macromoleculares. Esta es una característica general del crecimiento de hongos y las proteasas secretada en el medio ambiente juega un papel crucial en nutrición (Yike, 2011), así como, existen proteasas, incluidas las carboxipeptidasas, metaloproteasas, aspartil y serina proteasas, que inhiben las serina o cisteína proteasas del hospedero para suprimir las respuestas de defensa. Sin embargo los roles de las proteasas fúngicas secretadas y sus especificidades de sustrato en las interacciones hospedero-hongo no han sido del todo comprendidas (Ökmen *et al.*, 2018). Tanto la nutrición como inhibición de defensas es un punto clave en esta etapa de desarrollo de la infección luego de la penetración. Los demás genes efectores detectados carecen de cualquier anotación funcional, y dos de ellos a 4 dpi pertenecen a secuencias predichas como efectores por los cuatro enfoques utilizados. Cabe destacar que los posibles efectores sobreexpresados sin homología ni dominios conocidos pueden jugar un papel importante como factores de avirulencia específicos para la especie *P. dilatatum*, impidiendo una respuesta mayor como la ETS y la HR por parte de la planta, lo que los transforma en buenos candidatos para futuros estudios como nuevos efectores

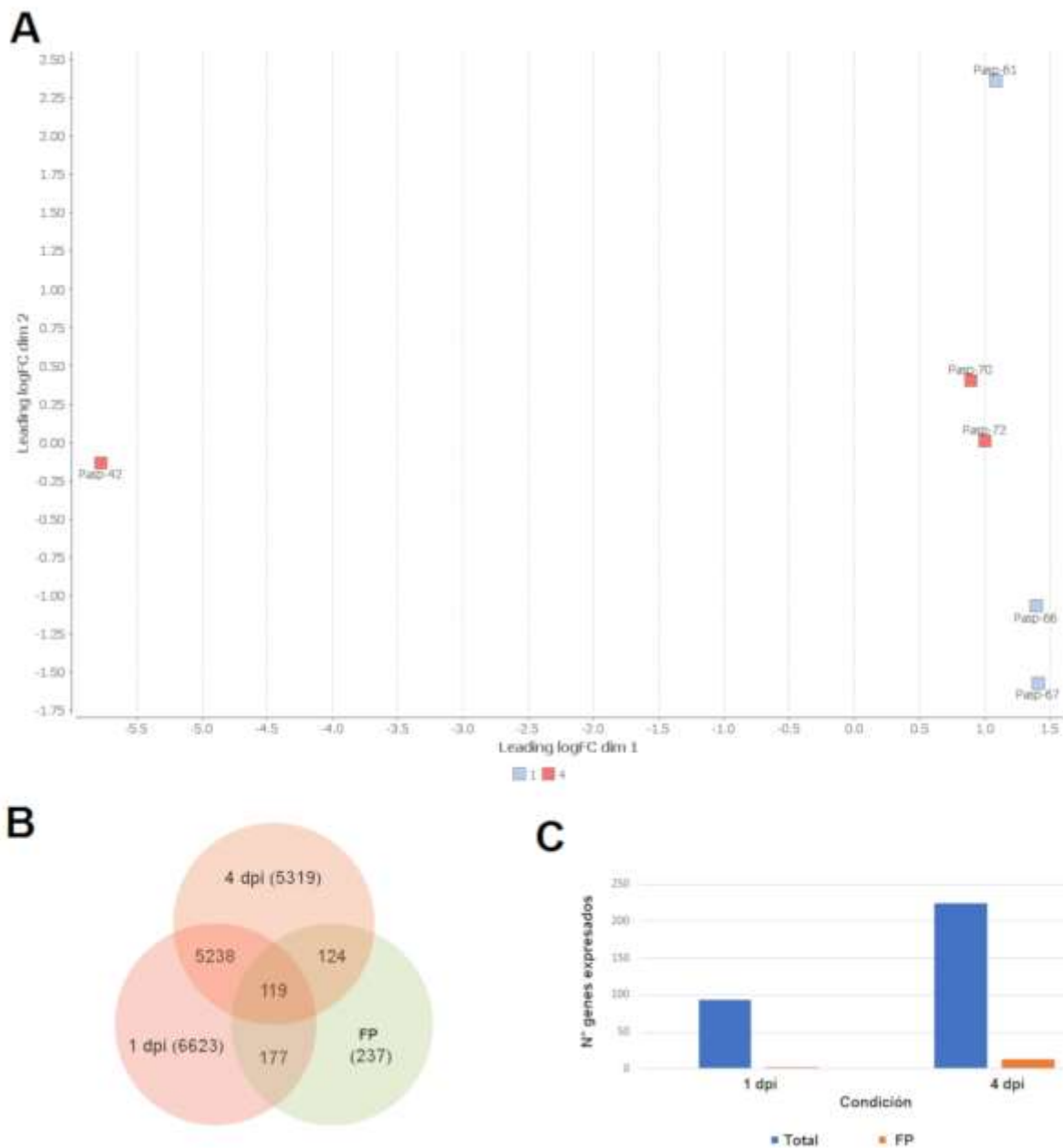


Figura 16. Análisis de expresión del transcriptoma de *C. paspali* durante la infección del EE de Chirú. A - Gráfico de escalado multidimensional para las dos muestras de infección con *C. paspali*. B - Diagrama de Venn de la distribución de transcritos expresados TPM > 1 en todas las muestras por condición junto con los efectores totales presentes en el genoma de *C. paspali*. C- Grafico de barras representando la cantidad de genes totales y factores de patogenicidad sobreexpresados en cada condición. FP = factores de patogenicidad.

Tabla 8. Identificación, descripción y anotación de los genes predichos como efectores diferencialmente expresados entre 1 y 4 dpi.

Condición	ID	Descripción BLASTp	GO	Nombre GO
1 dpi	<i>gene_03646.t1</i>	PH	C:GO:0005576	C: región extracelular
	<i>gene_06642.t1</i>	Tirosina 2	P:GO:0055114; F:GO:0016491; F:GO:0046872	P: oxidación-reduccion; F: actividad oxidoreductasa; F:Union ion metal
	<i>gene_03321.t1</i>	n/a	-	-
4 dpi	<i>gene_08004.t1</i>	vacuola carboxipeptidasea Cps1	F:GO:0004181	F: actividad metalo-carboxipeptidasa
	<i>gene_01265.t1</i>	PH	-	-
	<i>gene_00653.t1</i>	PH	-	-
	<i>gene_06186.t1</i>	PPS	-	-
	<i>gene_07069.t1</i>	Alergeno 16 kDa	-	-
	<i>gene_04144.t1</i>	n/a	-	-
	<i>gene_03561.t1</i>	n/a	-	-
	<i>gene_03720.t1*</i>	n/a	-	-
	<i>gene_03722.t1</i>	n/a	-	-
	<i>gene_00630.t1</i>	n/a	-	-
	<i>gene_07728.t1</i>	n/a	-	-
	<i>gene_01056.t1</i>	n/a	-	-
	<i>gene_00943.t1*</i>	n/a	-	-

n/a = Sin homología; PH = proteína hipotética; PPS = proteína pequeña secretada; * = proteínas predichas por las 4 condiciones como efectores; F = función molecular; C: metabolismo celular; P = proceso molecular

3.3.8. Validación mediante RT-qPCR

Se seleccionaron al azar cuatro genes predichos como efectores en *C. paspali* para validar mediante RT-qPCR. Previamente se evaluaron tres genes (*GAPDH*, *ACT*, *TEF*) para determinar que tienen un nivel de transcripción estable durante la infección. Esto se hizo para seleccionar dos como control interno adecuado para la normalización de datos en el análisis de expresión génica en *C. paspali*. RefFinder se utilizó para determinar estadísticamente los genes de control interno a utilizar (**Tabla 9**). Estos algoritmos condujeron a clasificaciones similares en donde se determinó *ACT* y *GAPDH* como los genes con la transcripción más estable.

Tabla 9. Valores obtenidos a partir del análisis con Refinder por gen de referencia.

	ΔCt	BestKeeper	normFinder	Genorm
<i>ACT</i>	2,67	1,125	0,669	1,337
<i>GAPDH</i>	2,79	1,667	1,376	1,337
<i>TEF</i>	4,13	1,972	4,024	3,200

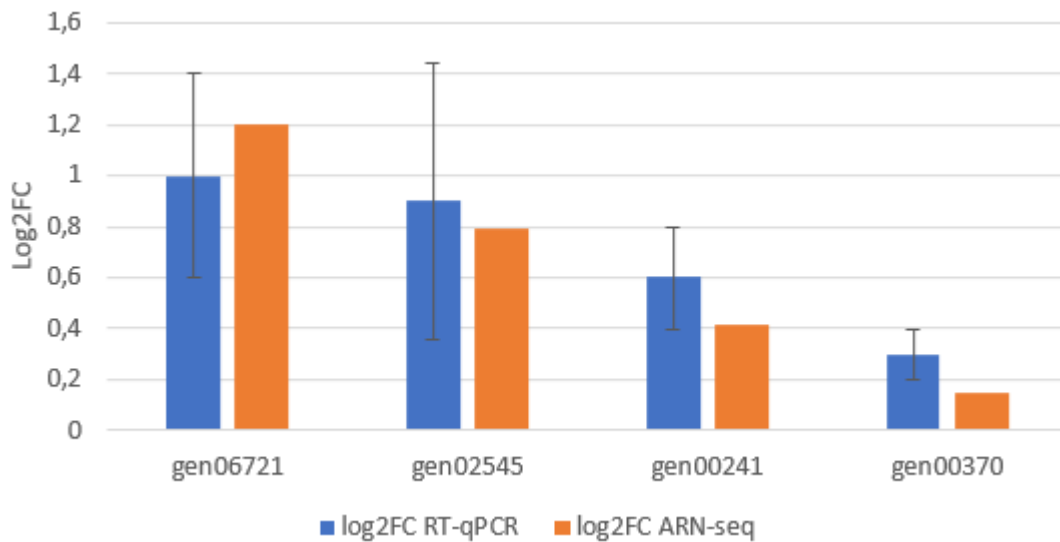


Figura 17. Comparación entre los datos de expresión basados en ARN-seq y RT-qPCR de cuatro genes de *C. paspali* predichos como secretados durante la primera etapa de infección en Chirú, normalizados en base a *ACT* y *GAPDH*

Luego, se cuantificó la expresión relativa de los cuatro genes seleccionados en las dos condiciones de infección en función de *ACT* y *GAPDH*. Los resultados se promediaron y se obtuvo el desvío estándar para estos valores (**Fig. 17**). Los valores de cambios de expresión (FC) se obtuvieron con la división entre la expresión relativa en 1 dpi sobre 4 dpi. Los resultados de RT-qPCR se compararon con las expresiones génicas obtenidas por RNA-seq para *C. paspali* (**Fig. 17**),

e indicaron que los dos conjuntos de resultados en las expresiones génicas obtenidas por los dos métodos tienen una alta correlación de Pearson ($r= 0.95$).

3.4. CONCLUSIONES

- 1) Se determinó que la metodología de multi *k-mer* produjo un conjunto de datos del transcriptoma de Chirú más conciso y rico en información que las metodologías de un solo *k-mer*. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que caracteriza los efectos de combinar múltiples conjuntos de transcriptomas ensamblados *de novo* para maximizar el contenido de la información y minimizar la redundancia del transcriptoma resultante para una especie de *Paspalum*.
- 2) El pequeño tamaño del secretoma (en comparación con su proteoma completo), en un hongo que tiene un amplio rango de hospederos podría indicar la alta generalidad que tienen las proteínas efectoras al género *Paspalum*.
- 3) Se determinó una posible descripción general de los mecanismos de defensa de Chirú durante las etapas tempranas del proceso de infección. Existe un reconocimiento por parte de Chirú del patógeno durante la infección con *C. paspali* que causa alteraciones en el transcriptoma del huésped, que incluyen regulación ascendente de transcritos relacionados al reconocimiento, señalización y respuesta de defensa frente a un patógeno.
- 8) Por primera vez se determinó un número de genes efectores de *C. paspali* que efectivamente son sobreexpresados durante distintos momentos de la infección en Chirú. El aumento de expresión de un número de efectores sugeriría que estos en particular jugarían un papel importante en la evasión de la defensa del hospedero luego de establecida la infección.
- 9) El análisis de expresión de cuatro efectores candidatos seleccionados al azar mediante RT-qPCR corroboraron los datos obtenidos mediante el análisis de expresión diferencial con ARN-seq.

Todo lo antes mencionado, indicaría una interacción compleja entre Chirú y *C. paspali*. Sin embargo, se puede concluir que *C. paspali* ha desarrollado de forma efectiva estrategias a través de su repertorio de efectores para interferir o secuestrar las vías de señalización y de defensa, para inducir la susceptibilidad en Chirú, logrando superar los mecanismos de reconocimiento y respuesta de su hospedero. Los resultados de este estudio proporcionan una buena base para diseñar enfoques futuros para analizar esos mecanismos y obtener una comprensión más profunda y detallada de esta interacción compatible específica entre *C. paspali* y *P. dilatatum*.

3.5. PERSPECTIVAS

Si bien la metodología de multi *k-mer* produjo un conjunto de datos del transcriptoma de Chirú más rico en cuanto a secuencias, todavía tenemos un numero alto de *contigs*, señalando un transcriptoma posiblemente fraccionado. Esto además sumado a la poliploidía de Chirú, genera un desafío extra para su completo ensamblado. A futuro se debería buscar secuenciar transcriptos completos mediante la secuenciación de *reads* largos como con la tecnología SMRT de PacBio. De esta forma obtener secuencias más completas y reducir el número de *contigs* del transcriptoma a un número más similar al real.

Se logró obtener una primera aproximación a la interacción *C. paspali*-Chirú, lo cual nos genera nuevas preguntas, sobre todo conociendo que se activan vías de respuesta a patógenos durante la infección. ¿Cuándo y en qué momento esa respuesta de la planta se transforma en insuficiente para que el hongo logre desarrollar la infección? ¿puede ser que la polinización genere una respuesta por parte de genes de defensa y ROS que logre que al llegar la espora del hongo no logre germinar por encontrarse en un ambiente no apto para su crecimiento? O la respuesta es más física y por ejemplo se debe a la deposición de calosa por parte de los estigmas polinizados o a la constricción del estigma como en mijos resistentes a *C. fusiformis* (Willingale y Mantle, 1987). Para responder estas preguntas se debería por ejemplo realizar nuevos ensayos de infección con *C. paspali* con más puntos en la línea del tiempo para tener un análisis más integro de toda la primera etapa de infección. También, otra aproximación podría ser, realizar el mismo trabajo para especies reportadas como inmunes a *C. paspali* en el género como es el caso de *P. malacophyllum*, que ayuden a detectar posibles genes involucrados en esta resistencia. También a medida que se avanza en el conocimiento del patosistema, surgen más y más evidencias para apoyar el papel biológico de los efectores fúngicos en la manipulación de la inmunidad de las plantas en favor de la colonización por parte del hongo. ¿Hay interacciones efector-proteína que son determinantes en este patosistema? Para intentar comprender mejor los mecanismos específicos de *C. paspali*, se debe seleccionar proteínas secretadas biológicamente significativas entre cientos de candidatos efectores predichos. Para esto se necesita la secuenciación del genoma de más cepas de *C. paspali* y establecer el secretoma y efectoma núcleo común para los aislamientos, así como establecer una lista de prioridades para el análisis funcional siguiendo criterios como la alta expresión durante diferentes etapas de infección. A futuro se debe realizar una secuenciación más profunda *in planta* para lograr capturar una mayor proporción de *reads* pertenecientes al hongo, así como más puntos en la línea del tiempo de la infección y las diferencias de expresión que ocurren en diferentes hospederos. También, la investigación de la actividad biológica de diferentes proteínas efectoras a través del *knock out* en aislamientos puede proporcionar información sobre la importancia de estas durante la infección de *C. paspali*.

3.6. BIBLIOGRAFÍA

- Abiri, R. *et al.* (2017) 'Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions', *Environmental and Experimental Botany*, 134, pp. 33–44. doi: 10.1016/j.envexpbot.2016.10.015.
- Acosta, G., Deregibus, V. A. y Hammar Aldatz, R. (1996) 'Inclusión de pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir.) en pasturas, efecto sobre el valor nutritivo.', *Revista Argentina de Producción Animal.*, 16(2), pp. 157–167.
- Acosta, G., Deregibus, V. A. y Hammar Aldatz, R. (2003) 'Efecto del pasto miel sobre la producción y calidad nutritiva de la pastura.', *Revista Argentina de Producción Animal.*, 23(3–4), pp. 136–143.
- Acuña, C. A. *et al.* (2019) 'Reproductive systems in *Paspalum* : Relevance for germplasm collection and conservation , breeding techniques , and adoption of released cultivars', *Frontiers in Plant Science*, 10(November), pp. 1–17. doi: 10.3389/fpls.2019.01377.
- Adachi, H. and Tsuda, K. (2019) 'Convergence of cell-surface and intracellular immune receptor signalling', *New Phytologist*, 221(4), pp. 1676–1678. doi: 10.1111/nph.15634.
- Aguilera, P. M. *et al.* (2011) 'Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: Sexual *Paspalum plicatulum* and apomictic *P. guenoarum*', *Crop Science*, 51(4), pp. 1544–1550. doi: 10.2135/cropsci2010.10.0610.
- Aguileta, G. *et al.* (2008) 'Assessing the performance of single-copy genes for recovering robust phylogenies.', *Systematic biology*, 57(4), pp. 613–627. doi: 10.1080/10635150802306527.
- Ah-Fong, A. M. V., Shrivastava, J. and Judelson, H. S. (2017) 'Lifestyle, gene gain and loss, and transcriptional remodeling cause divergence in the transcriptomes of *Phytophthora infestans* and *Pythium ultimum* during potato tuber colonization', *BMC Genomics*. BMC Genomics, 18(1), pp. 1–28. doi: 10.1186/s12864-017-4151-2.
- Alderman, S. (2006) 'Ergot : Biology and Control', *Production*, pp. 1–7.
- Alderman, S. C., Halse, R. R. y White, J. F. (2004) 'A reevaluation of the host range and geographical distribution of *Claviceps* species in the United States', *Plant Disease*, 88(1), pp. 63–81. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.1.63.
- Ali, S. *et al.* (2018) 'Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance', *Microbiological Research*. Elsevier, 212–213(March), pp.

29–37. doi: 10.1016/j.micres.2018.04.008.

Almagro Armenteros, J. J. *et al.* (2019) ‘SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks’, *Nature Biotechnology*, 37(4), pp. 420–423. doi: 10.1038/s41587-019-0036-z.

Alonso, S. I. y Monterubbianesi, M. G. (2006) ‘Phenotypic variability in leaf length, width and area and their relationships in clones of two subspecies of *Paspalum dilatatum* during summer and autumn’, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 49(1), pp. 25–33. doi: 10.1080/00288233.2006.9513690.

Anderson, J. P. *et al.* (2017) ‘Comparative secretome analysis of *Rhizoctonia solani* isolates with different host ranges reveals unique secretomes and cell death inducing effectors’, *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), p. 10410. doi: 10.1038/s41598-017-10405-y.

Araújo, A. C. de *et al.* (2020) ‘Plant NLR receptor proteins and their potential in the development of durable genetic resistance to biotic stresses’, *Biotechnology Research and Innovation*. Sociedade Brasileira de Biotecnologia. doi: 10.1016/j.biori.2020.01.002.

Armenteros, J. J. A. *et al.* (2019) ‘Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning’, *Life Science Alliance*, 2(5), pp. 1–14. doi: 10.26508/lsa.201900429.

Atwood, S. S. (1947) ‘Cytogenetics and breeding of forage crops’, *Advances in Genetics*, 1(C), pp. 1–67. doi: 10.1016/S0065-2660(08)60482-4.

Ballouz, S., Verleyen, W. y Gillis, J. (2015) ‘Guidance for RNA-seq co-expression network construction and analysis: Safety in numbers’, *Bioinformatics*, 31(13), pp. 2123–2130. doi: 10.1093/bioinformatics/btv118.

Bashaw, E. C. y Forbes, I. (1958) ‘Chromosome Numbers and Microsporogenesis in Dallisgrass *Paspalum Dilatatum* Poir¹’, *Agronomy Journal*, 50(8), p. 441. doi: 10.2134/agronj1958.00021962005000080006x.

Bashaw, E. C. y Holt, E. C. (1958) ‘Megaspороgenesis, embryo sac development and embryogenesis in dallisgrass, *Paspalum dilatatum* Poir’, *Agronomy Journal*, 50(12), p. 753. doi: 10.2134/agronj1958.00021962005000120011x.

Beckers, G. J. M. y Spoel, S. H. (2006) ‘Fine-tuning plant defence signalling : Salicylate versus Jasmonate’, 8, pp. 1–10. doi: 10.1055/s-2005-872705.

- Beckerson, W. C. *et al.* (2019) 'Cause and effectors: Whole-genome comparisons reveal shared but rapidly evolving effector sets among host-specific plant-castrating fungi', *mBio*, 10(6), pp. 1–17. doi: 10.1128/mBio.02391-19.
- Benevenuto, J. *et al.* (2018) 'Comparative genomics of smut pathogens: Insights from orphans and positively selected genes into host specialization', *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), pp. 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2018.00660.
- Bennet, H. W. *et al.* (1960) 'An interspecific hybrid in *Paspalum*', *Journal of Heredity*, 51(2), pp. 81–85. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a106958.
- Bennett, H. W. and Bashaw, E. C. (1966) 'Interspecific hybridization with *Paspalum* spp.', *Crop Science*, 6(1), p. 52. doi: 10.2135/cropsci1966.0011183x000600010016x.
- Bennett, H. W., Burson, B. L. and Bashaw, E. (1969) 'Intraspecific hybridization in dallisgrass, *Paspalum dilatatum* Poir', *Crop Sci*, 9, pp. 807–809.
- Bigeard, J., Colcombet, J. y Hirt, H. (2015) 'Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI)', *Molecular Plant*. Elsevier Ltd, 8(4), pp. 521–539. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.022.
- Birkenbihl, R. P., Liu, S. and Somssich, I. E. (2017) 'Transcriptional events defining plant immune responses', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 38, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.004.
- Blümke, A. *et al.* (2015) 'Reduced susceptibility to *Fusarium* head blight in *Brachypodium distachyon* through priming with the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol', *Molecular Plant Pathology*, 16(5), pp. 472–483. doi: 10.1111/mpp.12203.
- Bolger, A. M., Lohse, M. y Usadel, B. (2014) 'Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data', *Bioinformatics*, 30(15), pp. 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Boller, T. y Felix, G. (2009) 'A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by Pattern-Recognition Receptors', *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), pp. 379–406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346.
- Borrelli, G. M. *et al.* (2018) 'Regulation and evolution of NLR genes: A close interconnection for plant immunity', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). doi: 10.3390/ijms19061662.
- Boutrot, F. y Zipfel, C. (2017) 'Function, discovery, and exploitation of plant Pattern Recognition

- Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance', *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), pp. 257–286. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120106.
- Branton, D. *et al.* (2008) 'The potential and challenges of nanopore sequencing', *Nature Biotechnology*, 26(10), pp. 1146–1153. doi: 10.1038/nbt.1495.
- Bressendorff, S. *et al.* (2016) 'An innate immunity pathway in the moss *Physcomitrella patens*', *The Plant Cell*, 28(6), pp. 1328–1342. doi: 10.1105/tpc.15.00774.
- Bronnikova, W. M. S. T. V (2012) 'Peroxidase-ROS interactions', pp. 413–430. doi: 10.1007/s11071-011-0314-x.
- Brown, H. B. (1916) 'Life history and poisonous properties of *Claviceps paspali*', *Journal of Agricultural Research*, 7(9), pp. 401–407.
- Brutus, A. *et al.* (2010) 'A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), pp. 9452–9457. doi: 10.1073/pnas.1000675107.
- Burke, S. V. *et al.* (2016) 'Evolutionary relationships in Panicoid grasses based on plastome phylogenomics (*Panicoideae*; *Poaceae*)', *BMC Plant Biology*. BMC Plant Biology, 16(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12870-016-0823-3.
- Burson, B. (1991) 'Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*', *Bot. Gazz.*, 152(2), pp. 219–223. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Burson, B., Correa, J. and Potts, C. (1978) 'Anatomical study of seed shattering in bahiagrass and dallisgrass', *Crop Science*, 18(Jan-Feb), pp. 122–125.
- Burson, B. L. (1995) 'Genome relationship and reproductive behavior of intraspecific *Paspalum dilatatum* hybrids : Yellow-Anthered x Uruguaiana', *International Journal of Plant Sciences*, 156(3), pp. 326–331.
- Burson, B. L. y Bennett, H. W. (1971) 'Chromosome numbers, microsporogenesis, and mode of reproduction of seven *Paspalum* species', *Crop Science*, 11(2), p. 292. doi: 10.2135/cropsci1971.0011183x001100020038x.
- Burson, B. L., Correa, J. y Potts, H. C. (1978) 'Anatomical study of seed shattering in bahiagrass and dallisgrass', *Crop Science*, 18(1), p. 122. doi: 10.2135/cropsci1978.0011183x001800010032x.

- Burson, B. L. L. y Quarin, C. . L. (1992) 'Cytological relationship between *Paspalum dilatatum* and diploid cytotypes of *P. brunneum* and *P. rufum*', *Genome*, 35(2), pp. 332–336. doi: 10.1139/g92-050.
- Burson, B. L., Lee, H. y Bennet, H. (1973) 'Genome relations between tetraploid *Paspalum dilatatum* and four diploid *Paspalum* specie', *Crop Sci*, 13, pp. 739–743.
- Burson, B. L., Voigt, P. y Evers, G. W. (1991) 'Cytology, Reproductive behavior, and forage potential of Hexaploid Dallisgrass biotypes', *Crop Science*, 15(1), pp. 636–641.
- Burson, B. L. y Watson, V. (1995) 'Bahagrass, dallisgrass, and other *Paspalum* species', in Barnes, R. (ed.) *Forages: an introduction to grassland agriculture*. 5th edn. Ames: Iowa State University Press, pp. 431–440.
- Burton, G. W. (1942) 'Observations on the flowering habits of four *Paspalum* Species', *American Journal of Botany*, 29(10), p. 843. doi: 10.2307/2437653.
- Burton, G. W. (1943) 'Interspecific hybrids in the genus *Paspalum*', *Journal of Heredity*, 34(1), pp. 15–23. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a105214.
- Burton, G. W. (1955) 'Breeding Pensacola Bahagrass, *Paspalum notatum*: I. Method of Reproduction1', *Agronomy Journal*, 47(7), p. 311. doi: 10.2134/agronj1955.00021962004700070008x.
- Burton, G. W. y Lefebvre, C. L. (1948) 'Ergot and sterility in bahagrass', *Phytochemical Analysis*, 38, pp. 556–559.
- Camacho, C. *et al.* (2009) 'BLAST+: Architecture and applications', *BMC Bioinformatics*, 10, pp. 1–9. doi: 10.1186/1471-2105-10-421.
- Carambula, M. (2007) *Pasturas y forrajes; potenciales y alternativas para producir forraje*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Carpita, N. C. y Gibeaut, D. M. (1993) 'Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth', *Plant Journal*, 3(1), pp. 1–30. doi: 10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x.
- Casa, a M. *et al.* (2002) 'RAPD analysis reveals genetic variability among sexual and apomictic *Paspalum dilatatum* poirot biotypes.', *The Journal of heredity*, 93(4), pp. 300–302. doi:

10.1093/jhered/93.4.300.

de Castro, E. *et al.* (2006) ‘ScanProsit: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins’, *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.), pp. 362–365. doi: 10.1093/nar/gkl124.

Cawdell-Smith, A. J., Scrivener, C. J. y Bryden, W. L. (2010) ‘Staggers in horses grazing *Paspalum* infected with *Claviceps paspali*’, *Australian Veterinary Journal*, 88(10), pp. 393–395. doi: 10.1111/j.1751-0813.2010.00624.x.

Cerveau, N. y Jackson, D. J. (2016) ‘Combining independent de novo assemblies optimizes the coding transcriptome for nonconventional model eukaryotic organisms’, *BMC Bioinformatics*. BMC Bioinformatics, 17(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s12859-016-1406-x.

Chain, E. B., Bonino, C. y Tonolo, A. (1962) ‘Process for the production of alkaloid derivatives of lysergic acid’. United States. doi: 10.13189/cme.2016.040202.

Chakraborty, S. y Ryley, M. J. (2008) ‘Sorghum ergot can develop without local *Claviceps africana* inoculum from nearby infected plants’, *Plant Pathology*, 57(3), pp. 484–492. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01832.x.

Chang, Z. *et al.* (2015) ‘Bridger: A new framework for de novo transcriptome assembly using RNA-seq data’, *Genome Biology*, 16(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s13059-015-0596-2.

Charlton, N. D. *et al.* (2014) ‘Interspecific hybridization and bioactive alkaloid variation increases diversity in endophytic *Epichloë* species of *Bromus laevipes*’, *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), pp. 276–289. doi: 10.1111/1574-6941.12393.

Chase, A. (1929) ‘The North America Species of *Paspalum*’, *Contrib. U.S. Natl. Herbrib.*, 28, pp. 1–21.

Chinchilla, D. *et al.* (2009) ‘One for all: the receptor-associated kinase BAK1’, *Trends in Plant Science*, 14(10), pp. 535–541. doi: 10.1016/j.tplants.2009.08.002.

Chmelová, D. *et al.* (2019) ‘Microbial xylanases and their inhibition by specific proteins in cereals’, *Kvasny Prumysl*, 65(4), pp. 127–133. doi: 10.18832/kp2019.65.127.

Chopra, R. *et al.* (2014) ‘Comparisons of de novo transcriptome assemblers in diploid and polyploid species using peanut (*Arachis spp.*) RNA-Seq data’, *PLoS ONE*, 9(12), pp. 1–16. doi:

10.1371/journal.pone.0115055.

Cisneros-López, M. E. *et al.* (2010) 'Synchronicity of pollination and inoculation with *Claviceps africana* and its effects on pollen-pistil compatibility and seed production in sorghum', *Fungal Biology*, 114(4), pp. 285–292. doi: 10.1016/j.funbio.2010.02.007.

Clayton, W. D. y Renvoize, S. A. (1986) *Genera graminum : grasses of the world*. London: Kew Bulletin Additional Series XIII.

Cole, R. J. *et al.* (1977) 'Paspalum Staggers: Isolation and Identification of Tremorgenic Metabolites from Sclerotia of *Claviceps paspali*', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(5), pp. 1197–1201. doi: 10.1021/jf60213a061.

Coll, J. (1991) *Serie Técnica N4- Producción de semilla de Paspalum dilatatum*. Unidad de, INIA. Unidad de. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L.

Coufal-Majewski, S. *et al.* (2016) 'Impacts of Cereal Ergot in Food Animal Production', *Frontiers in Veterinary Science*, 3(February). doi: 10.3389/fvets.2016.00015.

Couso, L. L. *et al.* (2010) 'Are more productive varieties of *Paspalum dilatatum* less tolerant to drought?', *Grass and Forage Science*, 65(3), pp. 296–303. doi: 10.1111/j.1365-2494.2010.00748.x.

Cunfer, B. M. y Marshall, D. (1977) 'Germination requirements of *Claviceps paspali* sclerotia', *Mycologia*, 69(6), p. 1137. doi: 10.2307/3758936.

Cunfer, B. M. y Seckinger, A. (1977) 'Survival of *Claviceps purpurea* and *Claviceps paspali* sclerotia', *Mycologia*, 69(6), pp. 1142–1148. Available at: <http://www.jstor.org/stable/3758937>.

D' Esposito, R. y Lopez, C. . (2001) 'Características biológicas de *Claviceps paspali* Stev. and Hall.', *Boletín Micológico*, 16, pp. 1–8.

Danquah, A. *et al.* (2015) 'Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Journal*, 82(2), pp. 232–244. doi: 10.1111/tpj.12808.

Darlington, L. C., Mathre, D. E. y Johnston, R. H. (1977) 'Variation in pathogenicity between isolates of *Claviceps purpurea*', *Canadian Journal of Plant Science*, 57(3), pp. 729–733. doi: 10.4141/cjps77-106.

Davies, L. J. and Cohen, D. (1992) 'Phenotypic variation in somaclones of *Paspalum dilatatum* and their seedling offspring', *Canadian Journal of Plant Science*, 72(3), pp. 773–784. doi:

10.4141/cjps92-093.

Dempsey, D. A. *et al.* (2011) 'Salicylic Acid biosynthesis and metabolism', *The Arabidopsis Book*, 9(9), p. e0156. doi: 10.1199/tab.0156.

Derbyshire, M. *et al.* (2017) 'The complete genome sequence of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* reveals insights into the genome architecture of broad host range pathogens', *Genome Biology and Evolution*, 9(3), pp. 593–618. doi: 10.1093/gbe/evx030.

Derksen, H., Rampitsch, C. y Daayf, F. (2013) 'Signaling cross-talk in plant disease resistance', *Plant Science*. Elsevier Ireland Ltd, 207, pp. 79–87. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.03.004.

Díaz-triviño, S. *et al.* (2017) 'Chapter 7: Using Transient Expression Systems', 1629, pp. 83–103. doi: 10.1007/978-1-4939-7125-1.

Díaz, M. *et al.* (2004) 'Biotecnología y mejoramiento genético de especies forrajeras', *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 33(3), pp. 77–104.

Dobin, A. *et al.* (2016) 'Mapping RNA-seq with STAR', *Curr Protoc Bioinformatics*, 51(4), pp. 586–597. doi: 10.1002/0471250953.bi1114s51.Mapping.

Dodds, P. N. and Rathjen, J. P. (2010) 'Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 11(8), pp. 539–548. doi: 10.1038/nrg2812.

Doehlemann, G. *et al.* (2008) 'Reprogramming a maize plant: Transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*', *Plant Journal*, 56(2), pp. 181–195. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03590.x.

Van Der Does, H. C. y Rep, M. (2007) 'Virulence genes and the evolution of host specificity in plant-pathogenic fungi', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(10), pp. 1175–1182. doi: 10.1094/MPMI-20-10-1175.

Douhan, G. W. *et al.* (2008) 'Multigene analysis suggests ecological speciation in the fungal pathogen *Claviceps purpurea*', *Molecular Ecology*, 17(9), pp. 2276–2286. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03753.x.

Du, L. and Chen, Z. (2000) 'Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in

Arabidopsis', *Plant Journal*, 24(6), pp. 837–847. doi: 10.1046/j.1365-313X.2000.00923.x.

Dubiella, U. *et al.* (2013) 'Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21), pp. 8744–8749. doi: 10.1073/pnas.1221294110.

Dung, J. K. S. *et al.* (2018) 'Reducing *Claviceps purpurea* sclerotia germination with soil-applied fungicides', *Crop Protection*. Elsevier, 106(July 2017), pp. 146–149. doi: 10.1016/j.cropro.2017.12.023.

Dzelzkalns, V. A. *et al.* (1993) 'Distinct cis-acting elements direct pistil-specific and pollen-specific activity of the *Brassica* S locus glycoprotein gene promoter.', *The Plant cell*, 5(8), pp. 855–63. doi: 10.1105/tpc.5.8.855.

Elleman, C. J. y Dickinson, H. G. (1999) 'Commonalities between pollen/stigma and host/pathogen interactions: Calcium accumulation during stigmatic penetration by *Brassica oleracea* pollen tubes', *Sexual Plant Reproduction*, 12(3), pp. 194–202. doi: 10.1007/s004970050192.

Ellis, J. G. *et al.* (2009) 'Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens', *Current Opinion in Plant Biology*, pp. 399–405. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.004.

Esser, K. y Tudzynski, P. (1978) 'Genetics of the ergot fungus *Claviceps purpurea* - I. Proof of a monoecious life cycle and segregation patterns for mycelial morphology and alkaloid production', *Theoretical and Applied Genetics*, 53(4), pp. 145–149. doi: 10.1007/BF00273574.

Eugenia Cisneros-López, M., Mendoza-Onofre, L. E. y González-Hernández, V. A. (2012) 'Male parent effects on stigma receptivity and seed set of sorghum A-lines under chilling field temperatures', *Plant Breeding*, 131(1), pp. 88–93. doi: 10.1111/j.1439-0523.2011.01922.x.

Evans, T. J. y Gupta, R. C. (2018) *Tremorgenic Mycotoxins*. Third Edit, *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition*. Third Edit. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-811410-0.00074-X.

Evers G.W y Burson LB. (2004) 'Dallisgrass and other species', In: Moser LE. ed. Warm-season (C4) grasses. Agronomy Monography 45. Madison: ASA, CSSA, and SSSA, 681–713. doi: 10.2134/agronmonogr45.c20.

Feldman, T. S., O'Brien, H. E. y Arnold, A. E. (2008) 'Moths that vector a plant pathogen also

transport endophytic fungi and mycoparasitic antagonists', *Microbial Ecology*, 56(4), pp. 742–750. doi: 10.1007/s00248-008-9393-8.

Fernandes-Moraes, M., Barreto, I. and Salzano, F. (1968) 'Cytogenetic, ecologic and morphologic studies in Brazilian forms of *Paspalum dilatatum*', *Can J Gen Cytol*, 10, pp. 131–138.

Finotello, F. and Di Camillo, B. (2015) 'Measuring differential gene expression with RNA-seq: Challenges and strategies for data analysis', *Briefings in Functional Genomics*, 14(2), pp. 130–142. doi: 10.1093/bfpg/elu035.

Fisher, A. J., Gordon, T. K. y Ditomaso, J. M. (2005) 'Geographic distribution and diversity in *Claviceps purpurea* from salt marsh habitats and characterization of Pacific coast populations', *Mycological Research*, 109(4), pp. 439–446. doi: 10.1017/S0953756205002467.

Fowler, J. E. y Endress, P. K. (2016) 'The Diversity of the Pollen Tube Pathway in Plants : Toward an Increasing Control by the Sporophyte', 7(February), pp. 1–12. doi: 10.3389/fpls.2016.00107.

Franceschetti, M. *et al.* (2017) 'Effectors of filamentous plant pathogens: Commonalities and diversity', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(2), pp. 1–17. doi: 10.1128/membr.00066-16.

Franco-Orozco, B. *et al.* (2017) 'A new proteinaceous pathogen-associated molecular pattern (PAMP) identified in Ascomycete fungi induces cell death in Solanaceae', *New Phytologist*, 214(4), pp. 1657–1672. doi: 10.1111/nph.14542.

Gaberc-Porekar, V. *et al.* (1987) 'Metabolic changes in a conidia-induced *Claviceps paspali* strain during submerged fermentation', *Can.J.Microbiol.*, 33(7), pp. 602–606.

Gaidatzis, D. *et al.* (2015) 'QuasR: Quantification and annotation of short reads in R', *Bioinformatics*, 31(7), pp. 1130–1132. doi: 10.1093/bioinformatics/btu781.

Galla, G. *et al.* (2019) 'A Portion of the Apomixis Locus of *Paspalum Simplex* is Microsyntenic with an Unstable Chromosome Segment Highly Conserved Among Poaceae', *Scientific Reports*. Springer US, 9(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-019-39649-6.

Gao, Q. M. *et al.* (2011) 'Low oleic acid-derived repression of jasmonic acid-inducible defense responses requires the WRKY50 and WRKY51 proteins', *Plant Physiology*, 155(1), pp. 464–476. doi: 10.1104/pp.110.166876.

- García, M., Arturi, M. y Ansín, Ó. (2000) 'Potencial de mejora en caracteres cuantitativos de *Paspalum dilatatum* Poir. en poblaciones del noreste bonaerense', *Revista de la Facultad de Agronomía*, 104(2), pp. 105–111.
- García-Limones, C. *et al.* (2002) 'Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*', *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61(6), pp. 325–337. doi: 10.1006/pmpp.2003.0445.
- Gibbons, J. G. *et al.* (2009) 'Benchmarking next-generation transcriptome sequencing for functional and evolutionary genomics', *Molecular Biology and Evolution*, 26(12), pp. 2731–2744. doi: 10.1093/molbev/msp188.
- Gilmore, B. S. *et al.* (2016) 'Simple sequence repeat markers that identify *Claviceps* species and strains', *Fungal Biology and Biotechnology*. BioMed Central, 3(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s40694-016-0019-5.
- Giordano, A., Cogan, N. O. I., *et al.* (2014) 'Gene discovery and molecular marker development, based on high-throughput transcript sequencing of *Paspalum dilatatum* Poir', *PLoS ONE*, 9(2). doi: 10.1371/journal.pone.0085050.
- Giordano, A., Liu, Z., *et al.* (2014) 'Reduced lignin content and altered lignin composition in the warm season forage grass *Paspalum dilatatum* by down-regulation of a Cinnamoyl CoA Reductase Gene', *Transgenic Research*, 23(3), pp. 503–517. doi: 10.1007/s11248-014-9784-1.
- Girard, V. *et al.* (2013) 'Secretomes: The fungal strike force', *Proteomics*, 13(3–4), pp. 597–608. doi: 10.1002/pmic.201200282.
- Glazebrook, J. (2005) 'Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens', *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), pp. 205–227. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.
- Glazinska, P. *et al.* (2017) 'De novo transcriptome profiling of flowers, flower pedicels and pods of *Lupinus luteus* (Yellow Lupine) reveals complex expression changes during organ abscission', *Frontiers in Plant Science*, 8(May). doi: 10.3389/fpls.2017.00641.
- Gomez, L. D. *et al.* (2004) 'Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione', *Journal of Experimental Botany*, 55(404), pp. 1851–1859. doi: 10.1093/jxb/erh202.

- Gordon, A. *et al.* (2015) 'The identification of QTL controlling ergot sclerotia size in hexaploid wheat implicates a role for the Rht dwarfing alleles', *Theoretical and Applied Genetics*, 128(12), pp. 2447–2460. doi: 10.1007/s00122-015-2599-5.
- Gordon, A. *et al.* (2020) 'Genetic and transcriptional dissection of resistance to *Claviceps purpurea* in the durum wheat cultivar Greenshank', *Theoretical and Applied Genetics*. Springer Berlin Heidelberg, (0123456789). doi: 10.1007/s00122-020-03561-9.
- Guo, L. *et al.* (2016) 'A De Novo-assembly based data analysis pipeline for plant obligate parasite metatranscriptomic studies', *Frontiers in Plant Science*, 7(JULY2016), pp. 1–9. doi: 10.3389/fpls.2016.00925.
- Haas, B. J. *et al.* (2013) *De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity*, *Nature protocols*. doi: 10.1038/nprot.2013.084.De.
- Haile, Z. M. *et al.* (2019) 'Transcriptome profiles of strawberry (*Fragaria vesca*) fruit interacting with *Botrytis cinerea* at Different Ripening Stages', *Frontiers in Plant Science*, 10(September), pp. 1–17. doi: 10.3389/fpls.2019.01131.
- Hamann, T. (2012) 'Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms', 3(April), pp. 1–5. doi: 10.3389/fpls.2012.00077.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. and Ryan, P. D. (2001) 'PAST: Paleontological Statistics Software Package', *Palaeontologia Electronica*, 4(1), p. 9. doi: 10.1016/j.bcp.2008.05.025.
- Hampton, J. (1984) 'Control measures for ergot in the *Paspalum* (*Paspalum dilatatum* Poir) seed crop', *Journal of Applied Seed Production*, 2(March), pp. 32–35. Available at: http://www.ihsg.org/sites/ihsg.org/files/JASP_2_--_1984.pdf#page=34.
- Han, X. y Kahmann, R. (2019) 'Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens', *Frontiers in Plant Science*, 10(June). doi: 10.3389/fpls.2019.00822.
- Hao, D., Ohme-Takagi, M. y Sarai, A. (1998) 'Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant', *Journal of Biological Chemistry*, 273(41), pp. 26857–26861. doi: 10.1074/jbc.273.41.26857.
- Hatfield, R. D., Rancour, D. M. y Marita, J. M. (2017) 'Grass cell walls: A story of cross-linking', *Frontiers in Plant Science*, 7(January). doi: 10.3389/fpls.2016.02056.

- Haueisen, J. y Stukenbrock, E. H. (2016) 'Life cycle specialization of filamentous pathogens - colonization and reproduction in plant tissues', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 31–37. doi: 10.1016/j.mib.2016.04.015.
- Hayden, K. J. *et al.* (2014) 'Dual RNA-seq of the plant pathogen *Phytophthora ramorum* and its tanoak host', *Tree Genetics and Genomes*, 10(3), pp. 489–502. doi: 10.1007/s11295-014-0698-0.
- He, B. *et al.* (2015) 'Optimal assembly strategies of transcriptome related to ploidies of eukaryotic organisms', *BMC Genomics*, 16(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12864-014-1192-7.
- Heard, S., Brown, N. A. y Hammond-Kosack, K. (2015) 'An interspecies comparative analysis of the predicted secretomes of the necrotrophic plant pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*', *PLoS ONE*, 10(6), pp. 1–27. doi: 10.1371/journal.pone.0130534.
- Van Hengel, A. J. y Roberts, K. (2002) 'Fucosylated arabinogalactan-proteins are required for full root cell elongation in *Arabidopsis*', *Plant Journal*, 32(1), pp. 105–113. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01406.x.
- Hinsch, J. *et al.* (2015) 'De novo biosynthesis of cytokinins in the biotrophic fungus *Claviceps purpurea*', *Environmental Microbiology*, 17(8), pp. 2935–2951. doi: 10.1111/1462-2920.12838.
- Hinsch, J., Galuszka, P. and Tudzynski, P. (2016) 'Functional characterization of the first filamentous fungal tRNA-isopentenyltransferase and its role in the virulence of *Claviceps purpurea*', *The New phytologist*, 211(3), pp. 980–992. doi: 10.1111/nph.13960.
- Hitchcock, A. S. (1950) *Manual of grasses of the United States*. Ed. 2.
- Ho, T. T., Murthy, H. N. and Park, S. Y. (2020) 'Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). doi: 10.3390/ijms21030716.
- Hoang, N. V. *et al.* (2018) 'De novo assembly and characterizing of the culm-derived meta-transcriptome from the polyploid sugarcane genome based on coding transcripts', *Heliyon*. Elsevier Ltd, 4(3), p. e00583. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00583.
- Hodkinson, B. P. y Grice, E. A. (2015) 'Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research', *Advances in Wound Care*, 4(1), pp. 50–58. doi: 10.1089/wound.2014.0542.

- Hoff, K. J. *et al.* (2016) 'BRAKER1: Unsupervised RNA-Seq-Based Genome Annotation with GeneMark-ET and AUGUSTUS: Table 1.', *Bioinformatics*, 32(5), pp. 767–769. doi: 10.1093/bioinformatics/btv661.
- Hoff, K. J. y Stanke, M. (2013) 'WebAUGUSTUS--a web service for training AUGUSTUS and predicting genes in eukaryotes.', *Nucleic acids research*, 41(Web Server issue), pp. 123–128. doi: 10.1093/nar/gkt418.
- Hojsgaard, D. H. *et al.* (2016) 'Unravelling the ambiguous reproductive biology of *Paspalum malacophyllum*: a decades old story clarified', *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(6), pp. 1063–1071. doi: 10.1007/s10722-015-0303-x.
- Hölzer, M. y Marz, M. (2019) 'De novo transcriptome assembly: A comprehensive cross-species comparison of short-read RNA-Seq assemblers', *GigaScience*, 8(5), pp. 1–16. doi: 10.1093/gigascience/giz039.
- van der Hoorn, R. A. L. (2008) 'Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms', *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), pp. 191–223. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092835.
- Horton, P. *et al.* (2007) 'WoLF PSORT: Protein localization predictor', *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), pp. 585–587. doi: 10.1093/nar/gkm259.
- Hu, H., Xiong, L. and Yang, Y. (2005) 'Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection', *Planta*, 222(1), pp. 107–117. doi: 10.1007/s00425-005-1534-4.
- I. Shaw, B. and Mantle, P. G. (1980) 'Host infection by *Claviceps purpurea*', *Transactions of the British Mycological Society*. British Mycological Society, 75(1), pp. 77–90. doi: 10.1016/s0007-1536(80)80197-5.
- Icovx, A. I., Flieger, M. and Ek, Z. E. (1982) 'Quantitative changes of the alkaloid complex in a submerged Culture of *Claviceps paspali*', 445.
- Idänheimo, N. *et al.* (2014) 'The Arabidopsis thaliana cysteine-rich receptor-like kinases CRK6 and CRK7 protect against apoplastic oxidative stress', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(2), pp. 457–462. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.013.
- Irieda, H. *et al.* (2019) 'Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by

- targeting plant immune kinases', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(2), pp. 496–505. doi: 10.1073/pnas.1807297116.
- Irzykowska, L., Weber, Z. and Bocianowski, J. (2012) 'Comparison of *Claviceps purpurea* populations originated from experimental plots or fields of rye', *Central European Journal of Biology*, 7(5), pp. 839–849. doi: 10.2478/s11535-012-0075-7.
- Jain, M. *et al.* (2016) 'De novo transcriptome assembly and comprehensive expression profiling in *Crocus sativus* to gain insights into apocarotenoid biosynthesis', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(March), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep22456.
- Jashni, M. K. *et al.* (2015) 'The battle in the apoplast: Further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions', *Frontiers in Plant Science*, 6(AUG), pp. 1–7. doi: 10.3389/fpls.2015.00584.
- Jia, X. *et al.* (2015) 'Characterization of the global transcriptome using Illumina sequencing and novel microsatellite marker information in seashore *Paspalum*', *Genes and Genomics*, 37(1), pp. 77–86. doi: 10.1007/s13258-014-0231-8.
- de Jonge, R. (2012) 'The role and evolution of fungal effectors in plant pathogenesis'. *Tesis Doctoral*. Wageningen University.
- De Jonge, R. *et al.* (2012) 'Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(13), pp. 5110–5115. doi: 10.1073/pnas.1119623109.
- Jonge, R. De, Bolton, M. D. y Thomma, B. P. H. J. (2011) 'How filamentous pathogens co-opt plants : the ins and outs of fungal effectors', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 14(4), pp. 400–406. doi: 10.1016/j.pbi.2011.03.005.
- Journot-Catalino, H. *et al.* (2006) 'The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Cell*, 18(11), pp. 3289–3302. doi: 10.1105/tpc.106.044149.
- Jubic, L. M. *et al.* (2019) 'Help wanted: helper NLRs and plant immune responses', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 50(Id), pp. 82–94. doi: 10.1016/j.pbi.2019.03.013.
- Jungehulsing, U. y Tudzynski, P. (1997) 'Analysis of genetic diversity in *Claviceps purpurea* by RAPD markers', *Mycological Research*, 101(1), pp. 1–6.

- Kadota, Y. *et al.* (2019) ‘Quantitative phosphoproteomic analysis reveals common regulatory mechanisms between effector- and PAMP-triggered immunity in plants’, *New Phytologist*, 221(4), pp. 2160–2175. doi: 10.1111/nph.15523.
- Kain, S. R. (2005) *Methods and protocols, Methods of Biochemical Analysis*. doi: 10.1002/0471739499.oth1.
- Kämper, J. *et al.* (2006) ‘Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*’, *Nature*, 444(7115), pp. 97–101. doi: 10.1038/nature05248.
- Kanyuka, K. y Rudd, J. J. (2019) ‘Cell surface immune receptors: the guardians of the plant’s extracellular spaces’, *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 50, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.pbi.2019.02.005.
- Kazan, K. y Lyons, R. (2014) ‘Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors’, *The Plant Cell*, 26(6), pp. 2285–2309. doi: 10.1105/tpc.114.125419.
- Kim, K. T. *et al.* (2016) ‘Kingdom-wide analysis of fungal small secreted proteins (SSPs) reveals their potential role in host association’, *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), pp. 1–13. doi: 10.3389/fpls.2016.00186.
- Kim, T. H. (2012) ‘Plant stress surveillance monitored by ABA and disease signaling interactions’, *Molecules and Cells*, 33(1), pp. 1–7. doi: 10.1007/s10059-012-2299-9.
- Kind, S. *et al.* (2017) ‘*Brachypodium distachyon* as alternative model host system for the ergot fungus *Claviceps purpurea*’, *Molecular Plant Pathology*, 3462, pp. 1–15. doi: 10.1111/mpp.12563.
- Kind, S. *et al.* (2018) ‘Manipulation of cytokinin level in the ergot fungus *Claviceps purpurea* emphasizes its contribution to virulence’, *Current Genetics*. Springer Berlin Heidelberg, 64(6), pp. 1303–1319. doi: 10.1007/s00294-018-0847-3.
- Klemptner, R. L. *et al.* (2014) ‘Ergosterol, an orphan fungal microbe-associated molecular pattern (MAMP)’, *Molecular Plant Pathology*, 15(7), pp. 747–761. doi: 10.1111/mpp.12127.
- Knight, W. E. y Bennett, H. W. (1953) ‘Preliminary report of the effect of photoperiod and temperature on the flowering and growth of several southern grasses’, *Agronomy Journal*, 45(6), pp. 268–269. doi: 10.2134/agronj1953.00021962004500060011x.
- Kohorn, B. D. y Kohorn, S. L. (2012) ‘The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin

- receptors', *Frontiers in Plant Science*, 3(MAY), pp. 1–5. doi: 10.3389/fpls.2012.00088.
- Kozák, L. *et al.* (2018) 'Inactivation of the indole-diterpene biosynthetic gene cluster of *Claviceps paspali* by *Agrobacterium*-mediated gene replacement', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), pp. 3255–3266. doi: 10.1007/s00253-018-8807-x.
- Kozák, L. *et al.* (2019) 'Tremorgenic and neurotoxic paspaline-derived indole-diterpenes : biosynthetic diversity , threats and applications', *Applied Microbiology and Biotechnology*. Applied Microbiology and Biotechnology. doi: 10.1007/s00253-018-09594-x.
- Krijger, J.-J. J. *et al.* (2014) 'Compositions of fungal secretomes indicate a greater impact of phylogenetic history than lifestyle adaptation', *BMC Genomics*, 15(1), p. 722. doi: 10.1186/1471-2164-15-722.
- Krogh, A., Sonnhammer, E. L. L. y Ka, L. (2007) 'Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction — the Phobius web server', 35, pp. 429–432. doi: 10.1093/nar/gkm256.
- Kubicek, C.P., Starr, T. L. y Glass, N. L. (2014) 'Plant cell wall–degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi', *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), pp. 427–451. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-045831.
- Kumar, S., S, G. y Tamura, K. (2016) 'MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7 . 0 for Bigger Datasets Brief communication', *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Lacombe, S. *et al.* (2010) 'Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance', *Nature Biotechnology*, 28(4), pp. 365–369. doi: 10.1038/nbt.1613.
- Lai, Z. *et al.* (2014) 'MED18 interaction with distinct transcription factors regulates multiple plant functions', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–14. doi: 10.1038/ncomms4064.
- Langdon, R. F. N. (1952) *Studies on ergot*. University of Queensland, Australia.
- Langmead, B. and Salzberg, S. (2013) 'Bowtie2', *Nature methods*, 9(4), pp. 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923.Fast.
- Lanver, D. *et al.* (2018) 'The biotrophic development of *Ustilago maydis* studied by RNA-seq

analysis', *Plant Cell*, 30(2), pp. 300–323. doi: 10.1105/tpc.17.00764.

Laspina, N. V. *et al.* (2008) 'Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*', *Plant Molecular Biology*, 67(6), pp. 615–628. doi: 10.1007/s11103-008-9341-5.

Levin, J. Z. *et al.* (2010) 'Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods', *Nature Methods*, 7(9), pp. 709–715. doi: 10.1038/nmeth.1491.

Lewis, M. W. *et al.* (2010) 'The SERK1 receptor-like kinase regulates organ separation in *Arabidopsis* flowers', *Plant Journal*, 62(5), pp. 817–828. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04194.x.

Li, B. y Dewey, C. N. (2014) 'RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome', *Bioinformatics: The Impact of Accurate Quantification on Proteomic and Genetic Analysis and Research*, pp. 41–74. doi: 10.1201/b16589.

Li, W. y Godzik, A. (2006) 'Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences', *Bioinformatics*, 22(13), pp. 1658–1659. doi: 10.1093/bioinformatics/btl158.

Liang, H. *et al.* (2014) 'Comparative expression analysis of resistant and susceptible *Populus* clones inoculated with *Septoria musiva*', *Plant Science*, 223, pp. 69–78. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.03.004.

Liu, J. J. *et al.* (2015) 'Transcriptome analysis of the white pine blister rust pathogen *Cronartium ribicola*: De novo assembly, expression profiling, and identification of candidate effectors', *BMC Genomics*. BMC Genomics, 16(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s12864-015-1861-1.

Liu, L. *et al.* (2012) 'Comparison of next-generation sequencing systems', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. doi: 10.1155/2012/251364.

Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of Relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2 DeltaDeltaCT Method', 408, pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Lolle, S., Stevens, D. and Coaker, G. (2020) 'Plant NLR-triggered immunity: from receptor activation to downstream signaling', *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd, 62, pp. 99–105. doi: 10.1016/j.coi.2019.12.007.

- Lorenzo, O. *et al.* (2003) 'ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense', *Plant Cell*, 15(1), pp. 165–178. doi: 10.1105/tpc.007468.
- Lowe, R. G. T. y Howlett, B. J. (2012) 'Indifferent, affectionate, or deceitful: Lifestyles and secretomes of fungi', *PLoS Pathogens*, 8(3), pp. 1–3. doi: 10.1371/journal.ppat.1002515.
- Loyall, L. *et al.* (2000) 'Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures', *Plant Cell*, 12(10), pp. 1939–1950. doi: 10.1105/tpc.12.10.1939.
- Lu, H. (2009) 'Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks', *Plant Signaling and Behavior*, 4(8), pp. 713–717. doi: 10.4161/psb.4.8.9173.
- Luo, J. *et al.* (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). doi: 10.3390/biom9010012.
- Luttrell, E. S. (1977) 'The disease cycle and fungus-host relationships in dallisgrass ergot', *Phytopathology*, 67, pp. 1461–1468.
- Luttrell, E. S. (1980) 'Host–parasite relationships and development of the ergot sclerotium in *Claviceps purpurea*', *Canadian Journal of Botany*, 58(8), pp. 942–958. doi: 10.1139/b80-118.
- Macho, A. P. y Zipfel, C. (2014) 'Plant PRRs and the activation of innate immune signaling', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 54(2), pp. 263–272. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.028.
- Makandar, R. *et al.* (2010) 'Involvement of Salicylate and Jasmonate Signaling Pathways in *Arabidopsis* interaction with *Fusarium graminearum*', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(7), pp. 861–870. doi: 10.1094/MPMI-23-7-0861.
- Mantle, P. G. and Swan D. J. (1995) 'Effect of male sterility on ergot disease spread in wheat', *Plant Pathology*, 44(2), pp. 392–395. doi: 10.1111/j.1365-3059.1995.tb02792.x.
- Marioni, John C *et al.* (2008) 'RNA-seq : An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays', pp. 1509–1517. doi: 10.1101/gr.079558.108.
- Marioni, John C. *et al.* (2008) 'RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays', *Genome Research*, 18(9), pp. 1509–1517. doi: 10.1101/gr.079558.108.

- Medeiros, F. C. L. *et al.* (2009) 'Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato', *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Elsevier Ltd, 74(2), pp. 175–183. doi: 10.1016/j.pmpp.2009.11.004.
- Meinken, J. *et al.* (2014) 'FunSecKB2: a fungal protein subcellular location knowledgebase', *Computational Molecular Biology*, 4(7), pp. 1–17. doi: 10.5376/cmb.2014.04.0007.
- Meng, X. y Zhang, S. (2013) 'MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling', *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), pp. 245–266. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102314.
- Menzies, J. G. *et al.* (2017) 'Evaluation of *Claviceps purpurea* isolates on wheat reveals complex virulence and host susceptibility relationships', *Canadian Journal of Plant Pathology*. Taylor & Francis, 39(3), pp. 307–317. doi: 10.1080/07060661.2017.1355334.
- Metzker, M. L. (2010) 'Sequencing technologies the next generation', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 31–46. doi: 10.1038/nrg2626.
- Mey, G. *et al.* (2003) 'Structural and functional analysis of an oligomeric hydrophobin gene from *Claviceps purpurea*', *Molecular Plant Pathology*, 4(1), pp. 31–41. doi: 10.1046/j.1364-3703.2003.00138.x.
- Miedaner, T. y Geiger, H. H. (2015) 'Biology, genetics, and management of ergot (*Claviceps* spp.) in rye, sorghum, and pearl millet', *Toxins*, 7(3), pp. 659–678. doi: 10.3390/toxins7030659.
- Millot, J. . (1969) 'Mejoramiento de gramíneas forrajeras.', in *Reunión Técnica Producción y Conservación de Forraje (5º, 1969, Colonia). Trabajos presentados*. Colonia: MGAP/CIAAB, pp. 101–110.
- Millot, J. . (1977) *Sexuality in Paspalum dilatatum Poir. ssp. Dilatatum*. In: *Latin America Congress Genetic (3rd., 1977, Montevideo). Aspects of the chromosome organization and function*. Montevideo.
- Millot, J. , Risso, D. and Methol, R. (1987) *Relevamiento de las pasturas naturales y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay*. Montevideo.
- Min, B., Grigoriev, I. V y Choi, I. (2017) 'Genome analysis FunGAP : Fungal Genome Annotation Pipeline using evidence-based gene model evaluation', 33(June), pp. 2936–2937. doi: 10.1093/bioinformatics/btx353.

- Min, X. J. (2010) 'Evaluation of computational methods for secreted protein prediction in different eukaryotes', *Journal of Proteomics and Bioinformatics*, 3(5), pp. 143–147. doi: 10.4172/jpb.1000133.
- Minghetti, A. y Crespi-Perellino, N. (2005) 'The History of Ergot', in Kren, V. and Cvak, L. (eds) *Ergot the Genus Claviceps*. Hardwood Academic Publisher, pp. 1–447.
- Misas-Villamil, J. C. y van der Hoorn, R. AL (2008) 'Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface', *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), pp. 380–388. doi: 10.1016/j.pbi.2008.04.007.
- Miz, R. B. y De Souza-Chies, T. T. (2006) 'Genetic relationships and variation among biotypes of dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.) and related species using random amplified polymorphic DNA markers', *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(3), pp. 541–552. doi: 10.1007/s10722-005-1290-0.
- Molin, A. D. *et al.* (2018) 'The genome assembly of the fungal pathogen *Pyrenochaeta lycopersici* from single-molecule Eeal-Time sequencing sheds new light on its biological complexity', *PLoS ONE*, 13(7), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0200217.
- Monaghan, J. y Zipfel, C. (2012) 'Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 15(4), pp. 349–357. doi: 10.1016/j.pbi.2012.05.006.
- Montes-garcía, N. *et al.* (2008) 'Disease severity and susceptibility of Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench.) to infection by *Claviceps africana* Frederickson, Mantle and de Milliano in Mexico and the United States of America', 1915, pp. 121–127.
- Mortazavi, A. *et al.* (2008) 'Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq', *Nature Methods*, 5(7), pp. 621–628. doi: 10.1038/nmeth.1226.
- Naidoo, S. *et al.* (2014) 'Dual RNA-seq to Elucidate the Plant – Pathogen Duel'.
- Nakasugi, K. *et al.* (2014) 'Combining transcriptome assemblies from multiple de novoassemblers in the allo-tetraploid plant nicotiana benthamiana', *PLoS ONE*, 9(3). doi: 10.1371/journal.pone.0091776.
- Nasrallah, J. B., Nishio, T. and Nasrallah, M. E. (1991) 'The Self-Incompatibility Genes of Brassica: Expression and Use in Genetic Ablation of Floral Tissues', *Annual Review of Plant*

Physiology and Plant Molecular Biology, 42(1), pp. 393–422. doi: 10.1146/annurev.pp.42.060191.002141.

Neu, E. and Debener, T. (2019) ‘Prediction of the *Diplocarpon rosae* secretome reveals candidate genes for effectors and virulence factors’, *Fungal Biology*. Elsevier Ltd, 123(3), pp. 231–239. doi: 10.1016/j.funbio.2018.12.003.

Ng, T. B. (2004) ‘Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins’, *Peptides*, 25(7), pp. 1215–1222. doi: 10.1016/j.peptides.2004.03.012.

Novo, P. E. *et al.* (2016) ‘Interspecific hybrids between *Paspalum plicatulum* and *Paspalum oteroi*: a key tool for forage breeding’, *Scientia Agricola*, 73(4), pp. 356–362. doi: 10.1590/0103-9016-2015-0218.

O’Keeffe, K. R. y Jones, C. D. (2019) ‘Challenges and solutions for analysing dual RNA-seq data for non-model host–pathogen systems’, *Methods in Ecology and Evolution*, 10(3), pp. 401–414. doi: 10.1111/2041-210X.13135.

Oeser, B. *et al.* (2002) ‘Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction’, *Fungal Genetics and Biology*, 36(3), pp. 176–186. doi: 10.1016/S1087-1845(02)00020-8.

Oeser, B. *et al.* (2009) ‘Expressed sequence tags from the flower pathogen *Claviceps purpurea*’, *Molecular Plant Pathology*, 10(5), pp. 665–684. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00560.x.

Oeser, B. *et al.* (2017) ‘Cross-talk of the biotrophic pathogen *Claviceps purpurea* and its host *Secale cereale*’, *BMC Genomics*. BMC Genomics, 18(1), p. 273. doi: 10.1186/s12864-017-3619-4.

Ökmen, B. *et al.* (2018) ‘Mining the effector repertoire of the biotrophic fungal pathogen *Ustilago hordei* during host and non-host infection’, *Molecular Plant Pathology*, 19(12), pp. 2603–2622. doi: 10.1111/mpp.12732.

de Oliveira, F. A. *et al.* (2020) ‘Coexpression and Transcriptome analyses identify active Apomixis-related genes in *Paspalum notatum* leaves’, *BMC Genomics*. BMC Genomics, 21(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s12864-020-6518-z.

Ortiz, J. P. A. *et al.* (2017) ‘A reference floral transcriptome of sexual and apomictic *Paspalum notatum*’, *BMC Genomics*. BMC Genomics, 18(1), p. 318. doi: 10.1186/s12864-017-3700-z.

- Ortiz, J. P. A. *et al.* (2019) 'Small rna-seq reveals novel regulatory components for apomixis in *Paspalum notatum*', *BMC Genomics*. BMC Genomics, 20(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/s12864-019-5881-0.
- Osuna-Cruz, C. M. *et al.* (2018) 'PRGdb 3.0: A comprehensive platform for prediction and analysis of plant disease resistance genes', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 46(D1), pp. D1197–D1201. doi: 10.1093/nar/gkx1119.
- Ozsolak, F. *et al.* (2009) 'Direct RNA sequencing', *Nature*. Nature Publishing Group, 461(7265), pp. 814–818. doi: 10.1038/nature08390.
- Ozsolak, F. y Milos, P. M. (2011) 'RNA sequencing: advances, challenges and opportunities', *Nature Reviews Genetics*, 12(2), pp. 87–98. doi: 10.1038/nrg2934.
- Payá-Milans, M. *et al.* (2018) 'Comprehensive evaluation of RNA-seq analysis pipelines in diploid and polyploid species', *GigaScience*, 7(12), pp. 1–18. doi: 10.1093/gigascience/giy132.
- Pažoutová, S. *et al.* (2000) 'Chemoraces and habitat specialization of *Claviceps purpurea* populations', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), pp. 5419–5425. doi: 10.1128/AEM.66.12.5419-5425.2000.
- Pažoutová, S. (2001) 'The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*', *Mycological Research*, 105(3), pp. 275–283.
- Pažoutová, S. *et al.* (2002) 'Specialised population of *Claviceps purpurea* from salt marsh *Spartina* species', *Mycological Research*, 106(2), pp. 210–214. doi: 10.1017/S095375620100538X.
- Pažoutová, S. *et al.* (2011) 'New *Claviceps* species from warm-season grasses', *Fungal Diversity*, 49(July), pp. 145–165. doi: 10.1007/s13225-011-0102-4.
- Pažoutová, S. *et al.* (2015) 'Delimitation of cryptic species inside *Claviceps purpurea*', *Fungal Biology*, 119(1), pp. 7–26. doi: 10.1016/j.funbio.2014.10.003.
- Pažoutová, S. y Parbery, D. P. (1999) 'Taxonomy and phylogeny of *Claviceps*, *Medicinal & Aromatic Plants - Industrial Profiles*. Amsterdam: Hardwood Academic Publisher pp. 57–77.
- Pažoutová, S. y Tudzynski, P. (1999) '*Claviceps* sp. PRL 1980 (ATCC 26245), 59 and Pepty 695/ch-I: Their true story', *Mycological Research*, 103(8), pp. 1044–1048. doi: 10.1017/S0953756298008132.

- Peng, Z. *et al.* (2019) 'Effector gene reshuffling involves dispensable mini-chromosomes in the wheat blast fungus', *PLoS Genetics*, 15(9), pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.pgen.1008272.
- Píchová, K. *et al.* (2018) 'Evolutionary history of ergot with a new infrageneric classification (Hypocreales: Clavicipitaceae: *Claviceps*)', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 123(February), pp. 73–87. doi: 10.1016/j.ympev.2018.02.013.
- Pierleoni, A., Martelli, P. y Casadio, R. (2008) 'PredGPI: A GPI-anchor predictor', *BMC Bioinformatics*, 9, pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-2105-9-392.
- Pitzschke, A., Schikora, A. y Hirt, H. (2009) 'MAPK cascade signalling networks in plant defence', *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), pp. 421–426. doi: 10.1016/j.pbi.2009.06.008.
- Pizarro, E. A. (2002) 'Potencial forrajero del género *Paspalum*', *Pasturas Tropicales*, 22(1), pp. 38–46.
- Plett, J. M. y Martin, F. (2011) 'Blurred boundaries: Lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes', *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd, 27(1), pp. 14–22. doi: 10.1016/j.tig.2010.10.005.
- Plissonneau, C. *et al.* (2017) 'Using population and comparative genomics to understand the genetic basis of effector-driven fungal pathogen evolution', *Frontiers in Plant Science*, pp. 1–15. doi: 10.3389/fpls.2017.00119.
- Podio, M. *et al.* (2014) 'Characterization and expression analysis of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK) genes in sexual and apomictic *Paspalum notatum*', *Plant Molecular Biology*, 84(4–5), pp. 479–495. doi: 10.1007/s11103-013-0146-9.
- Poppe, S. *et al.* (2015) 'Rapidly evolving genes are key players in host specialization and virulence of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*)', *PLoS Pathogens*, 11(7), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.ppat.1005055.
- Lo Presti, L. *et al.* (2015) 'Fungal effectors and plant susceptibility', *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), pp. 513–545. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114623.
- Pusztahelyi, T. (2018) 'Chitin and chitin-related compounds in plant–fungal interactions', *Mycology*. Taylor & Francis, 9(3), pp. 189–201. doi: 10.1080/21501203.2018.1473299.
- Qi, P. *et al.* (2019) 'High Density Genetic Maps of Seashore *Paspalum* Using Genotyping-By-Sequencing and Their Relationship to The Sorghum Bicolor Genome', *Scientific Reports*, 9(1), p.

12183. doi: 10.1038/s41598-019-48257-3.

Qin, Y. *et al.* (2009) ‘Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil’, *PLoS Genetics*, 5(8). doi: 10.1371/journal.pgen.1000621.

Quail, M. *et al.* (2012) ‘A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers’, *BMC Genomics*, 13(1), p. 341. doi: 10.1186/1471-2164-13-341.

Quandt, C. A. *et al.* (2016) ‘Differential expression of genes involved in host recognition, attachment, and degradation in the mycoparasite *Tolypocladium ophioglossoides*’, *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 6(3), pp. 731–741. doi: 10.1534/g3.116.027045.

Quast, C. *et al.* (2013) ‘The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools’, *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp. 590–596. doi: 10.1093/nar/gks1219.

Quiapim, A. C. *et al.* (2009) ‘Analysis of the *Nicotiana tabacum* stigma/style transcriptome Reveals gene expression differences between wet and dry stigma species’, *Plant Physiology*, 149(3), pp. 1211–1230. doi: 10.1104/pp.108.131573.

Rana, S. B. *et al.* (2016) ‘Comparison of de novo transcriptome assemblers and k-mer strategies using the killifish, fundulus heteroclitus’, *PLoS ONE*, 11(4), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0153104.

Rao, P. *et al.* (2017) ‘Dynamic transcriptomic analysis of the early response of female flowers of *Populus alba* × *P. glandulosa* to pollination’, *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-017-06255-3.

Rejón, J. D. *et al.* (2013) ‘Proteomics profiling reveals novel proteins and functions of the plant stigma exudate’, *Journal of Experimental Botany*, 64(18), pp. 5695–5705. doi: 10.1093/jxb/ert345.

Research, M. P. *et al.* (1997) ‘Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus’, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), pp. 103–116.

Řiřicová, A., Pokorný, V. y Řeháček, Z. (1986) ‘Characteristics of the saprophytic reference strain FA of *Claviceps paspali*’, *Folia Microbiologica*, 31(1), pp. 32–43. doi: 10.1007/BF02928677.

- Rios, E. *et al.* (2015) 'Ergot Resistant Tetraploid Bahiagrass and Fungicide Effects on Seed Yield and Quality', *Plant Health Progress*, 16(2), pp. 56–62. doi: 10.1094/PHP-RS-14-0051.
- Robinson, D. L. *et al.* (1988) 'Dallisgrass yield, quality and nitrogen recovery responses to nitrogen and phosphorus fertilizers', *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 19(5), pp. 529–542. doi: 10.1080/00103628809367957.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J. y Smyth, G. K. (2009) 'edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data', *Bioinformatics*, 26(1), pp. 139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- Rodrigues, C. M. *et al.* (2013) 'RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defense response', *BMC Genomics*, 14(1). doi: 10.1186/1471-2164-14-676.
- Rolke, Y. y Tudzynski, P. (2008) 'The small GTPase Rac and the p21-activated kinase Cla4 in *Claviceps purpurea* : interaction and impact on polarity , development and pathogenicity', 68(March), pp. 405–423. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06159.x.
- Romeis, T. *et al.* (2001) 'Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response', *EMBO Journal*, 20(20), pp. 5556–5567. doi: 10.1093/emboj/20.20.5556.
- Rosengurtt, D., Arrillaga de Maffei, B. y Izaguirre de Artucio, P. (1970) *Gramíneas Uruguayas*. Montevideo.
- Rozas, J. *et al.* (2017) 'DnaSP 6 : DNA sequence polymorphism analysis of large data sets', *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), pp. 1–4. doi: 10.1093/molbev/msx248.
- Rua, G. H. *et al.* (2010) 'A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology', *Plant Systematics and Evolution*, 288(3–4), pp. 227–243. doi: 10.1007/s00606-010-0327-9.
- Rylko, V. *et al.* (1988) 'Formation of Conidia in a Saprophytic Strain *Claviceps paspali* Producing Simple Lysergic Acid Derivatives', *Folia Microbiol.*, 33, pp. 425–429.
- Saggese, I. *et al.* (2018) 'STable: a novel approach to de novo assembly of RNA-seq data and its application in a metabolic model network based metatranscriptomic workflow', *BMC Bioinformatics*, 19(S7), p. 184. doi: 10.1186/s12859-018-2174-6.

- Sánchez-Vallet, A. *et al.* (2013) ‘Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization’, *eLife*, 2013(2), pp. 1–16. doi: 10.7554/eLife.00790.
- Sánchez-Vallet, A., Mesters, J. R. y Thomma, B. P. H. J. (2015) ‘The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions’, *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), pp. 171–183. doi: 10.1093/femsre/fuu003.
- Sandhu, S. *et al.* (2010) ‘Apomixis and ploidy barrier suppress pollen-mediated gene flow in field grown transgenic turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flüggé)’, *Theoretical and Applied Genetics*, 121(5), pp. 919–929. doi: 10.1007/s00122-010-1360-3.
- Sandro, P., Gutiérrez, L. y Speranza, P. (2019) ‘Distribution of genetic and phenotypic diversity in the autogamous perennial *Paspalum dilatatum* subsp. *flavescens* Roseng., Arrill. & Izag. (*Poaceae*)’, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(6), pp. 1205–1216. doi: 10.1007/s10722-019-00791-9.
- Santiñaque, F. y Carámbula, M. (1981) ‘Productividad y comportamiento de distintas mezclas forrajeras’, *Investigaciones Agronómicas*, 2, pp. 16–21.
- Scalschi, L. *et al.* (2013) ‘Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways’, *Molecular Plant Pathology*, 14(4), pp. 342–355. doi: 10.1111/mpp.12010.
- Schaffer, W. M. y Bronnikova, T. V. (2012) ‘Peroxidase-ROS interactions’, *Nonlinear Dynamics*, 68(3), pp. 413–430. doi: 10.1007/s11071-011-0314-x.
- Schardl, C. L. *et al.* (2013) ‘Plant-Symbiotic Fungi as Chemical Engineers: Multi-Genome Analysis of the Clavicipitaceae Reveals Dynamics of Alkaloid Loci’, *PLoS Genetics*. Edited by J. Heitman, 9(2), p. e1003323. doi: 10.1371/journal.pgen.1003323.
- Schardl, C. L. *et al.* (2013) ‘The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses’, *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4), pp. 480–488. doi: 10.1016/j.pbi.2013.06.012.
- Schardl, C. L. *et al.* (2014) ‘Genomes of plant-associated clavicipitaceae’, in Martin, F. (ed.) *Advances in Botanical Research*. 1st edn. London: Elsevier Ltd., pp. 291–327. doi: 10.1016/B978-0-12-397940-7.00010-0.
- Schrauf, G. E. *et al.* (2003) ‘Ergot resistance in plants of *Paspalum dilatatum* incorporated by hybridisation with *Paspalum urvillei*’, *Tropical Grasslands*, 37(1), pp. 182–186.

- Schürmann, J. *et al.* (2013) 'Molecular characterization of the NADPH oxidase complex in the ergot fungus *Claviceps purpurea*: CpNox2 and CpPls1 are important for a balanced host-pathogen interaction.', *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 26(10), pp. 1151–64. doi: 10.1094/MPMI-03-13-0064-R.
- Schwessinger, B. y Zipfel, C. (2008) 'News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants', *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), pp. 389–395. doi: 10.1016/j.pbi.2008.06.001.
- Selin, C. *et al.* (2016) 'Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: Progress and challenges', *Frontiers in Microbiology*, 7(April), pp. 1–21. doi: 10.3389/fmicb.2016.00600.
- Serba, D. D. *et al.* (2015) 'Transcriptome profiling of rust resistance in switchgrass using RNA-Seq analysis', *Plant Genome*, 8(2), pp. 1–12. doi: 10.3835/plantgenome2014.10.0075.
- Sheikh, A. H. *et al.* (2016) 'Regulation of WRKY46 transcription factor function by mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana*', *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), pp. 1–15. doi: 10.3389/fpls.2016.00061.
- Shymanovich, T. *et al.* (2014) 'Alkaloid variation among *Epichloa* endophytes of sleepygrass (*Achnatherum robustum*) and consequences for resistance to insect herbivores', *Journal of Chemical Ecology*, 41(1), pp. 93–104. doi: 10.1007/s10886-014-0534-x.
- Simão, F. A. *et al.* (2015) 'BUSCO : assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs', *Bioinformatics Advance*, pp. 9–10.
- Singh, K. B., Foley, R. C. y Oñate-Sánchez, L. (2002) 'Transcription factors in plant defense and stress responses', *Current Opinion in Plant Biology*, 5(5), pp. 430–436. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00289-3.
- Skerman, P. y Riveros, F. (1992) 'Gramíneas tropicales', *Colección FAO: Producción y Protección Vegetal*, 23, p. 866.
- Solano-De La Cruz, M. T. *et al.* (2019) 'Functional categorization of de novo transcriptome assembly of *Vanilla planifolia* Jacks. potentially points to a translational regulation during early stages of infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*', *BMC Genomics*. BMC Genomics, 20(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s12864-019-6229-5.
- Sollapure, V. (2015) 'Comparative transcriptome analysis between mature pollen and stigma of

Brassicaceae and Triticeae crop species', 2(2), p. 8936.

Sonah, H., Deshmukh, R. K. y Bélanger, R. R. (2016) 'Computational prediction of effector proteins in fungi: Opportunities and challenges', *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), pp. 1–14. doi: 10.3389/fpls.2016.00126.

Souza-Chies, T. T. *et al.* (2006) 'A preliminary approach to the phylogeny of the genus *Paspalum* (Poaceae)', *Genetica*, 126(1–2), pp. 15–32. doi: 10.1007/s10709-005-1428-1.

Spallek, T. *et al.* (2018) 'Same tune, different song — cytokinins as virulence factors in plant–pathogen interactions?', *Current Opinion in Plant Biology*. The Authors, 44, pp. 82–87. doi: 10.1016/j.pbi.2018.03.002.

Spatafora, J. W. *et al.* (2007) 'Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes', *Molecular Ecology*, 16, pp. 1701–1711. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03225.x.

Speranza, P. *et al.* (2017) *Utilización y domesticación de gramíneas forrajeras del género Paspalum en Uruguay*. Montevideo. Available at:
<http://www.ainfo.inia.uy/consulta/busca?b=pc&id=58002&biblioteca=vazio&busca=fpta61&qFacets=fpta61&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>.

Speranza, P. and Malosetti, M. (2007) 'Nuclear and cytoplasmic microsatellite markers for the species of the Dilatata group of *Paspalum* (Poaceae)', *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 5(1), pp. 14–26. doi: 10.1017/S1479262107192145.

Speranza, P. R. (2005) Evolutionary patterns in the dilatata group (*Paspalum*, Poaceae): A polyploid/agamic complex). *Tesis Doctoral*. Universidad de Florida.

Speranza, P. R. (2009) 'Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae)', *Plant Systematics and Evolution*, 282(1–2), pp. 43–56. doi: 10.1007/s00606-009-0205-5.

Sperschneider, J., Dodds, Peter N., *et al.* (2015) 'Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi', *PLoS Pathogens*, 11(5), pp. 1–7. doi: 10.1371/journal.ppat.1004806.

Sperschneider, J. *et al.* (2018) 'ApoplastP: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning', *New Phytologist*, 217(4), pp. 1764–1778. doi: 10.1111/nph.14946.

- Stergiopoulos, I. y de Wit, P. J. G. M. (2009) 'Fungal Effector Proteins', *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), pp. 233–263. doi: 10.1146/annurev.phyto.112408.132637.
- Stevens, F. L. y Hall, F. G. (1910) 'Three interesting species of *Claviceps*', *Bot.* 622, 50, pp. 460–463.
- Stotz, H. U. *et al.* (2014) 'Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens', *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 19(8), pp. 491–500. doi: 10.1016/j.tplants.2014.04.009.
- Stukenbrock, E. H. *et al.* (2011) 'The making of a new pathogen: Insights from comparative population genomics of the domesticated wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* and its wild sister species', *Genome Research*, 21(12), pp. 2157–2166. doi: 10.1101/gr.118851.110.
- Surget-Groba, Y. y Montoya-Burgos, J. I. (2010) 'Optimization of de novo transcriptome assembly from next-generation sequencing data', *Genome Research*, 20(10), pp. 1432–1440. doi: 10.1101/gr.103846.109.
- Takach, J. E. y Young, C. A. (2014) 'Alkaloid genotype diversity of tall fescue endophytes', *Crop Science*, 54(2), pp. 667–678. doi: 10.2135/cropsci2013.06.0423.
- Tenberge, K. B. (1999) 'Biology and life strategy of the ergot fungi', *Medicinal & Aromatic Plants - Industrial Profiles*. Amsterdam: Hardwood Academic Publisher, pp. 25–56. doi: 10.1201/9780203304198.ch2.
- Thomma, B. P. H. J., Nürnberger, T. and Joosten, M. H. A. J. (2011) 'Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy', *Plant Cell*, 23(1), pp. 4–15. doi: 10.1105/tpc.110.082602.
- Tooley, P. W. *et al.* (2001) 'Characterization of *Claviceps* species pathogenic on Sorghum by sequence analysis of the β -tubulin gene intron 3 region and EF-1 α gene intron 4. *Mycologia*, 93(3), pp. 541–551.
- Tscherter, H. y Hauth, H. (1974) 'Three new ergot alkaloids from sapro-phytic culture of *Claviceps paspali* Stevens et Hall', *Helv Chim Acta*, 57, pp. 113–121. doi: 10.1099/00221287-129-7-2109.
- Tudzynski, P. y Scheffer, J. (2004) '*Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle', *Molecular Plant Pathology*, 5(5), pp. 377–388. doi: 10.1111/j.1364-3703.2004.00237.x.
- Tudzynski, P. y Tenberge, K. B. (2003) 'Molecular aspects of host pathogen interaction and of ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps*', in White, J. *et al.* (eds) *The Clavicipitalean Fungi*:

Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol and Cultural Impacts. New York: Marcel Dekker, pp. 445–473.

Uhlig, Silvio *et al.* (2009) ‘Indole-diterpenes and ergot alkaloids in *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) infected with *Claviceps cynodontis* from an outbreak of tremors in cattle’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(23), pp. 11112–11119. doi: 10.1021/jf902208w.

Uhlig, S *et al.* (2009) ‘Indole - diterpenes and ergot alkaloids in *Cynodon dactylon* (Bermuda Grass) infected with *Claviceps cynodontis* from an outbreak of tremors in cattle’, *J. Agric. Food Chem.*, 57, pp. 11112–11119. doi: 10.1021/jf902208w.

Ungaro, A. *et al.* (2017) ‘Challenges and advances for transcriptome assembly in non-model species’, *PloS one*, 12(9), p. e0185020. doi: 10.1371/journal.pone.0185020.

Vaio, M. *et al.* (2007) ‘Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*’, *Plant Systematics and Evolution*, 265(1–2), pp. 109–121. doi: 10.1007/s00606-006-0506-x.

Venuto, B. C. *et al.* (2003) ‘Forage yield, nutritive value, and grazing tolerance of dallisgrass biotypes’, *Crop Science*, 43(1), p. 295. doi: 10.2135/cropsci2003.0295.

Venuto, B. C. *et al.* (2007) ‘Variation among hexaploid *Paspalum dilatatum* Poir. regenerants from tissue culture’, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 47(9), pp. 1109–1116. doi: 10.1071/EA06337.

Vilgalys, R. y Sun, B. A. O. L. I. N. (1994) ‘Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(May), pp. 4599–4603.

Viñas, S. (2015) ‘Análisis de plantas transgénicas ATEMYB32 :: IPT de pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir .) una gramínea C4’, *Tesis Doctoral*, p. 98.

Vincent, D., Rafiqi, M. y Job, D. (2020) ‘The multiple facets of plant–fungal interactions revealed through plant and fungal ecretomics’, *Frontiers in Plant Science*, 10(January). doi: 10.3389/fpls.2019.01626.

Volpi, C. *et al.* (2013) ‘*Claviceps purpurea* expressing polygalacturonases escaping PGIP inhibition fully infects PvPGIP2 wheat transgenic plants but its infection is delayed in wheat transgenic plants with increased level of pectin methyl esterification’, *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier

Masson SAS, 73, pp. 294–301. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.10.011.

Wali, P. P. *et al.* (2013) ‘Is the Pathogenic Ergot Fungus a Conditional Defensive Mutualist for Its Host Grass?’, 8(7). doi: 10.1371/journal.pone.0069249.

Wan, J. *et al.* (2012) ‘LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in Arabidopsis’, *Plant Physiology*, 160(1), pp. 396–406. doi: 10.1104/pp.112.201699.

Wan, W. L. *et al.* (2019) ‘Plant cell surface immune receptor complex signaling’, *Current Opinion in Plant Biology*, 50(Figure 1), pp. 18–28. doi: 10.1016/j.pbi.2019.02.001.

Wang, Z., Gerstein, M. y Snyder, M. (2009) ‘RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics’, *Nature Reviews Genetics*, 10(1), pp. 57–63. doi: 10.1038/nrg2484.

Westermann, A. J. (2014) ‘Dual RNA-seq of pathogen and host. *Tesis doctoral*. Universidad de Würzburg.

Westermann, A. J., Barquist, L. y Vogel, J. (2017) ‘Resolving host–pathogen interactions by dual RNA-seq’, *PLOS Pathogens*. Edited by J. B. Bliska, 13(2), p. e1006033. doi: 10.1371/journal.ppat.1006033.

Westermann, A. J. y Vogel, J. (2018) ‘Host-Pathogen transcriptomics by dual RNA-Seq’, in *Methods in Molecular Biology*, pp. 59–75. doi: 10.1007/978-1-4939-7634-8_4.

Wilkins, K. A. *et al.* (2011) ‘Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self-incompatibility response of papaver’, *Plant Physiology*, 156(1), pp. 404–416. doi: 10.1104/pp.110.167510.

Willingale, J. y Mantle, P. G. (1987) ‘Stigmatic constriction in pearl millet following infection by *Claviceps fusiformis*’, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 30(2), pp. 247–257. doi: 10.1016/0885-5765(87)90038-5.

Windram, O. *et al.* (2012) ‘Arabidopsis defense against *Botrytis cinerea*: Chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis’, *Plant Cell*, 24(9), pp. 3530–3557. doi: 10.1105/tpc.112.102046.

Woodward, A. W. y Bartel, B. (2005) ‘Auxin: Regulation, action, and interaction’, *Annals of Botany*, 95(5), pp. 707–735. doi: 10.1093/aob/mci083.

- Wrzaczek, M. *et al.* (2010) 'Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of Receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in Arabidopsis', *BMC Plant Biology*, 10, pp. 1–19. doi: 10.1186/1471-2229-10-95.
- Wu, P. *et al.* (2020) 'Comparative transcriptome profiling provides insights into plant salt tolerance in seashore *Paspalum* (*Paspalum vaginatum*)', *BMC Genomics*. BMC Genomics, 21(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s12864-020-6508-1.
- Yadeta, K. A. *et al.* (2017) 'A cysteine-rich protein kinase associates with a membrane immune complex and the cysteine residues are required for cell death', *Plant Physiology*, 173(1), pp. 771–787. doi: 10.1104/pp.16.01404.
- Yang, D. H. *et al.* (2011) 'The multifaceted function of BAK1/SERK3: Plant immunity to pathogens and responses to insect herbivores', *Plant Signaling and Behavior*, 6(9), pp. 1322–1324. doi: 10.4161/psb.6.9.16438.
- Yi, W. *et al.* (2006) 'Stigma development and receptivity in almond (*Prunus dulcis*)', *Annals of Botany*, 97(1), pp. 57–63. doi: 10.1093/aob/mcj013.
- Yike, I. (2011) 'Fungal proteases and their pathophysiological effects', *Mycopathologia*, 171(5), pp. 299–323. doi: 10.1007/s11046-010-9386-2.
- Young, C. A. *et al.* (2015) 'Genetics, genomics and evolution of ergot alkaloid diversity', *Toxins*, 7(4), pp. 1273–1302. doi: 10.3390/toxins7041273.
- Zerbino, D. R. y Birney, E. (2008) 'Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs', *Genome Research*, 18(5), pp. 821–829. doi: 10.1101/gr.074492.107.
- Zhang, H., Lomba, P. and Altpeter, F. (2007) 'Improved turf quality of transgenic bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge) constitutively expressing the ATHB16 gene, a repressor of cell expansion', *Molecular Breeding*, 20(4), pp. 415–423. doi: 10.1007/s11032-007-9101-2.
- Zhang, L. *et al.* (2014) 'Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the arabidopsis receptor-like protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASES', *Plant Physiology*, 164(1), pp. 352–364. doi: 10.1104/pp.113.230698.
- Zhang, L. *et al.* (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(April), pp. 1–19. doi: 10.3389/fpls.2018.00434.

Zhang, T. *et al.* (2017) 'Time-course transcriptome analysis of compatible and incompatible pollen-stigma interactions in *Brassica napus* L.', *Frontiers in Plant Science*, 8(May), pp. 1–15. doi: 10.3389/fpls.2017.00682.

Zhao, P., Zhang, L. y Zhao, L. (2015) 'Dissection of the style's response to pollination using transcriptome profiling in self-compatible (*Solanum pimpinellifolium*) and self-incompatible (*Solanum chilense*) tomato species', *BMC Plant Biology*. ???, 15(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12870-015-0492-7.

Zhao, Z. *et al.* (2014) 'Correction to Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi [BMC Genomics 14(2013) 274]', *BMC Genomics*, 15(1). doi: 10.1186/1471-2164-15-6.

Zhou, Q. *et al.* (2014) 'The large-scale investigation of gene expression in *Leymus chinensis* stigmas provides a valuable resource for understanding the mechanisms of Poaceae self-incompatibility', *BMC Genomics*, 15(1), p. 399. doi: 10.1186/1471-2164-15-399.

Zhu, Q. *et al.* (2012) 'Characterization of the defense transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum*-infection in *Arabidopsis* using RNA-seq', *Gene*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.gene.2012.10.036.

Zipfel, C. (2009) 'Early molecular events in PAMP-triggered immunity', *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), pp. 414–420. doi: 10.1016/j.pbi.2009.06.003.

Zuloaga, F. O. y Morrone, O. (2005) *Revisión de las Especies de Paspalum para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay, y Uruguay)*. 102: VII. St. Louis, Mo: Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden.

4. CAPITULO II:

Diversity of *Claviceps* *paspali* reveals unknown lineages and unique alkaloid genotypes

Este capítulo corresponde a la adaptación del artículo publicado en la revista *Mycologia*

<https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1694827>.

Enviado el 25 Abril 2019, Aceptado el 15 Noviembre 2019, Publicado online: 07 Enero 2020

4.1. ABSTRACT

Claviceps species affecting *Paspalum* spp. are a serious problem, as they infect forage grasses such as *Paspalum dilatatum* and *P. plicatulum*, producing the ergot disease. The ascomycete *C. paspali* is known to be the pathogen responsible for this disease in both grasses. This fungus produces alkaloids, including ergot alkaloids and indole-diterpenes, that have potent neurotropic activities in mammals. A total of 32 isolates from Uruguay were obtained from infected *P. dilatatum* and *P. plicatulum*. Isolates were phylogenetically identified using partial sequences of the genes coding for the second largest subunit of RNA polymerase subunit II (RPB2), translation elongation factor 1- α (TEF1), β -tubulin (TUB2), and the nuc rDNA 28S subunit (28S). Isolates were also genotyped by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and presence of genes within the ergot alkaloid (EAS) and indole-diterpene (IDT) biosynthetic gene clusters. This study represents the first genetic characterization of several isolates of *C. paspali*. The results from this study provide insight into the genetic and genotypic diversity of *C. paspali* present in *P. dilatatum* and suggest that isolates from *P. plicatulum* could be considered an ecological subspecies or specialized variant of *C. paspali*. Some of these isolates show hypothetical alkaloid genotypes never reported before.

KEYWORDS: *Paspalum*, phylogeny, fingerprinting, stagger, ergot, host speciation

4.2. INTRODUCTION

Claviceps species are the causal agents of the ubiquitous ergot disease of sedges, rushes and grasses (Pažoutová, 2002). Ergot in *Paspalum* spp. is caused mainly by *Claviceps paspali* described by Stevens & Hall (1910) in USA and *C. clavispora* described recently by Pažoutová & Odvody (2011) in Mexico. In addition, *C. queenslandica* was reported by Langdon (1952¹) affecting only *P. orbiculare* in Australia. Infection of these warm season grasses with *Claviceps* spp. has become a serious problem for forage production as it affects grasses like *P. dilatatum* Poir (Luttrell, 1977; Schrauf *et al.*, 2003) and *P. plicatulum* Michx (Alderman *et al.*, 2004). These grasses, native to

South America, are considered drought resistant (Couso *et al.*, 2010; Pezzopane *et al.*, 2017) and have been selected for use as forage in warmer regions (Pizarro, 2002) and for the generation of highly productive and persistent interspecific hybrids (Schrauf *et al.*, 2003; Aguilera *et al.*, 2011; Novo *et al.*, 2016). However, *C. paspali* infects inflorescences in summer, leading to the production of the typical honeydew that characterizes the disease, and to the substitution of the seeds by sclerotia (Luttrell, 1977) in both grasses, similar to the infection process described for *C. purpurea* which occurs mostly through the stigma (Luttrell, 1977). Conidia germinate on the stigma and infection progresses down the style to the base of the ovary, which is later substituted by the sclerotium. Seed substitution lowers the seed yield to noncommercial levels, hampering the efficient multiplication of selected cultivars of these grasses (Luttrell, 1977; Tenberge, 1999; Schrauf *et al.*, 2003). Of the *Claviceps* species affecting *Paspalum*, only sclerotia of *C. paspali* have been reported to contain alkaloids like ergot alkaloids and indole-diterpenes (Cole *et al.*, 1977; Píchová *et al.*, 2018), which have potent neurotropic activities in mammals (Schardl *et al.*, 2013a). In particular, indole-diterpene like *paspalinine* (PNE) and *paspalitrem* A (PTMA) and B (PTMB) are tremorgenic toxins that cause *Paspalum* staggers (Cole *et al.*, 1977; Uhlig *et al.*, 2009), which results in involuntary shaking and trembling and can also lead to seizures and affect cattle performance (Cawdell-Smith, Scrivener y Bryden, 2010; Coufal-Majewski *et al.*, 2016). Although *C. paspali* also produces ergot alkaloids, their concentration are less problematic for cattle (Evans y Gupta, 2018). The pathways and genes involved in the biosynthesis of these metabolites in *C. paspali* have been described (Schardl *et al.*, 2013a; Kozák *et al.*, 2018) (**Fig. 1**). However, no further research has been done to characterize the genetic potential for alkaloid production of strains of *C. paspali*.

Many molecular tools have been applied to assess the relationships between species of *Claviceps* and the extent and distribution of genetic variation within and among them. Sequences of regions of rDNA (Pažoutová, 2001; Spatafora *et al.*, 2007), fragments of the *MCM7* gene (Aguileta *et al.*, 2008), regions of the elongation factor 1- α (*TEF1*), and β -tubulin (*TUB2*) genes (Tooley *et al.*, 2001) and part of the RNA polymerase subunit II gene (*RPB2*) (Píchová *et al.*, 2018) have been used to assess taxonomic relatedness among *Claviceps* species and to develop identification techniques (Tooley *et al.*, 2001; Gilmore *et al.*, 2016). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method has been successfully used to discriminate different *Claviceps* species (Minghetti y Crespi-Perellino, 2005) and especially to type *C. purpurea* isolates (Jungehulsing y Tudzynski, 1997; Pažoutová *et al.*, 2000, 2002a, 2011b; Fisher, Gordon y Ditomaso, 2005; Irzykowska, Weber y Bocianowski, 2012). However, molecular studies of *Claviceps* species infecting *P. dilatatum* and *P. plicatulum* are scarce. The ability to fingerprint *Claviceps* infecting these host species could allow the discrimination of strains according to their prevalence, degree of virulence and alkaloid

potential. RAPDs or other typing method would then prove to be a valuable molecular tool for differentiating *Claviceps* species and strains for improvement of *P. dilatatum* and *P. plicatum* breeding programs and for gaining a better understanding of *Claviceps* population biology and genetics.

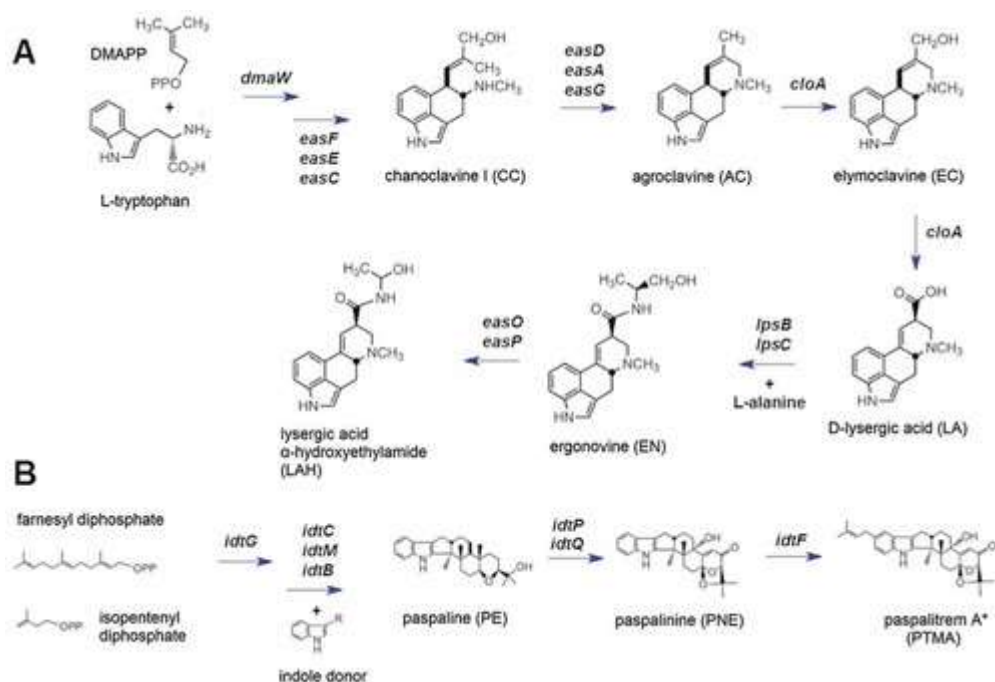


Figure 1. Abbreviated biosynthetic pathways of alkaloids produced by *Claviceps paspali*. A. Ergot alkaloids. B. Indole-diterpenes. Double arrows indicate multiple steps, and arrows are labeled according to the gene products (enzymes) that catalyze the steps. * indicates *paspalitrem A* (PTMA) or *paspalitrem B* (PTMB). Modified from Schardl et al. [2013a](#).

Because South America is the center of origin of *P. dilatatum* and *P. plicatum*, it is expected that associated *Claviceps* species in this region exhibit high diversity. Due to the lack of information regarding *Claviceps* species affecting *Paspalum* spp., and lack of knowledge on their genetic diversity in Uruguay, the principal aims of this work were to identify the *Claviceps* species affecting *P. dilatatum* and *P. plicatum*, to characterize their genetic diversity and their potential for alkaloid production.

4.3. MATERIALS and METHODS

4.3.1. Sampling and fungal isolates

Infected plant material was collected during summer in 2017–2018 from 12 sites in Uruguay. *Paspalum dilatatum* specimens were taken from 11 sites located in four regions (north, northwest, central, and south) at the border of the roads throughout the country and from the natural lawn at the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Las Brujas Research Station (**Table 1**). *Paspalum plicatulum* specimens were collected from populations at the border of the road, only from two regions (north and northwest) of the country. In both plant species, panicles showing honeydew or containing sclerotia were collected.

Cultures were obtained by diluting honeydew 100-fold in sterile distilled water and streaking onto plates of 2 % water agar (Tooley *et al* 2001). Plates were incubated at 26 C in the dark for 2 d, and individual germinated conidia were transferred to plates with *Claviceps* Medium (Gilmore *et al.*, 2016) at 26 C. Cultures from sclerotia were obtained as described on Gilmore *et al.*, (2016) with modifications. Sclerotia were surface-disinfected by dipping in 95 % ethanol for 30 s, soaking in 0.6 % sodium hypochlorite solution for 25 min, and rinsing in sterile water for 30 s. Then sclerotia were bisected with a flame-sterilized blade and placed with the cut surface down on water agar in a 9.5 cm diameter Petri plate. Single hyphal tips were transferred to *Claviceps* Medium to establish hyphal tip cultures. Pure isolates were stored at the Laboratorio de Bioproducción INIA Las Brujas fungal collection (ILB). A list of field isolates used in this study is shown in **Table 1**, including *C. paspali* DSMZ-833 strain (Braunschweig, Germany) equivalent to the now-discontinued ATCC 13893 (Chain *et al.*, 1962).

Table 1. Isolates of *Claviceps* species, *Paspalum* hosts, locations, sampling regions, and GenBank accession numbers obtained in this work.

Isolate	Host	Origin	Region	Source	GenBank			
					28S	TUB2	TEF1	RPB2
ILB357	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Sclerotium	MK795789	MK575074	MK575107	MK833884
ILB358	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Honeydew	MK795791	MK575076	MK575109	MK833886
ILB359	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Sclerotium	MK795802	MK575087	MK575120	MK833897
ILB360	<i>P. plicatulum</i>	Villa Ansina, Tacuarembó	North	Sclerotium	MK795804	MK575089	MK575122	MK833899
ILB361	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Honeydew	MK795790	MK575075	MK575108	MK833885
ILB363	<i>P. dilatatum</i>	Corrales, Paysandú	Noth-West	Sclerotium	MK795798	MK575083	MK575116	MK833893
ILB364	<i>P. plicatulum</i>	Tranqueras, Rivera	South	Sclerotium	MK795797	MK575082	MK575115	MK833892
ILB365	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Sclerotium	MK795788	MK575073	MK575106	MK833883
ILB366	<i>P. dilatatum</i>	Rincón de Pérez, Paysandú	Noth-West	Sclerotium	MK795793	MK575078	MK575111	MK833888
ILB367	<i>P. dilatatum</i>	Los Ceballos, Paysandú	Noth-West	Sclerotium	MK795795	MK575080	MK575113	MK833890
ILB368	<i>P. dilatatum</i>	Estación Goñi, Florida	Center	Sclerotium	MK795815	MK575100	MK575133	MK833910
ILB369	<i>P. dilatatum</i>	Tambores, Tacuarembó	South	Sclerotium	MK795812	MK575097	MK575130	MK833907
ILB370	<i>P. dilatatum</i>	Villa Ansina, Tacuarembó	South	Sclerotium	MK795796	MK575081	MK575114	MK833891
ILB371	<i>P. dilatatum</i>	Estación Goñi, Florida	Center	Sclerotium	MK795813	MK575098	MK575131	MK833908
ILB373	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Sclerotium	MK795808	MK575093	MK575126	MK833903
ILB374	<i>P. dilatatum</i>	Valle Edén, Tacuarembó	South	Sclerotium	MK795799	MK575084	MK575117	MK833894
ILB375	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Sclerotium	MK795801	MK575086	MK575119	MK833896
ILB376	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Sclerotium	MK795787	MK575072	MK575105	MK833882
ILB377	<i>P. dilatatum</i>	Estación Goñi, Florida	Center	Sclerotium	MK795803	MK575088	MK575121	MK833898
ILB378	<i>P. dilatatum</i>	Glencoe, Paysandú	Noth-West	Sclerotium	MK795794	MK575079	MK575112	MK833889
ILB380	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Sclerotium	MK795806	MK575091	MK575124	MK833901
ILB381	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Sclerotium	MK795792	MK575077	MK575110	MK833887
ILB382	<i>P. dilatatum</i>	Carlos Reyles, Durazno	Center	Sclerotium	MK795811	MK575096	MK575129	MK833906
ILB383	<i>P. dilatatum</i>	Carlos Reyles, Durazno	Center	Sclerotium	MK795810	MK575095	MK575128	MK833905
ILB384	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Honeydew	MK795786	MK575071	MK575104	MK833881
ILB385	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Sclerotium	MK795805	MK575090	MK575123	MK833900
ILB386	<i>P. dilatatum</i>	Carlos Reyles, Durazno	Center	Sclerotium	MK795807	MK575092	MK575125	MK833902
ILB387	<i>P. dilatatum</i>	Las Brujas, Canelones	South	Sclerotium	MK795809	MK575094	MK575127	MK833904
ILB388	<i>P. plicatulum</i>	Villa Ansina, Tacuarembó	South	Sclerotium	MK795800	MK575085	MK575118	MK833895
ILB389	<i>P. dilatatum</i>	Estación Goñi, Florida	Center	Sclerotium	MK795816	MK575101	MK575134	MK833911
ILB391	<i>P. dilatatum</i>	Tacuarembó, Tacuarembó	South	Sclerotium	MK795817	MK575102	MK575135	MK833912
ILB393	<i>P. dilatatum</i>	Tacuarembó, Tacuarembó	South	Sclerotium	MK795814	MK575099	MK575132	MK833909
DSMZ-833	<i>P. distichum</i>	Rome, Italy	-	Sclerotium	--	MK575103	MK575136	MK833912

4.3.2. DNA extraction, PCR amplification and sequencing

DNA was isolated from cultures after 2 wk of growth using the Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Kit (Zymo Research, USA) following the manufacturer's instructions. Four loci were amplified by PCR. Part of the *TUB2* gene was amplified with the primers T1(AACATGCGTGAGATTGTAAGT) (O'Donnell y Cigelnik 1997) and Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) (Glass y Donaldson, 1995). For the samples that did not amplify with T1, BT2a (TTTCGTGGTATTGTTCGCAGA) (Glass y Donaldson, 1995) was used instead. Primers EF1-728F (CATCGAGAAGTTCGAGAAGG) and EF1-986R (TACTTGAAGGAACCCTTACC) were used to amplify a region of *TEF1* gene (Carbone y Kohn, 1999). Primers LROR (GTACCCGCTGAACTTAAGC) and LR5 (ATCCTGAGGGAAACTTC) were used for amplification of approx. 1000 bp of 28S (Vilgalys y Sun, 1994). Primers RPB2_CspasF (GAGACGGAAAACCTGGCAAAG) and RPB2R_CspasR (ACATGTGTGTCGTCGGATTG) were design for partial *RPB2* amplification based on conserved regions of reported *C. paspali* *RPB2* sequences (DQ522416.1, KP689513.1, LT216594.1).

The PCR mixture consisted of 1x Mg-free reaction buffer, 2 mM of Mg⁺², 1 U of Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Lithuania), 0.2 mM deoxynucleotides mix, 2 pmol of each primer, and 5-50 ng of DNA in 25 µl of total volume. The PCR reaction conditions in a Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) were for *TEF1* and *TUB2* as follows: 3 m at 95 C, 30 cycles of 30 s at 95 C, 30 s at 60 C and 90 s at 72 C and a final extension of 10 min at 72 C. For 28S and *RPB2* conditions were as follows: 3 min at 95 C, 30 cycles of 30 s at 95 C, 60 s at 58 C and 60 s at 72 C and a final extension of 10 min at 72 C. Amplicons were purified with the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) and sequenced in both directions by Macrogen Inc. (Seoul, Korea) using the same primers. Sequences were submitted to GenBank (**Table 1**).

4.3.3. Phylogenetic analysis

DNA sequences were aligned and manually corrected with other sequences obtained from GenBank (**Table 2**) using ClustalW algorithm within the free software MEGA v.7.0 (Kumar,

Stecher y Tamura, 2016). Manual adjustments were made to improve the alignments. Maximum parsimony (MP) and Maximum-likelihood (ML) implemented in MEGA v.7.0 were used for phylogenetic analyses of the individual data sets.

Table 2. GenBank/EMBL accession numbers of *RPB2* gene sequences used in this study

Specie-strain	Accession	Reference
<i>Claviceps paspali</i> -ATCC3892	DQ522416.1	Spatafora <i>et al.</i> , 2007
<i>Claviceps paspali</i> -CCC130	LT216594.1	Pichova <i>et al.</i> , 2018
<i>Claviceps paspali</i> -RRC1481	KF042054.1	Scharld <i>et al.</i> , 2013
<i>Claviceps monticola</i> -CCC1483	LT216591.1	Pichova <i>et al.</i> , 2018
<i>Claviceps monticola</i> -CCC1222	LT216592.1	Pichova <i>et al.</i> , 2018
<i>Claviceps africana</i> -CCC554	LT216566.1	Pichova <i>et al.</i> , 2018
<i>Claviceps africana</i> -CCC489	LT216566.1	Pichova <i>et al.</i> , 2018
<i>Claviceps sorghi</i> -CCC627	LT216607.1	Pichova <i>et al.</i> , 2018
<i>Claviceps sorghi</i> -CCC632	LT216566.1	Pichova <i>et al.</i> , 2018
<i>Claviceps zizaniae</i> -CCC429	LT216617.1	Pichova <i>et al.</i> , 2018
<i>Claviceps nigricans</i> -CCC802	LT216593.1	Pichova <i>et al.</i> , 2018
<i>Claviceps clavispora</i> -CCC606	LT216566.1	Pichova <i>et al.</i> , 2018
<i>Claviceps clavispora</i> -CCC610	LT216567.1	Pichova <i>et al.</i> , 2018
<i>Epichloë typhina</i> -ATCC 56429	DQ522440.1	Spatafora <i>et al.</i> , 2007

For MP analysis, we use the addition of 1000 random replicates and tree bisection and reconstruction (TBR) selected as branch swapping algorithm. Gaps were treated as missing character and all characters were unordered and of equal weight. Branches of zero length were collapsed. To estimate branch support, MP bootstrap values were determined using 1000 bootstrap replicates (Felsenstein, 1985). For the ML analysis, a suitable model for each locus was selected using Mega v.7.0 and 1000 replicates of bootstrap test were run.

MP and ML analyses generated nearly identical topologies for each data set; thus, only the topology from the MP analysis is presented in the main text along with statistical values from the MP and ML algorithms.

The data sets and analysis were archived in TreeBASE under the submission ID number 25465 (<http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S25465>).

4.3.4. Haplotype analysis

The data set containing sequences of genes 28S, *TEF1*, *TUB2* and *RPB2* for all the Uruguayan isolates were used for haplotype analysis. The number of haplotypes of each gene, segregating sites, haplotypic diversity and nucleotide diversity and average number of nucleotide differences, were calculated using DNASP v.6 (Rozas *et al.*, 2017), and relationships between the haplotypes for the combined datasets were inferred via a median-joining network (Bandelt, Forster y Röhl, 1999) calculated using PopART (<http://popart.otago.ac.nz>).

4.3.5. RAPD fingerprinting

Ten 10-mer primers were evaluated to screen the isolates for polymorphism (Table 3). Preliminary amplifications were performed with primers 1CR, 1CF, 206, 257 designed by Pažoutová *et al.*, (2000) as well as the primers OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA08, OPE04, OPE14, and OPE18 (Operon Qiagen, Cologne, Germany). OPA04 and 206 were highly polymorphic in isolates from both hosts and were selected for further characterization of the whole set of *Claviceps* strains.

The PCR mixture consisted of 1x Mg-free reaction buffer, 2 mM of Mg^{+2} , 1 U of the Taq DNA Polymerase DNA polymerase (Thermo Scientific, Lithuania), 0.2 mM deoxynucleotides mix, 2 pmol of each primer, and 5-50 ng of DNA in 25 µl of total volume. The PCR reaction conditions were as follows: 1 cycle of 3 min at 95 C, 30 cycles of 30 s at 95 C, 30 s at 38 C and 1 min at 72 C and a final extension of 10 min at 72 C. The PCR products were separated by electrophoresis in 1% agarose gel (Bioron, Germany), stained with GoodView Nucleic Acid Stain (SBS Genetech, Beijing, China) and photographed under UV illumination.

Reactions were run in duplicate, from different DNA extractions and in different thermocyclers: Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) and CG1-96 (Corbett

Research, Mortlake, Australia), to analyze the presence/absence of consistent bands only. A band was considered monomorphic when present in all strains, and polymorphic when absent in at least one strain.

Table 3. Sequence of RAPD primers used in this study

Primer	Sequence 5' -3'
1CR	GCCTTGCGGACGGCAATATC
1CF	TCCTTGATGCATTCGCAACC
206	TCAACAATGTCGGCCTCCGT
257	CGTGATGTCAGTGATGC
OPA02	TGCCGAGCTG
OPA03	AGTCAGCCAC
OPA04	AATCGGGCTG
OPA05	AGGGGTCTTG
OPA08	GTGACGTAGG
OPE04	GTGACATGCC
OPE14	TGCGGCTGAG
OPE18	GGACTGCAGA

4.3.6. Detection of *EAS* and *IDT* cluster genes

The nucleotide sequences of the putative indole-diterpenes biosynthetic gene cluster (GenBank accession numbers JN613321.1) and the ergot alkaloid biosynthetic gene cluster (GenBank accession numbers JN186800.1) of *C. paspali* RRC-1481 were used to design primers for PCR amplification. Five peripheral genes (*easG*, *easO*, *lpsB*, *lpsC*, *easP*) and two core genes (*dmaW* and *easE*) of *EAS* cluster in *C. paspali*, and the 3 peripheral genes (*idtQ*, *idtF*, *idtP*) of the *IDT* cluster (Schardl *et al.*, 2014) were selected to design primers (**Table 4**). PCR amplification products that showed the expected size were randomly chosen for sequencing with the same primers to corroborate the specificity of the amplification with a Blast search in GenBank.

Table 4. Sequence of designed primers for EAs and IDT genes amplification and expected amplicon size.

Primer	Sequence 5' -3'	Amplicon (bp)
dmaW_F	ACGGTCTTCTCGAGCAGGTA	313
dmaW_R	TATGGACGCAGAACAAGCTG	
easG_F	CCATCTTATTGACGGGAGGA	980
easG_R	GCGATCATGTCTGCAATGTC	
lpsC_F	AGGCAAGGCTGAAACTGAAA	493
lpsC_R	AAGGAGGTTCCATTGTGCTG	
lpsB_F	CCACCTCCTCGTAGCTGAAG	316
lpsB_R	CCTTTTCAAGGTGGAGGACA	
easO_F	TCGTAATCCTCCCACCTGTC	463
easO_R	AAACACGCACATTGCTAACG	
easP_F	ACAATGTCAAGACGCACAGG	857
easP_R	TGACCAGTTGCTCAGATTCTG	
idtP_F	ACCCTAATGTCGGAATGTGC	393
idtP_R	GAAGAACGAAGACGCTCACC	
idtQ_F	ATCTCGGCACCAATGATCTC	957
idtQ_R	CGTGTCTATGCCAGGGATT	
idtF_F	GGTTTCGTGGCATTGACTT	594
idtF_R	TGTTTGAGTGCGTTTTCGAG	
2000bp_easE_F	GATCTGTAGCCTGCCTCGTG	2029-2059
2000bp_easE_R	ATCGCCCGAGTTGTTTCTAA	

The PCR mixture consisted of 1x Mg-free reaction buffer, 2 mM of Mg²⁺, 1 U of the Taq DNA Polymerase DNA polymerase (Thermo Scientific, Lithuania), 0.2 mM deoxynucleotides mix, 2 pmol of each primer, and 5-50 ng of DNA in 25 µl of total volume. The PCR reaction conditions were as follows: 1 cycle of 3 min at 95 C, 35 cycles of 30 s at 95 C, 30 s at 58 C and 1 min at 72 C and a final extension of 10 m at 72 C. The *easE* gene of three uruguayan isolates, two from *P. plicatulum* (ILB360 and ILB388), one from *P. dilatatum* (ILB361) where analyzed to exclude the presence of a nonfunctional version of this gene. This gene was amplified and sequenced with primers 2000bp_easE_F and 2000bp_easE_R to obtain 2000 bp long sequences. These sequences were compared with sequence of the pseudogene reported in strain RRC-1481 and the also amplified functional gene of strain DSMZ-833. The pseudogene was called when a 30 bp deletion was found after position 1469.

4.3.7. Genotypic diversity based on RAPD fingerprinting and presence of alkaloid genes

The band pattern generated by the selected RAPD primers (206 and OPA04) and the presence/absence of selected *EAS* and *IDT* genes were used to generate a single presence/absence matrix to be used to analyze similarity between pairs of isolates, using the Jaccard coefficient (Jc). Jaccard coefficient values close to 1.0 indicate high genetic similarity between the strains. In order to graphically represent patterns of genetic divergence, the similarity matrix was analyzed with unweighted pair group method of arithmetic averages (UPGMA) group analysis, using the software Past3 (Hammer *et al.*, 2001).

4.4. RESULTS

4.4.1. Phylogenetic análisis

The *RPB2* sequences analysis involved 32 field-sampled isolates, *C. paspali* DSZM-833, three *C. paspali* sequences from GeneBank, 10 isolates of related *Claviceps* species, and *Epichloë typhina* as outgroup. The alignment comprised 635 characters, of which 135 were parsimony-informative. Kimura 2-parameter with invariant sites (K2+I) was determined to be the most suitable model for ML analysis. For MP analysis, consistency index and retention index were 0.73 and 0.91, respectively. One of the 100 most parsimonious trees is shown (**Fig. 2**). All isolates obtained from *P. dilatatum* grouped with *C. paspali* strain DSMZ-833 and the *C. paspali* sequences obtained from GenBank. In addition, the three isolates from *P. plicatulum* forming two lineages, clustered separately from the *C. paspali* group with high bootstrap support (92%).

In addition to *RPB2*, three other loci were sequenced for the 32 Uruguayan isolates. The phylogeny of each gene was reconstructed to confirm the observed separation of the isolates obtained from *P. plicatulum* (Fig. 3), and the sequences were used to define haplotypes. Sequences were submitted to public databases (**Table 1**). For *RPB2*, 635 characters were analyzed with 10 parsimony-informative characters. MP analysis yielded 100 equally parsimonious trees with a length (L) of 92 (**Fig. 3**). Consistency (CI) and retention (RI) indices were 0.84 and 0.90, respectively. K2 was determined to be the best suitable model for ML analysis for this gene. For 28S, 517 characters were analyzed with seven parsimony-informative characters. MP analysis yielded 100 equally parsimonious trees with L = 22 (**Fig. 3**), CI = 1.00, and RI = 1.00. Jukes-Cantor was determined to be the best suitable model for ML analysis for this gene. For *TUB2*, 238 characters were analyzed with 14 parsimony-informative characters. MP analysis yielded 100 equally parsimonious trees with L = 76 (**Fig. 3**), CI = 0.81, and RI = 0.86. K2+G was determined to be the best suitable model for ML analysis for this gene. For *TEF1*, 293 characters were analyzed with 32 parsimony-informative characters. MP analysis yielded 90 equally parsimonious trees with L = 152 (Fig. 3), CI = 0.56, and RI = 0.74. K2+G was set as the best suitable model for ML analysis for this gene.

Tree topologies based on MP and ML analysis of 28S, *TUB2*, *TEF1*, *RPB2* showed no conflicts in grouping *P. plicatulum* isolates. Each of the individual phylogenies based on MP (**Fig. 3**) and ML analyses resolved the isolates obtained from *P. plicatulum* as different lineages from isolates obtained from *P. dilatatum* with moderate to high bootstrap support (**Fig. 3**). Three of the four tested loci (*RPB2*, *TEF1*, *TUB2*) supported these two new lineages, whereas 28S grouped the three isolates as one single lineage.

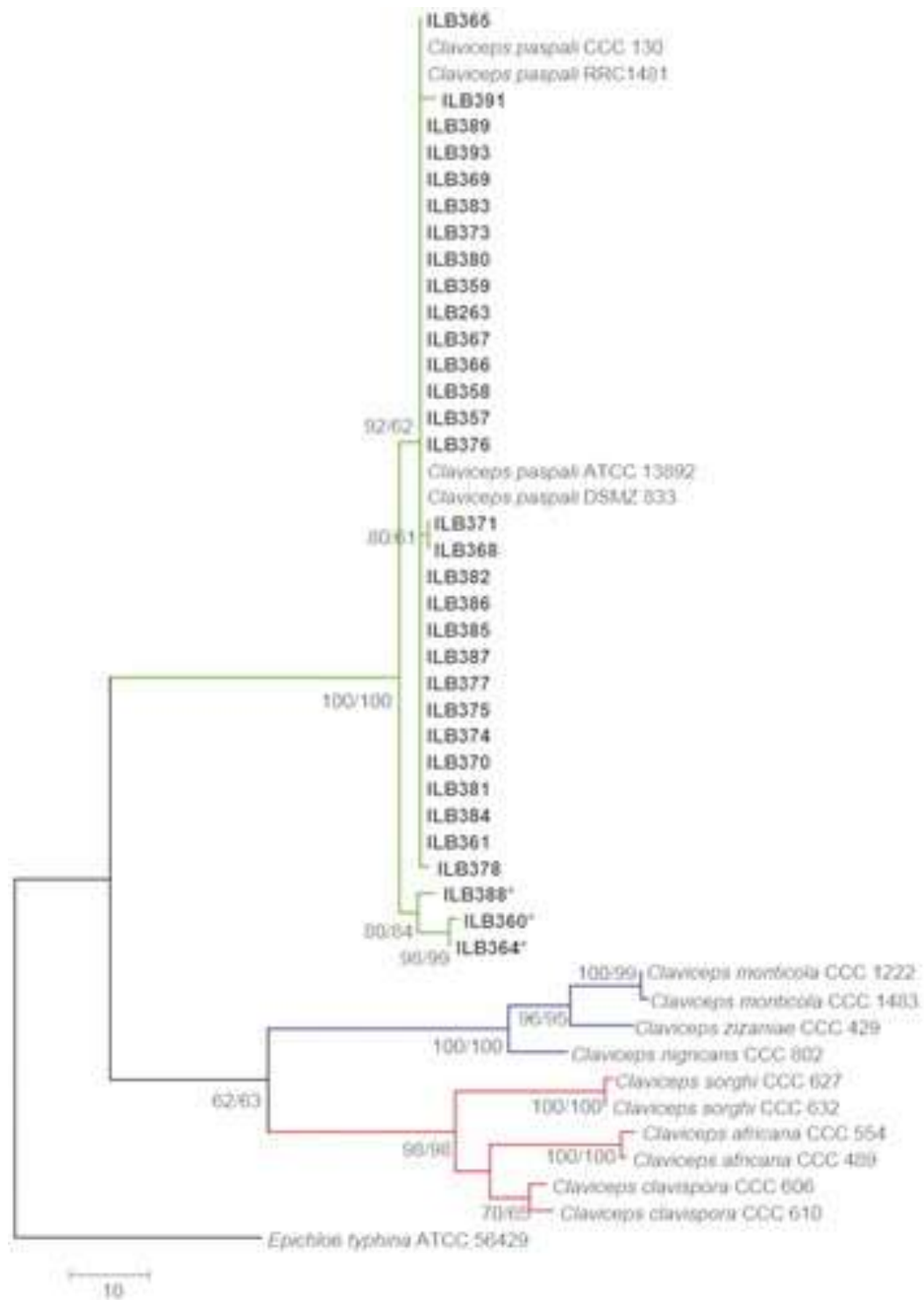


Figure 2. One most parsimonious tree obtained by phylogenetic analysis with MEGA7 of sequences of *RPB2* gene of 32 local isolates of *Claviceps* with *Epichloë typhina* as outgroup. ML/MP bootstrap support values of 60% and above are indicated on nodes based on 1000 replicates. Branch lengths were calculated using the average pathway method. Bar indicates number of changes over the whole sequence. Section *Paspalorum* (green lines). Section *Pusillae* (red lines). Section *Claviceps* (blue lines). In bold, *Claviceps paspali* isolates from this work. Note the separation between *P. plicatulum* isolates (ILB360, ILB364, ILB388) and all other *C. paspali* isolates within section *Paspalorum*. *Isolates from *P. plicatulum*.

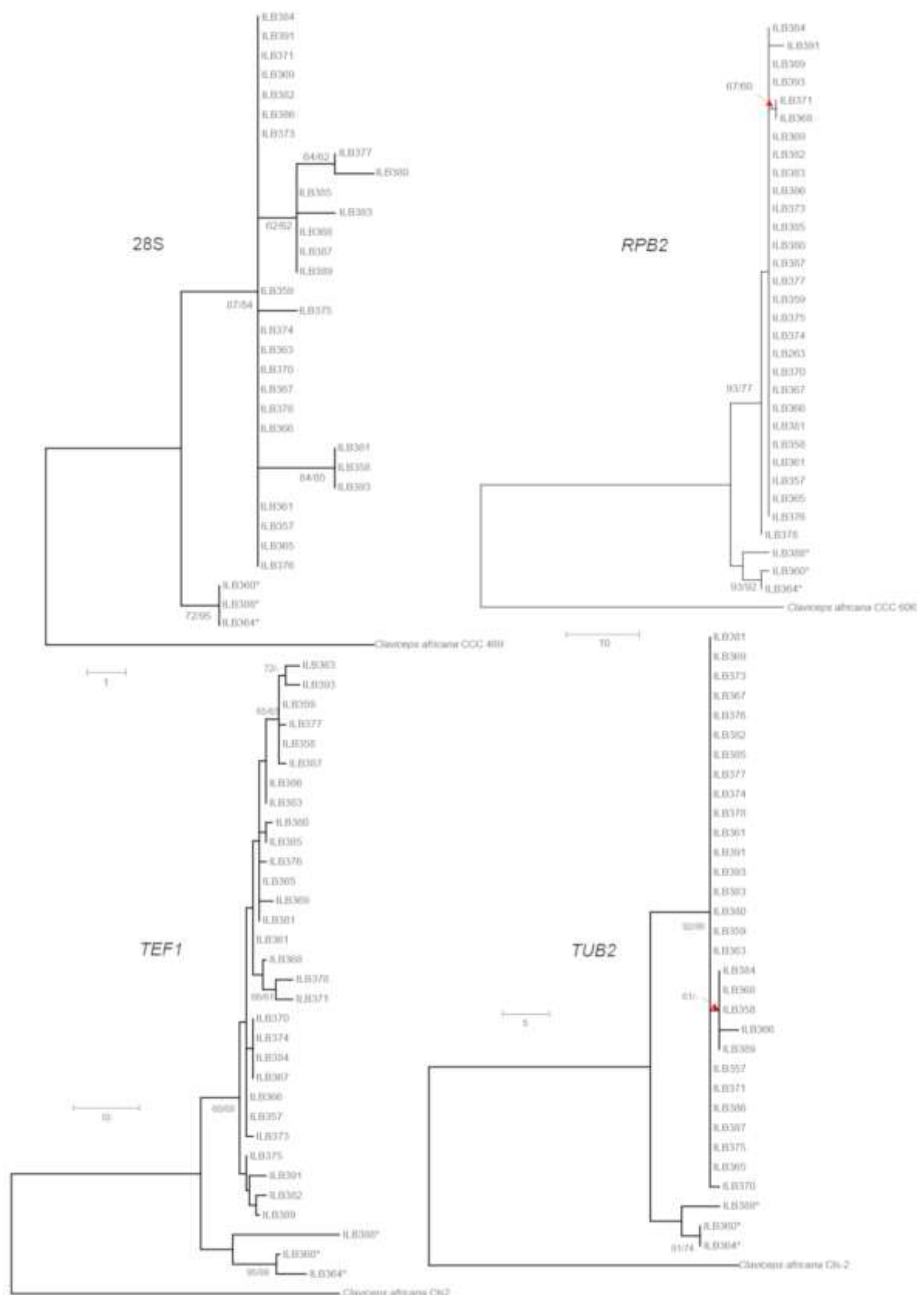


Figure 3. Maximum parsimony analyses of four individual loci (28S, *RPB2*, *TEF1*, *TUB2*) of Uruguayan isolates of *Claviceps paspali* with *Claviceps africana* as outgroup. MP/ML bootstrap support values of 60% and above

are indicated on nodes based on 1000 replicates. GenBank accession numbers: *C. Africana*, 28S = LT216447.1; *RPB2* = LT216566.1; *TEF1* = AF255899.1; *TUB2* = AF263597.1. *Isolates from *P. plicatulum*.

4.4.2. Haplotype analysis

The number of haplotypes per locus varied from 6 to 25 (**Table 5**). The isolates from *P. dilatatum* and *P. plicatulum* did not share any haplotype in any of the four genes, whereas isolates from *P. plicatulum* shared haplotypes in the 28S gene (3) and TUB2 (2). TEF1 was the locus that had more haplotypes and the highest haplotype diversity (25.0 and 0.98, respectively). The haplotype diversity was moderate to high for every locus, ranging from 0.48 to 0.98. In contrast, nucleotide diversity was low, ranging between $\pi = 0.0018$ and $\pi = 0.0027$, indicating only few differences among haplotypes within *C. paspali*. The haplotype network of the four combined genes showed the presence of 31 haplotypes, 28 corresponding to isolates from *P. dilatatum* and 3 from *P. plicatulum*. The three isolates from *P. plicatulum* formed a distinct group, connected to the closest isolate obtained from *P. dilatatum* by one single branch accumulating 36 polymorphic positions (**Fig. 4**). Other associations between haplotype, sampling region, and alkaloid genotype were not evident.

Table 5. Nucleotide polymorphism of the Uruguayan isolates of *Claviceps paspali*.

	Ht	Hd	S	π	k
<i>Tef1</i>	25	0.980	6	0.0335	7.571
<i>RPB2</i>	7	0.393	15	0.00303	1.915
<i>Tub2</i>	6	0.476	18	0.01050	2.296
28S	7	0.635	7	0.00281	1.415

Ht=Haplotype; Hd=Haplotype diversity; S=Segregation sites; π =Nucleotide diversity; k=Average number of nucleotide differences.

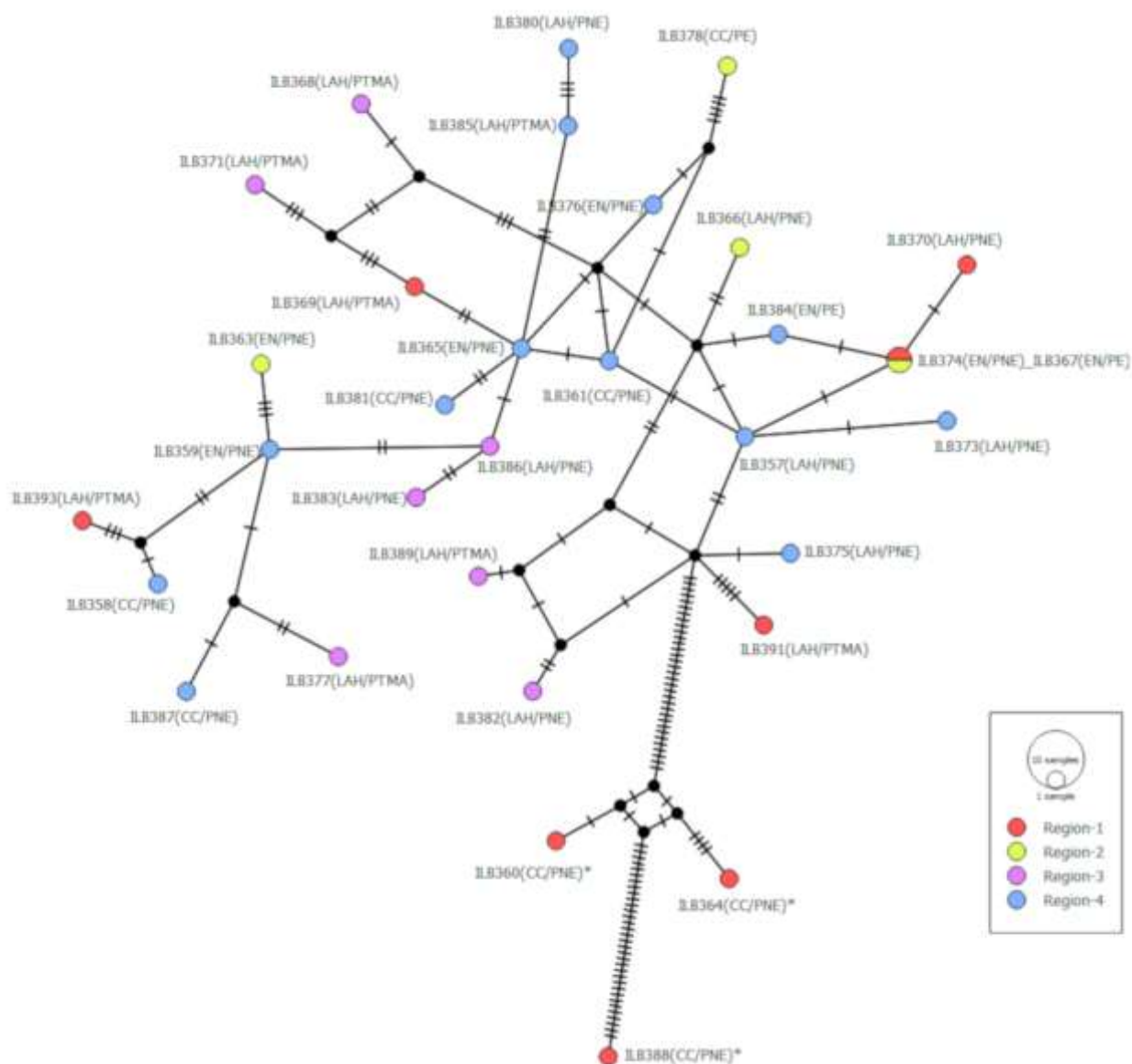


Figure 4. Median-joining network for the strain haplotypes of concatenated data sets of *28S*, *TUB2*, *TEF1*, *RPB2* genes of Uruguayan isolates. Each circle represents a haplotype and circle size is shown proportional to haplotype frequency. Colors indicate the geographic origin of haplotypes. Small black dots represent missing or not sampled haplotypes. Haplotype codes according to those are represented in Table 1. Region 1 = North; Region 2 = North-West; Region 3 = Center; Region 4 = South

4.4.3. RAPD fingerprinting

In total, the 10 primers assayed produced 1 to 15 bands each (**Table 3**). Primers 1CF and OPA02 did not produce visible bands. In total, 75 bands were generated, of which 73 were polymorphic (97%), with an average of 7.5 bands per primer. The banding patterns obtained with primers 206 and OPA04 could differentiate isolates between and within hosts (**Fig. 5**); therefore, these primers were selected. These two primers generated 21 loci in the total population. In isolates from *P. dilatatum*, the number of total amplified loci was 15, with 11 bands that were specific for this group. In total, they produce 57% of polymorphic bands in these isolates. In isolates from *P. plicatulum*, these two primers generated 10 total bands, with 6 that were specific for this group. In total, they produced 33% of polymorphic bands for these isolates (**Table 6**).

Table 6. Number of polymorphic and monomorphic bands and percentage of polymorphism for each positive RAPD primer.

Primer	M	P	P (%)
OPA03	0	10	100
OPA04	0	10	100
OPE04	0	15	100
OPE14	1 (900 pb)	14	93
OPE18	0	1	100
1CR	0	7	100
206	1 (1100 pb)	11	91
257	0	5	100

M= monomorphic band; P=polymorphic band; P (%) = percentage of polymorphic bands (%),

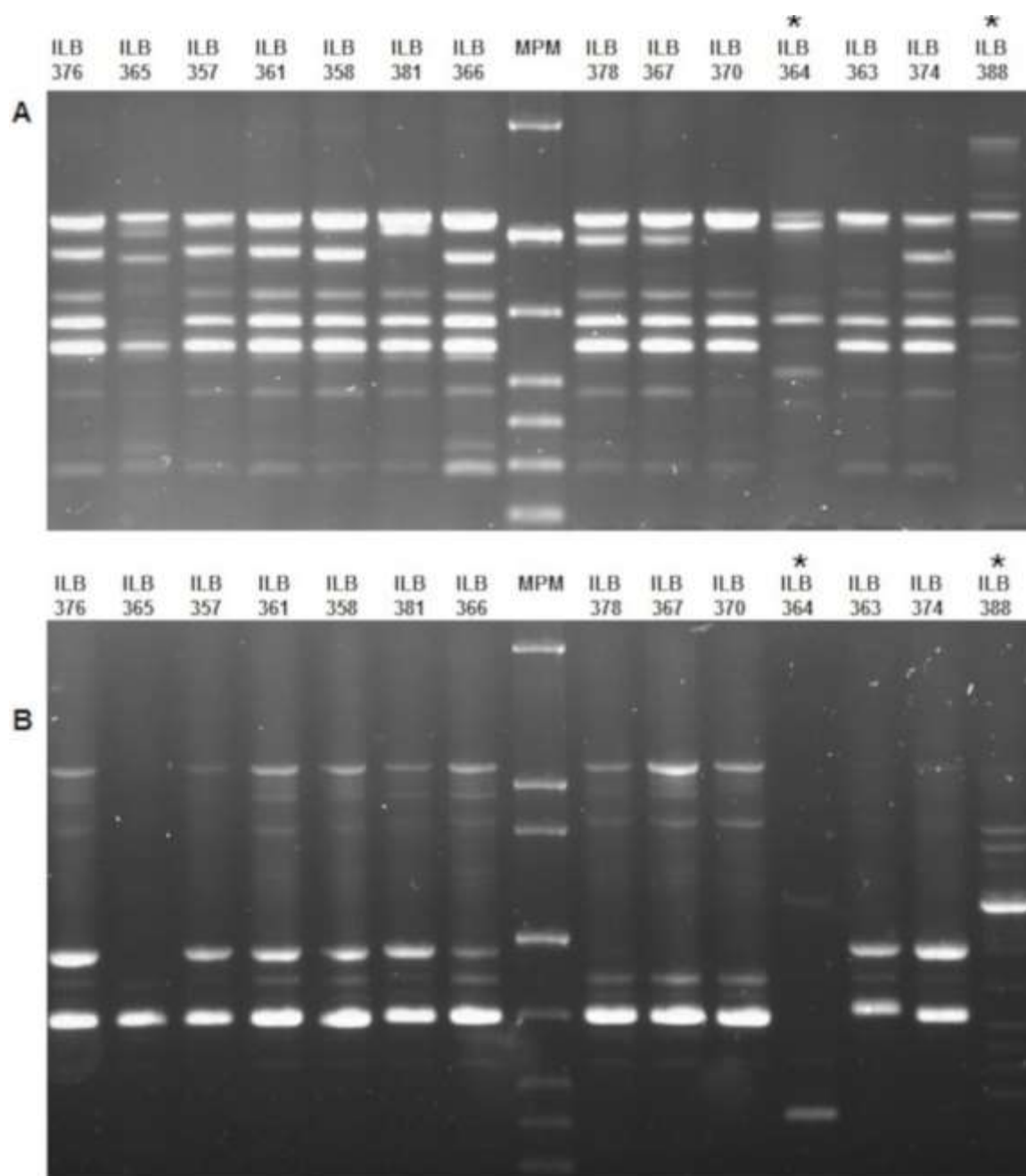


Figure 5. Examples of band patterns obtained with primers 206 and OPA04 in some *C. paspali* isolates. * *P. plicatulum* Isolates

4.4.4. EAS and IDT analysis and potential alkaloid production

Since the biosynthetic functions have been determined for all known *EAS* and *IDT* clusters genes in *Clavicipitaceae* (Gerhards *et al.* [2014](#); Kozák *et al.* [2019](#)), detecting gene presence or absence provides considerable power to predict alkaloid profiles (Robinson and Panaccione [2015](#)).

To address the issue of a possible *easE* pseudogene in the Uruguayan isolates, the analysis of the partial sequences of a functional and a nonfunctional *easE* gene was performed. This showed a deletion of 30 bp and a subsequent frameshift that produced a truncated protein in the nonfunctional gene after position 1469 of RRC-1481. The sequences of the three local isolates from both hosts did not show the 30 bp deletion in the *easE* gene that characterized the pseudogene and were therefore considered as functional (**Fig. 6**).

```
>Claviceps paspali ILB361 easE partial sequence
CCCAGATTGCGAGCCGTCATCGTCTCCGCTGGTCGTCGGAACACGGGCCACGACAATGCGGGACGGTCCGCCGCCCGCATTCTTCC
>Claviceps pasapli DSMZ-833 easE partial sequence
CCCAGATTGCGAGCCGTCATCGTCTCCGCTGGTCGTCGGAACACGGGCCACGACAATGCGGGACGGTCCGCCGCCCGCATTCTTCC
>Claviceps paspali strain RRC-1481
CCCAGATTGCGAGCCGTCATCGTCTCCGCTGGTCGTCGGAACACGGGCCACGACAATGCGGGACGGTCCGCCGCCCGCATTCTTCC
>Claviceps paspali ILB388 easE partial sequence
CCCAGATTGCGAGCCGTCATCGTCTCCGCTGGTCGTCGGAACACGGGCCATGACAATGCGGGACGGTCCGCCGCCCGCATTCTTCC
>Claviceps paspali ILB360 easE partial sequence
CCCAGATTGCGAGCCGTCATCGTCTCCGCTGGTCGTCGGAACACGGGCCATGACAATGCGGGACGGTCCGCCGCCCGCATTCTTCC
```

Figure 6. Analysis of partial sequences of *easE* gene in *C. paspali* isolates. A functional (isolate DSMZ-833) and a nonfunctional *easE* gene (isolate RRC-1481) sequences were compared with three Uruguayan isolates. In black rectangle the missing sequence in non-functional *easE* gene.

After the amplification of the one core and five peripheral genes of the *EAS* cluster and the three peripheral genes of the *IDT* cluster, the results are summarized in **Table 7**. For the analysis of the potential ergot alkaloids and indole-diterpenes, we assumed that all the amplified genes were

functional, and if one of the genes of any step was not present, all the subsequent products after that step were absent.

Table 7. *Claviceps paspali* isolates ordered by sampling region, showing presence/absence of *EAS* and *IDT* cluster genes, hypothetical products, and proposed alkaloid genotypes.

Isolate	Sampling Region	<i>EAs</i>						<i>EAS</i> Genotype	<i>IDT</i>			<i>IDT</i> Genotype
		<i>dmaW</i>	<i>easG</i>	<i>lpsC</i>	<i>lpsB</i>	<i>easO</i>	<i>easP</i>		<i>idtP</i>	<i>idtQ</i>	<i>idtF</i>	
DSMZ-833	Rome, Italy	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	+	PE,PNE,PTMA,PTMB
ILB360*	North	+	-	-	-	+	-	CC	+	+	-	PE,PNE
ILB364*	North	+	-	-	-	+	+	CC	+	+	-	PE,PNE
ILB369	North	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	+	PE,PNE,PTMA,PTMB
ILB370	North	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	-	PE,PNE
ILB374	North	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN	+	+	-	PE,PNE
ILB388*	North	+	-	+	+	+	+	CC	+	+	-	PE,PNE
ILB391	North	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	+	PE,PNE,PTMA,PTMB
ILB393	North	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	+	PE,PNE,PTMA,PTMB
ILB363	North-West	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN	+	+	-	PE,PNE
ILB366	North-West	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	-	PE,PNE
ILB367	North-West	+	+	+	+	+	-	CC,AC,EC,PA,EN	+	-	-	PE
ILB378	North-West	+	-	+	+	+	-	CC	+	-	-	PE
ILB368	Center	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	+	PE,PNE,PTMA,PTMB
ILB371	Center	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	+	PE,PNE,PTMA,PTMB
ILB377	Center	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	+	PE,PNE,PTMA,PTMB
ILB382	Center	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	-	PE,PNE
ILB383	Center	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	-	PE,PNE
ILB386	Center	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	-	PE,PNE
ILB389	Center	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	+	PE,PNE,PTMA,PTMB
ILB357	South	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	-	PE,PNE
ILB358	South	+	-	+	+	-	+	CC	+	+	-	PE,PNE
ILB359	South	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN	+	+	-	PE,PNE
ILB361	South	+	-	+	+	-	+	CC	+	+	-	PE,PNE
ILB365	South	+	+	+	+	+	-	CC,AC,EC,PA,EN	+	+	-	PE,PNE
ILB373	South	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	-	PE,PNE
ILB375	South	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	-	PE,PNE
ILB376	South	+	+	+	+	+	-	CC,AC,EC,PA,EN	+	+	-	PE,PNE
ILB380	South	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	-	PE,PNE
ILB381	South	+	-	+	+	+	+	CC	+	+	-	PE,PNE
ILB384	South	+	+	+	+	+	-	CC,AC,EC,PA,EN	+	-	-	PE
ILB385	South	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	+	PE,PNE,PTMA,PTMB
ILB387	South	+	+	+	+	+	+	CC,AC,EC,PA,EN,LAH	+	+	-	PE,PNE

CC=chanoclavine-I; AC=Agroclavine; EC=Elymoclavine; LA=D-Lysergic Acid; EN=Ergonovine; LAH=Lysergic Acid α -hydroxyethylamide;

PE=Paspaline; PNE=Paspalinine; PTMA=Paspalitrem A; PTMB=Paspalitrem B.

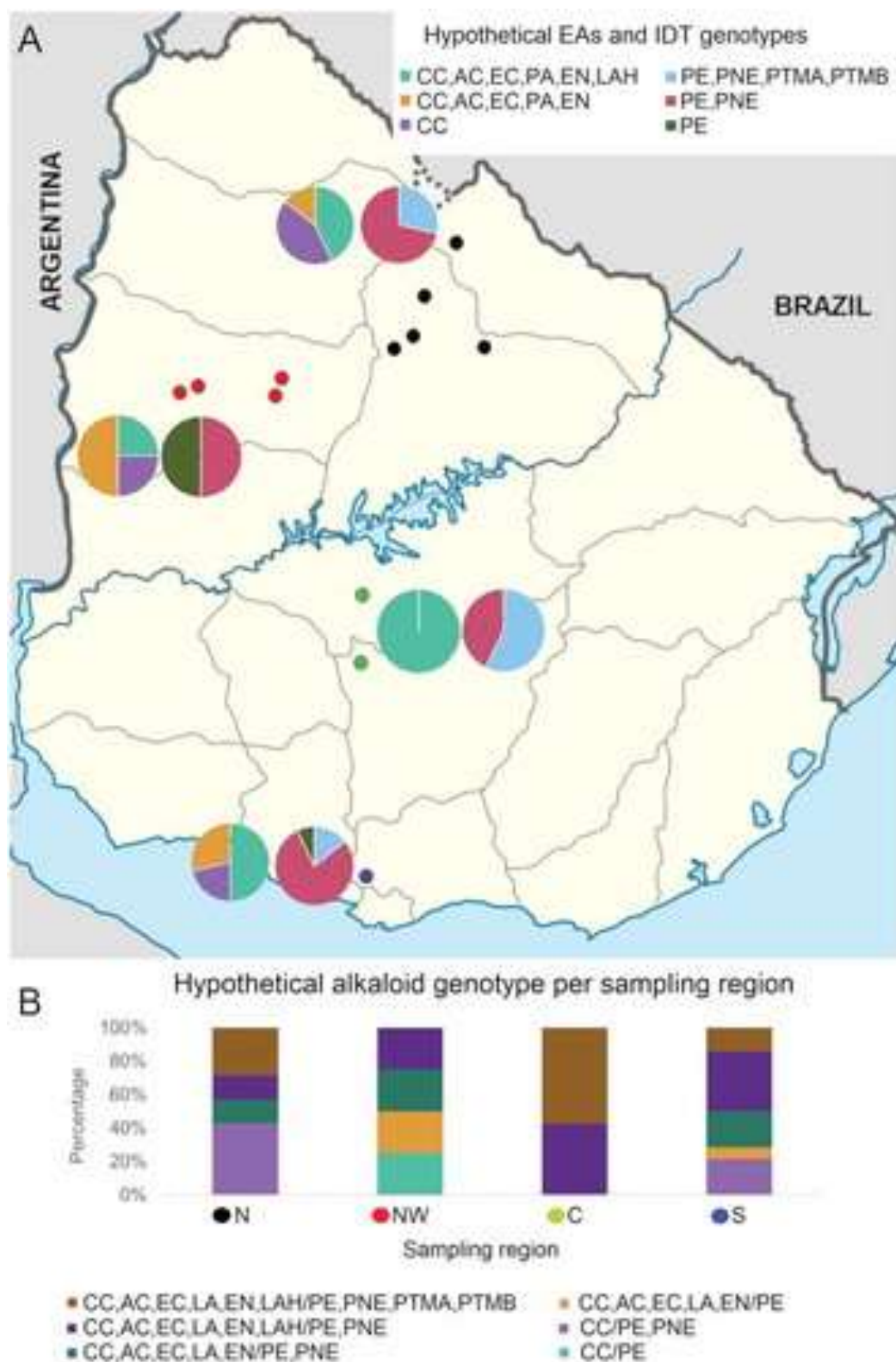


Figure 7. A. Sampled regions in Uruguay and detected *EAS* and *IDT* genotypes. North region (black dots). Northwest region (red dots). Central region (green dots). South region (blue dots). Pie charts representing *EAS* (left) and *IDT* (right) genotypes diversity. B. Total alkaloid genotype per sampled region. N = north region; NW = northwest region; C = central region; S = south region.

4.4.5. Diversity based on RAPD and presence/absence of *EAS* and *IDT* genes

A genetic similarity matrix was built with presence/absence data of RAPD bands obtained with primers 206 and OPA04 and presence/absence of *EAS* and *IDT* genes, and a dendrogram was generated by UPGMA (**Fig. 8**). The Jc for the 32 Uruguayan isolates varied from 0.15 to 1.00 with an average of 0.67 (average genetic similarity). The lowest similarity value was between strains ILB360/ILB358 and ILB360/ILB384, whereas the highest similarity value was between ILB369/ILB368 and ILB371/ILB389, which appeared to be the same genotype (**Fig. 8**).

Comparison and classification of data using the Jc and the UPGMA clustering method generated three robust groups at 60% similarity level among the 33 isolates, including the reference strain DSMZ-833 (**Fig. 5**). We described three major genetic groups (I to III). Groups I and II formed by isolates from *P. plicatulum* were placed on a branch clearly separated from group III. This group comprised isolates from *P. dilatatum* and reference strain DSMZ-833 from *P. distichum*. Group I comprised two isolates from *P. plicatulum*, group II contained one isolate also from this host, and group III was the largest, with 30 isolates representing 28 genotypes. Within group III, the relationship between the subgenetic groups remained unresolved due to bootstrap values below 50% (**Fig. 8**).

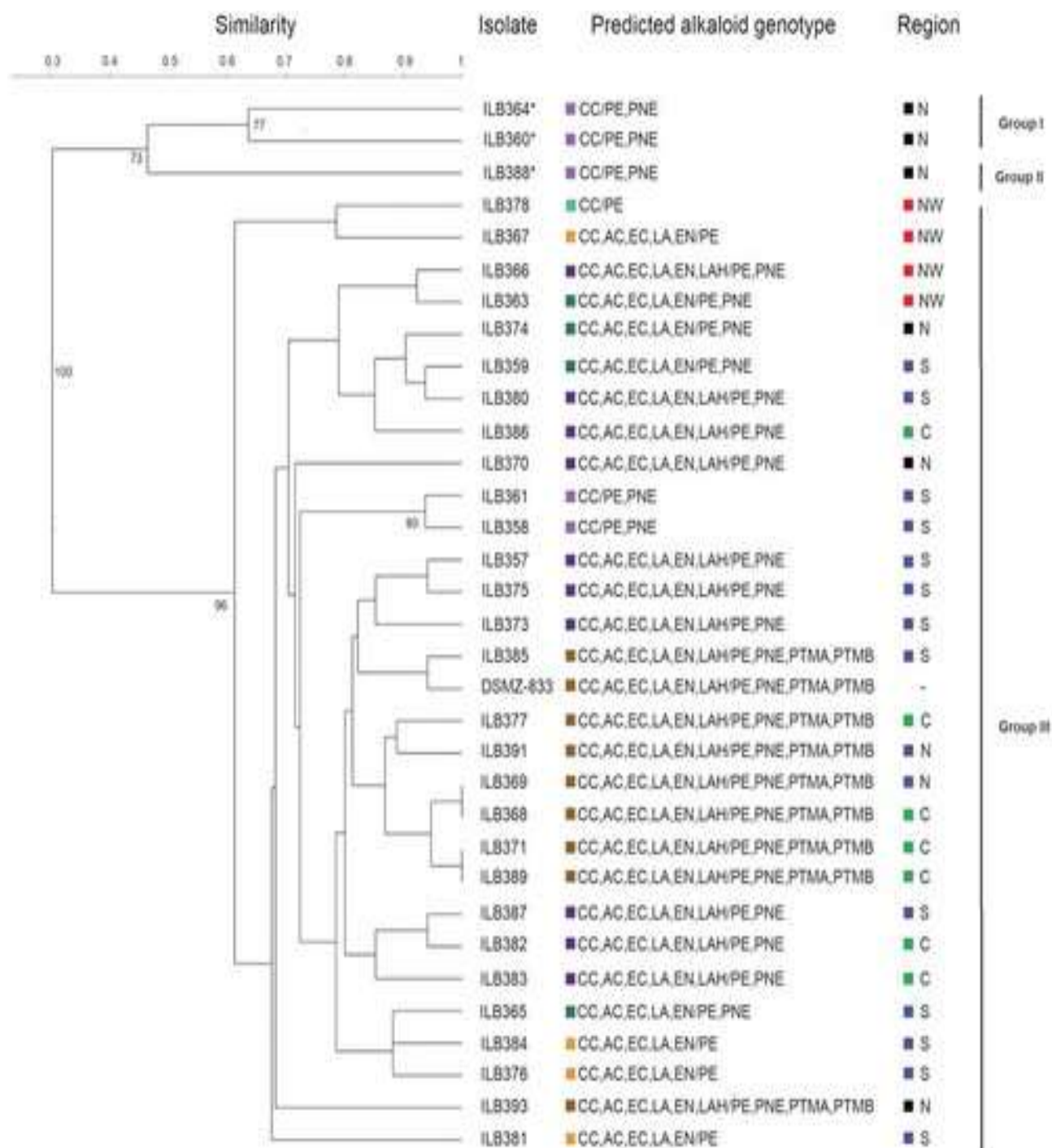


Figure 8. Dendrogram showing similarity among 29 *Claviceps paspali* isolates from *Paspalum dilatatum*, strain DSMZ-833, and 3 isolates from *P. plicatulum* based on 30 loci (21 from RAPD analysis and 9 from alkaloid genes analysis) using Jaccard coefficient and the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) algorithm with PAST3 program. Bootstrap support is shown only where values >70%. *Isolates from *P. plicatulum*. N = north region; NW = northwest region; C = central region; S = south region. CC = chanoclavine I; AC = agroclavine; EC = elymoclavine; LA = D-lysergic acid; EN = ergonovine; LAH = lysergic acid α -hydroxyethylamide; PE = *paspaline*; PNE = *paspalinine*; PTMA = *paspalitrem A*; PTMB = *paspalitrem B*.

4.5. DISCUSSION

In this work, we have addressed the diversity of the ergot fungi affecting *P. dilatatum* and *P. plicatulum* in Uruguay and their potential for alkaloid production. This information is essential to understand the ecology of these fungi, their potential damage to cattle, and to include resistance to *Claviceps* in breeding programs of *P. dilatatum* and *P. plicatulum*.

Phylogenetic analysis based on *RPB2* confirmed that *C. paspali* (and not *C. clavispora*) was the species associated with the ergot symptoms in these grasses. All the isolates could be assigned to section *Paspalorum*, separated from sections *Pusillae* and *Claviceps*. Isolates obtained from *P. dilatatum* grouped with the reference strain DSMZ-833 and others *C. paspali* sequences retrieved from GenBank whereas isolates obtained from *P. plicatulum* formed a highly supported separated clade. Since section *Paspalorum* comprises only *C. paspali* (Píchová *et al.*, 2018), the position of the *Claviceps* isolates from *P. plicatulum* suggests that they could be considered an ecological subspecies or specialized variants adapted to colonize other *Paspalum* species such as *P. plicatulum*. This situation could mirror the speciation process recently described for *C. purpurea* cryptic species (Douhan *et al.*, 2008; Pažoutová *et al.*, 2015). The remarkable separation of the three isolates obtained from *P. plicatulum* from those obtained from *P. dilatatum* was confirmed by the four single gene phylogenetic analyses, by RAPD fingerprinting combined with presence of *EAS* and *IDT* genes, and the observation that no sequence-based haplotype was shared, for any locus, among isolates from both grasses.

Hitchcock (1950) and Langdon, (1952), and more recently Píchová *et al.*, (2018) proposed that *C. paspali* originates from South America. The high gene and genotypic diversity found in this study in section *Paspalorum*, could be due to the North and South American origin of *Paspalum* spp. and *Claviceps* spp. and the occurrence of sexual reproduction (Luttrell, 1977). Similarly, *C. purpurea* has been considered a panmictic population (Miedaner y Geiger, 2015), with sexual reproduction at the beginning of the season explaining the diversity of genotypes. The genotypic similarity between the reference strain DSMZ-833, which originated from a different grass species in Rome, and the isolates obtained from *P. dilatatum* in this study suggest that the Italian isolate is related to the most abundant genotypes in this area.

One of the most problematic issues of livestock grazing *C. paspali* infected *Paspalum* is *Paspalum* staggers (Kozák *et al.*, 2018). Similar to studies performed for *Epichloë* species, (Charlton *et al.*, 2014; Shymanovich *et al.*, 2014; Takach y Young, 2014) we have defined the potential for alkaloid production in our collection of *Claviceps paspali*. Interestingly, the potential

alkaloid profile obtained for reference strain DSZM-833 matched the alkaloids actually produced by this strain (Kozák *et al.*, 2018), and the *easE* sequence of this strain matched the sequence of isolates from *P. dilatatum* and *P. plicatulum*, ruling out the presence of a pseudogene in these representative strains. Therefore, although some potential alkaloids might not be produced due to mutations within the genes coding for the enzymes involved in their biosynthesis (Schardl *et al.* 2013a), these verifications suggest that the primers designed in this study are useful to amplify the selected *EAS* and *IDT* gene. Therefore, the designed primers can be used to define potential alkaloid genotypes in this species. However, this would need to be verified by alkaloid quantification (liquid chromatography-tandem mass spectrometry or HPLC) to rule out the presence of other non-functional genes additional to the *easE* pseudogene (Schardl *et al.* 2013a).

The most abundant alkaloid genotypes were predicted to produce 5 to 6 ergot alkaloids and 2 to 4 indole-diterpens (56% of isolates) and were present in the four sampled regions. Of the 32 Uruguayan isolates, only three -from north-west and south regions- lacked the gene content needed to produce tremorgenic indole-diterpene (PNE, PTMA and PTMB), and could then be expected to be less toxic to cattle. To our knowledge, this is the first report of *C. paspali* isolates lacking genes needed for *Paspalum* staggers production. Some isolates, such as ILB384, were obtained from a location where other isolates could potentially produce the alkaloids causing staggers, which highlights the diversity in alkaloid profiles already described for other *Claviceps* species (Schardl *et al.*, 2013a; Young *et al.*, 2015). Even though isolates from *P. plicatulum* shared one single alkaloid genotype, this was also present in 3 isolates from *P. dilatatum*. Altogether, there was no clear association between alkaloid genotypes and RAPDS or phylogenetic groups or haplotypes or location.

Although it has been reported that in almost all cases of *EAS* and *IDT* gene loss, all genes are lost or inactivated for that branch of the pathway (Schardl *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2015), we found that for the studied *C. paspali* isolates some *EAS* cluster genes for late pathway steps were retained. For instance, isolates ILB381 and ILB388 retain *lpsB*, *lpsC*, *easO* and *easP* genes of the mid and late steps of the pathway despite missing early step *easG* gene. This could indicate that *C. paspali* *EAS* gene cluster is unstable, and subjected to partial elimination, as described for *Epichloë* (Schardl *et al.*, 2013b). This was not observed for *IDT* genes, when loss of an early step gene (*idtP*) was accompanied by a loss of late steps genes (*idtQ* and *idtF*).

Even though the morphology, alkaloid metabolism and the biological cycle of *C. paspali* had been studied, little was known about the intraspecific genetic variation of this species, its potential alkaloids profiles, and whether host specialization existed. In this study, we have used phylogenetic analyses and molecular typing methods to reveal diversity among *C. paspali* isolates

from two host species. The presence of different lineages of *C. paspali* in *P. dilatatum* and *P. plicatulum* could be confirmed by two different methods, one based on sequence analysis of four genes, and a second method based on presence/absence of loci, including a set of genes involved in alkaloid production. Within these lineages, high diversity was also observed, but without associations between potential alkaloids profiles and specific genotypes. Further studies are still necessary to settle whether isolates obtained from *P. plicatulum* and *P. dilatatum* are effectively different species showing specific host association within section *Paspalorum*. Genomic data and secondary metabolite analysis with suitable techniques (MS-MS or HPLC) will be needed to prove the presence and functionality of detected *EAS* and *IDT* genes.

4.6. BIBLIOGRAPHY

- Aguilera, P. M. *et al.* (2011) 'Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: sexual *Paspalum plicatulum* and apomictic *P. guenoarum*', *Crop Science*, 51(4), pp. 1544–1550. doi: 10.2135/cropsci2010.10.0610.
- Aguileta, G. *et al.* (2008) 'Assessing the performance of single-copy genes for recovering robust phylogenies.', *Systematic biology*, 57(4), pp. 613–627. doi: 10.1080/10635150802306527.
- Alderman, S. C., Halse, R. R. and White, J. F. (2004) 'A reevaluation of the host range and geographical distribution of *Claviceps* species in the United States', *Plant Disease*, 88(1), pp. 63–81. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.1.63.
- Bandelt, H., Forster, P. y Röhl, A. (1999) 'Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies', in *Molecular Biology and Evolution* 16:37–48. doi: 10.7882/FS.2004.039.
- Carbone, I. and Kohn, L. M. (1999) 'A Method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes', *Mycologia*, 91(3), pp. 553–556.
- Cawdell-Smith, A. J., Scrivener, C. J. and Bryden, W. L. (2010) 'Staggers in horses grazing *Paspalum* infected with *Claviceps paspali*', *Australian Veterinary Journal*, 88(10), pp. 393–395.

doi: 10.1111/j.1751-0813.2010.00624.x.

Chain, E. B., Bonino, C. y Tonolo, A. (1962) 'Process for the production of alkaloid derivatives of lysergic acid'. United States. doi: 10.13189/cme.2016.040202.

Charlton, N. D. *et al.* (2014) 'Interspecific hybridization and bioactive alkaloid variation increases diversity in endophytic *Epichloë* species of *Bromus laevipes*', *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), pp. 276–289. doi: 10.1111/1574-6941.12393.

Cole, R. J. *et al.* (1977) '*Paspalum* Staggers: isolation and identification of tremorgenic metabolites from sclerotia of *Claviceps paspali*', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(5), pp. 1197–1201. doi: 10.1021/jf60213a061.

Coufal-Majewski, S. *et al.* (2016) 'Impacts of cereal ergot in food animal production', *Frontiers in Veterinary Science*, 3(February). doi: 10.3389/fvets.2016.00015.

Couso, L. L. *et al.* (2010) 'Are more productive varieties of *Paspalum dilatatum* less tolerant to drought ? Are more productive varieties of *Paspalum dilatatum* less tolerant to drought ?', *Grass and Forage Science*, 65, pp. 296–303. doi: 10.1111/j.1365-2494.2010.00748.x.

Douhan, G. W. *et al.* (2008) 'Multigene analysis suggests ecological speciation in the fungal pathogen *Claviceps purpurea*', *Molecular Ecology*, 17(9), pp. 2276–2286. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03753.x.

Evans, T. J. y Gupta, R. C. (2018) *Tremorgenic Mycotoxins*. Third Edit, *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition*. Third Edit. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-811410-0.00074-X.

Felsenstein, J. (1985) 'Phylogenies and the comparative method', *The American Naturalist*, 125(1), pp. 1–15. doi: 10.1086/284325.

Fisher, A. J., Gordon, T. K. and Ditomaso, J. M. (2005) 'Geographic distribution and diversity in *Claviceps purpurea* from salt marsh habitats and characterization of Pacific coast populations', *Mycological Research*, 109(4), pp. 439–446. doi: 10.1017/S0953756205002467.

Gilmore, B. S. *et al.* (2016) 'Simple sequence repeat markers that identify *Claviceps* species and strains', *Fungal Biology and Biotechnology*. BioMed Central, 3(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s40694-016-0019-5.

- Glass, N. L. y Donaldson, G. C. (1995) 'Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes', *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), pp. 1323–1330.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. and Ryan, P. D. (2001) 'PAST: Paleontological Statistics Software Package', *Palaeontologia Electronica*, 4(1), p. 9. doi: 10.1016/j.bcp.2008.05.025.
- Hitchcock, A. S. (1950) *Manual of grasses of the United States*. Ed. 2.
- Irzykowska, L., Weber, Z. y Bocianowski, J. (2012) 'Comparison of *Claviceps purpurea* populations originated from experimental plots or fields of rye', *Central European Journal of Biology*, 7(5), pp. 839–849. doi: 10.2478/s11535-012-0075-7.
- Jungehulsing, U. y Tudzynski, P. (1997) 'Analysis of genetic diversity in *Claviceps purpurea* by RAPD markers', *Mycological Research*, 101(1), pp. 1–6.
- Kozák, L. *et al.* (2018) 'Inactivation of the indole-diterpene biosynthetic gene cluster of *Claviceps paspali* by *Agrobacterium*-mediated gene replacement', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), pp. 3255–3266. doi: 10.1007/s00253-018-8807-x.
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. (2016) 'MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7 . 0 for bigger datasets Brief communication', *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Langdon, R. F. N. (1952) *Studies on ergot*. University of Queensland, Australia.
- Luttrell, E. S. (1977) 'The disease cycle and fungus-host relationships in dallisgrass ergot', *Phytopathology*, 67, pp. 1461–1468.
- Miedaner, T. y Geiger, H. H. (2015) 'Biology, genetics, and management of ergot (*Claviceps* spp.) in rye, sorghum, and pearl millet', *Toxins*, 7(3), pp. 659–678. doi: 10.3390/toxins7030659.
- Minghetti, A. and Crespi-Perellino, N. (2005) 'The History of Ergot', in Kren, V. and Cvak, L. (eds) *Ergot the Genus Claviceps*. Hardwood Academic Publisher, pp. 1–447.
- Novo, P. E. *et al.* (2016) 'Interspecific hybrids between *Paspalum plicatulum* and *P. oteroi*: a key tool for forage breeding', *Scientia Agricola*, 73(4), pp. 356–362. doi: 10.1590/0103-9016-2015-0218.
- Pažoutová, S. *et al.* (2000) 'Chemoraces and habitat specialization of *Claviceps purpurea*

- populations', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), pp. 5419–5425. doi: 10.1128/AEM.66.12.5419-5425.2000.
- Pažoutová, S. (2001) 'The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*', *Mycological Research*, 105(3), pp. 275–283.
- Pažoutová, S. *et al.* (2002) 'Specialised population of *Claviceps purpurea* from salt marsh *Spartina* species', *Mycological Research*, 106(2), pp. 210–214. doi: 10.1017/S095375620100538X.
- Pažoutová, S. *et al.* (2011a) 'New *Claviceps* species from warm-season grasses', *Fungal Diversity*, 49(July), pp. 145–165. doi: 10.1007/s13225-011-0102-4.
- Pažoutová, S. *et al.* (2011b) 'New *Claviceps* species from warm-season grasses', *Fungal Diversity*, 49, pp. 145–165. doi: 10.1007/s13225-011-0102-4.
- Pažoutová, S. *et al.* (2015) 'Delimitation of cryptic species inside *Claviceps purpurea*', *Fungal Biology*, 119(1), pp. 7–26. doi: 10.1016/j.funbio.2014.10.003.
- Pezzopane, C. de G. *et al.* (2017) 'Evaluation and strategies of tolerance to water stress in *Paspalum* germplasm', *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 5(3), p. 153. doi: 10.17138/TGFT(5)153-162.
- Píchová, K. *et al.* (2018) 'Evolutionary history of ergot with a new infrageneric classification (*Hypocreales: Clavicipitaceae: Claviceps*)', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 123(February), pp. 73–87. doi: 10.1016/j.ympev.2018.02.013.
- Pizarro, E. A. (2002) 'Potencial forrajero del género *Paspalum*', *Pasturas Tropicales*, 22(1), pp. 38–46.
- Research, M. P. *et al.* (1997) 'Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), pp. 103–116.
- Rozas, J. *et al.* (2017) 'DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism analysis of large data sets', *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), pp. 3299–3302. doi: 10.1093/molbev/msx248.
- Schardl, Christopher L. *et al.* (2013a) 'Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: Multi-genome analysis of the Clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci', *PLoS Genetics*, 9(2). doi: 10.1371/journal.pgen.1003323.
- Schardl, Christopher L *et al.* (2013b) 'The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with

- grasses', *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4), pp. 480–488. doi: 10.1016/j.pbi.2013.06.012.
- Schardl, C. L. *et al.* (2014) 'Genomes of plant-associated Clavicipitaceae', in Martin, F. (ed.) *Advances in Botanical Research*. 1st edn. London: Elsevier Ltd., pp. 291–327. doi: 10.1016/B978-0-12-397940-7.00010-0.
- Schrauf, G. E. *et al.* (2003) 'Ergot resistance in plants of *Paspalum dilatatum* incorporated by hybridisation with *Paspalum urvillei*', *Tropical Grasslands*, 37(1), pp. 182–186.
- Shymanovich, T. *et al.* (2014) 'Alkaloid variation among Epichloid endophytes of sleepygrass (*Achnatherum robustum*) and consequences for resistance to insect herbivores', *Journal of Chemical Ecology*, 41(1), pp. 93–104. doi: 10.1007/s10886-014-0534-x.
- Spatafora, J. W. *et al.* (2007) 'Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes', *Molecular Ecology*, 16, pp. 1701–1711. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03225.x.
- Stevens, F. L. y Hall, F. G. (1910) 'Three interesting species of *Claviceps*', *Bot.* 622, 50, pp. 460–463.
- Takach, J. E. y Young, C. A. (2014) 'Alkaloid genotype diversity of tall fescue endophytes', *Crop Science*, 54(2), pp. 667–678. doi: 10.2135/cropsci2013.06.0423.
- Tenberge, K. B. (1999) 'Biology and life strategy of the ergot fungi', *Medicinal & Aromatic Plants - Industrial Profiles*. Amsterdam: Hardwood Academic Publisher, pp. 25–56. doi: 10.1201/9780203304198.ch2.
- Tooley, P. W. *et al.* (2001) 'Characterization of *Claviceps* species pathogenic on Sorghum by sequence analysis of the β -tubulin gene intron 3 region and EF-1 α gene intron 4', *Mycologia*, 93(3), pp. 541–551.
- Uhlig, S. *et al.* (2009) 'Indole-diterpenes and ergot alkaloids in *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) infected with *Claviceps cynodontis* from an outbreak of tremors in cattle', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(23), pp. 11112–11119. doi: 10.1021/jf902208w.
- Vilgalys, R. and Sun, B. A. O. L. I. N. (1994) 'Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(May), pp. 4599–4603.

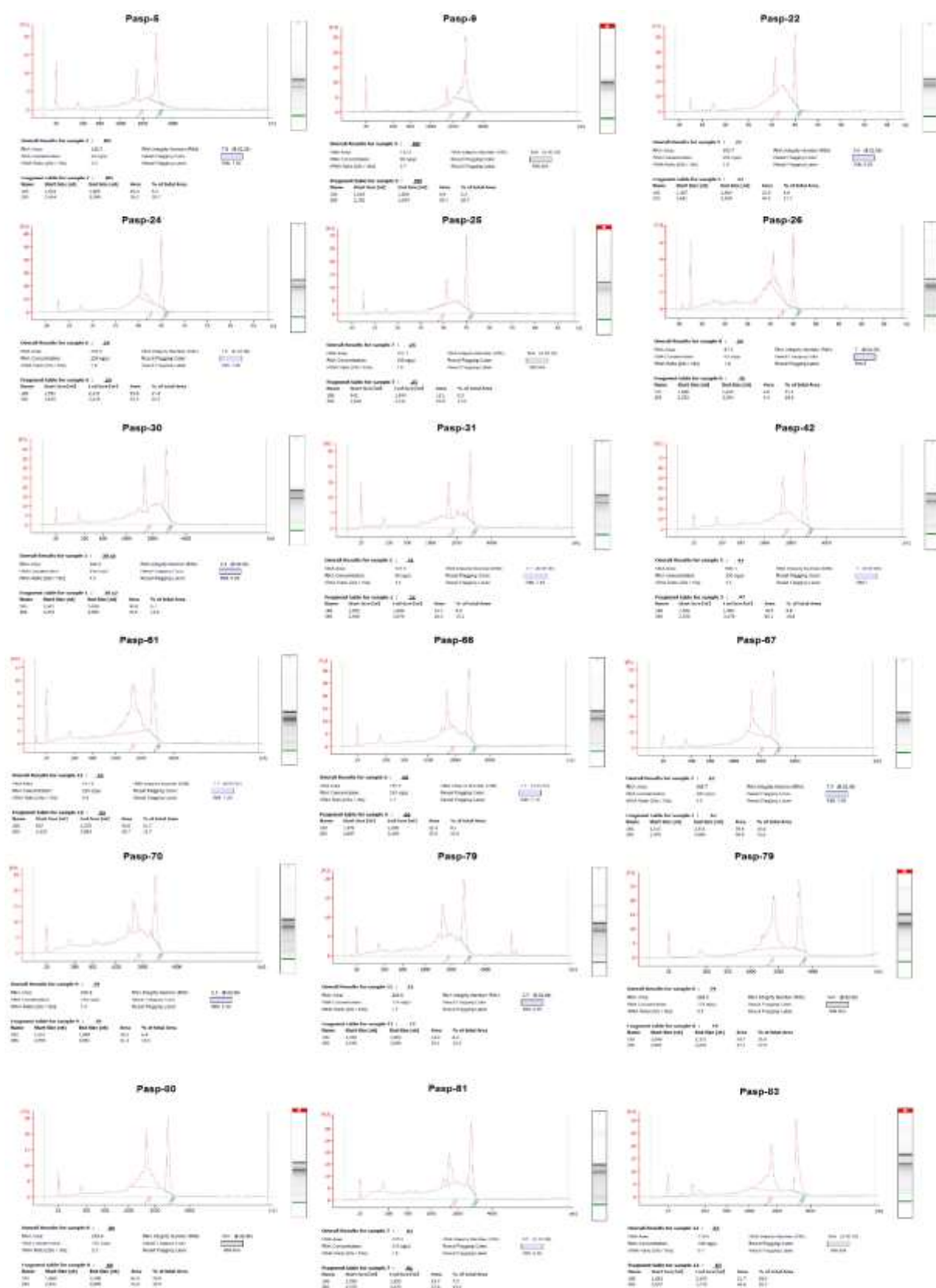
Young, C. A. *et al.* (2015) 'Genetics, genomics and evolution of ergot alkaloid diversity', *Toxins*, 7(4), pp. 1273–1302. doi: 10.3390/toxins7041273.

5. ANEXOS

ANEXO 1. Tabla con secuencia and nombre de primer para cada gen de *C. paspali* utilizado en la RT-qPCR

Primer	Secuencia 3'-5'
Tef_cpasp_F1	GGCTCGTTACCAGGAAATCA
Tef_Cpasp_R1	ACCGTTGAAACCAGAGATGG
Act_cpasp_F1	TGCCAATCTACGAGGGTTTC
Act_cpasp_R1	CTCGGCAGTGGTAGAGAAGG
GPDH_cpasp_F1	CGTCTCCGTTGTTGACTTGA
GPDH_cpasp_R1	TTCATGTCGCTGGACACAAT
GPDH_cpasp_F1	CGTCTCCGTTGTTGACTTGA
GPDH_cpasp_R1	TTCATGTCGCTGGACACAAT
00970_cpasp_F1	TCCATCTCCGAGAGCAAAC
00970_cpasp_R1	ACAGCGACGTTAAGCAGGAT
04144_cpasp_F1	AATTGGGGCTCTTCTGTGTG
04144_cpasp_R1	CATGCGCTGATGAGAAAAGA
06721_cpasp_F1	CTTGGGGAGAATGCAGAGAG
06721_cpasp_R1	AAAGAACAAGATGCCGGATG

ANEXO 2. Electroferogramas de cada muestra enviada a secuenciar obtenidos mediante Bioanalyzer 2100



ANEXO 3. Tabla con la ID, tamaño de secuencia and el match en el nr NCBI de las proteínas identificadas como efectoras por al menos una de las condiciones establecidas

ID gen	Tamaño (aa)	Best BLASTp hit nr NCBI
gene_00541.t1	121	T9SS type A sorting domain-containing protein
gene_00656.t1	122	uncharacterized protein CPUR_02993
gene_02019.t1	98	extracellular protein 9-7
gene_03436.t1	120	hypothetical protein E2P81_ATG02511
gene_05345.t1	110	uncharacterized protein CPUR_03607
gene_00655.t1	125	hypothetical protein CNYM01_07663
gene_02934.t1	125	hypothetical protein E6O75_ATG10224
gene_03952.t1	91	uncharacterized protein CPUR_05493
gene_03437.t1	122	putative amidase
gene_03934.t1	95	uncharacterized protein CPUR_03424
gene_05269.t1	103	extracellular protein 9-1
gene_06598.t1	122	uncharacterized protein CPUR_01353
gene_00072.t1	55	GPI anchored serine-threonine rich protein
gene_00834.t1	122	hypothetical protein BFJ70_g17299
gene_01055.t1	89	uncharacterized protein CPUR_01529
gene_06721.t1	155	major allergen alt
gene_01098.t1	115	uncharacterized protein CPUR_03058
gene_03261.t1	51	hypothetical protein CEP54_012495
gene_04213.t1	115	hypothetical protein BFJ70_g17299
gene_00731.t1	107	hypothetical protein FPSE_08081
gene_06718.t1	153	uncharacterized protein CPUR_06302
gene_01095.t1	115	uncharacterized protein CPUR_03439
gene_01093.t1	115	uncharacterized protein CPUR_03439
gene_01337.t1	135	major allergen alt
gene_01417.t1	149	hypothetical protein PFICI_13814
gene_01096.t1	167	Uncharacterized protein
gene_02541.t1	97	hypothetical protein VHEMI10714
gene_02598.t1	85	LysM domain-containing protein
gene_01265.t1	76	Uncharacterized protein
gene_00543.t1	119	uncharacterized protein CPUR_02104
gene_03646.t1	96	hydrophobin 5
gene_03698.t1	70	methyltransferase type 11
gene_05145.t1	104	hypothetical protein VFPPC_13310
gene_02634.t1	99	uncharacterized protein CPUR_02806
gene_06321.t1	108	Fungal hydrophobin
gene_01138.t1	83	hypothetical protein MAM_01055
gene_00232.t1	130	L-amino-acid oxidase
gene_02336.t1	84	uncharacterized protein CPUR_07945
gene_08039.t1	160	uncharacterized protein CPUR_00268
gene_04138.t1	203	uncharacterized protein CPUR_04490

gene_01690.t1	159	EC13 protein
gene_05594.t1	191	predicted protein
gene_00828.t1	173	hydrophobic surface binding protein A domain-containing protein
gene_03935.t1	207	uncharacterized protein CPUR_03425
gene_07494.t1	122	Long chronological lifespan protein 2
gene_00410.t1	166	aspartic protease
gene_01266.t1	179	hydrophobic surface binding protein A domain-containing protein
gene_02287.t1	142	uncharacterized protein CPUR_02853
gene_06700.t1	194	mannose-6-phosphate isomerase, class I
gene_02423.t1	172	uncharacterized protein CPUR_00922
gene_06759.t1	210	predicted protein
gene_01271.t1	146	Kazal domain-containing protein
gene_02836.t1	158	thioredoxin-like protein
gene_05098.t1	210	uncharacterized protein CPUR_05103
gene_06186.t1	149	small secreted protein
gene_07549.t1	192	hypothetical protein DM02DRAFT_614138
gene_07069.t1	195	16 kDa allergen
gene_06657.t1	155	Blastomyces yeast-phase-specific protein
gene_01405.t1	136	secreted insect toxic protein
gene_04285.t1	136	Basic form of pathogenesis- protein 1
gene_05555.t1	227	uncharacterized protein CPUR_01295
gene_06804.t1	229	uncharacterized protein CPUR_00215
gene_05804.t1	184	plastocyanin-like domain-containing protein
gene_07714.t1	180	phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein precursor
gene_04384.t1	228	carbohydrate esterase family 5 protein
gene_08099.t1	220	Concanavalin A-like lectins/glucanase
gene_02601.t1	190	related to PRY1-strong similarity to the plant PR-1 class of pathogen related proteins
gene_07960.t1	178	uncharacterized protein CPUR_07819
gene_02372.t1	212	hypothetical protein VFPPC_17733
gene_07024.t1	209	uncharacterized protein CPUR_08601
gene_07313.t1	286	WSC domain-containing protein
gene_05336.t1	221	uncharacterized protein CPUR_04615
gene_00902.t1	187	Cu/Zn superoxide dismutase-related protein
gene_02414.t1	304	hypothetical protein UV8b_4753
gene_01349.t1	186	GPI-anchor transamidase precursor
gene_06243.t1	218	uncharacterized protein CPUR_05966
gene_01021.t1	299	glycoside hydrolase
gene_04773.t1	286	endo-1,3(4)-beta-glucanase
gene_04276.t1	277	cell wall glucanosyltransferase Mwg2
gene_07020.t1	429	glycoside hydrolase family 28
gene_06587.t1	274	hypothetical protein AAL_07365
gene_06593.t1	269	related to putative arabinase
gene_00970.t1	332	glucan endo-1,3-beta-glucosidase A1-like protein
gene_04411.t1	408	endoglucanase-4 precursor
gene_06095.t1	408	Related to spore coat protein SP96
gene_03234.t1	341	fungal alpha-L-arabinofuranosidase, putative
gene_04708.t1	338	glycosyl hydrolase family 62 protein
gene_08004.t1	541	vacuolar carboxypeptidase Cps1

gene_05900.t1	351	hypothetical protein FAVG1_10530
gene_01634.t1	342	related to mixed-linked glucanase precursor MLG1
gene_06529.t1	541	Stress-responsive protein Ish1
gene_01553.t1	776	Heterokaryon incompatibility protein Het-C
gene_07503.t1	566	Carboxylic ester hydrolase
gene_05712.t1	510	glycoside hydrolase family 30 protein
gene_00429.t1	584	endoplasmic oxidoreductin-1 precursor
gene_07702.t1	901	dimethylallyltryptophan N-methyltransferase
gene_07705.t1	501	elymoclavine monooxygenase
gene_02545.t1	447	glycoside hydrolase family 28
gene_00812.t1	454	glycoside hydrolase family 5 protein
gene_02899.t1	467	exoglucanase 1 precursor
gene_02138.t1	514	Glycoside hydrolase, family 43
gene_03500.t1	523	uncharacterized protein CPUR_03773
gene_00241.t1	807	Glycoside hydrolase, family 3
gene_07406.t1	877	glycoside hydrolase family 3 protein
gene_07886.t1	1042	probable beta-galactosidase
gene_02613.t1	723	glycoside hydrolase family 55
gene_06642.t1	547	tyrosinase 2
gene_06110.t1	670	related to tyrosinase precursor (monophenol monooxygenase)
gene_07642.t1	435	acid phosphatase
gene_07729.t1	442	Metallo-dependent phosphatase
gene_07576.t1	689	glycoside hydrolase family 47 protein
gene_02717.t1	818	Glycosyl hydrolase 92
gene_01741.t1	536	DUF1237 domain protein
gene_01106.t1	48	Sin homología
gene_06579.t1	59	Sin homología
gene_03561.t1	71	Sin homología
gene_06965.t1	72	Sin homología
gene_03720.t1	76	Sin homología
gene_07383.t1	76	Sin homología
gene_00233.t1	80	Sin homología
gene_03722.t1	80	Sin homología
gene_02018.t1	82	Sin homología
gene_02450.t1	86	Sin homología
gene_04833.t1	89	Sin homología
gene_00987.t1	90	Sin homología
gene_03438.t1	90	Sin homología
gene_03012.t1	91	Sin homología
gene_00396.t1	92	Sin homología
gene_04251.t1	92	Sin homología
gene_05842.t1	92	Sin homología
gene_07725.t1	92	Sin homología
gene_00398.t1	93	Sin homología
gene_00988.t1	93	Sin homología
gene_00989.t1	93	Sin homología
gene_00990.t1	93	Sin homología
gene_00991.t1	93	Sin homología

gene_00992.t1	93	Sin homología
gene_00630.t1	94	Sin homología
gene_01058.t1	94	Sin homología
gene_01059.t1	94	Sin homología
gene_01195.t1	94	Sin homología
gene_04252.t1	94	Sin homología
gene_00391.t1	95	Sin homología
gene_07639.t1	95	Sin homología
gene_00067.t1	96	Sin homología
gene_07721.t1	96	Sin homología
gene_01109.t1	97	Sin homología
gene_01196.t1	97	Sin homología
gene_01197.t1	97	Sin homología
gene_03178.t1	98	Sin homología
gene_07728.t1	98	Sin homología
gene_01056.t1	99	Sin homología
gene_05287.t1	100	Sin homología
gene_07226.t1	100	Sin homología
gene_00077.t1	101	Sin homología
gene_00775.t1	101	Sin homología
gene_01300.t1	101	Sin homología
gene_01812.t1	101	Sin homología
gene_03970.t1	101	Sin homología
gene_07720.t1	101	Sin homología
gene_00665.t1	102	Sin homología
gene_05284.t1	102	Sin homología
gene_01108.t1	103	Sin homología
gene_03915.t1	103	Sin homología
gene_03721.t1	104	Sin homología
gene_05001.t1	104	Sin homología
gene_05285.t1	105	Sin homología
gene_07727.t1	105	Sin homología
gene_00171.t1	106	Sin homología
gene_02406.t1	108	Sin homología
gene_07723.t1	109	Sin homología
gene_07726.t1	109	Sin homología
gene_01583.t1	110	Sin homología
gene_02405.t1	110	Sin homología
gene_04516.t1	111	Sin homología
gene_07722.t1	111	Sin homología
gene_00701.t1	112	Sin homología
gene_04686.t1	112	Sin homología
gene_06394.t1	112	Sin homología
gene_01194.t1	114	Sin homología
gene_00663.t1	115	Sin homología
gene_04466.t1	115	Sin homología
gene_05812.t1	115	Sin homología
gene_05816.t1	115	Sin homología

gene_05818.t1	115	Sin homología
gene_00640.t1	116	Sin homología
gene_02772.t1	116	Sin homología
gene_07036.t1	116	Sin homología
gene_00653.t1	118	Sin homología
gene_05813.t1	118	Sin homología
gene_05814.t1	118	Sin homología
gene_03321.t1	119	Sin homología
gene_05817.t1	119	Sin homología
gene_02603.t1	120	Sin homología
gene_01896.t1	121	Sin homología
gene_04037.t1	121	Sin homología
gene_04687.t1	121	Sin homología
gene_00183.t1	122	Sin homología
gene_04468.t1	122	Sin homología
gene_04673.t1	122	Sin homología
gene_00654.t1	125	Sin homología
gene_02712.t1	125	Sin homología
gene_04038.t1	125	Sin homología
gene_04672.t1	125	Sin homología
gene_06964.t1	126	Sin homología
gene_00702.t1	127	Sin homología
gene_04039.t1	127	Sin homología
gene_02850.t1	128	Sin homología
gene_02711.t1	129	Sin homología
gene_01107.t1	130	Sin homología
gene_04040.t1	130	Sin homología
gene_01742.t1	133	Sin homología
gene_03135.t1	134	Sin homología
gene_05448.t1	141	Sin homología
gene_05729.t1	141	Sin homología
gene_05730.t1	154	Sin homología
gene_07454.t1	201	Sin homología
gene_05815.t1	248	Sin homología
gene_04144.t1	66	Sin homología
gene_00943.t1	101	Sin homología
gene_03896.t1	113	Sin homología
gene_05593.t1	113	Sin homología
gene_06227.t1	122	Sin homología
gene_04467.t1	134	Sin homología
gene_03452.t1	141	Sin homología
gene_06285.t1	141	Sin homología
gene_02452.t1	142	Sin homología
gene_07262.t1	154	Sin homología
gene_00336.t1	194	Sin homología
gene_03177.t1	83	Sin homología
gene_00390.t1	87	Sin homología
gene_04979.t1	88	Sin homología

gene_07724.t1	96	Sin homología
gene_01184.t1	124	Sin homología
gene_07811.t1	125	Sin homología
gene_04214.t1	164	Sin homología
gene_01641.t1	177	Sin homología

ANEXO 4. Tabla con la identificación de CAZymes en el secretoma de *C. paspali* RRC-1481 en base al meta servidor dbCAN2.

Gen ID	HMMER	Hotpep	DIAMOND	EDPCV
gene_00241.t1	GH3(90-310)	GH3	GH3	Si
gene_00812.t1	GH5_5(153-429)	GH5	CBM1+GH5_5	Si
gene_00970.t1	GH16(47-328)	GH16	N	Si
gene_01149.t1	GH15(54-469)+CBM20(513-600)	GH15	CBM20+GH15	No
gene_01634.t1	GH16(71-284)	GH16	GH16	Si
gene_01721.t1	AA2(61-256)	N	AA0	No
gene_01741.t1	GH125(102-512)	GH125	GH125	No
gene_02049.t1	GH64(69-439)	GH64	GH64	No
gene_02138.t1	GH43_34(35-315)+CBM66(334-502)	GH43	CBM66+GH43_34	Si
gene_02386.t1	GH132(154-449)	GH132	GH132	No
gene_02545.t1	GH28(101-434)	GH28	GH28	Si
gene_02613.t1	GH55(16-714)	GH55	GH55	No
gene_02717.t1	GH92(264-772)	GH92	GH92	No
gene_02719.t1	GH125(76-514)	GH125	GH125	No
gene_02899.t1	GH7(21-453)	GH7	GH7	Si
gene_03055.t1	GH2(61-337)	N	GH2	No
gene_03234.t1	GH54(23-339)	GH54	CBM42+GH54	Si
gene_03500.t1	GH43_36(22-284)	GH43	CBM1+GH43_36	Si
gene_04276.t1	GH16(86-227)	GH16	N	Si
gene_04411.t1	AA9(7-233)	AA9	N	Si
gene_04500.t1	GH55(27-761)	GH55	GH55	No
gene_04538.t1	AA11(21-220)	AA11	N	No
gene_04708.t1	GH62(26-306)	GH62	GH10+GH62	Si
gene_04773.t1	GH16(34-262)	GH16	N	Si
gene_04862.t1	GH47(44-518)	GH47	GH47	No
gene_05128.t1	CE16(39-335)	CE16	N	Si
gene_05336.t1	GH131(33-220)	GH131	N	No
gene_05560.t1	GH55(41-778)	GH55	GH55	No
gene_05712.t1	GH30_7(37-478)	N	GH30_7	Si
gene_05900.t1	GH43_22(84-299)	N	GH43_22	Si
gene_06058.t1	GH32(49-356)	GH32	GH32	No
gene_06095.t1	AA11(18-215)	AA11	N	No
gene_06116.t1	GH37(55-629)	GH37	GH37	No
gene_06593.t1	GH43_22(79-248)	GH43	N	Si
gene_06894.t1	GH18(43-397)	GH18	GH18	No
gene_06955.t1	GH17(171-416)	GH17	N	No
gene_07020.t1	GH28(98-417)	GH28	GH28	Si
gene_07398.t1	AA5_2(64-667)	AA5	AA5_2+CBM32	No
gene_07406.t1	GH3(183-434)	GH3	GH3	Si
gene_07576.t1	GH47(44-513)	GH47	GH47	No
gene_07736.t1	CE4(126-252)	CE4	CBM18+CE4	No
gene_07839.t1	GH18(40-397)	N	GH18	No

gene_07886.t1	GH35(47-394)	GH35	GH35	No
gene_07969.t1	CE8(31-314)	CE8	N	No
gene_07973.t1	GH2(45-766)	GH2	GH2	No

ANEXO 5. Tabla de reads de cada muestra secuenciada mapeados mediante bowtie2 al transcriptoma ensamblado *de novo* final utilizado como referencia.

Tejido	ID	Reads totales	Reads alineados			
			1 vez	Múltiples veces	Total	% alineado
Estambres	Pasp-22	17555009	4181144	10334022	14515166	82,68
Estambres	Pasp-26	9825766	2140881	5735656	7876537	80,16
Estambres	Pasp-30	12708009	2874010	7235123	10109133	79,54
EE post-antesis	Pasp-24	10158151	2084356	6288734	8373090	82,42
EE post-antesis	Pasp-31	11865685	2776798	7131629	9908427	83,50
EE post-antesis	Pasp-79	17158455	3873954	10238727	14112681	82,24
EE pre-antesis	Pasp-5	15751085	3859458	9229693	13080151	83,04
EE pre-antesis	Pasp-25	14264571	2748512	9006686	11755198	82,40
EE pre-antesis	Pasp-9	7889433	1846120	4619145	6465265	81,94
EE pre-antesis	Pasp-83	24410667	6055992	13883296	19939288	81,68
Hoja	Pasp-80	25501836	5219319	15782478	21001797	82,35
Hoja	Pasp-81	28714793	5708083	18129073	23837156	83,013
EE 1 dpi	Pasp-61	7138457	1544656	3967309	5511965	77,21
EE 1 dpi	Pasp-66	17626833	3426244	11049809	14476053	82,12
EE 1 dpi	Pasp-67	7498758	1445275	4737316	6182591	82,44
EE 4 dpi	Pasp-42	11767683	2231488	4198709	6430197	54,64
EE 4 dpi	Pasp-70	74430365	16887845	39967640	56855485	76,38
EE 4 dpi	Pasp-72	57707915	12416774	33465505	45882279	79,50
Promedio						79,85

Anexo 6. Tabla de los 20 GO más enriquecidos en base a los TDE en cada comparación de EE de Chirú durante la infección con *C. paspali*. Los GO están ordenados de mayor a menor en número de secuencias en cada condición de sobrerrepresentados.

Comparación	Condición	Termino GO	Nombre GO	GO categoría
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0005524	Unión ATP	MF
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0006468	fosforilación de proteínas	PB
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0004672	actividad de la proteína quinasa	MF
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0005576	región extracelular	CC
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0005509	enlace de iones de calcio	MF
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0030599	actividad de pectinesterasa	MF
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0042545	modificación de la pared celular	PB
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0005618	pared celular	CC
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0009860	crecimiento del tubo de polen	PB
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0004650	actividad de poligalacturonasa	MF
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0043086	regulación negativa de la actividad catalítica	PB
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0045490	proceso catabólico de pectina	PB
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0006073	proceso metabólico del glucano celular	PB
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0005507	enlace de iones de cobre	MF
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0003779	unión a actina	MF
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0030570	actividad de pectato liasa	MF
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0005199	constituyente estructural de la pared celular	MF
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0047911	actividad galacturan 1,4-alfa-galacturonidasa	MF
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0009664	organización de la pared celular tipo planta	PB
0 dpi vs 1 dpi	0 dpi	GO:0031225	componente anclado de membrana	CC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0003735	constituyente estructural del ribosoma	FC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0050662	unión a coenzima	FC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0020037	enlace hemo	FC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0005525	Enlace GTP	FC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0032787	proceso metabólico del ácido monocarboxílico	BP
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0003924	Actividad de GTPasa	FC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0022625	subunidad ribosómica grande citosólica	CC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0006099	ciclo del ácido tricarboxílico	BP
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0005743	membrana interna mitocondrial	CC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0006165	fosforilación de difosfato de nucleósidos	BP
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0003746	actividad del factor de alargamiento de la traducción	FC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0022627	subunidad ribosómica pequeña citosólica	CC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0015986	Transporte de protones acoplados con síntesis de ATP	BP
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0003755	actividad de peptidil-prolil cis-trans isomerasa	FC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0046686	respuesta al ion cadmio	BP
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0004356	actividad glutamato-amoniaco ligasa	FC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0042788	ribosoma polisómico	CC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0004298	actividad de endopeptidasa de tipo treonina	FC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0005839	complejo del núcleo de proteasoma	CC
0 dpi vs 1 dpi	1 dpi	GO:0006542	proceso biosintético de glutamina	BP
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0005524	ATP binding	FC
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0004672	protein kinase activity	FC

0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0006468	protein phosphorylation	BP
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0003735	structural constituent of ribosome	FC
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0005576	extracellular region	CC
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0005509	calcium ion binding	FC
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0008092	cytoskeletal protein binding	FC
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0005618	cell wall	CC
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0031982	vesicle	CC
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0030599	pectinesterase activity	FC
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0008289	lipid binding	FC
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0042545	cell wall modification	BP
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0044391	ribosomal subunit	CC
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0009414	response to water deprivation	BP
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0048364	root development	BP
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0043086	negative regulation of catalytic activity	BP
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0019953	sexual reproduction	BP
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0031225	anchored component of membrane	CC
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0009860	pollen tube growth	BP
0 dpi vs 4 dpi	0 dpi	GO:0030244	cellulose biosynthetic process	BP
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0003735	structural constituent of ribosome	FC
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0020037	heme binding	FC
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0005525	GTP binding	FC
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0005506	iron ion binding	FC
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0006457	protein folding	BP
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0030163	protein catabolic process	BP
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0003924	GTPase activity	FC
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0003743	translation initiation factor activity	FC
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0045454	cell redox homeostasis	BP
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0006413	translational initiation	BP
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0000287	magnesium ion binding	FC
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit	CC
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	BP
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0051287	NAD binding	FC
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0050832	defense response to fungus	BP
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0051082	unfolded protein binding	FC
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0022627	cytosolic small ribosomal subunit	CC
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0006096	glycolytic process	BP
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0003755	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	FC
0 dpi vs 4 dpi	4 dpi	GO:0003746	translation elongation factor activity	FC

ANEXO 7. Transcritos de interés sobreexpresados durante la infección en Chirú.

ID	Descripción BLASTx	GO
Proteínas PR	Endochitinase A n=1 Tax=Dichanthelium oligosanthos TaxID=888268 RepID=A0A1E5VJ45_9POAL	P:carbohydrate metabolic process; P:chitin catabolic process; P:cell wall macromolecule catabolic process; F:chitinase activity; F:chitin binding; C:integral component of membrane
	RSE25TRINITY_DN12971_c2_g1_i2	P:carbohydrate metabolic process; P:chitin catabolic process;
	RSE25TRINITY_DN12112_c0_g1_i1	P:cell wall macromolecule catabolic process; F:chitinase activity; C:extracellular region
	Endochitinase A n=73 Tax=Tripsacinae TaxID=1648029 RepID=CHIA_MAIZE	P:carbohydrate metabolic process; P:chitin catabolic process;
	Endochitinase PR4 n=1 Tax=Cinnamomum micranthum f. kanehirae TaxID=337451	P:cell wall macromolecule catabolic process; F:chitinase activity; F:chitin binding
	TRINITY_DN64882_c0_g1_i1	F:chitin binding
	RSE25TRINITY_DN9858_c0_g1_i1	Chitinase 1 n=12 Tax=Oryza TaxID=4527 RepID=CHI1_ORYSJ
	Chitinase 1 n=1 Tax=Tulipa saxatilis subsp. bakeri TaxID=110455	P:organic substance metabolic process; F:hydrolase activity, acting on glycosyl bonds
	TRINITY_DN33465_c0_g1_i1	RepID=CHIT1_TULSB
	RSE25TRINITY_DN20080_c1_g1_i4	Chitinase 2 n=11 Tax=Oryza TaxID=4527 RepID=CHI2_ORYSJ
	Chitinase 2 n=1 Tax=Tulipa saxatilis subsp. bakeri TaxID=110455	P:carbohydrate metabolic process; P:chitin catabolic process; P:cell wall macromolecule catabolic process; F:chitinase activity; F:chitin binding
	TRINITY_DN62770_c0_g2_i2	RepID=CHIT2_TULSB
	RSE25TRINITY_DN170612_c0_g1_i2	Chitinase 4 n=11 Tax=Oryza TaxID=4527 RepID=CHI4_ORYSJ
	Chitinase CLP n=4 Tax=Oryza TaxID=4527 RepID=CLP_ORYSJ	P:carbohydrate metabolic process; P:macromolecule catabolic process; F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
	TRINITY_DN1992_c0_g1_i1	Xylanase inhibitor protein 1 n=7
	RSE25TRINITY_DN1687_c0_g1_i2	Tax=Oryza TaxID=4527 RepID=XIP1_ORYSJ
	Xylanase inhibitor protein 2 n=6 Tax=Oryza TaxID=4527	P:carbohydrate metabolic process
	RSE25TRINITY_DN1687_c0_g2_i1	RepID=XIP2_ORYSJ
	Xylanase inhibitor protein XIP n=8 Tax=Oryza TaxID=4527	P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity
	RSE25TRINITY_DN62697_c0_g1_i1	RepID=XIP_ORYSJ
Proteínas PR	Zeamatin n=25 Tax=Zea TaxID=4575 RepID=ZEAM_MAIZE	P:chitin catabolic process; P:seed germination; F:chitinase activity; F:calcium ion binding; C:amyloplast
	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GIV n=1 Tax=Hordeum vulgare TaxID=4513	P:defense response; P:response to biotic stimulus; P:response to salt stress; P:response to UV-B; P:response to arachidonic acid; F:hydrolase activity; C:extracellular region
	TRINITY_DN64598_c0_g1_i1	RepID=E13D_HORVU
	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII n=32 Tax=Triticeae TaxID=147389	P:carbohydrate metabolic process; P:defense response; F:glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase activity; C:vacuole
	RSE25TRINITY_DN4818_c0_g1_i1	RepID=E13B_HORVU
	Wheatwin-1 n=17 Tax=Triticeae TaxID=147389	P:carbohydrate metabolic process; P:defense response; F:glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase activity; C:vacuole
Proteínas PR	TRINITY_DN21075_c0_g1_i3	RepID=WHW1_WHEAT
		P:defense response to bacterium; P:defense response to fungus

		Thaumatococcus-like pathogenesis-related protein 1 n=3 Tax=Avena sativa	
	RSE25TRINITY_DN68502_c1_g1_i1	TaxID=4498 RepID=RST1_AVESA	P:killing of cells of other organism; P:defense response to fungus
		Thaumatococcus-like protein n=10 Tax=Oryza	
	TRINITY_DN69706_c0_g2_i6	TaxID=4527 RepID=TLP_ORYSJ	P:killing of cells of other organism; P:defense response to fungus P:polysaccharide catabolic process; P:carbohydrate metabolic process; P:chitin catabolic process; P:defense response; P:metabolic process; P:cell wall macromolecule catabolic process; F:chitinase activity; F:chitin binding; F:hydrolase activity; F:hydrolase activity, acting on glycosyl bonds; C:extracellular region; C:extracellular space
		Basic endochitinase CHB4 n=19	
	RSE25TRINITY_DN25054_c0_g1_i2	Tax=Brassicaceae TaxID=3700 RepID=CHI4_BRANA	
		Bowman-Birk type trypsin inhibitor n=2	
	RSE25TRINITY_DN9049_c0_g1_i7	Tax=Triticinae TaxID=1648030 RepID=IBB3_WHEAT	F:serine-type endopeptidase inhibitor activity; C:extracellular region P:response to wounding; P:negative regulation of peptidase activity; P:negative regulation of endopeptidase activity; F:serine-type endopeptidase inhibitor activity; F:peptidase inhibitor activity
		Subtilisin-chymotrypsin inhibitor-2A n=45 Tax=Hordeum vulgare	
	RSE25TRINITY_DN3454_c0_g1_i8	TaxID=4513 RepID=ICI2_HORVU	
		Somatic embryogenesis receptor kinase 1 n=30 Tax=rosids TaxID=71275	
Transduccion de señales	RSE25TRINITY_DN11839_c0_g1_i4	RepID=SERK1_ARATH	F:protein binding
		Putative L-type lectin-domain containing receptor kinase V.8 n=1 Tax=Arabidopsis thaliana TaxID=3702	
	RSE25TRINITY_DN8943_c0_g1_i1	RepID=LRK58_ARATH	F:carbohydrate binding
		Disease resistance protein PIK6-NP n=8 Tax=Oryza TaxID=4527	
	TRINITY_DN35547_c0_g1_i5	RepID=PIK6_ORYSJ	F:ADP binding
		Disease resistance protein Pik-2 n=21	
	RSE25TRINITY_DN42178_c0_g2_i2	Tax=Oryza TaxID=4527 RepID=PIK2_ORYSJ	P:defense response; P:response to light stimulus; P:response to other organism; F:ADP binding; C:cellular anatomical entity P:protein phosphorylation; P:oligosaccharide metabolic process; P:response to virus; P:response to salicylic acid; P:unidimensional cell growth; P:cellular water homeostasis; P:lateral root development; P:defense response to fungus; F:protein kinase activity; F:calcium ion binding; F:protein binding; F:ATP binding; F:polysaccharide binding; C:vacuole; C:plant-type cell wall; C:membrane P:protein phosphorylation; P:defense response; P:response to bacterium; P:response to fungus; P:response to salicylic acid; F:guanylate cyclase activity; F:protein serine/threonine kinase activity; F:ATP binding; C:plasma membrane
		Wall-associated receptor kinase 2 n=3 Tax=Arabidopsis thaliana TaxID=3702 RepID=WAK2_ARATH	
		Wall-associated receptor kinase-like 20 n=3 Tax=Brassicaceae TaxID=3700 RepID=WAKLQ_ARATH	
	RSE25TRINITY_DN10310_c1_g1_i1	Brassinosteroid LRR receptor kinase BRL1 n=9 Tax=Oryzinae TaxID=1648021 RepID=BRL1_ORYSJ	
		Cysteine-rich receptor-like protein kinase 25 n=5 Tax=Arabidopsis TaxID=3701 RepID=CRK25_ARATH	P:response to reactive oxygen species; P:protein phosphorylation; F:protein kinase activity; F:protein binding; F:ATP binding; C:plasma membrane
	RSE25TRINITY_DN10169_c0_g1_i5	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 3 n=8 Tax=Camelineae TaxID=980083 RepID=CRK3_ARATH	P:protein phosphorylation; F:protein kinase activity; F:ATP binding

		Cysteine-rich receptor-like protein kinase	
RSE25TRINITY_DN10169_c0_g1_i3	3 n=8 Tax=Camelineae TaxID=980083 RepID=CRK3_ARATH	P:protein phosphorylation; F:protein kinase activity; F:ATP binding	
	Cysteine-rich receptor-like protein kinase		
RSE25TRINITY_DN1437_c0_g1_i6	42 n=5 Tax=Arabidopsis TaxID=3701 RepID=CRK42_ARATH	P:protein phosphorylation; F:protein kinase activity; F:ATP binding	
	Cysteine-rich receptor-like protein kinase	P:response to reactive oxygen species; P:protein phosphorylation;	
TRINITY_DN34543_c0_g1_i3	6 n=2 Tax=Arabidopsis thaliana TaxID=3702 RepID=CRK6_ARATH	P:defense response to bacterium; F:protein serine/threonine kinase activity; F:protein binding; F:ATP binding; C:plasma membrane	
		P:protein phosphorylation; P:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway; P:response to fungus;	
RSE25TRINITY_DN14424_c1_g1_i1	PR5-like receptor kinase n=3 Tax=Arabidopsis thaliana TaxID=3702 RepID=PR5K_ARATH	P:response to metal ion; F:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity; F:ATP binding; C:plasmodesma; C:integral component of membrane	
		P:defense response to oomycetes; P:protein phosphorylation;	
RSE25TRINITY_DN2866_c0_g2_i1	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 n=8 Tax=Camelineae TaxID=980083 RepID=LRK41_ARATH	P:defense response to bacterium; F:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity; F:ATP binding; C:plasma membrane	
		P:signal transduction; P:cellular protein localization; P:protein autophosphorylation; P:cellular response to abscisic acid stimulus; F:transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity; F:ATP binding; F:ubiquitin protein ligase binding;	
RSE25TRINITY_DN43951_c0_g1_i7	Receptor-like serine/threonine-protein kinase SD1-8 n=25 Tax=Camelineae TaxID=980083 RepID=SD18_ARATH	C:nucleus; C:cytosol; C:plasma membrane	
RSE25TRINITY_DN40343_c0_g1_i1	Mitogen-activated protein kinase 3 n=10 Tax=Brassicaceae TaxID=3700 RepID=MPK3_ARATH	P:pattern recognition receptor signaling pathway; P:regulation of gene expression; P:stress-activated MAPK cascade; F:MAP kinase activity; F:ATP binding; C:nucleus; C:cytoplasm	
		P:response to oxidative stress; P:signal transduction by protein phosphorylation; P:activation of protein kinase activity; P:protein autophosphorylation; F:protein serine/threonine kinase activity; F:ATP binding	
RSE25TRINITY_DN327451_c0_g1_i1	Mitogen-activated protein kinase kinase 2 n=3 Tax=Arabidopsis TaxID=3701 RepID=M3K2_ARATH		
	Zinc finger transcription factor YY1 n=7 Tax=Camelineae TaxID=980083 RepID=YY1_ARATH	F:nucleic acid binding	
Factores transcripcion	RSE25TRINITY_DN30971_c0_g1_i3		
	Zinc finger transcription factor YY1 n=7 Tax=Camelineae TaxID=980083 RepID=YY1_ARATH	F:nucleic acid binding	
	RSE25TRINITY_DN37997_c0_g1_i15		
	Probable WRKY transcription factor 11 n=6 Tax=Arabidopsis TaxID=3701 RepID=WRK11_ARATH	P:regulation of transcription, DNA-templated; F:DNA-binding transcription factor activity; F:sequence-specific DNA binding	
	TRINITY_DN39374_c0_g1_i11	P:pollen development; P:embryo development ending in seed dormancy; F:DNA-binding transcription factor activity; F:sequence-specific DNA binding; F:transcription regulatory region DNA binding; C:nucleus	
	RSE25TRINITY_DN22017_c0_g1_i8		
	Probable WRKY transcription factor 21 n=3 Tax=Arabidopsis TaxID=3701 RepID=WRK21_ARATH	P:regulation of transcription, DNA-templated; P:defense response; F:DNA-binding transcription factor activity; F:sequence-specific DNA binding; C:nucleus	
	RSE25TRINITY_DN6899_c2_g1_i7		
	Probable WRKY transcription factor 72 n=6 Tax=Camelineae TaxID=980083 RepID=WRK72_ARATH	P:regulation of transcription, DNA-templated; P:pollen development; P:embryo development ending in seed dormancy; F:DNA-binding transcription factor activity; F:sequence-specific DNA binding; F:transcription regulatory region DNA binding; C:nucleus	
	RSE25TRINITY_DN6358_c0_g3_i2		
	WRKY transcription factor 22 n=10 Tax=Brassicaceae TaxID=3700 RepID=WRK22_ARATH		

Señalización por ROS	TRINITY_DN17185_c0_g1_i1	WRKY transcription factor 23 n=4 Tax=Arabidopsis TaxID=3701 RepID=WRK23_ARATH	P:vegetative to reproductive phase transition of meristem; P:positive regulation of transcription, DNA-templated; F:sequence-specific double-stranded DNA binding; C:nucleus
	RSE25TRINITY_DN15003_c1_g1_i5	WRKY transcription factor 42 n=10 Tax=Camelineae TaxID=980083 RepID=WRK42_ARATH	P:regulation of transcription, DNA-templated; F:DNA-binding transcription factor activity; F:sequence-specific DNA binding P:vegetative to reproductive phase transition of meristem;
	TRINITY_DN706_c0_g1_i1	WRKY transcription factor 71 n=3 Tax=Arabidopsis thaliana TaxID=3702 RepID=WRK71_ARATH	P:positive regulation of transcription, DNA-templated; F:DNA-binding transcription factor activity; F:sequence-specific double-stranded DNA binding; C:nucleus
	TRINITY_DN66614_c0_g4_i2	WRKY transcription factor 72B n=1 Tax=Solanum lycopersicum TaxID=4081 RepID=WK72B_SOLLC	P:regulation of transcription, DNA-templated; P:defense response; F:DNA-binding transcription factor activity; F:sequence-specific DNA binding; C:nucleus
	RSE25TRINITY_DN22017_c0_g1_i2	WRKY transcription factor WRKY51 n=8 Tax=Oryza TaxID=4527 RepID=WRK51_ORYSJ	P:regulation of transcription, DNA-templated; F:DNA-binding transcription factor activity; F:sequence-specific DNA binding
	RSE25TRINITY_DN1674_c0_g3_i3	Ethylene-responsive transcription factor 1B n=3 Tax=Arabidopsis TaxID=3701 RepID=ERF92_ARATH	P:regulation of transcription, DNA-templated; F:DNA binding; F:DNA-binding transcription factor activity
	RSE25TRINITY_DN2858_c0_g3_i2	Ethylene-responsive transcription factor 5 n=3 Tax=Arabidopsis TaxID=3701 RepID=EF102_ARATH	P:regulation of transcription, DNA-templated; F:DNA binding; F:DNA-binding transcription factor activity P:regulation of transcription, DNA-templated; P:response to cold; P:response to water deprivation; P:response to light stimulus; P:response to wounding; P:cytokinin-activated signaling pathway; P:ethylene-activated signaling pathway; P:regulation of cell differentiation; P:cellular response to salt stress; F:DNA-binding transcription factor activity; F:protein binding; F:sequence-specific DNA binding; F:transcription regulatory region DNA binding; C:nucleus
	RSE25TRINITY_DN5863_c2_g1_i2	Ethylene-responsive transcription factor RAP2-4 n=2 Tax=Arabidopsis thaliana TaxID=3702 RepID=RAP24_ARATH	
	RSE25TRINITY_DN4177_c0_g1_i3	Putative transcription factor bHLH041 n=3 Tax=Arabidopsis TaxID=3701 RepID=BH041_ARATH	P:negative regulation of gene expression; F:protein dimerization activity; C:nucleus; C:cytoplasm
	TRINITY_DN281859_c0_g1_i1	Superoxide dismutase L-ascorbate peroxidase 5, peroxisomal	P:superoxide metabolic process; P:oxidation-reduction process; F:superoxide dismutase activity; F:metal ion binding
	RSE25TRINITY_DN69389_c0_g1_i5	n=4 Tax=Brassicaceae TaxID=3700 RepID=APX5_ARATH	P:response to oxidative stress; P:oxidation-reduction process; F:catalase activity; F:heme binding
	RSE25TRINITY_DN295199_c0_g1_i1	Respiratory burst oxidase homolog protein B n=13 Tax=Solanaceae TaxID=4070 RepID=RBOHB_SOL TU	P:oxidation-reduction process; F:oxidoreductase activity; C:membrane
	RSE25TRINITY_DN9906_c0_g1_i4	Peroxidase 1 n=4 Tax=Oryza TaxID=4527 RepID=PER1_ORYSJ	P:response to oxidative stress; P:oxidation-reduction process; F:peroxidase activity; F:heme binding
	RSE25TRINITY_DN2204_c0_g2_i3	Peroxidase 2 n=5 Tax=Zea mays TaxID=4577 RepID=PER2_MAIZE	P:response to oxidative stress; P:circadian rhythm; P:regulation of gene expression; P:multicellular organismal process; P:hydrogen peroxide catabolic process; P:oxidation-reduction process; F:peroxidase activity; F:heme binding; C:cellular anatomical entity
	RSE25TRINITY_DN17182_c0_g1_i1	Peroxidase 3 n=30 Tax=Brassicaceae TaxID=3700 RepID=PER3_ARATH	P:response to oxidative stress; P:hydrogen peroxide catabolic process; P:oxidation-reduction process; F:peroxidase activity; F:heme binding; C:plant-type cell wall; C:plasmodesma

	RSE25TRINITY_DN504_c0_g1_i7	Peroxidase 5 n=3 Tax=Vitis vinifera TaxID=29760 RepID=PER5_VITVI	P:response to oxidative stress; P:hydrogen peroxide catabolic process; P:oxidation-reduction process; F:peroxidase activity; F:heme binding
	RSE25TRINITY_DN10814_c0_g2_i3	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 6, mitochondrial n=2 Tax=Arabidopsis thaliana TaxID=3702 RepID=GPX6_ARATH Auxin-responsive protein IAA1 n=7	P:response to oxidative stress; P:response to cadmium ion; P:oxidation-reduction process; P:cellular oxidant detoxification; F:glutathione peroxidase activity; F:phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase activity; C:mitochondrion; C:cytosol; C:plasma membrane; C:chloroplast
Señalización por hormonas	RSE25TRINITY_DN17000_c0_g1_i13	Tax=Oryza TaxID=4527 RepID=IAA1_ORYSJ Auxin-responsive protein SAUR32 n=9 Tax=Brassicaceae TaxID=3700	P:regulation of transcription, DNA-templated; F:protein binding; C:nucleus
	TRINITY_DN6856_c0_g1_i5	RepID=SAU32_ARATH Auxin-responsive protein SAUR40 n=5	P:response to auxin
	RSE25TRINITY_DN26795_c0_g1_i2	Tax=Camelineae TaxID=980083 RepID=SAU40_ARATH Auxin-responsive protein SAUR71 n=5	P:response to auxin
	RSE25TRINITY_DN19799_c0_g1_i4	Tax=Camelineae TaxID=980083 RepID=SAU71_ARATH	P:response to auxin
	RSE25TRINITY_DN21603_c0_g1_i1	E3 ubiquitin-protein ligase RHA2A n=8 Tax=Camelineae TaxID=980083 RepID=RHA2A_ARATH E3 ubiquitin-protein ligase RDUF1 n=6	P:positive regulation of abscisic acid-activated signaling pathway; P:protein ubiquitination; P:regulation of response to osmotic stress; P:response to karrikin; F:protein binding; F:transcription regulatory region DNA binding; F:ubiquitin protein ligase activity; C:nucleus; C:cytoplasm
	RSE25TRINITY_DN188139_c0_g1_i1	Tax=Camelineae TaxID=980083 RepID=RDUF1_ARATH E3 ubiquitin-protein ligase MPSR1 n=4	P:response to abscisic acid; P:protein ubiquitination; F:ubiquitin-protein transferase activity
	RSE25TRINITY_DN4814_c0_g1_i5	Tax=Arabidopsis TaxID=3701 RepID=MPSR1_ARATH Indole-3-acetate beta-glucosyltransferase	P:response to water deprivation; P:response to abscisic acid; P:response to chitin; P:protein autoubiquitination; F:ubiquitin-protein transferase activity; C:cytoplasm
	RSE25TRINITY_DN10681_c2_g1_i2	n=3 Tax=Zea mays TaxID=4577 RepID=IABG_MAIZE Auxin-responsive protein IAA1 n=7	F:UDP-glucosyltransferase activity; C:intracellular membrane-bounded organelle
	RSE25TRINITY_DN17000_c0_g1_i13	Tax=Oryza TaxID=4527 RepID=IAA1_ORYSJ	P:regulation of transcription, DNA-templated; F:protein binding; C:nucleus
	RSE25TRINITY_DN36920_c0_g2_i2	Auxin-responsive protein IAA9 n=9 Tax=Oryza TaxID=4527 RepID=IAA9_ORYSJ	P:response to auxin; P:embryonic pattern specification; P:xylem and phloem pattern formation; P:negative regulation of transcription, DNA-templated; P:root development; F:protein binding; F:transcription regulatory region DNA binding; C:nucleus
	RSE25TRINITY_DN1031_c0_g1_i1	Putative linoleate 9S-lipoxygenase 3 n=11 Tax=Oryzinae TaxID=1648021 RepID=LOX3_ORYSJ	P:oxidation-reduction process; F:oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen; F:metal ion binding

Anexo 8. Tabla de los 20 GO más enriquecidos en base a los TDE en cada comparación de EEPre y EEPost deChirpu. Los GO están ordenados de mayor a menor en número de secuencias en cada condición de sobrerrepresentados.

Condición	Termino GO	Nombre GO	GO categoría
EEPost	GO:0003824	actividad catalítica	FM
EEPost	GO:0043167	unión de iones	FM
EEPost	GO:0016020	membrana	CC
EEPost	GO:0050896	respuesta al estímulo	PB
EEPost	GO:0065007	regulación biológica	PB
EEPost	GO:0043169	enlace catiónico	FM
EEPost	GO:0046872	unión de iones metálicos	FM
EEPost	GO:0016491	actividad oxidorreductasa	FM
EEPost	GO:0051179	localización	PB
EEPost	GO:0006950	respuesta al estrés	PB
EEPost	GO:0006810	transporte	PB
EEPost	GO:0051234	establecimiento de localización	PB
EEPost	GO:0055114	proceso de oxidación-reducción	PB
EEPost	GO:0006464	proceso de modificación de proteínas celulares	PB
EEPost	GO:0036211	proceso de modificación de proteínas	PB
EEPost	GO:0042221	respuesta a químicos	PB
EEPost	GO:0016301	actividad quinasa	FM
EEPost	GO:0048037	encuadernación cofactor	FM
EEPost	GO:0003677	Unión de ADN	FM
EEPost	GO:0016310	fosforilación	PB
EEPre	GO:0003824	actividad catalítica	FM
EEPre	GO:0016740	actividad transferasa	FM
EEPre	GO:0005515	enlace proteico	FM
EEPre	GO:0065007	regulación biológica	PB
EEPre	GO:0050789	regulación del proceso biológico	PB
EEPre	GO:0050794	regulación del proceso celular	PB
EEPre	GO:0055114	proceso de oxidación-reducción	PB
EEPre	GO:0019222	regulación del proceso metabólico	PB
EEPre	GO:0016310	fosforilación	PB
EEPre	GO:0060255	regulación del proceso metabólico de macromoléculas	PB
EEPre	GO:0031323	regulación del proceso metabólico celular	PB
EEPre	GO:0010468	regulación de la expresión génica	PB
EEPre	GO:0080090	regulación del proceso metabólico primario	PB
EEPre	GO:0016773	actividad de fosfotransferasa, grupo alcohol como aceptor	FM
EEPre	GO:0005975	proceso metabólico de carbohidratos	PB
EEPre	GO:0009889	regulación del proceso biosintético	PB
EEPre	GO:0051171	regulación del proceso metabólico compuesto de nitrógeno	PB
EEPre	GO:0031326	regulación del proceso biosintético celular	PB
EEPre	GO:0032774	Proceso biosintético de ARN	PB
EEPre	GO:0006351	transcripción, con plantilla de ADN	PB