



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN
GÉNICA EN OOMICETOS PATÓGENOS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE
MICRORNAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
JACOBO SEVILLANO SERRANO

TUTOR PRINCIPAL
DR. JULIO CÉSAR VEGA ARREGUÍN
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN, UNAM

COMITÉ TUTOR
DRA. NANCY CALDERÓN CORTÉS
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA, UNAM

DR. ALFONSO MÉNDEZ BRAVO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA, UNAM

MORELIA MICHOACÁN, SEPTIEMBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN
GÉNICA EN OOMICETOS PATÓGENOS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE
MICRORNAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
JACOBO SEVILLANO SERRANO

TUTOR PRINCIPAL
DR. JULIO CÉSAR VEGA ARREGUÍN
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN, UNAM

COMITÉ TUTOR
DRA. NANCY CALDERÓN CORTÉS
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA, UNAM

DR. ALFONSO MÉNDEZ BRAVO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA, UNAM

MORELIA MICHOACÁN, SEPTIEMBRE 2023

**COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA
OFICIO: CGEP/CPCB/ ENESMO /589/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado**

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **22 de mayo de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **SEVILLANO SERRANO JACOBO** con número de cuenta **520019311** con la tesis titulada **“Estudio de los mecanismos de regulación de la expresión génica en oomicetos patógenos mediante el análisis de microRNAs”**, realizada bajo la dirección del **DR. JULIO CÉSAR VEGA ARREGUÍN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. MARIO ALBERTO SERRANO ORTEGA
Vocal: DR. OSWALDO VALDÉS LÓPEZ
Vocal: DRA. LUCÍA GUADALUPE MORALES REYES
Vocal: DRA. DULCE ALEJANDRA ROUGON CARDOSO
Secretario: DR. ALFONSO MÉNDEZ BRAVO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 01 de agosto de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/JHP/EARR/jhp



Agradecimientos institucionales

Quiero agradecer en primera instancia al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por aceptarme como alumno y brindarme la oportunidad de continuar con mis estudios de Posgrado, por las excelentes atenciones y oportunidades recibidas como estudiante.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría en Ciencias Biológicas con número de apoyo 762526 y por recibir parte del financiamiento para la realización del presente proyecto de investigación con el Programa de Ciencia Básica A1-S-34759, así como al Laboratorio Nacional PlanTECC de la ENES León y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA proyecto IG200921) por ser parte importante para el financiamiento del proyecto.

Al Dr. Julio César Vega Arreguín de la ENES-León, UNAM por ser un excelente tutor principal, por guiarme, por sus consejos y disposición de tiempo para seguir mejorando en el área de investigación científica, así como a la Dra. Nancy Calderón Cortés y el Dr. Alfonso Méndez Bravo de la ENES-Morelia, UNAM por aceptar ser miembros de mi comité tutor, por su acompañamiento en la evolución del proyecto de investigación, su excelente disposición e importantes consejos sobre áreas de oportunidad de éste.

Agradecimientos a título personal

Quiero agradecer infinitamente a que hizo todo esto posible, incluyendo el presente proyecto de investigación.

Así mismo, agradecer al Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria y Laboratorio Nacional PLATECC de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, ENES-UNAM, León, donde realicé los experimentos.

Con agradecimiento muy en especial al Post-Doc Dr. Fernando Uriel Rojas Rojas por ser parte importante en la realización del presente proyecto, por sus consejos, resolución de dudas y excelente disposición durante mi estancia como estudiante, a quien admiro.

A mis profesores de asignaturas que ayudaron a enriquecer el presente proyecto de investigación pertenecientes a varias facultades de la UNAM.

Así, como agradecer a mis compañeras y compañeros del laboratorio interdisciplinario de la división de Ciencias Agrogenómicas de la ENES-León por la ayuda en la ejecución de experimentos en especial a Mónica, Rodrigo, Monse, Brenda, Uriel.

A mi familia, mis padres, hermanxs, sobrinxs y bis-sobrinxs quiénes son una fuente importante de inspiración y ejemplo de tenacidad en la vida.

Índice

Resumen	1
Abstract	3
I Introducción	4
II Pregunta de investigación	5
2.2 Objetivo general	5
2.3 Objetivos específicos	5
III Antecedentes	6
3.1 Generalidades de los oomicetos	6
3.2 <i>Phytophthora capsici</i>	6
3.3 Características morfológicas y fisiológicas de <i>P. capsici</i>	8
3.4 Ciclo de vida e infeccioso de <i>Phytophthora capsici</i>	9
3.5 Rango de hospederos que infecta <i>P. capsici</i>	12
3.6 Relación de <i>P. capsici</i> con plantas de chile	12
3.7 Relación de <i>P. capsici</i> con plantas de pepino.....	13
3.8 Relación de <i>P. capsici</i> con plantas de brócoli.....	14
3.9 Relación de <i>P. capsici</i> con plantas de frijol.....	14
3.10 Características genómicas de <i>P. capsici</i>	15
3.11 Mecanismos moleculares implicados en infecciones causadas por <i>P. capsici</i>	15
3.12 Efectores patógenos implicados en la infección causada por <i>P. capsici</i>	16
3.13 La epigenética mediada por RNAs no codificantes en oomicetos patógenos	18
3.14 Características de miRNAs como regulares epigenéticos	20
3.15 Biogénesis y procesamiento de miRNAs.....	20
3.16 Componentes de miRNAs y siRNAs en <i>Phytophthora</i>	22
3.17 Reinos cruzados de RNAi entre patógenos y plantas	24
3.18 Herencia epigenética por RNAs no codificantes	26
3.19 Proceso adaptación de <i>P. capsici</i> a diversas plantas hospederas.....	28
3.20 Plasticidad fenotípica en patógenos por sRNAs	30
3.21 Variación de la patogenicidad y virulencia mediada por sRNAs en <i>P. capsici</i>	32
IV Metodología	33
4.1 Caracterización molecular de la cepa D3 de <i>Phytophthora capsici</i>	33
4.2 Caracterización morfológica de <i>Phytophthora capsici</i>	34

4.3 Obtención de inóculo de <i>Phytophthora capsici</i>	34
4.4 Ensayo de infección en hoja desprendida	34
4.5 Aislamiento primario de <i>Phytophthora capsici</i> derivado de ensayos de infección.....	35
4.6 Aislamiento secundario de <i>Phytophthora capsici</i> derivado de infección secundaria	35
4.7 Secuenciación de RNAs pequeños de aislados de <i>Phytophthora capsici</i>	38
4.8 Análisis bioinformáticos sRNA-seq de aislados secundarios	38
4.8.1 Análisis de poblaciones de RNAs pequeños	39
4.8.2 Identificación y análisis de potenciales microRNAs	40
4.8.3 Identificación de potenciales RNAs pequeños y miRNAs de Chile en aislados secundarios de <i>P. capsici</i>	42
4.8.4 Identificación del probable tráfico transgeneracional de RNAs pequeños y miRNAs de brócoli en el aislado A-br-ch de <i>P. capsici</i>	43
4.9 Identificación del potencial regulatorio del genoma de <i>P. capsici</i> LT1534 auxiliado por familias de miRNAs	44
4.10 Caracterización <i>in silico</i> de genes asociados a la biogénesis y el procesamiento de RNAs pequeños-miRNAs en <i>P. capsici</i> LT1534	44
4.11 Análisis de la expresión relativa de genes y miRNAs en <i>P. capsici</i>	46
V Resultados.....	49
5.1 Infección primaria causada por <i>P. capsici</i> D3.....	49
5.2 Infección secundaria causada por aislados primarios de <i>P. capsici</i>	49
5.4 Plasticidad fenotípica de conformación micelial en aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i>	54
5.5 Plasticidad morfológica de esporangios en aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i>	56
5.6 Correlación del crecimiento, patogenicidad y morfología en D3 y aislados primarios de <i>P. capsici</i>	58
5.7 Análisis de componentes principales de las variables patogenicidad, crecimiento y morfología en D3 y aislados primarios de <i>P. capsici</i>	60
5.8 Clusterización k-means en D3 y aislados primarios de <i>P. capsici</i>	61
5.9 Correlación del crecimiento, patogenicidad y morfología en D3, aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i>	62
5.10 Análisis de componentes principales de las variables crecimiento y morfología en D3, aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i>	64
5.11 Clusterización k-means en D3, aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i>	65
5.12 Análisis sRNA-seq de los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch de <i>P. capsici</i>	66

5.12.1 Identificación predictiva de reinos cruzados de sRNAs entre <i>P. capsici</i> y <i>Capsicum annuum</i>	82
5.12.2 Evidencia de memoria epigenética inducida <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> a través del tráfico de miRNAs y sRNAs a <i>P. capsici</i>	83
5.12.3 Evidencia de herencia epigenética transgeneracional mediado por sRNAs inducidos por el hospedero primario en el aislado br-ch de <i>P. capsici</i>	85
5.14 Identificación y reconstrucción filogenética de genes dicer-like, exportina 5, argonautas y RNA polimerasa dependiente de RNA en <i>P. capsici</i>	88
5.14.1 Reconstrucción filogenética de proteínas dicer-like.....	88
5.14.2 Reconstrucción filogenética de proteína exportina 5A	89
5.14.3 Reconstrucción filogenética de proteínas argonautas	90
5.14.4 Reconstrucción filogenética de proteínas RNA polimerasa dependiente de RNA	92
5.15 Validación de expresión relativa de genes y miRNAs en <i>Phytophthora capsici</i>	92
5.15.1 Análisis de expresión relativa de genes asociados a la biogénesis de miRNAs en <i>P. capsici</i>	93
5.15.2 Análisis de la expresión relativa de genes argonautas en <i>P. capsici</i>	95
5.15.3 Análisis de la expresión relativa de RDR-RNA Polimerasa dependiente de RNA en <i>P. capsici</i>	97
5.15.4 Análisis de expresión de genes asociados a la patogenicidad de <i>P. capsici</i>	97
5.15.5 Análisis de expresión de genes asociados a modificaciones de histonas.....	100
5.15.7 Análisis de co-expresión de miR65 y potencial gen target transposasa Tam3 ...	103
5.15.8 Análisis de co-expresión entre miR102 y miR65 de <i>P. capsici</i>	104
5.15.9 Matriz de correlación de Pearson del perfil de expresión de los genes y miRNAs evaluados por RT-qPCR en <i>P. capsici</i>	105
5.15.10 Análisis de componentes principales del perfil de expresión de genes y miRNAs evaluados por RT-qPCR en <i>P. capsici</i>	107
5.15.11 Clusterización K-means de perfiles de expresión de genes y miRNAs evaluados por RT-qPCR en <i>P. capsici</i>	108
5.15.12 Matriz de correlación entre características de crecimiento, patogenicidad, plasticidad fenotípica, genotípica, regulación génica en D3, A-chile y A-brócoli.....	110
VI Discusión.....	112
6.1 <i>P. capsici</i> modifica su virulencia después de infectar diversas especies vegetales	112
6.2 En las infecciones secundarias <i>P. capsici</i> modifica su virulencia dependiente del historial de infección.....	113
6.3 La especie vegetal e historial de infección inducen cambios en el crecimiento de <i>P. capsici</i>	115

6.4 La especie vegetal e historial infectivo inducen plasticidad fenotípica en la morfología del crecimiento colonial de <i>P. capsici</i>	116
6.5 <i>P. capsici</i> modifica la morfología de sus esporangios después de infectar varias especies vegetales por dos generaciones.....	118
6.6 En los aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i> existen varios tipos de correlación entre sus características plásticas.....	119
6.7 D3, aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i> se agrupan de acuerdo a sus características plásticas	119
6.8 <i>P. capsici</i> tiene poblaciones de sRNAs relacionados con el proceso de adaptación/aclimatación a especies vegetales.....	121
6.9 Las poblaciones de sRNAs de <i>P. capsici</i> tienen un extremo 5´ característico	122
6.10 <i>P. capsici</i> expresa diferencialmente sRNAs relacionados con el proceso de adaptación/aclimatación a diferentes hospederos	123
6.11 <i>P. capsici</i> tiene poblaciones de sRNAs asociados con la regulación de genes efectores del tipo elicitinas, RXLR, CRN y NLP	123
6.12 <i>P. capsici</i> tiene sRNAs y un miRNA asociados con la regulación enzimas modificadores de histonas y factores de transcripción	125
6.13 <i>P. capsici</i> tiene sRNAs asociados con la regulación de elementos transponibles	125
6.14 <i>P. capsici</i> tiene miRNAs reportados en miRBase diferencialmente expresados	127
6.15 <i>P. capsici</i> expresa potenciales miRNAs únicos que regulan diversos procesos celulares del desarrollo, patogénesis y evolución de su genoma	127
6.16 Existencia predictiva de reinos cruzados de sRNAs de <i>P. capsici</i> hacia <i>C. annuum</i>	130
6.17 Evidencia de memoria epigenética inducida por xeno-miRNAs de <i>C. annuum</i> hacia <i>P. capsici</i>	130
6.18 Evidencia de herencia epigenética transgeneracional en <i>P. capsici</i> inducido por sRNAs y miRNAs exógenos del hospedero primario.....	132
6.19 <i>P. capsici</i> codifica enzimas centrales en la biogénesis, transporte y procesamiento de sRNAs y miRNAs en su genoma.....	134
6.20 Las enzimas DCL de <i>P. capsici</i> están relacionadas filogenéticamente con otros oomicetos.....	135
6.21 La exportina-5A de <i>P. capsici</i> está relacionada con homólogas de otros oomicetos	136
6.22 <i>P. capsici</i> tiene seis enzimas argonautas relacionadas con otros oomicetos	136
6.23 La RDR de <i>P. capsici</i> se agrupa en un clado separado entre los oomicetos	137
6.24 Las enzimas centrales de biogénesis, transporte y procesamiento de sRNAs se expresan significativamente entre varios aislados de <i>P. capsici</i>	137

6.24.1 El hospedero e historial de infecciones reducen la expresión de DCL α en aislados de <i>P. capsici</i>	138
6.24.2 El hospedero e historial de infecciones disminuyen el nivel de expresión de DCL β en <i>P. capsici</i>	139
6.24.3 El hospedero e historial de infección/aislamiento de <i>P. capsici</i> producen disminución en la expresión de Exp5	140
6.24.4 El nivel de expresión relativa de genes argonautas cambia por el historial de infección y hospederos	141
6.24.5 Brócoli induce el aumento significativo de la expresión de RDR en <i>P. capsici</i> ...	142
6.25 La expresión de genes efectores asociados a sRNAs cambia en aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i>	143
6.26 <i>P. capsici</i> expresa diferencialmente enzimas modificadoras de histonas asociadas a sRNAs.....	144
6.27 Existe correlación negativa entre la expresión relativa de miR102 y Avr1b en <i>P. capsici</i>	145
6.28 Existe correlación negativa entre la expresión de miR65 y transposasa Tam3 en los aislados de <i>P. capsici</i>	145
6.29 Usualmente es positiva la correlación significativa entre los genes y miRNAs expresados relativamente en <i>P. capsici</i>	147
6.30 La expresión relativa de genes y miRNAs se agrupan por hospedero inmediato anterior en los aislamientos de <i>P. capsici</i>	147
6.31 Existe correlación entre la virulencia, crecimiento, plasticidad fenotípica con la expresión de genes y miRNAs inducida por el hospedero en <i>P. capsici</i>	148
Conclusiones	150
Perspectivas	152
Referencias bibliográficas	153
Índice de ANEXOS	177

Índice de figuras

Figura 1.	Infección causada por <i>P. capsici</i> en tejidos de varias especies vegetales.	7
Figura 2.	Características morfológicas de <i>P. capsici</i> .	8
Figura 3.	Patrón de crecimiento colonial de <i>P. capsici</i> .	9
Figura 4.	Ciclo de vida e infección de <i>P. capsici</i> .	11
Figura 5.	Biogénesis, procesamiento y actividad regulatoria de miRNAs-sRNAs en <i>Phytophthora</i> .	23
Figura 6.	Reinos cruzados de RNAi entre plantas-patógenos.	26
Figura 7.	Diagrama general de infección y aislamiento de <i>P. capsici</i> durante dos generaciones.	36
Figura 8.	Infección primaria en hojas de chile, pepino, brócoli y frijol.	49
Figura 9.	Medición de infección primaria y secundaria causado por aislados de <i>P. capsici</i> en hojas de chile, pepino, brócoli y frijol.	50
Figura 10.	Fenotipo del desarrollo de infección causado por D3 y aislados primarios de <i>P. capsici</i> en hoja de chile pepino brócoli y frijol a las 48 hdi.	52
Figura 11.	Crecimiento diametral de D3, aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i> .	53
Figura 12.	Plasticidad fenotípica de micelio en aislados de <i>P. capsici</i> .	55
Figura 13.	Plasticidad morfológica de esporangios en aislados de <i>P. capsici</i> .	57
Figura 14.	Matriz de correlación de Pearson de características de crecimiento, patogenicidad y morfológicas de aislados primarios.	59
Figura 15.	Análisis de componentes principales de D3 y aislados primarios de <i>P. capsici</i>	60
Figura 16.	Clusterización k-means de D3 y aislados primarios de <i>P. capsici</i> .	62
Figura 17.	Matriz de correlación de Pearson del crecimiento y fenotipo macroscópico y microscópico de aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i> .	63
Figura 18.	Análisis de componentes principales de D3, aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i> .	64
Figura 19.	Clusterización por k-means de D3, aislados primarios y secundarios.	65
Figura 20.	Modelo gráfico de k-means normalizados de clústers en D3, aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i> .	66
Figura 21.	Características de small RNAs de A-ch-ch y A-br-ch.	67
Figura 22.	Small RNAs asociados a regiones genómicas de <i>P. capsici</i> y nucleótido 5'P de sRNAs.	68
Figura 23.	sRNAs diferencialmente expresados asociados a genes de <i>P. capsici</i> .	69
Figura 24.	Enriquecimiento KEEG de sRNAs diferencialmente expresados asociados a genes de <i>P. capsici</i> en A-br-ch con respecto a A-ch-ch.	70
Figura 25.	Identificación de miRNAs anotados en miRBase v22.	71
Figura 26.	Potenciales miRNAs de <i>P. capsici</i> compartidos con diversas especies de organismos.	72
Figura 27.	miRNAs diferencialmente expresados anotados en miRBase v22.	72
Figura 28.	Diagrama de Venn miRNAs identificados <i>de novo</i> y familias de genes MIR en A-ch-ch y A-br-ch.	73

Figura 29.	Relaciones filogenéticas de familias de genes MIR en A-ch-ch	73
Figura 30.	Relaciones filogenéticas de familias de genes MIR en A-br-ch	74
Figura 31.	Análisis de expresión de miRNAs <i>de novo</i> y sus potenciales genes target	75
Figura 32.	Modelo de perfil regulatorio mediado por potenciales miRNAs en aislados de <i>P. capsici</i> .	76
Figura 33.	sRNAs asociados a genes efectores de <i>P. capsici</i> .	77
Figura 34.	Nivel de expresión sRNAs asociados a genes efectores CRN, elicinas, NLP y RxLR en A-ch-ch y A-br-ch	78
Figura 35.	Características de miRNAs homólogos A-ch-ch_102 y A-br-ch_214.	78
Figura 36.	Potencial sitio de regulación del gen efector target Avr1b de A-ch-ch_102 y A-br-ch_214 en <i>P. capsici</i> .	79
Figura 37.	sRNAs asociados a genes modificadores de histonas de <i>P. capsici</i> .	79
Figura 38.	Características de sRNAs asociados a regiones de elementos transponibles en <i>P. capsici</i> .	80
Figura 39.	Características de A-ch-ch_65 y potencial gen target Transposasa Tam3 (familia Ac).	81
Figura 40.	Potenciales sRNAs y miRNAs de <i>P. capsici</i> asociados a regular genes susceptibles de <i>C. annuum</i>	82
Figura 41.	Modelo de memoria epigenética en <i>P. capsici</i> inducida por <i>C. annuum</i> .	84
Figura 42.	sRNAs y miRNAs asociados a <i>C. annuum</i> .	84
Figura 43.	sRNAs asociados a <i>C. annuum</i> relacionados con otras especies vegetales.	85
Figura 44.	Herencia epigenética en <i>P. capsici</i> inducida por el aislado primario.	86
Figura 45.	Características de potenciales sRNAs, miRNAs asociados a <i>Brassica oleraceae</i> .	86
Figura 46.	sRNAs asociados a <i>Brassica oleraceae</i> en A-br-ch relacionados con otras especies vegetales.	87
Figura 47.	Predicción de locus de miR8788 homólogo alojado en el genoma de <i>P. capsici</i> .	88
Figura 48.	Filogenia de proteínas Dicer-like de <i>P. capsici</i>	89
Figura 49.	Filogenia de proteínas exportina 5 de <i>P. capsici</i> .	90
Figura 50.	Filogenia de proteínas Argonautas de <i>Phytophthora capsici</i> .	91
Figura 51.	Filogenia de proteína RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR) de <i>P. capsici</i> .	92
Figura 52.	Nivel de expresión relativa de los genes DCL α , Exportina 5A y DCL β de <i>P. capsici</i> .	94
Figura 53.	Nivel de expresión de genes argonautas de <i>P. capsici</i> .	96
Figura 54.	Nivel de expresión relativa del gen RNA polimerasa dependiente de RNA	97
Figura 55.	Nivel de expresión de genes efectores de <i>P. capsici</i> .	98
Figura 56.	Nivel de expresión de genes modificadores de histonas de <i>P. capsici</i> .	101
Figura 57.	Nivel de expresión de Avr1b y A-ch-ch-102 de <i>P. capsici</i>	102
Figura 58.	Nivel de co-expresión relativa de A-ch-ch_65 y transposasa Tam3 de <i>P. capsici</i>	103
Figura 59.	Niveles de expresión de A-ch-ch_102 y A-ch-ch_65 de <i>P. capsici</i>	104

Figura 60.	Matriz de correlación de Pearson del perfil de expresión de los genes y miRNAs evaluados por RT-qPCR en <i>P. capsici</i> .	106
Figura 61.	Análisis de componentes principales de perfiles de expresión de genes y miRNAs evaluados por RT-qPCR en cinco aislados de <i>P. capsici</i>	107
Figura 62.	Clusterización K-means de perfiles de expresión de genes evaluados por RT-qPCR en cinco aislados de <i>P. capsici</i> .	109
Figura 63.	Matriz de correlación entre características de desarrollo, patogenicidad, fenotípicas y genotípicas en D3, A-chile y A-brócoli de <i>P. capsici</i> .	110

Índice de abreviaturas

°C	Grado centígrado
µL	Microlitro
3'UTR	Región 3' no traducida (3'Untranslated Region)
A-br-br	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de brócoli ocasionado por A-brócoli
A-br-ch	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de chile ocasionado por A-brócoli
A-br-fr	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de frijol ocasionado por A-brócoli
A-brócoli	Aislado primario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección primaria en hoja de brócoli ocasionada por D3
A-br-pe	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de pepino ocasionado por A-brócoli
A-ch-br	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de brócoli ocasionado por A-chile
A-ch-ch	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de chile ocasionado por A-chile
A-ch-fr	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de frijol ocasionado por A-chile
A-chile	Aislado primario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección primaria en hoja de chile ocasionada por D3
A-ch-pe	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de pepino ocasionado por A-chile
A-fr-br	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de brócoli ocasionado por A-frijol
A-fr-ch	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de chile ocasionado por A-frijol
A-fr-fr	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de frijol ocasionado por A-frijol
A-frijol	Aislado primario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección primaria en hoja de frijol ocasionada por D3
A-fr-pe	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de pepino ocasionado por A-frijol
AGO	Proteína argonauta
AGO-A	Argonauta A de <i>P. capsici</i>
AGO-B	Argonauta B de <i>P. capsici</i>
AGO-C	Argonauta C de <i>P. capsici</i>
AGO-D	Argonauta D de <i>P. capsici</i>
AGO-E	Argonauta E de <i>P. capsici</i>
AGO-F	Argonauta F de <i>P. capsici</i>
ANOVA	Análisis de Varianza (Analysis Of Variance)

A-pe-br	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de brócoli ocasionado por A-pepino
A-pe-ch	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de chile ocasionado por A-pepino
A-pe-fr	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de frijol ocasionado por A-pepino
A-pe-pe	Aislado secundario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección secundaria en hoja de pepino ocasionado por A-pepino
A-pepino	Aislado primario de <i>P. capsici</i> recuperado de infección primaria en hoja de pepino ocasionada por D3
BcsRNA	RNA pequeño de <i>Botrytis cinérea</i>
cDNA	DNA copia o complementario (copy DNA)
cm	Centímetro
CRN	Efector Crinkler
Ct	Ciclo de umbral (Cycle threshold)
D3	Cepa caracterizada de <i>P. capsici</i> considerada como control obtenida de cultivos de chile
DCL1	Enzima Dicer-like 1
DCL2	Enzima Dicer-like 2
DCLα	Enzima Dicer-like α de <i>P. capsici</i>
DCLβ	Enzima Dicer-like β de <i>P. capsici</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
DNAg	DNA genómico
dNTP's	desoxi-Nucléotidos trifosfatos
DO	Densidad óptica
dsRNA	RNA de doble cadena (double strand RNA)
EF-1α	Factor de elongación de la transcripción 1 α
EGasas	endo- β -1,3-glucanasas
ETI	Inmunidad Desencadenada por Efectores (Effector Triggered Immunity)
ETS	Susceptibilidad desencadenada por efectores (Effectors Triggered Susceptibility)
EV	Vesícula extracelular (Extracellular vesicle)
Exp5	Exportina 5
Exp5A	Enzima exportina 5A de <i>P. capsici</i>
GIP1	Efector GIP1:Proteína inhibidora de glucanasas (Glucanase Inhibitor Protein)
gr	Gramo
hdi	Horas después de la inoculación
HdM-1	Enzima histona desmetilasa-1 de <i>P. capsici</i>
HdM-2	Enzima histona desmetilasa-2 de <i>P. capsici</i>
HdM-3	Enzima histona desmetilasa-3 de <i>P. capsici</i>
HIGS	Silenciamiento génico inducido por el huésped (Host-Induced Gene Silencing)
H-metilasa	Enzima histona metilasa de <i>P. capsici</i>
HR	Respuesta hipersensible (Hipersensible Response)

I-br-br	Infección secundaria en hoja de brócoli ocasionada por A-brócoli
I-br-ch	Infección secundaria en hoja de chile ocasionada por A-brócoli
I-br-fr	Infección secundaria en hoja de frijol ocasionada por A-brócoli
I-brócoli	Infección primaria en hoja de brócoli ocasionada por <i>P. capsici</i> D3
I-br-pe	Infección secundaria en hoja de pepino ocasionada por A-brócoli
I-ch-br	Infección secundaria en hoja de brócoli ocasionada por A-chile
I-ch-ch	Infección secundaria en hoja de chile ocasionada por A-chile
I-ch-fr	Infección secundaria en hoja de frijol ocasionada por A-chile
I-chile	Infección primaria en hoja de chile ocasionada por <i>P. capsici</i> D3
I-ch-pe	Infección secundaria en hoja de pepino ocasionada por A-chile
I-fr-br	Infección secundaria en hoja de brócoli ocasionada por A-frijol
I-fr-ch	Infección secundaria en hoja de chile ocasionada por A-frijol
I-fr-fr	Infección secundaria en hoja de frijol ocasionada por A-frijol
I-frijol	Infección primaria en hoja de frijol ocasionada por <i>P. capsici</i> D3
I-fr-pe	Infección secundaria en hoja de pepino ocasionada por A-frijol
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
I-pe-br	Infección secundaria en hoja de brócoli ocasionada por A-pepino
I-pe-ch	Infección secundaria en hoja de chile ocasionada por A-pepino
I-pe-fr	Infección secundaria en hoja de frijol ocasionada por A-pepino
I-pe-pe	Infección secundaria en hoja de pepino ocasionada por A-pepino
I-pepino	Infección primaria en hoja de pepino ocasionada por <i>P. capsici</i> D3
ITS	Regiones Espaciadoras Internas (Internal Transcribed Spacers)
JGI	Join Genome Institute
L	Litro
LOH	Perdida de heterocigocidad (Lost-Heterocigosity)
MB	Mega bases
mg	miligramo
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
miRNA	micro RNA (RNA no codificante)
mL	Mililitro
MLSA	Análisis de secuencias multilocus (Multilocus Sequence Analysis)
mm	Milímetro
mM	Mili molar
mm²	Milímetro cuadrado
mtDNA	DNA mitocondrial (mitochondrial DNA)
NB-LRR	Repeticiones ricas en leucina de unión a nucleótidos (Nucleotide binding-Leucine Repeats Rich)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEP1	Proteína inductora de necrosis y etileno 1 (Necrosis and Ethylene-Inducing Proteins)
NLP	Proteína inductora de Necrosis (Necrosis-inducing Protein)

Nm	Nanómetro
nt	Nucleótido
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns)
PCA	Análisis de Componentes Principales (Principal component analysis)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
piRNA	RNA pequeño que interactúa con Piwi (Piwi interacting RNA)
PRR	Receptores de PAMPs (PAMPs Receptor Recognition)
PTGS	Silenciamiento génico postranscripcional (Post-transcriptional gene silencing)
PTI	Inmunidad Activada por PAMPs (PAMPs-triggered immunity)
PTM	Modificación post-traducciona de histona (Posttranslational histone Modification)
RdDM	Metilación de DNA dependiente de RNA
RDR	RNA polimerasa dependiente de RNA
RIN	Número de Integridad de RNA (RNA Integrity Number)
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RNA Induced Silence Complex)
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
RNAi	Vía del RNA interferente (RNA interference)
RNAm	RNA mensajero
RNAnc	RNA no codificante
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR cuantitativo en tiempo real (Real-time quantitative PCR)
RXLR	Aminoácidos Arg-X-Leu-Arg, donde X es cualquier residuo
siRNA	RNA pequeño de interferencia (small interference RNA)
SNP	Polimorfismos de un sólo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism)
sRNAs	RNAs pequeños (small RNAs)
sRNA-seq	Secuenciación masiva de RNAs pequeños
srRNA	RNA pequeño ribosomal (small ribosome RNA)
ssRNAs	RNAs monocatenarios (single strand RNA)
stRNA	RNA pequeño de transferencia (small transference RNA)
TEs	Elementos transponibles (Transponible elements)
TGS	Silenciamiento génico transcripcional (Transcriptional Gene Silencing)
TMM	Media truncada de M-valores (Trimmed mean of M)
V8CA+	Medio de cultivo V8-Agar clarificado adicionado con antibióticos

Resumen

Phytophthora capsici es un oomiceto patógeno de plantas que causa pérdidas millonarias anualmente alrededor del mundo. Produce síntomas de marchitamiento y pudrición en los distintos órganos de las más de 50 especies vegetales que afecta. Esta capacidad de infectar diversos hospederos podría involucrar mecanismos epigenéticos de regulación génica que le permiten evadir el sistema inmune de la planta hospedera, pudiendo presentar en algunos casos variación en la patogenicidad, virulencia y plasticidad fenotípica. Entre estos mecanismos de regulación epigenética se encuentra el silenciamiento de genes por RNAs pequeños (sRNAs) como los microRNAs.

Esta investigación consistió en estudiar mediante sRNA-seq el papel de los sRNAs y miRNAs en la regulación de la expresión de genes en la cepa D3 de *P. capsici* asociados con la patogenicidad, virulencia y plasticidad fenotípica. Se utilizaron infecciones de hojas de chile (*Capsicum annuum* var. *annuum*), pepino (*Cucumis sativus*), brócoli (*Brassica oleraceae* var. *italica*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*); y mediante RT-qPCR se validó el nivel de expresión de genes asociados a la patogenicidad, elementos transponibles, metilación y desmetilación de histonas, biogénesis, transporte y procesamiento de sRNAs-miRNAs, así como un par de potenciales miRNAs con su gen target.

El análisis de virulencia indicó que *P. capsici* modifica su capacidad patogénica al infectar diversas especies vegetales. Además, presentó cambios significativos en el crecimiento, morfología colonial y esporangios. Estos cambios de la virulencia y características plásticas se consideran un posible mecanismo de adaptación/aclimatación del oomiceto a varias especies vegetales.

Los análisis de sRNA-seq revelaron que *P. capsici* tiene principalmente dos poblaciones de sRNAs de 20-22nt y 25nt, los cuales se asociaron a las vías de regulación basadas en miRNAs y RNAi, respectivamente. Además, se identificaron poblaciones de sRNAs asociados a genes efectores, modificadores de histonas, elementos transponibles y diversos procesos celulares, algunos diferencialmente expresados. Entre éstos, se identificó a un miRNA de *P. capsici* homólogo al miR8788 de *P. infestans* que contribuye a la virulencia. Además, se identificaron miRNAs *de novo* con potenciales genes target específicos.

Fueron identificados los genes centrales de la biogénesis, transporte y procesamiento de RNAs pequeños en *P. capsici* conformados por DCL α , DCL β , Exp5A, seis AGO y RDR, relacionados filogenéticamente con homólogos de otros oomicetos. El análisis de su nivel de expresión relativa mostró variación significativa en el patógeno aislado de los distintos hospederos. Además, se analizó la expresión de genes efectores tipo elicinas, RXLR, CRN y NLP, así como de genes que codifican para metilasas y desmetilasas de histonas.

Se encontró una correlación negativa entre la expresión relativa de miR102 y su potencial gen blanco el efector Avr1b, así como de miR65 y su gen blanco transposasa Tam3 con expresión diferente en cada condición evaluada, sugiriendo que ambos miRNAs podrían estar regulando sus genes blanco respectivos. Estos resultados muestran el papel importante que tienen los

miRNAs en *P. capsici* como mecanismo epigenético hacia el proceso de adaptación/aclimatación a diferentes especies vegetales.

Abstract

Phytophthora capsici is a plant pathogenic oomycete that causes millions in losses annually around the world. It produces symptoms of wilting and rot in the different organs of the more than 50 plant species it affects. This ability to infect various hosts could involve epigenetic gene regulation mechanisms that allow it to evade the host plant's immune system, and in some cases may present variation in pathogenicity, virulence, and phenotypic plasticity. Among these epigenetic regulation mechanisms is gene silencing by small RNAs (sRNAs) such as microRNAs.

This research consisted of studying by sRNA-seq the role of sRNAs and miRNAs in the regulation of gene expression in the D3 strain of *P. capsici* associated with pathogenicity, virulence, and phenotypic plasticity. Infections of chili pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*), cucumber (*Cucumis sativus*), broccoli (*Brassica oleraceae* var. *italica*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves were used; and using RT-qPCR, the expression level of genes associated with pathogenicity, transposable elements, histone methylation and demethylation, biogenesis, transport and processing of sRNAs-miRNAs, as well as a pair of potential miRNAs with their target gene, were validated.

The virulence analysis indicated that *P. capsici* modifies its pathogenic capacity when infecting various plant species. In addition to presenting significant changes in growth, and colonial morphology and sporangia. These changes in virulence and plastic characteristics are considered a possible adaptation/acclimatization mechanism of the oomycete to various plant species.

sRNA-seq analyzes revealed that *P. capsici* mainly has two populations of sRNAs of 20-22nt and 25nt, which were associated with miRNA-based and RNAi-based regulatory pathways, respectively. In addition, populations of sRNAs associated with genes involved in various cellular processes, effector genes, histone modifiers, and transposable elements, some differentially expressed, were identified. Among these, a *P. capsici* miRNA homologous to *P. infestans* miR8788 that contributes to virulence was identified. In addition, de novo miRNAs with potential specific target genes were identified.

The central genes of the biogenesis, transport and processing of small RNAs in *P. capsici*, made up of DCL α , DCL β , Exp5, six AGO and RDR, phylogenetically related to homologues of other oomycetes, were identified. The analysis of its relative expression level showed significant variation in the pathogen isolated from the different hosts. In addition, the expression of effector genes such as elicitors, RXLR, CRN and NLP were analyzed, as well as genes that code for histone methylases and demethylases.

A negative correlation was found between the relative expression of miR102 and its potential target gene, the Avr1b effector, as well as miR65 and its target gene transposase Tam3 with different expression in each condition evaluated, suggesting that both miRNAs could be regulating their respective target genes. These results show the important role that miRNAs have in *P. capsici* as an epigenetic mechanism towards the adaptation/acclimatization process to different plant species.

I Introducción

P. capsici representa una amenaza importante para la seguridad alimentaria debido a la infección que provoca en distintos cultivos agrícolas susceptibles. Para comprender y ayudar a controlar los efectos devastadores que causa este patógeno es importante ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la interacción con sus hospederos. Sin embargo, la mayoría de los estudios que se han realizado en este microorganismo corresponden a su desarrollo e infección en plantas, son pocas las investigaciones que se enfocan en estudiar las características fenotípicas y procesos moleculares del patógeno después de la infección, principalmente aquellas en donde la regulación epigenética podría tener un papel importante.

Este trabajo de investigación plantea el tema de la regulación génica mediada por mecanismos epigenéticos a través de microRNAs en el oomiceto fitopatógeno *Phytophthora capsici* aislado de infecciones secuenciales en solanáceas (chile, *Capsicum annuum*, var. *Annuum* L.), cucurbitáceas (pepino, *Cucumis sativus*), brassicáceas (brócoli, *Brassica oleraceae* var. *Itálica*) y fabáceas (frijol, *Phaseolus vulgaris*).

Hasta el momento, se desconoce el papel e importancia que pueden tener los miRNAs, así como los genes asociados a su biogénesis y procesamiento sobre la regulación de genes y elementos genómicos en *P. capsici*. Incluso dentro del género *Phytophthora* es reducida la información sobre la función que tienen los miRNAs durante la infección y el proceso de adaptación/aclimatación a diferentes especies vegetales. El estudio de dichos elementos no codificantes y sus genes blanco en *P. capsici* puede brindar conocimiento relevante acerca de los mecanismos de regulación epigenética mediados por miRNAs-sRNAs después de infectar cada especie vegetal, así como información útil que pueda ayudar a dilucidar su importancia en la regulación de efectores, en el desarrollo y la diversificación de su patogenicidad, para comprender mejor la biología de este patógeno y contribuir en la búsqueda de estrategias para su control.

En la presente investigación se evaluó la patogenicidad y virulencia de la cepa D3 de *P. capsici* sobre hojas de chile, pepino, brócoli y frijol, a través de infecciones primarias y posteriormente en infecciones secundarias con el patógeno aislado de cada uno de los hospederos. Se evaluó también, el crecimiento, plasticidad fenotípica colonial y de esporangios como mecanismo inicial adaptativo/aclimatación a las diferentes especies vegetales, a través de la modificación de su patogenicidad y plasticidad fenotípica. Mediante secuenciación masiva de RNAs pequeños utilizando la tecnología Illumina y análisis bioinformáticos, se identificaron patrones de expresión y de regulación génica mediados por potenciales miRNAs y sRNAs. Se evaluó experimentalmente la expresión de dichos RNAs no codificantes, así como de genes que codifican proteínas asociadas a su biogénesis, transporte y procesamiento, con el fin de establecer una relación entre la variación de la patogenicidad del oomiceto con su crecimiento, morfología y aspectos de regulación génica de miRNAs y sRNAs.

II Pregunta de investigación

¿Existirán miRNAs que modulan la variación de la patogenicidad y el fenotipo de *P. capsici* después de la interacción con diferentes especies vegetales?

2.2 Objetivo general

Identificar el papel de los microRNAs y genes asociados a su biogénesis y procesamiento sobre la patogenicidad y plasticidad fenotípica de *Phytophthora capsici* después de infectar diferentes hospederos.

2.3 Objetivos específicos

1. Caracterizar la patogenicidad, virulencia y fenotipo de *P. capsici* después de infectar por dos generaciones hojas de chile, pepino, brócoli y frijol.
2. Identificar la relación entre historial de infección, virulencia y plasticidad fenotípica de *P. capsici* aislado de chile, pepino, brócoli y frijol.
3. Analizar mediante sRNA-seq la expresión de miRNAs de *P. capsici* aislado de distintos hospederos.
4. Analizar el nivel de expresión relativa mediante RT-qPCR de potenciales miRNAs y su posible gen blanco, así como de genes asociados a la biogénesis y procesamiento de miRNAs de *P. capsici*.
5. Identificar la relación de expresión de miRNAs, genes asociados a su biogénesis y procesamiento con la patogenicidad y plasticidad fenotípica de *P. capsici*.

III Antecedentes

3.1 Generalidades de los oomicetos

Los oomicetos forman un linaje antiguo del reino Chromista (Kamoun, 2006, 2007), los cuales son organismos eucariotas que incluyen una gran cantidad de patógenos de plantas que amenazan ecosistemas naturales (Kamoun et al., 2015). Superficialmente se asemejan a los hongos filamentosos, pero están filogenéticamente relacionados con organismos acuáticos como las diatomeas y las algas pardas (Gunderson et al., 1987; Jiang & Tyler, 2012; K. Lamour & Kamoun, 2009; Thines, 2014; Thines & Kamoun, 2010).

La evidencia fósil indica que varios oomicetos surgieron como endófitos de plantas terrestres en el período Carbonífero, hace aproximadamente 300–350 millones de años (Krings et al., 2011). El impacto de los oomicetos en la humanidad está bien documentado como una amenaza persistente para la agricultura comercial, de subsistencia y como patógenos destructivos de las plantas nativas (Agrios, 2005; D. C. Erwin & Ribeiro, 1996; K. Lamour & Kamoun, 2009).

Dentro de los oomicetos se encuentra el género *Phytophthora*, constituido por más de cien especies reportadas (Stam et al., 2013), el cual contiene algunos de los patógenos de plantas más notorios como *Phytophthora infestans*, agente causal del tizón tardío de la papa que fue responsable de la Gran Hambruna Irlandesa a mediados del siglo XIX (B. J. Haas et al., 2009). *Phytophthora ramorum* que representa una gran amenaza forestal al causar la muerte súbita del roble (Hüberli & Garbelotto, 2012), *Phytophthora sojae* por ser el segundo patógeno más destructivo de la soya (Tyler BM, 2007); y considerado como el siguiente oomiceto patógeno más devastador se encuentra *P. capsici* (Kamoun et al., 2015), el cual es el organismo principal de interés en esta investigación.

3.2 *Phytophthora capsici*

Phytophthora capsici fue descrito por primera vez por Leon H. Leonian en la Estación de Investigación Agrícola de Nuevo México, Las Cruces en 1922 (L. H. Leonian, 1922). En su informe, describió una nueva especie de *Phytophthora* que causó daños considerables a las plantas de Chile en el otoño de 1918. Un año después, la enfermedad reapareció en el mismo sitio y también afectó las áreas circundantes (Kreutzer W. A., 1937). Originalmente se pensó que era patógeno específico de Chile, pero pronto se informó sobre jitomate, berenjena, pepino, melón, calabaza y más recientemente en frijol (Davidson et al., 2002; A. Gevens & Hausbeck, 2004; Kreutzer et al., 1940; kreutzer W. A., 1937; Kreutzer & Bryant, 1946; Tompkins & Tucker, 1937; Wiant, 1940).

Phytophthora capsici provoca la pudrición de la raíz, corona, hojas y el fruto en varias hortalizas importantes por lo que causa pérdidas económicas significativas en todo el mundo. Tan solo en 2010, se sembraron 77 850 acres de Chile y pimiento morrón en E. U. con un valor estimado de \$ 772 millones, los cuales se vieron afectados por el oomiceto. Dado que las epidemias de *P. capsici* causan daños en otros cultivos hospedantes importantes como jitomate, berenjena, frijol y cucurbitáceas en diversas regiones de cultivo importantes de América Central y del Sur, el sur de Europa y Asia, la pérdida de la producción mundial de estos vegetales amenazados cada año se valora en más de mil millones de dólares (D. C. Erwin &

Ribeiro, 1996; A. J. Gevens et al., 2008; L. H. Leonian, 1922; K. H. Lamour & Hausbeck, 2001; K. Lamour & Kamoun, 2009; Meitz et al., 2010).

Una vez introducido en un sitio de campo, *P. capsici* es difícil de controlar y, a menudo, imposible de erradicar (Gobena et al., 2012; K. H. Lamour & Hausbeck, 2000). Se ha tratado de controlar la enfermedad del tizón en campos infestados por el patógeno mediante la aplicación de fungicidas como el metalaxil, sin embargo, diversas cepas se han vuelto resistentes, además que la aplicación indiscriminada de estos compuestos representan un impacto ambiental significativamente negativo por la contaminación que causan. Por otro lado, los síntomas de enfermedad que causa el oomiceto varían considerablemente según la especie vegetal, la parte de la planta infectada y las condiciones ambientales, mostrado en la figura 1 (K. H. Lamour, Stam, et al., 2012).

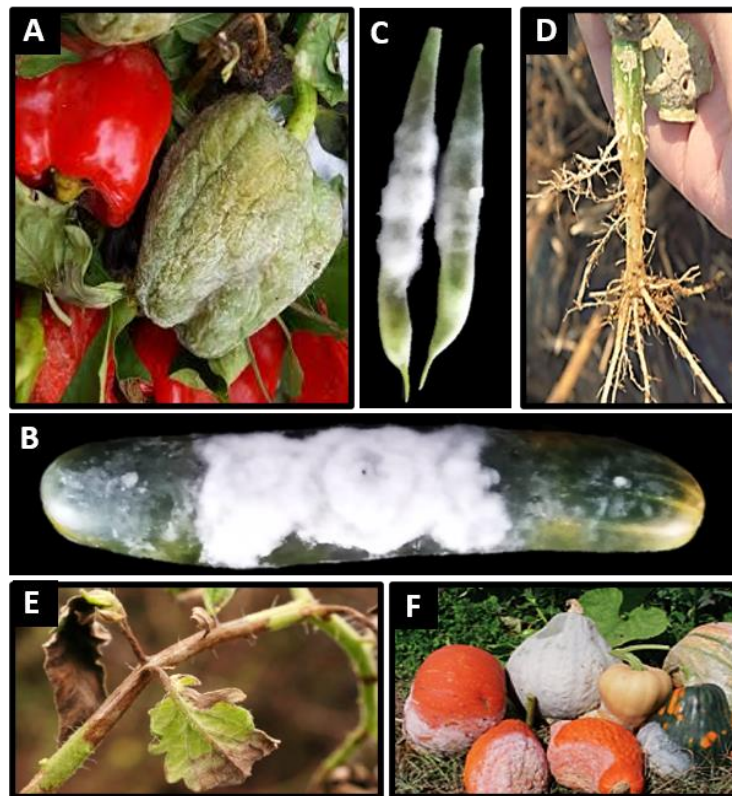


Figura 1. Infección causada por *P. capsici* en tejidos de varias especies vegetales. **A:** Tizón del chile causado por *P. capsici*, obtenido de (Lamour, K. H, et al., 2012). **B:** Infección de pepino causado por *P. capsici* D3, imagen obtenida de esta investigación. **C:** Micelio aéreo creciendo sobre vainas de frijol infectadas por *P. capsici* D3, obtenido de esta investigación. **D:** Síntomas de infección en la base de raíz necrosada de cucurbitácea causada por *P. capsici*, obtenido de (Lamour, K. H, et al., 2012). **E:** Infección de hojas y tallo de jitomate causado por *P. capsici*, obtenido de (Kurt, et al., 2012). **F:** Infección en fruto de calabaza con crecimiento aéreo de *P. capsici*, obtenido de (Lamour, K. H, et al., 2012).

Durante los últimos noventa años *P. capsici* se ha extendido geográficamente a medida que se ha intensificado el cultivo agrícola a varias partes del mundo como Estados Unidos, México, Perú, Argentina, China, Sudáfrica, entre otros; adaptándose dinámicamente a nuevos hospederos (D. C. Erwin & Ribeiro, 1996; A. J. Gevens et al., 2008; Gobena et al., 2012;

Hausbeck & Lamour, 2004; Hurtado-González et al., 2008; L. H. Leonian, 1922; K. H. Lamour, Stam, et al., 2012; K. H. Lamour & Hausbeck, 2001; K. Lamour & Kamoun, 2009).

La clasificación taxonómica de *P. capsici* lo incluye en el reino de los Chromistas, formando parte del Phylum Oomycota, en la clase de los oomicetos, del orden de los Peronosporales, en la familia Peronosporaceae, dentro del género *Phytophthora* y especie denominada como *capsici* (Schoch et al., 2020). Dentro de los 10 clados principales en que se agrupan los oomicetos, *P. capsici* se encuentra en el clado 2 (Blair et al., 2008), estrechamente relacionado con *P. tropicalis* y *P. mexicana* (Aragaki & Uchida, 2001; Blair et al., 2008).

3.3 Características morfológicas y fisiológicas de *P. capsici*

Los caracteres morfológicos que definen a *P. capsici* son la constitución de hifas y micelio cenocítico e hialino, es decir sin septos y continuo, con paredes celulares paralelas donde pueden observarse abundantes gotas oleaginosas. *P. capsici* se puede reproducir de manera sexual a través de la fusión de estructuras sexuales denominadas anteridio (masculino) y oogonio (femenino), para desarrollar oosporas de paredes gruesas. En su reproducción asexual, produce esporangios los cuales son pequeños sáculos predominantemente papilados con forma variante desde casi esférica a elongada, con una base estrechada en algunos casos y pedicelos largos. Dentro de los esporangios se albergan las zoosporas, las cuales son células especializadas en la dispersión de la enfermedad, caracterizadas por la presencia de un par de flagelos que le permiten moverse, mostrado en la figura 2 (K. H. Lamour, Stam, et al., 2012).

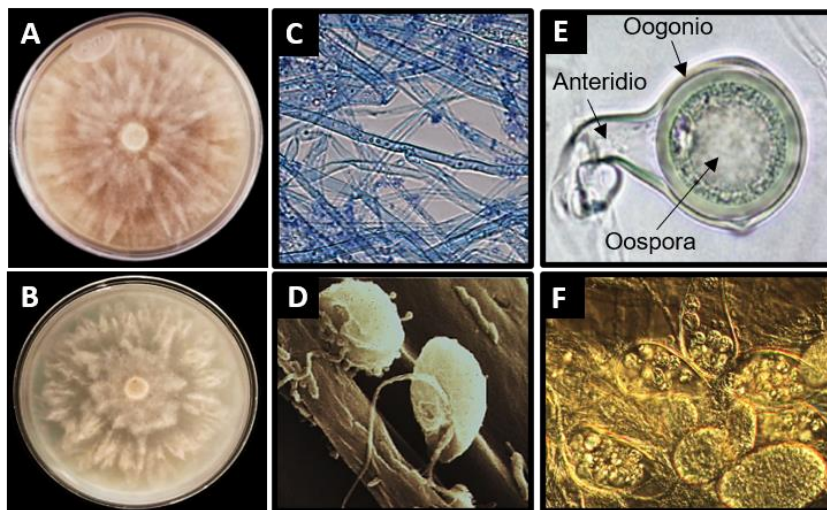


Figura 2. Características morfológicas de *P. capsici*. **A:** Morfología colonial de tipo estrellada de *P. capsici* D3 en medio V8, obtenida de esta investigación. **B:** Morfología colonial en roseta de *P. capsici* D3, obtenido de esta investigación. **C:** Micelio aéreo de *P. capsici* D3, obtenido de análisis propios de esta investigación. **D:** Zoosporas de *P. capsici*, vista bajo microscopio electrónico de barrido, imagen obtenida de (Shew & Mendoza-Moran, 2016). **E:** Oospora de *P. capsici*, imagen modificada de (Jung et al., 2017). **F:** Esporangios de *P. capsici* D3 con zoosporas, imagen obtenida de esta investigación.

Sus características fisiológicas más destacadas es la temperatura de crecimiento de 10°C mínima, 28°C óptima y 35°C máxima, abundancia de esporulación en medios líquidos y puede producir engrosamientos hifales. El aspecto de las colonias en medios de cultivo sólidos se clasifican de acuerdo con el patrón micelial y ramificación de hifas, las cuales pueden ser en su mayoría de tipo estrellado y menor abundancia de forma petaloide, en roseta, irregular,

concéntrico, con micelio aéreo ralo (poco poblado), harinoso o algodonoso, mostrado en la figura 3 (D. C. Erwin & Ribeiro, 1996).



Figura 3. Patrón de crecimiento colonial de *P. capsici* en medio V8 de tipo: sin patrón, estrellado, radial, crisantemo, petaloide y crecimiento lento con morfología ralo, imagen obtenida de (Abad G. *et al.*, 2019).

3.4 Ciclo de vida e infeccioso de *Phytophthora capsici*

P. capsici es un patógeno de suelo que tiene reproducción mixta ya que se puede reproducir de manera asexual o sexual (McDonald & Linde, 2002). Para ésta última al ser una especie heterotálica con aislamientos que tienen uno de dos tipos de apareamiento designados como A1 y A2, se requiere que ambos estén muy cerca para que ocurra el apareamiento, así como la producción de gametangios tanto masculinos (anteridios) como femeninos (oogoniales) dentro de cada uno de los aislamientos A1 y A2, además de crecimiento de los anteridios a través del gametangio oogonial (D. C. Erwin & Ribeiro, 1996; Ko, 1988).

La meiosis se produce en los gametangios y los núcleos haploides se transportan al oogonio a través de un tubo de fertilización. Este proceso ocurre dentro de 3 a 5 días en condiciones de laboratorio y conduce a la producción de oosporas anfíginas de paredes gruesas distintivas. Las oosporas formadas en el campo pueden persistir en el suelo durante años y son resistentes a las duras condiciones ambientales (Bowers *et al.*, 1990; Lamour & Hausbeck, 2003).

Las oosporas requieren generalmente de un período de latencia indeterminado aproximadamente de más de 8 semanas y, dependiendo de los padres, las oosporas germinan para producir tubos germinativos que se ramifican en un micelio típico y/o producen esporangios en pedicelos largos o pueden producir descendencia sexual viable cuando se cruzan *in vitro* (D. C. Erwin & Ribeiro, 1996).

Cuando ambos tipos de apareamiento están presentes en el mismo campo, se producen oosporas que permiten que el patógeno sobreviva durante años en el suelo, incluso en

ausencia de la planta susceptible (Granke et al., 2012). Se considera a la reproducción sexual como la principal fuente de variación genotípica en *P. capsici* (Tyler, 2002).

En cambio, para que se lleve a cabo la reproducción asexual en *P. capsici* generalmente las condiciones ambientales deben ser favorables, así como la presencia de una planta hospedera o sustrato rico en nutrientes, por lo que entonces el oomiceto a menudo produce cantidades masivas de esporangios en la superficie del tejido infectado o sustrato, siendo la principal forma de reproducirse (D. C. Erwin & Ribeiro, 1996). En esta investigación analizamos la capacidad que tiene el patógeno de infectar varias especies vegetales a través de las generaciones mediante reproducción asexual, generando líneas clonales del oomiceto.

Cuando los esporangios maduran se desprenden fácilmente del esporangióforo, el cual es una hifa modificada de anclaje entre el micelio y el esporangio. Los esporangios pueden liberar rápidamente de 20 a 40 zoosporas móviles biflageladas por estructura (D. C. Erwin & Ribeiro, 1996). Las zoosporas nadan quimiotácticamente con geotropismo negativo para llegar a las plantas, y cada una de estas zoosporas puede potencialmente causar una nueva infección (Latijnhouwers et al., 2003; van West et al., 2002).

Una vez en la superficie de la planta, las zoosporas desprenden sus flagelos, se enquistan y se adhieren a la superficie del hospedero y producen un tubo germinativo. Con el tubo germinativo y con la ayuda de enzimas secretadas, penetran la cutícula de la planta directamente y colonizan los tejidos del hospedero (B. , L. P. Feng et al., 2010; P. Li et al., 2011).

La infección causada por *P. capsici* hacia una especie vegetal comienza cuando una hifa que emana de una oospora germinada en su reproducción sexual, un esporangio que germina directamente y/o una zoospora enquistada penetra la cutícula de la planta y accede a las células de la misma. Luego, la invasión exitosa es seguida por el crecimiento y la colonización del patógeno en los tejidos del hospedero, lo que finalmente da como resultado el colapso del tejido y la esporulación. En condiciones óptimas de 25–30 °C y alta humedad relativa, el tiempo desde el comienzo de la infección hasta la esporulación se produce en 2–3 días (D. C. Erwin & Ribeiro, 1996; Ko, 1988).

Los esporangios se pueden dispersar a través del agua de riego o la lluvia. A medida que el patógeno coloniza la planta, se forman copiosas cantidades de esporangios que pueden infectar nuevas plantas o nuevas partes de la misma planta y causar múltiples ciclos de infección durante una sola temporada de crecimiento (Granke et al., 2009). En la figura 4A se observa un esquema sobre el ciclo de vida asexual e infeccioso de *P. capsici*.

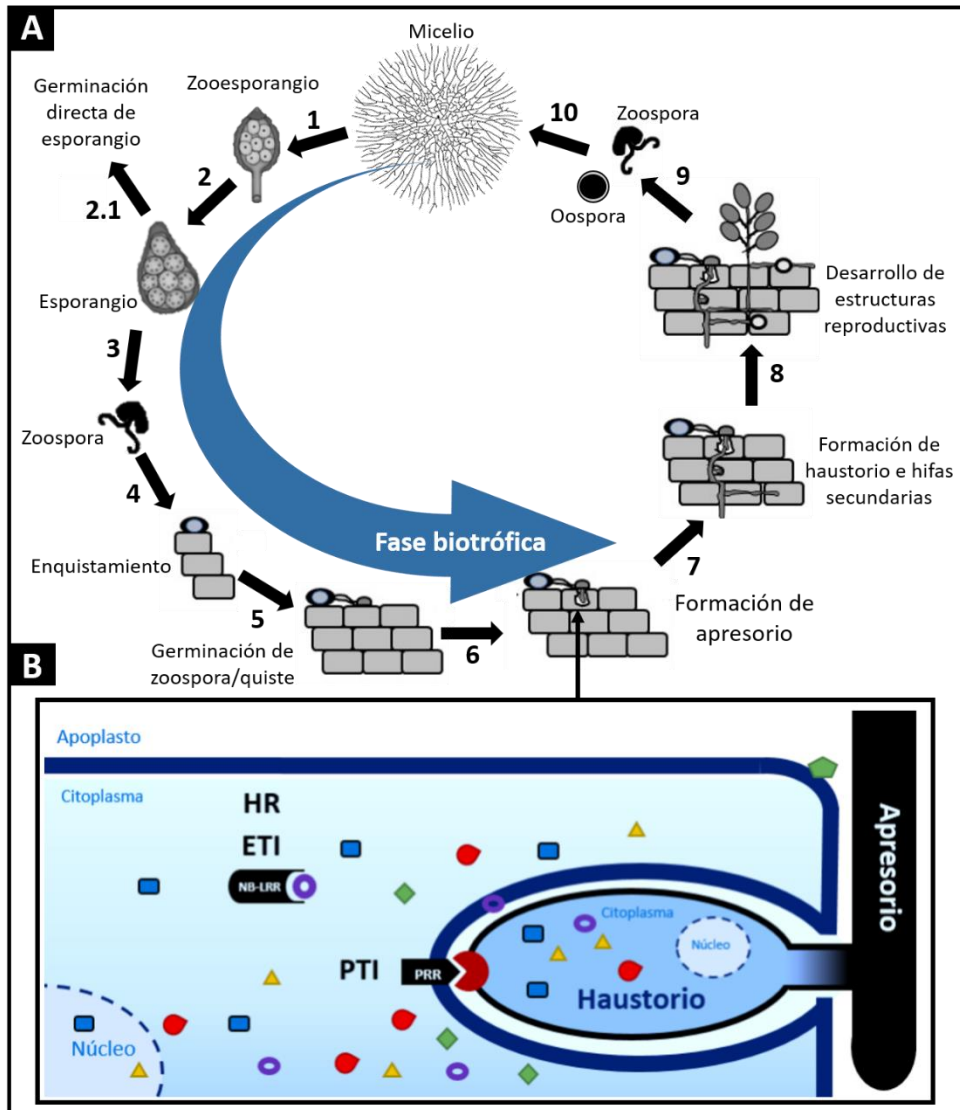


Figura 4. Ciclo de vida asexual e infectivo de *P. capsici*. **A:** Fases generales del ciclo de vida e infeccioso de *P. capsici*. **1.** Formación de zoosporangios a partir de micelio aéreo del oomiceto. **2:** Desprendimiento de zoosporangios del micelio aéreo, denominados esporangios. **2.1:** Si las condiciones son adecuadas para el crecimiento, los esporangios pueden germinar directamente para formar micelio. **3:** Los esporangios liberan zoosporas biflageladas que nadan quimióticamente al tejido de la planta. **4:** Una vez en el sitio, las zoosporas pierden motilidad al desprenderse de sus flagelos, enquistarse y formación de pared que se adhiere a la superficie de la planta. **5:** El quiste germina formando un tubo germinativo, lo que proporciona una adhesión más fuerte a la superficie del huésped en preparación, para la posterior invasión de la epidermis de algunos tejidos aéreos. En los tejidos fundamentales, el tubo germinativo puede penetrar la epidermis de la raíz al crecer intercelularmente a lo largo de las paredes celulares anticlinales. **6.** En el sitio de adhesión se forman apresorios y las hifas de *P. capsici* que crecen para invadir intracelularmente, formando un haustorio (**7**), ésta es la etapa final de la fase biotrófica. **8:** Durante la etapa necrotrófica, se forman hifas secundarias que matan a la célula huésped. **9:** *P. capsici* desarrolla nuevas estructuras asexuales o sexuales que son características del oomiceto (esporangios, anteridio u oogonio) para la formación de oosporas o zoosporas, respectivamente, proporcionando nuevos inóculos para la infección futura en el mismo hospedero u otros hospederos. **10.** Germinación de zoosporas/oosporas para formación de micelio del oomiceto. Imagen modificada obtenida de (Perrine-Walker, 2020). **B:** Mecanismos moleculares durante la infección de *P. capsici*. En la infección, *P. capsici* puede ser reconocido por la planta mediante sus PAMPs (Patrones moleculares asociados a patógenos-Pathogen Associated Molecular Patterns) a través receptores de reconocimiento de la planta (PRR-Protein Receptor

Recognition), activando la inmunidad desencadenada por patrones moleculares asociados a patógenos (PTI-PAMPs-triggered immunity), sin embargo, el oomiceto también puede secretar diversos efectores apoplásicos y citoplasmáticos al hospedero con la finalidad de promover la infección, algunos de los efectores pueden ser reconocidos y suprimidos por proteínas de resistencia de la planta (NB-LRR), activando entonces la inmunidad desencadenada por efectores o ETI (Effector-triggered immunity), culminando en una respuesta de hipersensibilidad (HR); sin embargo, si el patógeno logra sobrepasar los sistemas de defensa de la planta es capaz de infectarla, imagen inspirada en (Ojeda-Rivera et al., 2022).

Como organismo hemibiotrófo, la infección que produce *P. capsici* presenta dos fases distintas: la fase biotrófica y la necrotrófica (K. H. Lamour, Stam, et al., 2012). En la fase temprana o biotrófica el oomiceto presenta protuberancias de hifas modificadas denominadas haustorios que empujan la membrana de la célula huésped hacia adentro y forman una interfaz directa entre el hospedero y el patógeno (Schornack et al., 2010). En esta fase, las células no parecen verse afectadas, lo que indica una supresión local de las respuestas de defensa. Sin embargo, al continuar el desarrollo de la infección a la fase necrotrófica, el oomiceto va matando las células infectadas, causando colapso y necrosis significativos del tejido, mostrando evidentes síntomas de la infección. Después, al colapso del tejido le sigue la aparición de esporangios, lo que proporciona los medios para la dispersión del patógeno y un nuevo ciclo de infección (K. H. Lamour, Stam, et al., 2012).

P. capsici puede afectar a la planta hospedera en cualquier etapa de crecimiento y causar muerte de plántulas, pudrición de la corona, tizón foliar y pudrición de la fruta (Hwang & Kim, 1995; Kreutzer et al., 1940; B. K. Lee et al., 2001; Ristaino, 1990).

3.5 Rango de hospederos que infecta *P. capsici*

P. capsici puede infectar una amplia gama de hospederos en condiciones de laboratorio e invernadero, incluidos cultivos, plantas ornamentales y plantas nativas pertenecientes al menos a 26 familias vegetales. Sin embargo, principalmente afecta a solanáceas y cucurbitáceas (Crossan et al., 1954; D. C. Erwin & Ribeiro, 1996; Hwang & Kim, 1995; Granke et al., 2012), de manera que es un patógeno destructivo que produce pérdidas económicas sustanciales por cultivos infestados cada año. Esto lo convierte en un excelente organismo modelo para el estudio de la virulencia y adaptación a diversas plantas hospederas, teniendo en cuenta que *P. capsici* es fácil de cultivar y manipular en el laboratorio, e infectar diversas especies de plantas (K. H. Lamour, Stam, et al., 2012). En la presente investigación estudiamos el papel patogénico que tiene *P. capsici* en varias familias vegetales conformadas por chile, pepino, brócoli y frijol. Se conoce que en condiciones de campo y laboratorio, chile, pepino y frijol son susceptibles a ser infectadas por *P. capsici* (Mary K. Hausbeck & Kurt H. Lamour, 2004), en cambio, brócoli suele ser resistente (Vargas et al., 2013).

3.6 Relación de *P. capsici* con plantas de Chile

En plantas de Chile, el patógeno causa la enfermedad más devastadora conocida como “marchitez del Chile”, debido a la pudrición de las raíces de la planta, lesiones negras circulares, acuosas y de color café grisáceo en las hojas y tallos, así como pudrición en frutos cubiertos de esporangios blancos (Ristaino & S.A. Johnston, 1999). Las infecciones de las raíces causan que las plántulas se marchiten, mientras que, en las plantas más viejas, es común observar crecimiento atrofiado, marchitamiento, y finalmente, la muerte (K. H. Lamour, Stam, et al., 2012).

El chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes en México. En la región norte-centro del país, la marchitez causada por *P. capsici* en chile, es uno de los principales problemas fitopatológicos a los que se enfrentan los productores (Castro et al., 2012), ya que se han reportado pérdidas de entre 10 y 100% de la producción a causa de este fitopatógeno (Guigón-López & González-González, 2004).

Por su parte, la planta de chile (*Capsicum annuum*, var. *annuum* L.), utilizada en la presente investigación es caracterizada por ser parte de la familia de las Solanáceas, la cual es una planta herbácea, de cultivo generalmente anual, en algunos casos puede ser bianual. Su ciclo de vida comprende las fases principales de plántula vegetativa, floración y fructificación (Votava et al., 2005).

Esta especie presenta sistema de raíces de tipo pivotante y profundo, con tallo erecto de hasta 2 m o más de altura, anguloso y provisto de ramificaciones. Se encuentra compuesta por hojas alternas, brillantes de forma ovada o elíptica. Sus hojas son ricas en estomas llegando hasta 30000/cm² en el envés cuya característica es aprovechada por patógenos como *P. capsici* para su infección. Tiene flores hermafroditas, color blancas, solitarias, raramente de dos a tres pares. Pedúnculo largo y delgado, cáliz truncado; corola blanca raramente verdosa. Los frutos que desarrolla son los típicos chiles, considerados como bayas carnosas, donde está presente el alcaloide “capsaicina” que es responsable del sabor picante (Votava et al., 2005).

3.7 Relación de *P. capsici* con plantas de pepino

La primera aparición informada de *P. capsici* en cultivos de cucurbitáceas ocurrió en 1937, cuando un campo de pepino se enfermó y el 100 % de la fruta se pudrió (Kreutzer W. A., 1937). Algunas plantas de pepino parecen tolerar la infección de la raíz por *P. capsici*, pero la fruta es especialmente susceptible (Mary K. Hausbeck & Kurt H. Lamour, 2004), ya que las infecciones en la plantas pueden ser relativamente asintomáticas o mostrar pudrición de la raíz limitada, así como retraso en el crecimiento de la planta (Mary K. Hausbeck & Kurt H. Lamour, 2004).

En frutos infectados de pepino, se puede observar expansión de las lesiones, produciendo esporangios frescos durante días o semanas según el tamaño de la fruta (K. H. Lamour, Stam, et al., 2012). En México y en la región centro-norte de los Estados Unidos, *P. capsici* es un problema que ha sido reportado en pepino (Stevenson et al., 2000, 2001).

Por su parte, la planta de pepino (*Cucumis sativus*) utilizada en esta investigación es originaria de las regiones tropicales de Asia, siendo cultivada en la India desde hace más de 3000 años. Es una planta, herbácea de crecimiento rastrero e indeterminado. El sistema radicular consiste en una fuerte raíz principal que alcanza de 1-1.20 metros de largo, ramificándose en todas las direcciones. Sus tallos son rastreros llegando a alcanzar hasta 3.5 metros. Las hojas son simples, acorazonadas, alternas y opuestas; con epidermis de cutícula delgada, lo que es sencillo para patógenos como *P. capsici* sobrepasar su barrera física de defensa (Fornaris, 2001).

Algunas variedades de plantas de pepino presentan flores hermafroditas, situadas en las axilas de las hojas en racimos con pétalos amarillos. El fruto se considera como una baya falsa (pepónide) y es alargada, mide aproximadamente entre 15 y 35 cm de longitud. Es un

fruto carnoso, más o menos cilíndrico, color verde en su exterior, amarillo o blanco interiormente (Fornaris, 2001).

3.8 Relación de *P. capsici* con plantas de brócoli

A diferencia de las familias vegetales de Solanáceas y Cucurbitáceas, los cultivos de hortalizas de la familia *Brassicaceae*, en los que se incluye brócoli se han considerado no hospederos (non-host), o resistentes a *P. capsici* debido principalmente a la producción de metabolitos secundarios de tipo glucosinolatos que protegen a la planta en respuesta al patógeno (Vargas *et al.*, 2013). Por ello, normalmente se plantan como cultivos rotacionales en campos y se siembran como cultivos de cobertura de biofumigación contra *P. capsici* y otros patógenos del suelo, esta práctica ha aumentado debido al incremento de las restricciones sobre el uso de fungicidas (Krasnow & Hausbeck, 2015).

Sin embargo, en condiciones de laboratorio algunos aislamientos de *P. capsici* pueden mostrar la capacidad infectiva a especies vegetales de Brasicáceas como brócoli (Krasnow & Hausbeck, 2015).

Por su parte, la planta de brócoli (*Brassica oleraceae* var. *Itálica*) es una hortaliza anual, con sistema radical poco profundo con hojas grandes con bordes ondulados de color verde intenso a verde grisáceo, y cuyo tallo principal termina en una inflorescencia primaria con flores dispuestas en una estructura denominada “pella” o “pan”, que se comercializa para consumo. Se caracteriza por el alto contenido de compuestos azufrados, provitamina A, vitamina C y antioxidantes (Kehr & Díaz, 2012).

3.9 Relación de *P. capsici* con plantas de frijol

Al principio se informó en Estados Unidos que las plantas de frijol eran "inmunes" a la infección por *P. capsici* bajo condiciones de invernadero (Satour & Butler, 1967), por lo cual cultivares de frijol se consideraban una rotación adecuada para cultivos susceptibles a *P. capsici*. Sin embargo, en los veranos de 2000 y 2001 se aisló al patógeno de cinco cultivares comerciales de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) en Delaware, Maryland y Nueva Jersey, E. U. (Davidson *et al.*, 2002). Antes de este momento, solo hubo un informe de *P. capsici* que causó una infección natural en vainas y tallos de frijol lima que ocurrió en Córdoba, Argentina en 1950 (Frezzi, 1950).

Recientemente, se ha aislado al oomiceto de campos comerciales de frijol ejotero (*Phaseolus spp.*) en el norte de Michigan (A. Gevens & Hausbeck, 2003), agregando a esta planta a la larga lista de cultivos susceptibles a *P. capsici*. Lo interesante en esta situación, es que los campos de frijol tenían un historial de cultivo de calabaza con infestación de *P. capsici*, por lo cual es probable que las cepas del oomiceto se estén adaptando relativamente rápido a plantas de frijol a nivel de campo (A. J. Gevens *et al.*, 2008).

Los síntomas de enfermedad que causa *P. capsici* en plantas de frijol incluyen marchitez y clorosis, necrosis en hojas, tallos, pecíolos, vainas y declive en general (A. Gevens & Hausbeck, 2003).

Phaseolus vulgaris, o planta de frijol ejotero pertenece a la familia de las fabáceas, dentro del grupo de las leguminosas que poseen semillas comestibles. El frijol común corresponde a uno de los cultivos más importantes de México y el mundo por ser un componente esencial de la dieta. Su sistema radical está formado por una raíz principal y pelos absorbentes donde viven en simbiosis bacterias del género *Rhizobium* fijadoras del nitrógeno atmosférico. Su tallo es herbáceo y semileñoso de color verde, rosa o morado, con entrenudos donde se insertan las hojas y los diversos complejos axilares, sus hojas son de dos tipos: simples y compuestas. Las flores de frijol se desarrollan en una inflorescencia de racimo. Los botones florales pueden ser blancos, rosados o de color púrpura. El fruto es la vaina que contiene las semillas (Heike, 2009; McVaugh, 1987).

3.10 Características genómicas de *P. capsici*

En 2005 se inició el primer proyecto de secuenciación del genoma de *P. capsici* con el objetivo de generar un borrador de referencia de su genoma y desarrollar una base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), ya que ahora se conoce, el oomiceto presenta altos niveles de polimorfismos dentro de las poblaciones alrededor del mundo. Se secuenció el aislado LT1534 mediante Sanger, 454 e Illumina, logrando 64 de los 65 MB (98,4 %) previstos del genoma de *P. capsici* (Hurtado-Gonzales & Lamour, 2009).

Algunas de las características del genoma de *P. capsici* LT1534 son que presenta regiones altamente densas de genes, y otras con escasos genes, en donde se encuentran las regiones repetitivas ricas en elementos transponibles, genes relacionados con su patogenicidad, denominados genes efectores. Por lo tanto, la secuenciación del genoma de *P. capsici* y de otras especies de *Phytophthora* han abierto nuevas vías en el estudio de la genómica comparativa que permiten explorar factores relacionados con la patogenicidad entre estos organismos (Jiang & Tyler, 2012; K. H. Lamour, Mudge, et al., 2012).

Además, la disponibilidad de otros datos ómicos de *P. capsici*, como transcriptoma y proteoma (K. H. Lamour, Stam, et al., 2012) también han abierto la posibilidad del estudio de los procesos moleculares implicados en infección y adaptación a diferentes hospederos, los cuales utilizamos en la presente investigación.

3.11 Mecanismos moleculares implicados en infecciones causadas por *P. capsici*

P. capsici es un oomiceto patógeno hemibiotrófico, ya que durante el inicio de la infección tiene una fase biotrófica donde los síntomas de la infección no son evidentes, seguida de una fase necrotrófica observándose el tejido necrosado y colapsado. Durante el ciclo infectivo, *P. capsici* utiliza diferentes estrategias moleculares para eludir la defensa de la planta. En la primera fase, *P. capsici* sobrepasa las barreras físicas y químicas externas de la planta para modular su sistema inmunitario, suprimiendo la muerte celular inducida por la planta. En la segunda fase, el patógeno promueve la muerte de la célula hospedera (K. H. Lamour, Stam, et al., 2012).

Desde la fase biotrófica *P. capsici* comienza a internalizarse en el tejido de la planta a través de apresorios y haustorios, proteínas de degradación de pared celular, etc. denominados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés Pathogen Associated Molecular Patterns), los cuales pueden ser reconocidos por la planta a través de

Receptores de PAMPs (PRR, por sus siglas en inglés-Protein Receptor Recognition), y sobre los cuales actúa la Inmunidad Activada por Patrones (PTI, por sus siglas en inglés-PAMPs-triggered immunity) evitando la progresión de la infección (Pacheco, 2015). Para contrarrestar la PTI, los patógenos exitosos han desarrollado repertorios de efectores diversos que pueden suprimir la PTI y desencadenar la susceptibilidad (susceptibilidad desencadenada por efectores, ETS-Effectors Triggered Susceptibility) (Hein et al., 2009; Jones & Dangl, 2006). Este arsenal secretado de efectores permiten la infección y reproducción parasitarias de *P. capsici* (Birch et al., 2006; W. and K. S. Morgan, 2007; Oliva et al., 2010; Stassen JHM, 2011).

Cuando el patógeno sobrepasa estos sistemas de defensa de la planta, ésta puede expresar diversas proteínas especializadas en la identificación y supresión de la actividad de los genes efectores del patógeno mediante proteínas de resistencia (genes R), las cuales activan el segundo nivel de inmunidad de la planta llamado Inmunidad Desencadenada por Efectores o ETI (ETI, por sus siglas en inglés-Effector Triggered Immunity), siendo más rápida y fuerte que la PTI, culminando en una respuesta hipersensible de la planta (HR, Hipersensitive Response), cuya muerte celular programada evita que *P. capsici* continúe colonizando el tejido circundante (M. Wang et al., 2015).

Sin embargo, como sistema co-evolutivo en la infección, *P. capsici* ha desarrollado la diversificación de genes efectores o disminuir su expresión para evitar ser reconocido por el sistema inmune de la planta y así lograr invadirla exitosamente (Damasceno et al., 2008; Rose et al., 2002), considerando a este sistema como un interesante modelo que constantemente está evolucionando por parte de la planta y de *P. capsici* (Hein et al., 2009). En la figura 4B se muestra un esquema sobre las interacciones moleculares ocurridas en la interacción planta-patógeno.

3.12 Efectores patógenos implicados en la infección causada por *P. capsici*

Los genes efectores de *P. capsici* y diversos oomicetos son considerados como los principales contribuyentes de su patogenicidad y virulencia, por lo cual han sido ampliamente estudiados desde su descubrimiento y son parte importante en esta investigación. Los efectores son moléculas capaces de manipular la estructura y función del hospedero, facilitando la infección (factores de virulencia o toxinas) y/o desencadenando respuestas de defensa (factores de avirulencia o elicitores o proteínas AVR). Una vez que los efectores son reconocidos por los mecanismos de defensa del hospedero, se les denomina como factores de avirulencia, desarrollándose una respuesta de defensa hacia un efector particular (de Jonge et al., 2011; Kamoun, 2006).

Existen dos amplias clases de efectores en oomicetos: los efectores apoplásicos que actúan extracelularmente al ser secretados en el espacio extracelular de la planta, es decir en el apoplasto. Estos interactúan con proteínas secretadas relacionadas con la defensa y receptores en la superficie vegetal, conformados por efectores inhibidores de hidrolasas vegetales, tales como glucanasas, así como proteasas de serina (Damasceno et al., 2008; Rose et al., 2002). En *P. capsici* el efector apoplásico GIP1 (por sus siglas en inglés-Glucanase Inhibitor Protein) considerado como una elicitorina o elicitor de la infección es el ejemplo más reconocido que se une e inhibe la actividad de las endo- β -1,3-glucanasas (EGasas) extracelulares de la planta para continuar con la infección (Damasceno et al., 2008). En

general, los efectores apoplásicos contienen péptidos señal N-terminal para la secreción, seguidos de módulos efectores C-terminal, sin embargo se desconoce si transportan señales adicionales dirigidas a la planta (Damasceno et al., 2008; Kamoun, 2006, 2007).

La segunda clase de efectores son citoplasmáticos que actúan intracelularmente, al ser translocados hacia el citoplasma a través de estructuras especializadas como vesículas de infección y haustorios que se invaginan hacia el interior de las células vivas del hospedero. Dichos efectores suprimen la transducción de las señales relacionadas con la defensa, así como la regulación y el tráfico de moléculas que lleven a la inmunidad del hospedero. Ejemplos de efectores citoplasmáticos en *P. capsici* incluyen las familias denominadas como RXLR, CRN y NLP (Birch et al., 2006, 2008), los cuales se pueden dirigir a diferentes sitios de las células de la planta (Kamoun, 2006, 2007).

Los efectores citoplasmáticos consisten en una región N-terminal involucrada en la secreción y translocación dentro de las células huésped y un dominio C-terminal que lleva la actividad bioquímica efectora (Kamoun, 2006, 2007; W. and K. S. Morgan, 2007).

Los efectores de las familias RXLR y Crinkler (CRN) también pueden tener actividad de avirulencia por su reconocimiento a través de las llamadas proteínas de resistencia (R), receptores inmunes intracelulares de la familia de repeticiones ricas en leucina de unión a nucleótidos (NB-LRR, Nucleotide binding-Leucine Repeats Rich), lo que resulta en la inducción de la muerte celular hipersensible y la inmunidad (Kamoun, 2006, 2007).

Los efectores RXLR se definen por la secuencia de aminoácidos Arg-X-Leu-Arg, que designa un dominio involucrado en la translocación dentro de las células de la planta (Dou et al., 2008; S. C. Whisson et al., 2007). La secreción y la translocación de los efectores RXLR requieren la presencia de un péptido señal, seguido de un motivo RXLR N-terminal conservado (Birch et al., 2008; W. and K. S. Morgan, 2007; S. C. Whisson et al., 2007). Estas características estructurales permiten la rápida identificación de genes efectores en el genoma del oomiceto y entre especies. Se han identificado más de 400 genes candidatos putativos que codifican motivos RXLR en el genoma del oomiceto, lo que apunta a un papel importante en la biología de *P. capsici*. Un ejemplo de efector del tipo RXLR en este patógeno, es el gen *Avr3a1*, el cual contribuye a la avirulencia del oomiceto en plantas de *N. tabacum* (Vega-Arreguín et al., 2014).

Las proteínas CRN comparten una región N-terminal conservada que alberga un péptido señal predecible en la mayoría de los casos y un motivo LQLFLAK altamente conservado necesario para la translocación. La familia presenta un repertorio diverso de dominios efectores C-terminales, que se cree que aumentan la virulencia (B. J. Haas et al., 2009; Torto et al., 2003). Análisis *in silico* del genoma de *P. capsici* han identificado aproximadamente 80 genes candidatos codificantes de CRN de longitud completa y más de 200 pseudogenes, lo que sugiere que estos efectores están evolucionando rápidamente (B. J. Haas et al., 2009).

Además de los efectores intracelulares RXLR y CRN, se ha identificado otra clase de proteínas secretadas por el patógeno como posibles factores de virulencia, denominados NLP (Necrosis-inducing Proteins), o NEP1 (Necrosis and Ethylene-Inducing Proteins) (Bailey, 1995), que pueden causar la muerte celular mientras estimulan la reacción inmune de la planta (Bailey, 1995; Tyler et al., 1995). Se ha propuesto que estos efectores pueden actuar en el apoplasto

sobre objetivos de la membrana plasmática de la planta y sobre sus núcleos (Y. J. Jia et al., 2008).

Se conoce que los genes que codifican efectores NLP en *P. capsici* inducen la muerte de la células de la planta, sin embargo también se conoce que miembros de la familia NLP pueden inducir clorosis o necrosis durante la infección (Fellbrich et al., 2002; T. D. Kanneganti et al., 2006a; Veit et al., 2001a). En *P. capsici*, se han identificado 18 potenciales proteínas NLP con diversas funciones durante la patogénesis (B. Z. Feng et al., 2011; P. Li et al., 2011). Debido a, que los genes individuales de NLP tienen diferentes efectos fitotóxicos, algunos pueden desempeñar funciones importantes en el desarrollo de los síntomas que pueden ser cruciales para la virulencia, la actividad inductora de necrosis o la muerte celular durante la infección (Gijzen & Nürnberger, 2006).

Teniendo en cuenta los altos niveles de expresión encontrados de los efectores NLP durante la infección, así como su actividad inductora de muerte celular, se ha propuesto que las proteínas NLP contribuyen a la transición de la fase biotrófica a necrotrófica (P. Li et al., 2011).

Recientemente se han propuesto otro tipo de moléculas efectoras no proteicas de patógenos relacionados con su patogenicidad y virulencia, denominados RNAs pequeños no codificantes efectores (sRNAs: small RNAs). Es decir, se ha sugerido que componentes epigenéticos como los sRNAs están implicados en la patogenicidad (Fei et al., 2016; Knip et al., 2014) en oomicetos. Sin embargo, en *P. capsici* no existen estudios que describan la función efectora que pueden tener estos elementos epigenéticos como mecanismo regulatorio en la patogénesis.

3.13 La epigenética mediada por RNAs no codificantes en oomicetos patógenos

El término *Epigenética* fue propuesto en la década de los 50's para describir el mecanismo por el cual los organismos multicelulares desarrollan múltiples tejidos a partir de un único genoma (D. Morgan & Whitelaw, 2008). En la actualidad el término epigenética ha evolucionado para indicar cambios heredables en la estructura y organización del DNA que no involucran cambios en la secuencia y que modulan la expresión génica. Estos cambios pueden conducir a cambios heredables en el fenotipo. Existen tres mecanismos de regulación epigenética conformados por: elementos no codificantes de RNA, metilación del DNA y modificaciones de histonas. Los tres mecanismos epigenéticos se consideran como moduladores de los complejos remodeladores de la cromatina que conducen a cambios en el nivel de la expresión génica y la evolución del genoma (D. Morgan & Whitelaw, 2008; Y. Wang et al., 2008).

Los pocos reportes que abarcan el estudio de la regulación epigenética en oomicetos patógenos del género *Phytophthora* se enfocan principalmente en el estudio de la metilación de histonas relacionados con genes efectores que regulan la patogenicidad de los mismos (H. Chen et al., 2018; L. Wang et al., 2020). Sin embargo, existe evidencia predictiva y experimental que indica la inexistencia en el genoma de los oomicetos incluido *P. capsici* de potenciales enzimas homólogas que lleven a cabo la metilación del DNA como mecanismo epigenético (Rojas-Rojas & Vega-Arreguín, 2021). Asimismo, son pocos los estudios que se han realizado en oomicetos patógenos sobre la regulación epigenética mediada por RNAs no codificantes en donde se incluyen los miRNAs (R. R. Vetukuri, Avrova, et al., 2011). Incluso,

en *P. capsici* no existen reportes que indiquen la presencia y/o función de estos elementos regulatorios.

Los RNAs pequeños (sRNAs-small RNAs) son secuencias cortas de RNA de 20 a 40 nucleótidos (nt) que no codifican para proteínas y desempeñan funciones clave en varios patógenos eucariotas como la regulación del desarrollo, la supresión de transposones, la respuesta ambiental, la interacción planta-patógeno y otros procesos biológicos diversos. Sin embargo, en los oomicetos sus funciones son poco conocidas (J. Jia et al., 2017a; Alptekin et al., 2017; M. J. Axtell, 2013; Budak et al., 2015; Katiyar-Agarwal & Jin, 2010; Lucas et al., 2014).

Los genomas eucarióticos contienen grandes cantidades de sRNAs y se ha sugerido que no es el número de genes, sino la proporción de RNAnc (RNA no codificante) lo que determina la complejidad del organismo (Q. Liu et al., 2009). Los sRNAs también juegan un papel importante en la estabilidad del genoma, la organización de la cromatina y la resistencia a los virus (Malone & Hannon, 2009). Desde su descubrimiento, se han descrito diversas clases de sRNAs y se siguen notificando nuevos tipos y vías de biogénesis. Los sRNAs más comúnmente encontrados en los organismos son los microRNAs (miRNA), los RNAs pequeños de interferencia (siRNA-small interference RNA) y los sRNAs que interactúan con Piwi (piRNAs-Piwi-interacting RNA) (Czech & Hannon, 2011).

Si bien, gran parte del enfoque en la comprensión del silenciamiento de sRNAs se ha dirigido hacia el humano, ratón, pez cebra, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* y *Schizosaccharomyces pombe*, comparativamente existen pocos informes de la rama filogenética que incluyen Stramenopiles en donde se encuentran los oomicetos patógenos (Braun et al., 2010; Norden-Krichmar et al., 2011).

Se conoce que el silenciamiento génico mediado por sRNAs ocurre en los oomicetos, y esto se ha estudiado mejor en *P. infestans* (Avrova et al., 2008; van West et al., 1999). Sin embargo, a pesar de ser el oomiceto más intensamente estudiado, los mecanismos moleculares que subyacen al silenciamiento génico no están tan bien caracterizados como en otros eucariotas modelo (R. Vetukuri et al., 2012).

Los sRNAs producidos por patógenos pueden clasificarse en dos grupos: los sRNAs endógenos de patógenos que regulan genes endógenos como efectores, y sRNAs que se translocan desde los patógenos a las células de la planta hospedera durante la infección para silenciar los genes de inmunidad del hospedero. Estos sRNAs producidos por patógenos, que dirigen el silenciamiento de los genes de inmunidad del huésped se denominan efectores de sRNA (M. Wang et al., 2015).

Estudios de secuenciación masiva de sRNAs (sRNA-seq) asociados a genomas de especies de *Phytophthora* sugieren que estos patógenos pueden producir sRNAs que se asignan a regiones genómicas de los genes RXLR y CRN, por lo cual existe evidencia que la expresión de algunos genes efectores está controlada por sRNAs reguladores (Fahlgren et al., 2013). Dentro de los diferentes tipos de sRNAs, los miRNAs representan el enfoque principal en esta investigación, sobre la identificación y caracterización de potenciales miRNAs en *P. capsici* después de infectar varias especies vegetales.

3.14 Características de miRNAs como regulares epigenéticos

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños no codificantes para proteínas de ~20-22 nucleótidos de longitud, generados de transcritos endógenos que pueden formar estructuras en forma de horquilla o hairpin (Y. Lee et al., 2004), involucrados en la regulación de la expresión génica (Stavast & Erkeland, 2019). Los miRNAs están codificados por genes *MIR* endógenos (Bologna & Voinnet, 2014). Fueron identificados por primera vez en *Caenorhabditis elegans* como reguladores de su desarrollo (R. C. Lee et al., 1993), y conforman una gran familia de genes reguladores postranscripcionales que controlan muchos procesos celulares y del desarrollo en eucariotas, cumpliendo una gran cantidad de funciones (Pabón-Martínez, 2011).

Se estima que el 30% de los genes son regulados por mecanismos dependientes de miRNAs (Rajewsky, 2006), y que un solo miRNA puede regular alrededor de 200 diferentes transcritos que pueden funcionar en diferentes vías en la célula (Krek et al., 2005), así como un mismo ARNm puede ser regulado por múltiples miRNAs (Y. Cai et al., 2009). Recientemente, se han identificado y caracterizado miles de miRNAs en diferentes organismos y están registrados en la base de datos en línea de miRBase (Stavast & Erkeland, 2019). Los miRNAs regulan diversos procesos biológicos, sin embargo, los defectos en los mismos pueden causar fenotipos graves, como enfermedades autoinmunes y cáncer (Alemdehy et al., 2015; Mehta et al., 2015). La expresión de los miRNAs suele ser específica de un tejido o etapa de desarrollo (R. C. Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993).

Los miRNAs pueden regular el procesamiento postranscripcional del RNA, mediante el apareamiento de bases con su RNA mensajero (RNAm) complementario, conduciendo a la represión de la transcripción o al clivaje del ARNm (Pabón-Martínez, 2011), pero también pueden regular el silenciamiento genético de manera transcripcional principalmente a través de la vía de metilación del DNA dependiente de RNA (RdDM) (Castel & Martienssen, 2013a; Law & Jacobsen, 2010). Generalmente, los miRNAs se asocian con miembros de la familia de las proteínas argonautas para ser guiados a su secuencia blanco (target) o complementaria del RNAm para llevar a cabo la regulación génica (V. N. Kim et al., 2009).

Actualmente, se ha descrito que la mayoría de los mamíferos, utilizan la vía canónica para la generación de miRNAs. Sin embargo, para organismos como *Drosophila melanogaster*, *Giardia lamblia*, *Zebrafish* y *Murine Gamma-herpesvirus* se ha definido la producción de miRNAs por vías no canónicas (Pabón-Martínez, 2011). Por lo cual, es de esperar que las células usen una variedad de transcritos como fuentes de miRNAs y utilicen diferentes mecanismos de generación de sRNAs. En general, las vías no canónicas son una prueba de la flexibilidad y habilidad de las células para generar estructuras en forma de horquilla como pre-miRNAs (Berezikov et al., 2007).

3.15 Biogénesis y procesamiento de miRNAs

En plantas, animales y en varios otros linajes eucarióticos como los oomicetos, la biogénesis de miRNAs inicia con la transcripción primaria por la RNA polimerasa II de secuencias que contienen regiones auto complementarias que se pliegan para formar estructuras imperfectas de bucle y tallo de doble cadena o hairpin. Generalmente ocurre en intrones, resultando en miRNAs primarios o pri-miRNAs de ~150-170nt, para posteriormente ser madurados por un

conjunto de enzimas especializadas. Por lo general, los miRNAs maduros de 20-22nt se forman a través de dos pasos de procesamiento mediados por una endonucleasa RNasa III y una proteína asociada al dominio de unión a dsRNA (RNA de doble cadena: double strand RNA) (Denli & Hannon, 2003).

En los animales, los pri-miRNAs son procesados inicialmente por la proteína RNaseIII DROSHA para formar precursores de miRNA (pre-miRNA). Luego, los pre-miRNAs se exportan al citoplasma por medio de la exportina 5 (Exp5), donde Dicer reconoce y corta el dúplex de pre-miRNA para obtener el miRNA/miRNA* (guía/pasajero*) maduro. La hebra guía del miARN, similar a los siARNs, se elige mediante selección termodinámica y se carga al complejo de Silenciamiento Inducido por RNA o RISC (RNA Induced Silence Complex).

En plantas, DCL1 (Dicer-like 1) realiza ambos pasos de procesamiento del pri-miRNA en el núcleo para la obtención de miRNAs maduros (Park et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Schauer et al., 2002). Se cree que la maduración de miRNAs en *Phytophthora* es similar que en plantas, debido a la identificación de un par de enzimas DCL (Bollmann et al., 2018). Las proteínas DCL se caracterizan por que tienen dos dominios de RNase III (a y b) en el extremo C-terminal. Otros dominios comúnmente encontrados incluyen la caja DEAD helicase, helicase C, dsRBD, PAZ y dsrm. Los dominios PAZ, RNase III y dsrm son responsables de la unión y escisión del dsRNA (Q. Liu et al., 2009). PAZ se une al saliente de dos bases 3' de dsRNA y está conectado a RNase IIIa mediante una hélice α larga cuya distancia funciona como una regla molecular (Hammond et al., 2000; Tabara et al., 1999; Zamore et al., 2000).

Una vez que el miRNA maduro se encuentra dentro del complejo RISC, la proteína de la familia de las argonautas (AGO) selecciona la hebra guía según uno o más criterios, incluida la estabilidad termodinámica del extremo del miARN 5', la identidad del nucleótido 5', es decir si el inicio de la secuencia es uracilo, adenina, guanina o citosina, de la estructura del dúplex miARN/miARN* (Czech & Hannon, 2011). Entonces, la proteína AGO cargada con el miARN está programada para reconocer por complementariedad de bases y reprimir RNAs mensajeros diana (target) a través de la escisión mediada por AGO o la represión traduccional (Carthew & Sontheimer, 2009). Los miembros de la familia AGO contienen principalmente el dominio PAZ (PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE) y Piwi, que contribuyen a la unión del extremo 3' de los miRNAs para la escisión del ARNm complementario target (Lingel et al., 2003; Song et al., 2004).

El mecanismo de regulación del gen target mediado por miRNAs, ya sea por escisión o represión de la traducción, está determinado por la unión de AGO al miARN y el grado de complementariedad con el RNAm diana (Bollmann et al., 2016); sin embargo, la especificidad de los miRNAs hacia un gen target específico también está determinado por la secuencia semilla que consta del segundo al octavo nucleótido del extremo 5' del miRNA maduro (Bartel, 2009), y este motivo es lo suficientemente corto como para que un solo miARN pueda dirigir AGO a cientos de RNAm. (Chi et al., 2009; J. Li et al., 2014). Sin embargo, la mayoría de los genes objetivos están mediados por sitios regulatorios de la región 3' no traducida (3'UTR) (Untranslated Region) (Bartel, 2018).

Una vez que se lleva a cabo la escisión del RNAm target se generan ssRNAs cortos (RNAs monocatenarios-single strand RNA) del gen diana, por lo cual la enzima RNA polimerasa

dependiente de RNA o RDR los reconoce y los transcribe a dsRNAs (doble strand RNA). Esto genera una reserva abundante de siRNA endógenos (Sala et al., 2021; Schwarz-Sommer et al., 2003), que nuevamente serán procesados por DCL/Dicer, enseguida cargados a RISC y por medio de AGO regulando la expresión génica amplificando y reforzando el silenciamiento a través de la formación de siRNA secundarios, este proceso es conocido como vía del RNA de interferencia (RNAi). A diferencia de los siRNAs, los miRNAs no requieren una RDR para la biogénesis (Alder et al., 2003; Sijen et al., 2001).

Por ello, los eventos de silenciamiento de genes pueden ocurrir después de la transcripción y se denomina silenciamiento de genes postranscripcional (PTGS) (Post-transcriptional gene silencing), o bien, antes de la transcripción que da como resultado un arresto transcripcional o silenciamiento transcripcional de genes (TGS) (Transcriptional Gene Silencing) (Cogoni & Macino, 2000; Verdel et al., 2004; Verdel & Moazed, 2005).

3.16 Componentes de miRNAs y siRNAs en *Phytophthora*

Las enzimas centrales de biogénesis y procesamiento de miRNAs y siRNAs canónicas se encuentran en *Phytophthora* las cuales incluyen dos DCL, un RDR (Bollmann et al., 2016; Fahlgren et al., 2013) y un número variable de AGO (Bollmann et al., 2018). Las dos DCL en cada especie de *Phytophthora* están asociados con la acumulación de dos clases principales de sRNA de 21 nt y 25/26 nt que podrían ser parte de la vía de los miRNAs y siRNAs, respectivamente (Bollmann et al., 2016; Fahlgren et al., 2013; R. Vetukuri et al., 2012). En *P. infestans*, se ha demostrado que la producción de sRNAs de 21 nt se asocia con la actividad de PiDCL1 (R. R. Vetukuri et al., 2012). Sin embargo, se desconoce si los sRNAs de 25/26 nt están asociados con PiDCL2.

En comparación con los hongos patógenos, las especies de *Phytophthora* tienen un mayor número de AGO, que también son variables en diferentes especies de oomicetos, por ejemplo, *P. infestans*, *P. ramorum* y *P. sojae* codifican cinco, seis y nueve genes AGO, respectivamente (Bollmann et al., 2018). Estos AGO forman dos clados bien respaldados, con AGO1 de cada especie, agrupados y separados de los otros homólogos. Los patrones de expresión de los genes AGO han mostrado una amplia gama de diversidad lo que indica un papel importante en la regulación génica (Bollmann et al., 2018). Ensayos de co-inmunoprecipitación de PiAGO1 en *P. infestans* indican que esta proteína está asociada con sRNAs de 20–22 nt y PiAGO4 principalmente con sRNAs de 24–26nt, mientras que PiAGO5 no parece tener una preferencia de tamaño para la unión de sRNAs, por lo cual las diferentes proteínas AGO en *Phytophthora* pueden tener funciones específicas (Åsman et al., 2016), incluso se ha propuesto una vía de biogénesis no canónica de miRNAs dependiente de AGO en *P. infestans*; en la figura 5, se muestra la construcción de un modelo de biogénesis y procesamiento de miRNAs y siRNAs sobre la regulación de genes en *Phytophthora* basado en los reportes de estos patógenos.

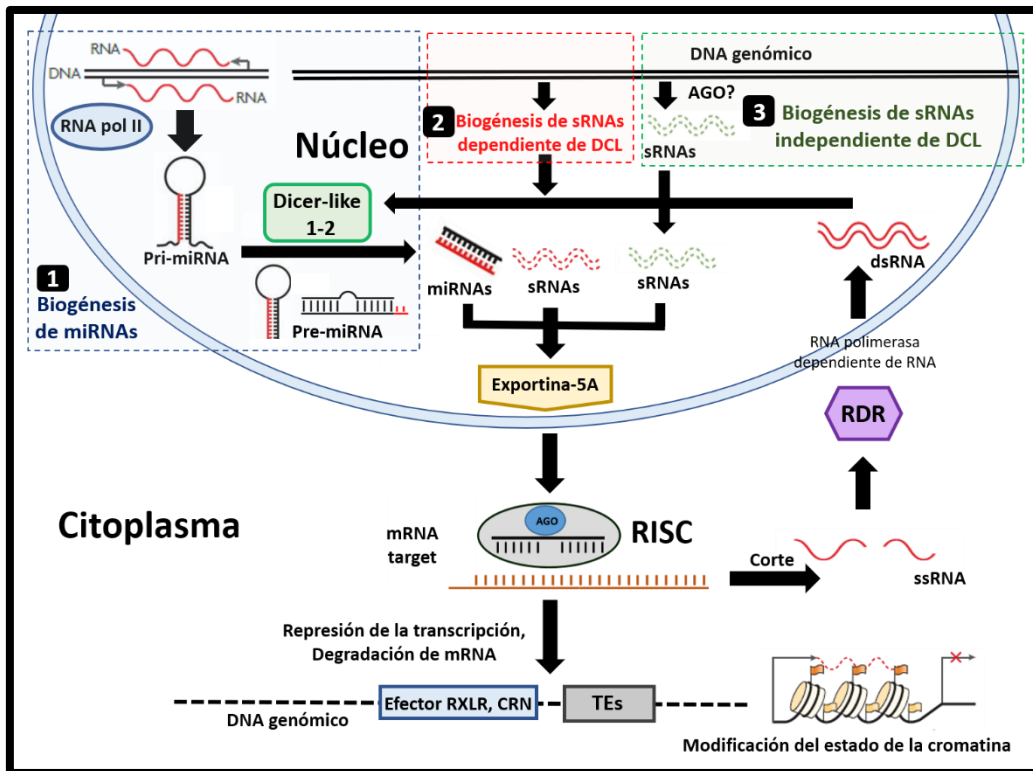


Figura 5. Biogénesis, procesamiento y actividad regulatoria de miRNAs-sRNAs en *Phytophthora*. Se han propuesto tres vías de biogénesis de miRNAs-sRNAs en el género *Phytophthora*. **1:** Biogénesis de miRNAs a partir de la transcripción mediada por la RNA polimerasa II para generar pri-miRNAs los cuales son procesados por DCL 1-2 obteniendo miRNAs maduros. **2:** Biogénesis de sRNAs dependientes de DCL (independiente de RNA pol. II). **3:** Biogénesis de sRNAs independientes de DCL, a partir de una potencial AGO se obtienen sRNAs. Los sRNAs y miRNAs obtenidos de las tres vías de biogénesis son transportados al citoplasma por medio de la exportina-5A, los cuales son cargados al complejo del silenciamiento inducido por RNA (RISC) y por medio de alguna de las argonautas, llevan a cabo la regulación de genes efectores (RXLR, CRN), no efectores y elementos transponibles (TEs) por la represión de la transcripción o degradación de mRNA, lo cual puede desencadenar modificación del estado de la cromatina. Los mRNAs escindidos por la acción de alguna de las argonautas producen ssRNAs (RNA de cadena simple-single strand RNA) los cuales pueden ser reconocidos por la RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR) que genera dsRNA (RNA de doble cadena-doble strand RNA) que pueden ser reconocidos por DCL para incorporarse a la vía del RNAi, maximizando la regulación epigenética, imagen inspirada de (Åsman et al., 2016; R. Vetukuri et al., 2012; R. R. Vetukuri, Avrova, et al., 2011; S. C. Whisson et al., 2012).

Es conocido que los sRNAs pueden afectar la expresión de genes efectores en *Phytophthora*, alterando así la interacción con la planta (S. Dong & Ma, 2021). Por ejemplo, se conoce que alelos naturalmente silenciados del efector Avr3a en aislamientos de campo de *P. sojae* que pueden evadir la ETI desencadenada por Avr3a con acumulación diferencial de sRNAs de 24 a 26 nt en el locus Avr3a, lo que sugiere un vínculo entre el silenciamiento de Avr3a y el RNAi mediado por RNAs (Qutob et al., 2013). En *Phytophthora parasítica*, los sRNAs de 25/26 nt, se asocian con un silenciamiento génico eficiente, por lo cual los loci generadores de sRNAs de dicho tamaño residen predominantemente en regiones ricas en repeticiones y escasas en genes. En cambio, los sRNAs de 21 nt en *Phytophthora infestans* se derivan principalmente de repeticiones invertidas y familias de genes específicos, como efectores CRN y fibronectinas de tipo III (Fahlgren et al., 2013).

Aunque las especies de *Phytophthora* tienen una ruta de RNAi conservada, solo se ha caracterizado funcionalmente un miRNA conservado: miR8788 en *P. infestans*, *P. sojae* y *P. ramorum*, que induce la escisión de su gen diana que codifica un aminoácido/auxina permeasa (Fahlgren et al., 2013).

Entonces, los miRNAs pueden llevar a cabo la regulación epigenética de la expresión de genes y efectores en oomicetos, lo que podría facilitar la rápida co-evolución de *Phytophthora* con sus hospederos (S. Dong & Ma, 2021; X. Nunes et al., 2011). Por ello creemos que los miRNAs son importantes elementos en el proceso de adaptación de *P. capsici* a diversas especies vegetales. Sin embargo, las estrategias por las cuales los sRNAs y miRNAs de *P. capsici* pueden conducir a esta adaptación/aclimatación es desconocida, aunque podría ser desde la regulación endógena de procesos celulares del patógeno, así como la transferencia de estos elementos no codificantes a la planta para suprimir el sistema de defensa del hospedero, como se describe a continuación.

3.17 Reinos cruzados de RNAi entre patógenos y plantas

El RNAi entre reinos o cross-kingdom RNAi describe el fenómeno en el que un organismo donante produce sRNAs (siRNAs o miRNAs) que se mueven hacia un organismo receptor y provoca el silenciamiento génico (M. Wang et al., 2015). Este proceso ocurre durante la interacción entre el patógeno (reino Animalia) y la planta hospedera (reino Plantae), y puede tener lugar en ambas direcciones: es decir, sRNAs producidos por un patógeno pueden ser entregados a las células de la planta para silenciar los genes del hospedero; y un silenciamiento génico producido por la planta para suprimir los genes patógenos (M. Wang et al., 2015). Sin embargo, todavía no está claro cómo se mueven las señales de silenciamiento, particularmente entre diferentes organismos (Weiberg et al., 2014).

El fenómeno RNAi entre reinos se ha descrito entre especies de diferentes micofloras, insectos, plagas, hospedantes vegetales y otros organismos correlativos (Knip et al., 2014), incluso en relaciones simbióticas (W. Islam et al., 2017).

Por lo cual, los sRNAs son moléculas móviles que pueden funcionar más allá de las células a partir de las cuales que se sintetizan (L. Liu & Chen, 2018). Además, la predicción de objetivos indica que los sRNAs de patógenos pueden regular tanto los genes endógenos como los posibles objetivos de la planta durante la infección (Glazebrook, 2005).

Este proceso del RNAi trans-especies también se ha observado entre plantas y otros organismos que interactúan con oomicetos, hongos, nemátodos, plagas de insectos y plantas parásitas a través de sistemas de señalización vía RNAi (Koch et al., 2013; Nowara et al., 2010). Sin embargo, la evidencia actual de RNAi entre reinos esta principalmente basado en datos de secuenciación de sRNAs obtenidos de tejidos vegetales infectados y predicción bioinformática de potenciales objetivos (Qiao et al., 2021). Por lo cual, existen pocas investigaciones que describan este proceso desde la perspectiva del ente patógeno, incluso actualmente no existen reportes de RNAi entre reinos causados por *P. capsici* hacia alguna planta. Sin embargo, se ha documentado que diversos patógenos producen sRNAs que se trasladan al genoma de la planta para desencadenar silenciamiento del gen del hospedero

(Knip et al., 2014; Weiberg et al., 2015; Weiberg, Wang, Lin, Zhao, Zhang, et al., 2013), como mecanismo de virulencia (Dunker et al., 2020).

Un estudio reciente ha mostrado que un conjunto de sRNAs de *Botrytis cinerea* (BcsRNA) se transportan a las células de la planta hospedera durante la infección y silencian importantes genes de inmunidad vegetal en *Arabidopsis thaliana* y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Weiberg, Wang, Lin, Zhao, Zhang, et al., 2013). Del mismo modo que los sRNAs endógenos del patógeno pueden regular su virulencia (Qiao et al., 2021). Las señales de silenciamiento de célula a célula son principalmente dúplex de sRNAs de 21 nt, mientras que las señales para RNAi sistémicos son en su mayoría sRNAs de 24 nt (Dunoyer et al., 2010; Molnar et al., 2010).

En las plantas, los sRNAs controlan epigenéticamente la expresión de diversos genes de resistencia R que activan los genes de defensa ante la infección, como el miR6019 en el tabaco (F. Li et al., 2012) y miR9863 en la cebada (J. Liu et al., 2014), reguladores de auxinas, como miR160, miR164 y miR167, los cuales se ven regulados al alza en plantas infectadas frente a patógenos filamentosos (Kuan et al., 2016).

Se ha descubierto que en plantas tanto los miRNAs como los siRNAs se mueven localmente de una célula a otra a través de plasmodesmos y largas distancias a través del floema (Melnik et al., 2011). En comparación con los siRNAs, los miRNA se consideran menos móviles y se ha encontrado que los sitios de su síntesis están correlacionados con los sitios de acción (Parizotto et al., 2004). No obstante, se han informado movimientos locales, sistémicos y trans-especies de algunos miRNAs de plantas a patógenos (Parizotto et al., 2004; Qiao et al., 2021).

Investigaciones más recientes indican que los sRNAs también pueden pasar naturalmente de las plantas a los patógenos en un proceso denominado silenciamiento génico inducido por el huésped (HIGS: Host-Induced Gene Silencing) (Baulcombe, 2015), considerado como el ejemplo fundamental de la señalización entre reinos (LaMonte et al., 2012). Las primeras observaciones de HIGS se realizaron cuando los transcritos de genes específicos mostraron una acumulación reducida en nematodos e insectos cuando se alimentaban de plantas transgénicas que producían construcciones artificiales de RNAi (Baum et al., 2007; G. Huang et al., 2006), ya que el RNAi condujo al silenciamiento del gen patógeno (Koch & Kogel, 2014; C. C. Nunes & Dean, 2012).

Se conoce que el mecanismo de intercambio de sRNAs de plantas hacia patógenos es a través de la secreción de vesículas extracelulares (EV) (extracellular vesicle) incorporadas con los sRNAs que son transportadas al interior de la célula del patógeno, sin embargo el mecanismo por el cual los sRNAs de patógenos se incorporan a las células vegetales sigue sin descubrirse (Hudzik et al., 2020). En la figura 6 se muestra un esquema general sobre reinos cruzados de RNAi entre patógenos y plantas.

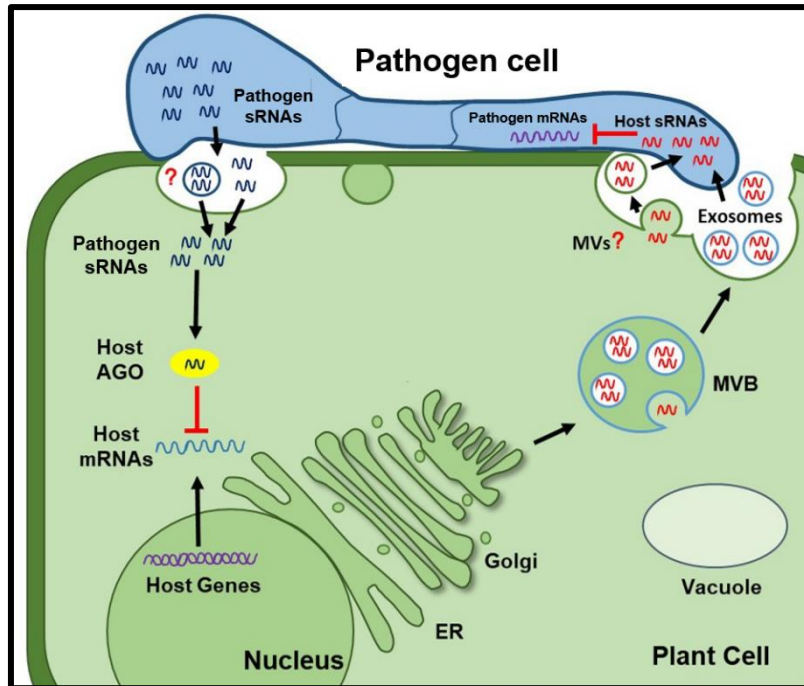


Figura 6. Reinos cruzados de RNAi entre patógenos-plantas. El ARNi entre reinos (Cross-kingdom RNAi) entre plantas y patógenos es bidireccional. Los sRNA derivados de los cuerpos multivesiculares (MVB) y microvesículas derivadas de la membrana plasmática (MV) de la planta se entregan a los patógenos a través de vesículas extracelulares (EV-extracelular vesicles) que están involucradas en la comunicación de célula a célula, secretadas principalmente por exosomas y suprimen la expresión del gen de virulencia en el patógeno. Las moléculas de sRNAs derivadas de patógenos pueden actuar como efectores que se translocan en las células del hospedero para utilizar la proteína AGO del huésped y silenciar los genes de defensa del huésped para una invasión exitosa. Imagen modificada obtenida de (C. Y. Huang et al., 2019).

Es probable que los distintos escenarios de reinos cruzados de RNAi afectan la interacción planta-patógeno y contribuyen a la resistencia de la planta, la virulencia del patógeno y adaptación (Weiberg et al., 2014), por lo cual creemos que estos mecanismos de interacción basados en sRNAs pueden tener un impacto epigenético a través de las generaciones sobre este potencial adaptativo/aclimatación de patógenos a hospederos el cual se describe a continuación.

3.18 Herencia epigenética por RNAs no codificantes

Desde las observaciones originales de la herencia de rasgos en plantas de guisantes por Gregor Mendel en 1865 (Mendel et al., 1865), y su redescubrimiento en 1900 (Tschermak-Seysenegg, 1900), se ha encontrado que la gran mayoría de los rasgos en los organismos eucariotas siguen patrones de herencia mendeliana que se transmiten a través del DNA (N. O. Burton & Greer, 2022). Durante casi el mismo tiempo, pero quizás menos apreciado, también se ha descrito que algunos rasgos no siguen los patrones de herencia mendeliana y pueden verse influenciados por el entorno o por caminos de señalización en generaciones posteriores (N. O. Burton & Greer, 2022). Estas observaciones consistentes de herencia no genética a través de diversos taxones evolutivos sugieren que tales efectos podrían representar un aspecto fundamental de la biología (N. O. Burton & Greer, 2022), como es el caso de la herencia epigenética.

El término herencia epigenética, incluye varias definiciones dependiendo el contexto, en un concepto generalista la herencia epigenética son “todos los procesos que no están específicamente basados en secuencias de DNA, incluida la herencia conductual y cultural que son heredados a la siguiente generación”, sin embargo existen definiciones más restrictivas del término como “los procesos celulares, incluida la transmisión de soma a soma y una serie de otros procesos bioquímicos que no están relacionados con las modificaciones de la cromatina” (Jablonka & Raz, 2009). Sin embargo, queda por determinarse si los conceptos sólo son aplicables para fenómenos transgeneracionales dentro de un mismo linaje, como es la forma asexual en que normalmente se reproduce *P. capsici* (Bossdorf et al., 2008; Jablonka & Raz, 2009).

Estudios en sistemas biológicos de levaduras (Levy & Siegal, 2008) plantas (Fieldes et al., 2005; Keyte et al., 2006; Molinier et al., 2006; Salmon et al., 2005, 2008), desarrollo animal (Ruden et al., 2005), comportamiento (Crews et al., 2007; Crews, 2008) y humanos (Whitelaw & Whitelaw, 2006) han encontrado que los cambios epigenéticos inducidos por la hibridación o el estrés ambiental pueden ser heredados a las generaciones futuras y, por lo tanto, contribuyen a explicar la adaptación a nuevos entornos.

Se ha documentado que la herencia epigenética mediada por RNAs pequeños puede durar múltiples generaciones. Las funciones hereditarias de los sRNAs se hicieron evidentes con el descubrimiento del fenómeno de RNA interferente en *C. elegans* (Fire et al., 1998). Los experimentos pioneros de Mello y Fire demostraron que el nematodo *C. elegans* inyectado con RNA de doble cadena (dsRNA) induce regulación de la expresión de algunos de sus genes los cuales se heredan a las siguientes generaciones (Hackett et al., 2013). Sin embargo, aún no está claro cómo los sRNAs heredados desencadenan la producción de sRNAs *de novo* entre generaciones. Además de que aún no se ha caracterizado si los miRNAs desempeñan un papel en la herencia epigenética (Cecere, 2021). En oomicetos como *P. capsici* se desconoce si existen estas características hereditarias, por lo cual en la presente investigación se analizó esta posibilidad.

Las características de los sRNAs los convierte en moléculas candidatas ideales para transmitir información epigenética entre generaciones, a través del movimiento de su translocación documentada entre tejidos y órganos, lo que permite la transmisión de la información adquirida del soma a la línea germinal y, por lo tanto, a la siguiente generación. También, debido a la amplificación de sRNAs por maquinarias específicas como las RDR que utilizan plantillas de RNAm diana para la producción de siRNAs a lo largo de las generaciones. Asimismo, los sRNAs pueden desencadenar la actividad de otros mecanismos epigenéticos como las modificaciones post-traduccionales de las histonas (PTM: Posttranslational histone Modification) y la metilación del DNA, que podrían ayudar a la propagación de la información epigenética (Cecere, 2021).

Por lo cual, los RNAs pequeños son moléculas epigenéticas capaces de transmitir rasgos entre generaciones (Cecere, 2021). Sin embargo, una característica interesante que parece ser común, aunque no necesariamente universal, en los sistemas hereditarios epigenéticos es que son más lábiles, es decir, menos estables que su contraparte de secuencia de DNA (Johannes et al., 2008; Kalisz & Purugganan, 2004; Kronholm, Johannesson, & Ketola, 2016; Reinders-Wulff et al., 2009; Vaughn & et al., 2007).

La información heredada epigenéticamente puede ser perjudicial cuando contribuye a propagar la herencia de enfermedades (Miska & Ferguson-Smith, 2016), pero también puede tener una función adaptativa y contribuir a la evolución de los rasgos adquiridos (Miska & Ferguson-Smith, 2016). Sin embargo, en este momento de la ciencia de la epigenética, la relevancia de los efectos epigenéticos hereditarios para la ecología y la evolución de la mayoría de los organismos es todavía muy especulativa (Richards et al., 2010).

La incorporación del término de la herencia epigenética a las teorías evolutivas extiende la visión del concepto de evolución (Richards et al., 2010). Jablonka y Lamb sugieren que la evolución sea redefinida como “conjunto de procesos que dirigen a cambios en la naturaleza y frecuencia de características heredables en una población”, y herencia como “procesos de reconstrucción del desarrollo que vinculan ancestros y descendientes y conducen a similitud entre ellos” (Jablonka & Lamb, 2007a, 2007b).

Los efectos de la herencia epigenética se pueden estudiar a través de múltiples generaciones (multigeneracionales), que abarca tanto los efectos intergeneracionales (que duran 1 o 2 generaciones) como los efectos transgeneracionales (más de 3 generaciones) sobre los efectos fenotípicos o moleculares que ocurren en la descendencia (van Otterdijk & Michels, 2016).

Los efectos intergeneracionales se refieren, más comúnmente, a los efectos del entorno de un padre en su descendencia y pueden ser tanto adaptativos como perjudiciales desde la perspectiva de la descendencia (N. O. Burton & Greer, 2022).

Por su parte, los efectos transgeneracionales también pueden ser tanto adaptativos como perjudiciales. Sin embargo, a diferencia de los efectos intergeneracionales, es probable que los efectos transgeneracionales adaptativos y perjudiciales estén mediados por mecanismos epigenéticos, ya que los efectos transgeneracionales generalmente no pueden deberse a la exposición directa de un organismo a un estrés o condición en particular (Cecere, 2021).

Por lo cual, en la presente investigación realizamos el estudio de los efectos de la herencia epigenética transgeneracional mediado por sRNAs y miRNAs en *P. capsici* sobre los efectos fenotípicos en la descendencia en los que se incluyen la plasticidad fenotípica, modificación de la virulencia que puede presentar el oomiceto después de infectar diferentes especies vegetales (como estrés o condición de tratamiento), ya que tanto la plasticidad fenotípica como los efectos de patogenicidad pueden ser resultado de mecanismos epigenéticos mediados por RNAs no codificantes (Maynard Smith & Szathmáry, 1995) que pueden contribuir a la adaptación del chomista a diferentes hospederos, cuyas características se describen a continuación.

3.19 Proceso adaptación de *P. capsici* a diversas plantas hospederas

Los patógenos del género *Phytophthora*, son notoriamente plásticos o “adaptables” en diversos escenarios de campo y laboratorio (Gobena et al., 2012; K. H. Lamour, Mudge, et al., 2012). Recientemente, se ha reportado que *Phytophthora capsici* ha mostrado una notable adaptación a nuevas plantas hospederas (K. H. Lamour, Mudge, et al., 2012), ya que informes

de varios productores de cultivos de cucurbitáceas y solanáceas en E.U. indican que cuando sus cultivos están en riesgo de infección por *P. capsici*, rotan estos cultivos con otros vegetales como zanahorias, habas, cebollas, espárragos, brócoli, soja y alfalfa que normalmente son resistentes al patógeno. Sin embargo, han observado que después de continuos ciclos de rotación de cultivos de habas (Davidson et al., 2002) éstos se vuelven susceptibles al patógeno, causando pérdidas económicas sustanciales.

Lo mismo se ha reportado en soja (A. Gevens & Hausbeck, 2003; A. J. Gevens et al., 2008) y otras verduras que inicialmente eran resistentes al patógeno, lo cual nos indica que *P. capsici* se va adaptando a nuevas especies vegetales relativamente rápido, posiblemente mediante diversas estrategias que aún se desconocen (Tian & Babadoost, 2004).

Se ha examinado la base molecular de la adaptación de *P. capsici* a hospederos mediante la secuenciación y caracterización de su genoma, encontrando que la pérdida de heterocigocidad (LOH: Lost-Heterocigosity) de regiones densas en genes del genoma, así como los elementos transponibles, se relacionan con la adaptación a los diferentes hospederos (K. H. Lamour, Mudge, et al., 2012). Sin embargo, los mecanismos epigenéticos subyacentes de cómo *P. capsici* se adapta a nuevos hospederos durante las interacciones coevolutivas aún se desconocen.

Diversos estudios indican que las mutaciones, hibridaciones, reorganizaciones cromosómicas o eventos de transferencia horizontal de genes, están involucradas en la capacidad que tienen ciertos patógenos en infectar diversos organismos, considerados como factores clave para la adaptación del patógeno en respuesta al nuevo entorno de un nuevo hospedero (DeWitt & Scheiner, 2004).

Sin embargo, los mecanismos epigenéticos se han descrito como factores claves que producen cambios en patógenos para que se lleve a cabo la adaptación a nuevos entornos con mayor velocidad. Estos cambios también son el resultado de la plasticidad fenotípica dentro de la vida de un organismo, que generalmente están exentos de la selección natural que solo actúa sobre la variación hereditaria (de Fine Licht, 2018).

El proceso de adaptación de un patógeno a nuevos hospederos implica varias etapas, cada una de las cuales representa diferentes barreras ecológicas y evolutivas para que se establezca una nueva asociación entre el hospedero y el patógeno, generalmente se considera que los patógenos cambian o se adaptan a un nuevo hospedero de dos formas (Agosta et al., 2010).

En primer lugar, los patógenos pueden colonizar nuevos hospederos que representen un recurso muy similar a la planta ancestral, es decir, ajuste ecológico a través del seguimiento de recursos. Esto puede ocurrir si el hospedero original y el nuevo están estrechamente relacionados o si el patógeno está explotando rasgos conservados evolutivamente entre las dos especies hospederas. Sin embargo, los hospederos pueden ser genéticamente diversos (Fellous et al., 2012), considerado también como proceso de aclimatación (Mason, 2016).

En segundo lugar, los patógenos pueden colonizar nuevos hospederos que representen recursos previamente desconocidos, es decir, ajuste ecológico mediante plasticidad

adaptativa. Bajo este escenario, se considera que el entorno completamente nuevo y potencialmente estresante que representa una nueva planta hospedera "libera" una variación genética críptica en la plasticidad del patógeno (C. K. Ghalambor, McKAY, et al., 2007). Esta variación en las respuestas plásticas conduce a una mayor variación en los fenotipos de patógenos que proporcionan la materia prima para que la selección natural dé forma a la evolución de los rasgos patogénicamente relevantes (Agosta et al., 2010; Levis & Pfennig, 2016; Schlichting & Wund, 2014). Por ello, existen casos en que dicha plasticidad produce un fenotipo adaptativo o "pre-adaptado" en el nuevo hospedero que eventualmente puede conducir al cambio de hospedero (adaptación).

En algunos sistemas biológicos, la plasticidad fenotípica ocurre antes de la adaptación de patógenos a nuevos entornos, la cual está fuertemente influenciada por mecanismos epigenéticos (C. Ghalambor et al., 2015; Moroney et al., 2013; Stoks et al., 2016). Es por ello que en la presente investigación se estudia la plasticidad fenotípica que puede presentar *P. capsici* como primer paso del proceso de adaptación o aclimatación a diferentes hospederos y como los mecanismos epigenéticos basados en RNAs no codificantes podrían estar involucrados en este proceso.

3.20 Plasticidad fenotípica en patógenos por sRNAs

La plasticidad fenotípica se define como la capacidad de un organismo para expresar diferentes fenotipos en respuesta a cambios ambientales (DeWitt & Scheiner, 2004), donde el fenotipo puede ser cualquier rasgo morfológico, fisiológico o conductual. En la mayoría de los casos, la plasticidad fenotípica se basa en ajustar los patrones de expresión génica (Nicotra et al., 2010). Sin embargo, los mecanismos por los cuales se influye y regula la expresión génica durante las respuestas plásticas son poco conocidos en la mayoría de los organismos (DeWitt & Scheiner, 2004), incluido *P. capsici*.

La plasticidad fenotípica puede influir en la dinámica evolutiva cuando un la población se adapta a un nuevo entorno u hospedero (Chevin et al., 2010; Kronholm, Johannesson, & Ketola T, 2016; Lande, 2009). Específicamente, la plasticidad puede facilitar la adaptación al aumentar el tamaño de la población en el entorno nuevo (Chevin et al., 2010) y al generar una variación fenotípica puede seleccionarse si es heredable (Pál, 1998). La variación fenotípica heredable puede lograrse potencialmente con diferentes mecanismos, siendo uno de ellos la plasticidad mediada por mecanismos epigenéticos. Estos incluyen modificaciones de la cromatina como la metilación del DNA (Bird, 2002), diferentes tipos de modificaciones de histonas y RNAs no codificantes (Bannister & Kouzarides, 2011). Curiosamente, los modelos evolutivos que incorporan sistemas genéticos y epigenéticos hereditarios sugieren que estos últimos desempeñan un papel importante en la adaptación (Day & Bonduriansky, 2011; Klironomos et al., 2013; Kronholm, Johannesson, & Ketola, 2016).

La mayoría de los rasgos son plásticos, pero el grado en que la plasticidad es adaptativa o no adaptativa depende de si los fenotipos inducidos por el medio ambiente están más cerca o más lejos del óptimo local (C. K. Ghalambor, McKay, et al., 2007; Schmalhausen, 1949). Por ejemplo, la plasticidad es adaptativa cuando el fenotipo se altera en la misma dirección favorecida por la selección natural de ese entorno (Conover et al., 2009; C. K. Ghalambor, McKay, et al., 2007). Algunos modelos sugieren que la plasticidad adaptativa es un primer paso

crítico en el proceso de evolución adaptativa, aumentando la persistencia de la población en nuevos entornos (el efecto Baldwin).

Por el contrario, la plasticidad no es adaptativa cuando una población se encuentra con un entorno que induce la producción de fenotipos más alejados del óptimo local (Conover et al., 2009; C. K. Ghalambor, McKay, et al., 2007), lo que genera una relación negativa entre la dirección de la plasticidad y la dirección de la evolución adaptativa (Conover et al., 2009; Grether, 2005).

Los experimentos de selección de laboratorio han encontrado apoyo para una relación positiva (adaptativa) (Suzuki & Nijhout, 2006; Waddington, 1961) y negativa (no adaptativa) (Schaum & Collins, 2014) entre la dirección de las respuestas plásticas y la dirección de la evolución.

Se conoce que los mecanismos epigenéticos como la metilación/desmetilación de histonas y proteínas relacionadas con la vía de sRNAs desempeñan un papel importante en la plasticidad fenotípica del hongo filamentoso *Neurospora crassa* sobre una variedad de entornos variables controlados (Kronholm, Johannesson, & Ketola, 2016).

Experimentos de Lachke et al. (2000) plantean la hipótesis de que el cambio es un medio para lograr la plasticidad fenotípica que permite a las poblaciones responder rápidamente a la fisiología cambiante y las respuestas inmunitarias del hospedero. Esta explicación adaptativa para el cambio fenotípico de alta frecuencia se ha propuesto como el mecanismo utilizado por patógenos oportunistas como *Candida albicans* que responde rápidamente a los cambios en su huésped (Soll, 2002).

La variación fenotípica sugiere la posibilidad de un sistema de herencia de dos vías subyacentes: una vía rápida pero inestable (epigenética) y otra lenta pero estable (secuencia de ADN) (Bossdorf et al., 2008). Por ejemplo, en *P. ramorum* se ha descrito que el roble es capaz de inducir la plasticidad de la morfología del crecimiento colonial del patógeno, la cual se relacionó con cambios masivos de regiones cromosómicas como la presencia de trisomías y elementos transponibles (Kasuga et al., 2016).

Los procesos de herencia que no están basados en la secuencia de DNA, se refiere a herencia epigenética; es decir, los efectos fenotípicos a través de las generaciones son también casos de herencia epigenética (Richards et al., 2010). Un potencial ejemplo, es la plasticidad fenotípica en *P. capsici* descrita por Ulloa & Vega (2017) la cual fue inducida por el hospedero al demostrar que los caracteres morfológicos del patrón de crecimiento colonial y virulencia variaban ampliamente entre aislados del patógeno después de infectar siete especies vegetales por dos generaciones, por lo cual pueden existir mecanismos epigenéticos mediados por sRNAs que modulen estos cambios fenotípicos.

Dentro de las características interesantes de *P. capsici* es su capacidad de la variación de la virulencia que puede provocar en diferentes especies vegetales. Por ello, en la presente investigación se aborda el estudio de la diversificación de la virulencia en *P. capsici* que podría ser mediada por mecanismos epigenéticos, cuyos antecedentes se describen a continuación.

3.21 Variación de la patogenicidad y virulencia mediada por sRNAs en *P. capsici*

La patogenicidad se refiere a la capacidad de un microorganismo para causar una enfermedad (Kumate et al., 2009), en cambio, la virulencia es el grado de patogenicidad que el microorganismo ocasiona en un hospedero (Kleinbaum et al., 1984). La variación de la patogenicidad y virulencia de patógenos depende de diferentes factores ambientales como la temperatura, cantidad de humedad relativa, disponibilidad de nutrientes, contenido proteico de efectores y su interacción con hospederos, en donde la carga genética en ambas partes es fundamental. Recientemente, como parte del contenido genético, los RNAs pequeños de patógenos han sido reconocidos como reguladores de la variación en la patogenicidad y virulencia (Weiberg, Wang, Lin, Zhao, & Zhang, 2013).

Las investigaciones realizadas por Ristaino (1990), demostraron que *P. capsici* produce variación en la virulencia entre los hospederos de las poblaciones naturales de solanáceas y cucurbitáceas. Además, se ha encontrado que algunos aislamientos de *P. capsici* son altamente virulentos en ciertos hospederos o partes de la planta, como la raíz o fruto, y menos virulentos o avirulentos en otros (Foster & Hausbeck, 2010; Granke et al., 2011a). También, se han observado diferentes niveles de agresividad entre diferentes aislamientos de *P. capsici* dependiendo su localización geográfica (Granke et al., 2012; Nawaz et al., 2018; Siddique et al., 2019).

Esta variación de la patogenicidad y virulencia observada en *P. capsici* puede estar influenciada principalmente por los genes efectores. Se conoce que en los genomas de *Phytophthora*, los genes que codifican los efectores RXLR, CRN y otros factores de patogenicidad se ubican predominantemente en las regiones densas en TE y escasas en genes. Se considera que estos evolucionan rápidamente en comparación con las regiones densas en genes, lo que da lugar a un "genoma de 2 velocidades" y subyace a la capacidad de las especies de *Phytophthora* para evolucionar rápidamente y superar la resistencia del hospedero (S. Raffaele et al., 2010; S. Whisson et al., 2012).

La variación en la expresión de efectores mediada por sRNAs proporciona una explicación potencialmente importante para la variabilidad patogénica de oomicetos patógenos, posiblemente como una estrategia de adaptabilidad hacia genes de resistencia en las plantas huésped. En *P. capsici*, no se han determinado los mecanismos moleculares que subyacen a esta variación en la expresión del gen efector, sin embargo estudios recientes han implicado al silenciamiento del RNA como importante en estrategias en oomicetos para adaptarse y variar su patogenicidad (Cunnac et al., 2011; Kvitko et al., 2009). Por todo lo anterior, en la presente investigación se analizó la variación de la patogenicidad y virulencia de *P. capsici* en el proceso de adaptación/aclimatación a diversos hospederos relacionada con mecanismos epigenéticos de sRNAs.

IV Metodología

En la presente investigación, se realizó un diseño de análisis experimental basado en la caracterización morfológica y de patogenicidad de *P. capsici* D3 cuando infecta y es recuperado del patosistema: hojas de chile, pepino, brócoli y frijol, y sus combinatorias por dos generaciones. Construcción de modelo de correlación y clusterización de estas variables.

Después, se realizó secuenciación y análisis bioinformáticos de RNAs pequeños a partir de dos aislados del patógeno con diferencias en el historial de especies vegetales de infección/recuperación, para identificar y caracterizar los sRNAs, miRNAs y sus probables genes targets. También, se identificó el potencial regulatorio de su genoma de referencia con familias homólogas de miRNAs reportadas en tres bases de datos.

En seguida, se identificaron y caracterizaron *in silico* los principales genes asociados a la biogénesis, transporte y procesamiento de elementos no traducibles, validando su nivel de expresión relativa y de genes efectores, modificadores de histonas, transposición y miRNAs con RT-qPCR y en stem loop, respectivamente, que presentaron diferencias significativas en su expresión en los análisis bioinformáticos. El nivel de expresión relativa se realizó en cuatro tratamientos de aislamientos del patógeno y un control sin tratamiento.

Por último, se generó un modelo gráfico y correlativo sobre la biogénesis y tráfico de sRNAs-miRNAs entre *P. capsici* y la especie vegetal infectada, virulencia, fenotipo y nivel de expresión de genes y miRNAs en dos aislados del microorganismo. En el ANEXO 1 se muestra el diagrama general de la metodología.

4.1 Caracterización molecular de la cepa D3 de *Phytophthora capsici*

La cepa D3 de *P. capsici* utilizada en esta investigación fue amablemente proporcionada por el Dr. Mario M. González-Chavira del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Celaya) recuperada de cultivos de chile poblano que presentaban síntomas de infección, situados en el municipio de Dolores hidalgo, Guanajuato (J. L. Pons-Hernández et al., 2020).

En estudios previos de Ulloa y Vega (2017) caracterizaron la cepa a nivel de especie mediante amplificación y secuenciación Sanger de las Regiones Espaciadoras Internas ribosomales o ITS (Internal Transcribed Spacers) con los oligonucleótidos ITS-5 e ITS-4 (Jaramillo-Pineda et al., 2015), obteniendo 95% de identidad con *Phytophthora capsici* de Leonian de acuerdo a la base de datos del NCBI, siendo el único organismo con el cual coincidió la secuencia. Posteriormente, Sevillano y colaboradores (2022) realizaron un análisis de secuencias multi locus (MLSA-Multilocus Sequence Analysis) de las secuencias ITS y seis marcadores moleculares del transcriptoma de la cepa D3 (Rojas Rojas et al., 2021), contra ITS y marcadores moleculares de otras especies de *Phytophthora*, encontrando que la cepa D3 se ubica dentro del clado 2, lo cual es característico de la especie en el grupo de los oomicetos del género *Phytophthora* (K. H. Lamour, Stam, et al., 2012). Confirmando mediante técnicas microbiológicas y moleculares que la cepa D3 utilizada en esta investigación se trata del oomiceto patógeno designado como *Phytophthora capsici*.

4.2 Caracterización morfológica de *Phytophthora capsici*

Con aumentos de 40X y ayuda de microscopio óptico LEICA CTR5000 se caracterizó la morfología microscópica del oomiceto, para ello se tiñeron sus componentes estructurales con azul de tripan al 0.2% (Larroque et al., 2013) y se analizó el tipo esporangióforo, longitud de pedicelo y morfología del esporangio, además se evaluó la cinética de crecimiento y patrón de crecimiento colonial denominada como morfología macroscópica, micelial o colonial, ambos tipos de morfologías fueron caracterizadas con base a las tablas de identificación morfológicas descritas por (Abad et al., 2019). Se indujo el desarrollo de esporangios a partir de placas Petri que contenían al patógeno de 5 días de edad, expuestas a luz blanca constante durante 3 días consecutivos a temperatura ambiente (Ristaino, 1990).

4.3 Obtención de inóculo de *Phytophthora capsici*

El crecimiento del microorganismo se realizó en placas Petri con medio V8-agar clarificado adicionado con antibióticos (V8CA+). La preparación por litro del medio de cultivo se realizó con 200mL de jugo comercial V8 HERDEZ® previamente clarificado mediante centrifugación a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 min, 800mL de agua destilada, 15 gr de agar y 3 gr de carbonato de calcio (Solache-Huacuz et al., 2010). El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min, cuando ya se encontraba esterilizado en estado líquido a una temperatura aproximada de 65°C y en campana de flujo laminar, se adicionaron y mezclaron los antibióticos: benomilo (100 mg/L), rifampicina (80 mg/L), ampicilina (100 mg/L), streptomina (50 mg/L) y kanamicina (50 mg/L) previamente esterilizados por filtración. Después, el medio de cultivo V8CA+ se dispensó en placas Petri y fueron inoculadas con discos de 1 cm de diámetro de micelio de *P. capsici* e incubadas a 28°C en oscuridad por 8 días, para realizar los ensayos de infección en hoja desprendida.

4.4 Ensayo de infección en hoja desprendida

Los ensayos de infección se realizaron a partir del protocolo descrito por (Ulloa & Vega, 2017) con algunas modificaciones, sobre hojas desprendidas de plantas de 4-6 semanas de edad crecidas en condiciones de invernadero a 28°C, representativas de cuatro familias de especies vegetales entre las que se incluyeron: solanáceas (chile, *Capsicum annuum*, var. *annuum* L.), cucurbitáceas (pepino, *Cucumis sativus*), brassicáceas (brócoli, *Brassica oleraceae* var. *italica*) y fabáceas (frijol, *Phaseolus vulgaris*).

En ambiente de esterilidad, las hojas fueron lavadas y enjuagadas con etanol al 70% y agua estéril, respectivamente por tres ocasiones, se retiró el exceso de humedad, se colocaron en una cámara de humedad estéril con el envés hacia arriba y a continuación se generó una pequeña herida de ~3 mm en el centro de la hoja, la cual se inoculó con un disco de 5 mm de diámetro de micelio aéreo de *P. capsici* de 8 días de edad. Entonces, la cámara con el patosistema se incubó a 28°C en oscuridad. Se monitoreó y evidenció el desarrollo de la infección a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación (hdi) con fotografías en presencia de luz UV de longitud de onda larga de 340 nm y luz natural.

Cada ensayo de infección por condición experimental evaluada se realizó en al menos seis ocasiones por cuadruplicado. Finalmente, se determinó el área infectada con el software ImageJ y se realizó su apropiado análisis estadístico que consistió en pruebas de normalidad y análisis de la varianza ANOVA con intervalo de confianza de $p < 0.05$.

4.5 Aislamiento primario de *Phytophthora capsici* derivado de ensayos de infección

La primera generación de infecciones ocasionadas por la cepa progenitora D3 de *P. capsici* en hojas desprendidas de chile, pepino, brócoli y frijol se denominaron “infecciones primarias” designadas como: I-chile, I-pepino, I-brócoli e I-frijol, respectivamente, mostrado en la figura 7A; cuyo progreso de infección fue valorado y analizado a las 24, 48 y 72 hdi para conocer la patogenicidad que la cepa D3 ocasiona en las cuatro especies vegetales.

A las 72 hdi de las infecciones primarias y en condiciones de esterilidad, se colectaron ~25 mm² de tejido infectado aledaño al sitio de inoculación y se transfirió al centro de una placa Petri con medio V8CA+, se incubó a 28°C en oscuridad para su crecimiento, obteniendo de esta manera al oomiceto aislado de manera axénica (Ulloa & Vega, 2017), el cual fue nombrado “aislado primario” que pudiera provenir de infectar chile, pepino, brócoli o frijol, identificados como: A-chile, A-pepino, A-brócoli y A-frijol, respectivamente, figura 7B.

Para conocer si existen cambios en el crecimiento de los aislados primarios se evaluó su cinética de crecimiento cada 24 horas hasta los 8 días de edad, ya que fue el tiempo promedio que la cepa control D3 se demoraba en colonizar la placa Petri de 8 cm de diámetro. Además, a los 8 días de edad se tomaron fotografías para evidenciar la plasticidad fenotípica que presentaban los aislados primarios.

Se indujo el desarrollo de esporangios (Ristaino, 1990) para la caracterización de sus componentes estructurales y reproductivos, teñidos con azul de metileno al 0.2% (Larroque et al., 2013) para probar que los aislados obtenidos corresponden a *P. capsici* e identificar si éstos presentan modificaciones en sus componentes estructurales después de ser recuperados de infección primaria (Abad et al., 2019). En seguida, el micelio aéreo de varias placas Petri de los cuatro aislados primarios de 8 días de edad se dividió en dos fracciones, la primera se destinó para colectar biomasa suficiente para realizar extracción y análisis de ácidos nucleicos, la segunda fracción del micelio se utilizó para realizar una segunda generación de infección en hojas desprendidas de las cuatro especies vegetales de chile, pepino, brócoli y frijol.

Finalmente, al obtener los datos de la caracterización de infecciones primarias y sus aislados primarios se construyó un modelo de correlación, análisis de componentes principales y clusterización mediante k-means en RStudio v4.2.1 (Studio Team, 2020).

4.6 Aislamiento secundario de *Phytophthora capsici* derivado de infección secundaria

A partir de los cuatro aislados primarios anteriormente caracterizados de A-chile, A-pepino, A-brócoli y A-frijol, se realizó una segunda generación de infección en hojas desprendidas de las cuatro especies vegetales de chile, pepino, brócoli y frijol (Ulloa & Vega, 2017) efectuando una combinatoria de 16 diferentes condiciones de infecciones experimentales, las cuales fueron llamadas “infecciones secundarias”, ya que son infecciones ocasionadas por *P. capsici* con conocimiento de procedencia de infección primaria hacia una especie vegetal particular, mostrado en la figura 7C.

Para generar infecciones secundarias ocasionadas por el aislado primario recuperado de la infección primaria de chile (A-chile) en las cuatro especies vegetales, se inocularon discos de 5 mm de diámetro de micelio aéreo del aislado de 8 días de edad en el centro de la parte abaxial que contenía una pequeña herida de hojas desprendidas de chile, pepino, brócoli y frijol dispuestas en cámara de humedad estéril, cuyo desarrollo de infección fue monitoreado y analizado a las 24, 48 y 72 hdi para determinar si existen cambios en la virulencia del patógeno hacia las cuatro especies vegetales infectadas cuando éste tiene un historial de ser recuperado de infección primaria en chile. La misma combinatoria de infección y análisis se realizó para los aislados primarios de A-pepino, A-brócoli y A-frijol hacia las mismas cuatro especies vegetales.

La nomenclatura establecida para referirse a las infecciones secundarias proporciona un seguimiento del historial de infección al que fue sometido el tratamiento experimental. Por ejemplo, la identificación de las infecciones secundarias ocasionadas por A-chile en hojas de chile, pepino, brócoli y frijol se estableció como: I-ch-ch, I-ch-pe, I-ch-br, I-ch-fr, ésta se lee de izquierda a derecha en donde la primera letra “I” alude al evento de infección, seguido de un guion medio de separación, las siguientes dos letras hacen referencia al nombre común de la especie vegetal en donde se realizó la infección primaria, seguido de guion medio, las últimas dos letras indican el dígrafo inicial del nombre común de la especie vegetal en que se realizó la infección secundaria. El indicador: “I-ch-pe”, significa que el tratamiento es una infección secundaria cuya infección primaria se realizó por *P. capsici* D3 en hoja chile seguido de infección secundaria ejecutada en hoja de pepino. También se establecieron los identificadores de infecciones secundarias para las obtenidas de los aislados primarios de A-pepino, A-brócoli y A-frijol en hojas desprendidas de las cuatro especies vegetales basado en las mismas reglas de nomenclatura, mostradas en el índice de abreviaturas y figura 7C.

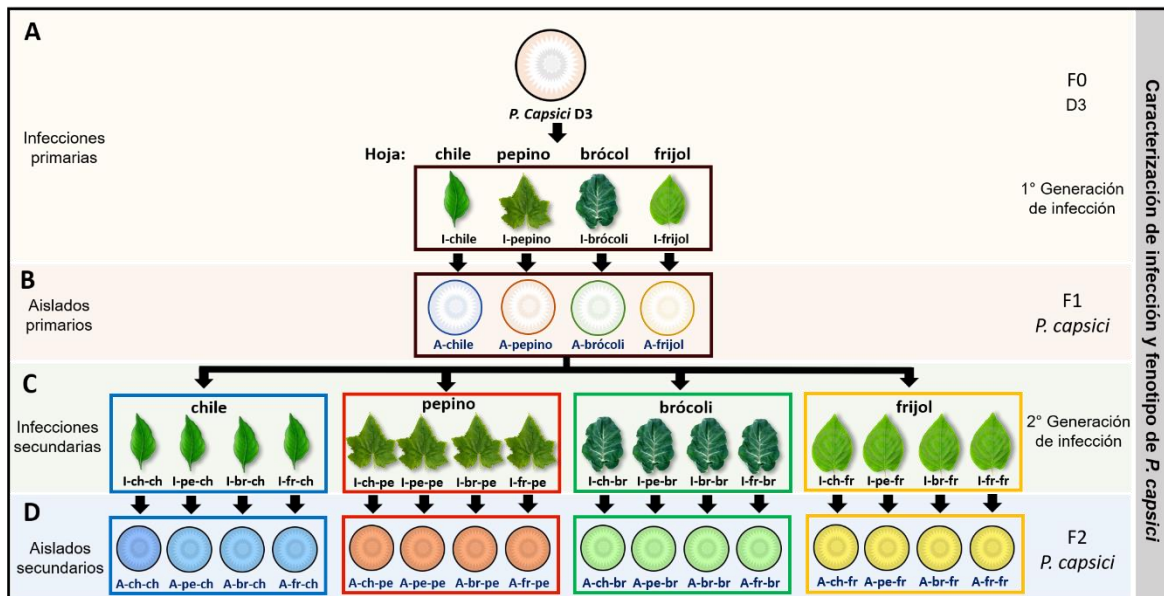


Figura 7. Diagrama general de infección y aislamiento de *P. capsici* durante dos generaciones.
 A. Infecciones primarias realizadas en hojas de chile, pepino, brócoli y frijol a partir de la cepa D3 de *P. capsici* y monitoreadas a las 24, 48 y 72 hdi.

- B. A las 72 hdi del tejido infectado de las cuatro especies vegetales correspondiente a la 1° generación de infección/infecciones primarias, se recuperó al oomiceto en placas Petri con medio V8-Agar adicionado con antibióticos (V8CA+) obteniendo los aislados primarios o F1 de *P. capsici* para evaluar su fenotipo, correspondiente a morfología microscópica, macroscópica y cinética de crecimiento.
- C. Segunda generación de infección/infecciones secundarias realizadas en hojas de chile, pepino, brócoli y frijol ocasionadas por los cuatro aislados primarios, obteniendo una combinatoria de 16 tratamientos infectivos con seguimiento a las 24, 48 y 72 hdi.
- D. Obtención de aislados secundarios o F2 de *P. capsici* a partir de tejido infectado de las 16 combinatorias de infecciones secundarias, crecidos en placas Petri con V8CA+ para caracterizar su fenotipo hasta los 8 días de edad.

A las 72 hdi de las 16 infecciones secundarias en hojas desprendidas de las 4 especies vegetales evaluadas y en condiciones de esterilidad, se tomaron ~25 mm² de tejido infectado de la periferia del sitio de inoculación y se transfirieron a sus respectivas placas Petri con medio V8CA+. Se crecieron a 28°C en oscuridad, obteniendo entonces los “aislados secundarios”, es decir aquellos aislados de *P. capsici* recuperados en estado axénico en su primer pase en placa que fueron infectados en alguno de los cuatro hospederos evaluados y recuperados por dos ocasiones consecutivas, mostrado en la figura 7D.

La nomenclatura establecida para distinguir a los aislados secundarios es similar a la desarrollada para las infecciones secundarias, cuya finalidad es notar el historial de infección y aislamiento al que fue sometido el oomiceto. Los identificadores: A-ch-ch, A-pe-ch, A-br-ch y A-fr-ch muestran que se trata de los aislados secundarios obtenidos de infección secundaria de hojas de chile que fueron infectados con los cuatro aislados primarios.

La nomenclatura de identificación de aislados secundarios del patógeno está constituida por tres componentes: la primera letra “A” indica que se trata de un aislamiento de *P. capsici*, seguido de un guion medio de separación, dos primeras letras que indican el aislado primario obtenido de infección primaria de una especie vegetal determinada, a continuación, un guion medio y finalmente, las dos primeras letras del nombre común de la especie vegetal de infección secundaria del cual el oomiceto fue recuperado por segunda ocasión.

Por ejemplo, el identificador “A-br-ch” indica que se trata de un aislado secundario del patógeno que fue recuperado de una infección secundaria de chile, la cual fue provocada por el aislado primario de *P. capsici*, obtenido de infección primaria de brócoli. Se aplicó una nomenclatura base específica para los restantes 12 aislados secundarios, mostrada en el índice de abreviaturas y figura 7D.

Al igual que en los cuatro aislados primarios, para los 16 aislados secundarios y la cepa D3 de *P. capsici*, se evaluó su cinética de crecimiento hasta los 8 días de edad, caracterización de su fenotipo macroscópico y microscópico, para realizar pruebas de abundancia morfológicas y sus respectivas pruebas de hipótesis con chi-cuadrada (χ^2) en RStudio (Abad et al., 2019; Larroque et al., 2013; Studio Team, 2020). Enseguida, se construyó un modelo de correlación de las variables patogenicidad, crecimiento y fenotipo, basado en análisis de componentes principales, clusterización de las muestras por medio de k-means en RStudio v4.2.1.

Por último, se colectaron muestras de micelio aéreo de 8 días de edad de cada tratamiento con ayuda de cúter estéril, asegurándose de no tomar parte del inóculo inicial del tejido vegetal

infectado de 4-5 placas de replicas técnicas por muestra, las cuales fueron colocadas en tubos eppendorf de 1.5 mL y congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido para ser almacenadas a -80°C hasta el momento de su extracción y análisis de ácidos nucleicos, incluidos RNAs pequeños.

4.7 Secuenciación de RNAs pequeños de aislados de *Phytophthora capsici*

Fueron seleccionadas dos muestras colectadas de micelio aéreo, correspondientes a aislados secundarios de *P. capsici* con diferencias en el historial de especies vegetales por el cual fue infectado/recuperado el patógeno para extracción y secuenciación masiva de sus RNAs pequeños (sRNA-seq), ya que el objetivo principal de la investigación fue estudiar los mecanismos de regulación de la expresión génica del oomiceto cuando infecta y es recuperado de diferentes especies vegetales a partir de sus RNAs pequeños, en donde se incluyen los microRNAs.

La muestra de aislado secundario de la que se secuenciaron sus small RNAs fue la identificada como: A-ch-ch obtenida de infección/recuperación de hojas de chile en dos ocasiones, utilizada como control ya que al igual que la cepa progenitora D3 se conoce que proviene de infectar y ser recuperado de chile sin cambio de especie vegetal. La segunda muestra denominada A-br-ch, proviene de la interacción con dos diferentes especies vegetales, derivada del aislamiento de infección secundaria de chile que proviene de infección primaria en brócoli.

Para ambas muestras se enriquecieron sus RNAs pequeños a través del kit de extracción “Plant microRNA Purification Kit” (NORGEN BIOTEK CORP) siguiendo las recomendaciones del fabricante, mostrado en el ANEXO 2. Se analizó su integridad y calidad de extracción mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y espectrometría con el equipo NanoDrop2000, respectivamente. Después, en el Laboratorio de Servicios Genómicos del Langebio, Irapuato (Labsergen), se validó que la calidad de la densidad óptica (DO) 260/280 de los RNAs pequeños de ambas muestras fuera mayor a 2, Número de Integridad de RNA (RIN-RNA Integrity Number) mayor o igual a 8 y tamaño de fragmento ~22nt con Chip RNA 6000 pico. Enseguida, generaron las respectivas bibliotecas de secuenciación a través del kit 4 TruSeq SmallRNA de Illumina, así como la secuenciación tipo sRNA-seq en una sola placa de 1x75, SE en la plataforma de Illumina Miseq. Por último, obtuvieron los datos crudos de secuenciación en formato .fastq disponibles para su análisis bioinformático.

4.8 Análisis bioinformáticos sRNA-seq de aislados secundarios

En general, se realizó el mismo tipo de análisis bioinformático y comparativo para ambas bibliotecas de sRNA-seq de los aislados secundarios de A-ch-ch y A-br-ch. Los datos crudos de secuenciación de formato .fastq de RNAs pequeños fueron preprocesados, concatenando archivos de 4 corridas de secuenciación en uno solo documento por muestra. Se analizó la calidad de los reads con el programa FastQC v0.11.9 (Simon, 2010), enseguida se cargaron a la plataforma en línea de Galaxy v0.6.7 (<https://usegalaxy.org/>) y se eliminaron los adaptadores con Trim Galore! v0.6.5 (Felix, 2019) con la herramienta “Remove Illumina small RNA adapters”. Después se ajustó la calidad y tamaño de los reads utilizando Trimmomatic v0.32 (Bolger et al., 2014) con los parámetros: ILUMINACLIP:TRuSeq3-SE:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:18 PHRED 33. Finalmente, se

verificó que los adaptadores y reads de baja calidad estén eliminados con FastQC, para entonces analizar las poblaciones de los RNAs pequeños de las secuencias.

4.8.1 Análisis de poblaciones de RNAs pequeños

En el procesamiento de datos, fueron filtrados los reads asociados a regiones de RNAs pequeños ribosomales (srRNAs) y de transferencia (stRNA) que se encuentran alojados en las bases de datos de Rfam (Kalvari et al., 2021) y Silva (Quast et al., 2013) con bowtie2 v2.4.4 (Langmead & Salzberg, 2012). Entonces, fueron cuantificados para obtener un gráfico comparativo de la abundancia de los RNAs pequeños asociados a los principales tipos de RNAs (tRNAs, rRNAs y mRNAs) presentes en las muestras de micelio de los aislados secundarios secuenciados.

Los reads que no mapearon a los srRNAs y stRNAs con características adecuadas de calidad y longitud, fueron mapeados al genoma de referencia de *Phytophthora capsici* LT1534 v.11 (K. H. Lamour, Mudge, et al., 2012) del Join Genome Institute (JGI) con bowtie2 v2.4.4. Los reads o RNAs pequeños mapeados a regiones de genes relativamente conocidas o curadas del genoma de *P. capsici*, que incluyen regiones no traducibles como es el caso de elementos transponibles, en archivos en formato .sam se pasaron a formato .bam con samtools (H. Li et al., 2009) y bamtools (Barnett et al., 2011), respectivamente.

Enseguida, se determinó la abundancia de poblaciones de RNAs pequeños asociados a regiones genómicas del oomiceto, las cuales fueron clasificadas de acuerdo a su longitud, mediante herramientas para recuento de secuencias de la plataforma de FAS Center Scriptome home (UNIX) (Harvard College, 2008), cuyo resultado fue graficado con el software GraphPad Prism v7.

Después, se construyó un diagrama de relaciones de Venn con el programa web “Calculate and draw custom Venn diagrams”, para conocer la cantidad de RNAs pequeños que estaban compartidos y/o eran característicos de cada tratamiento.

Con un pipeline basado en el marcaje de secuencias desarrollado en Ubuntu, se analizó la abundancia del primer nucleótido del extremo 5' de las secuencias de los RNAs pequeños antes clasificadas por tamaño. A continuación, con el programa Integrative Genome Viewer-IGV (Robinson et al., 2011) se identificaron y compararon aquellas regiones del genoma que podrían ser altamente asociadas a ser reguladas por los RNAs pequeños en ambos aislados.

Se realizó un análisis de expresión diferencial de los sRNAs asociados a regiones de genes anotados de *P. capsici* con DESeq2 en RStudio v4.2.1 y se realizó el enriquecimiento de las vías metabólicas que presentaron $\text{Log}_2\text{Folchage} \geq 1$ y ≤ 1 de la base de datos de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG) (Kanehisa & Goto, 2000) con el programa iDEP.96 (Ge et al., 2018).

A partir de los sRNAs asociados al genoma de *P. capsici*, se identificaron miRNAs reportados en la base de datos de miRNAs miRBase v22 con el programa sRNAbench (Griffiths-Jones et al., 2008) y se realizó su análisis expresión diferencial con edgeR, en el programa de sRNAtoolbox, usando la herramienta sRNAde (Ge et al., 2018).

Los restantes sRNAs asociados al genoma de *P. capsici* sin asignación a bases de datos curadas de miRNAs, se mapearon a genes específicos de patogenicidad, modificadores de histonas y factores de transcripción que mostraron diferencias significativas de expresión en transcriptomas de *P. capsici* D3 al infectar varios hospederos identificados en estudios anteriores del laboratorio (Rojas Rojas et al., 2021), así como a regiones de elementos transponibles obtenidas de la base de datos RepetDB (Amselem et al., 2019). Las secuencias de sRNAs que presentaron “mismaches” fueron filtradas mediante análisis de homología de secuencias basadas en alineamiento BLAST (Altschup et al., 1990).

Los sRNAs que cumplieron los filtros de 100% de identidad de secuencia, fueron visualizadas con la herramienta del BROWSE que se encuentra alojada en la página del genoma de *P. capsici* LT1534 del JGI, para caracterizar la abundancia de las poblaciones de sRNAs asociados a genes efectores, modificadores de histonas y elementos transponibles, así como identificar los sRNAs únicos y compartidos entre los dos aislados, y finalmente construir los respectivos gráficos en RStudio v4.2.1 (Studio Team, 2020). Una vez que fueron caracterizados los RNAs pequeños de manera global, se identificaron y analizaron aquellas secuencias que presentaban características de ser potenciales miRNAs *de novo*.

4.8.2 Identificación y análisis de potenciales microRNAs

Después de caracterizar las poblaciones de RNAs pequeños y miRNAs anotados en bases de datos en ambos aislados secundarios del oomiceto, se predijeron sus potenciales miRNAs *de novo* con el programa miRDeep* (An et al., 2013) con los parámetros: miRLength:18-23; minphred: 20; máx multimap:101; min reads:5; min score:-10; Genome:PcapLT1534. Para ello, se utilizaron los archivos de salida de los reads asociados al genoma de referencia del patógeno y que no mapearon a las bases de datos de Rfam y Silva de formato .SAM (Sequence Alignment Map).

En seguida, se analizó el nivel de expresión de los potenciales miRNAs predichos por miRDeep* y sus parámetros termodinámicos de la energía mínima libre (Minimum free energy-MFE) y predicción de la estructura secundaria fueron caracterizados con el programa RNAfold WebServer.

A partir de la secuencia de miRNA maduro y su potencial locus de síntesis de hairpin (pre-miRNA), se identificaron y clasificaron familias de genes MIR y fueron comparadas entre los dos aislados con la construcción de diagrama de Venn y relaciones filogenéticas, a través de alineamiento múltiple de las secuencias con el programa MUSCLE del EMBL-EBI, seguido de la construcción de árbol de relaciones con PhyML v3.0 (Guindon et al., 2010). Además, se identificaron potenciales isoformas de las familias de miRNAs con los programas isomiR-SEA v1.6 (Urgese et al., 2016) y sRNAbench. Así mismo, se realizó la búsqueda de potenciales miRNAs asociados a regular genes efectores, modificadores de histonas, cromatina, factores de transcripción y elementos transponibles con la misma estrategia de identificación.

Con el programa IGV se identificaron los loci del genoma de *P. capsici* LT1534 en donde los miRNAs *de novo* podrían estar ejerciendo su actividad regulatoria. Además, se identificaron sus potenciales genes target con la herramienta TargetScan (Agarwal et al., 2015) que se

encuentra incorporada en miRDeep* y con los programas PSROBOT, TAPIR_HYBRID y TAPIR_FASTA (Wu et al., 2012; Bonnet et al., 2010), a partir de datos de los miRNAs *de novo* y cDNA del fitopatógeno. Enseguida, se realizó la anotación funcional de los potenciales genes target, usando la bases de datos de euKaryotic Orthologous Groups (KOG) dispuesta en MycoCosm del JGI (Tatusov et al., 2003).

Existen varios programas para la predicción de genes targets de miRNAs, sin embargo, la mayoría son específicos para un organismo en particular, por lo que además se realizó una curación manual para localizar el locus o sitio de escisión más probable entre un potencial miRNA y gen target con alineamiento local BLAST (Altschup et al., 1990) entre las secuencias de miRNAs *de novo* maduros y en hairpin hacia bases de datos del genoma de *Phytophthora capsici* LT1534 v.11. Dichas regiones y genes fueron visualizadas en el BROWSE del genoma del microorganismo.

También, se realizó alineamiento confirmativo con BLAST de la secuencia de los genes target predichos por los programas antes mencionados y sus miRNAs, ya que parte del objetivo de esta investigación es conocer aquellos potenciales sitios genómicos en donde los miRNAs predichos podrían tener un probable efecto de regulación endógena en *P. capsici* y si existen cambios en el perfil de sitios regulados por miRNAs cuando el oomiceto tiene diferente historial de infección en distintas especies vegetales.

Con la identificación de potenciales miRNAs *de novo* y sus genes target se generó un modelo grafico que muestra de manera predictiva los principales procesos metabólicos que podrían ser regulados en el patógeno en ambas condiciones experimentales.

En seguida, se identificaron posibles RNAs pequeños y potenciales miRNAs de *P. capsici* asociados a regular elementos genómicos de chile, ya que fue la especie vegetal de la que fueron recuperados ambos aislados secundarios. Para esto, a partir de los RNAs pequeños y miRNAs previamente obtenidos que fueron asociados al genoma del oomiceto, fueron mapeados con bowtie2 v2.4.4 (Langmead & Salzberg, 2012) hacia secuencias de genes de resistencia de chile (Siddique et al., 2019) obtenidas del sitio web Sol Genomics Network y genoma de referencia de chile, *Capsicum annum* var. *annuum* cultivar CM334 (S. Kim et al., 2017) derivado del NCBI.

Después, se realizó filtrado estricto de las secuencias mediante alineamiento local BLAST hacia las mismas bases de datos de chile para eliminar aquellas secuencias que pudieron ser mapeadas de manera azarosa, contribuyendo a eliminar los falsos positivos. Enseguida, se construyó un gráfico de las poblaciones de RNAs pequeños y genes asociados a los mismos, comenzando con la construcción de un modelo gráfico que explique los resultados de reinos cruzados de RNAi de estos análisis.

Los aislados secundarios brindan información sobre el historial de especies vegetales que infectó el chromista y de las cuales fue recuperado. Entonces, los análisis bioinformáticos de sus RNAs pequeños pueden ofrecer conocimiento predictivo sobre la regulación endógena mediada por estos elementos en el oomiceto, pero además pueden proporcionar información relevante acerca de la existencia de una posible transferencia tanto horizontal como vertical de RNAs no codificantes por parte de la especie vegetal hacia el patógeno, en donde el historial

de infección es el factor clave que podría ayudar a profundizar el conocimiento de ambos tipos de tráfico de RNAs pequeños denominados como memoria y herencia epigenética mediada por RNAs no codificantes después de la interacción planta-patógeno en *P. capsici*, respectivamente. Por ello, fue importante identificar aquellos potenciales sRNAs y miRNAs que podrían ser generados a partir de las especies vegetales de Chile y brócoli que lograrían potencialmente estar presentes en los aislados secundarios del oomiceto.

4.8.3 Identificación de potenciales RNAs pequeños y miRNAs de Chile en aislados secundarios de *P. capsici*

A partir de los archivos .fastq de RNAs pequeños de los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch de *P. capsici* que fueron filtrados sus stRNAs, srRNAs y que no estaban asociados al genoma de referencia de *P. capsici* LT1534, se realizó mapeo con bowtie2 v2.4.4 hacia el genoma de referencia de Chile, *Capsicum annuum* var *annuum* cultivar CM334 (S. Kim et al., 2017) para identificar aquellos potenciales RNAs pequeños presentes en las muestras de ambos aislados secundarios que podrían tener origen en Chile y por alguna razón estaban incorporados en el micelio de *P. capsici*.

Después del mapeo, se realizó un filtrado estricto de los RNAs pequeños con alineamiento local BLAST hacia el mismo genoma de referencia de Chile para eliminar aquellos reads que habrían mapeado por azar y disminuir la probabilidad de obtener falsos positivos, teniendo mayor confiabilidad que los RNAs pequeños obtenidos en realidad son específicos de Chile.

Se caracterizó y comparó la abundancia de sRNAs asociados a Chile de acuerdo a su longitud a través de diagrama de Venn y fueron identificadas aquellas regiones del genoma de Chile del cual provienen estos RNAs pequeños, mediante la búsqueda hacia bases de datos del NCBI y genoma anotado de *Capsicum annuum*, conociendo entonces hacia que genes, fragmentos de genes o regiones del genoma de Chile corresponden éstos RNAs pequeños, incluso si corresponden a otro organismo con ayuda del programa sRNAscons (Aparicio-Puerta et al., 2022). Enseguida, se realizaron gráficos de los resultados con RStudio v4.2.1 (Studio Team, 2020).

De los sRNAs asociados al genoma de *Capsicum annuum* se identificaron miRNAs reportados en la base de datos PmiREN 2.0 (Guo et al., 2022), la cual es una enciclopedia de miRNAs específica para plantas y de la cual se anotaron los genes target. Enseguida, se identificaron potenciales miRNAs *de novo* con miRDeep* (An et al., 2013), a partir de los parámetros por defecto sólo cambiando la opción "Genome" con CapCM334 para confirmar que los miRNAs predichos son originarios de Chile.

Entonces, se realizó un siguiente paso de control de los potenciales miRNAs, para ello, se volvió a modificar el parámetro de "Genome" a PcapLT1534 en donde no se esperaría obtener la predicción de potenciales miRNAs, confirmando que los resultados de miRNAs asociados a Chile son específicos de la especie vegetal de *Capsicum annuum* y no corresponden al oomiceto, evitando obtener falsos positivos.

Usando targetScan, PSROBOT, TAPIR_HYBRID y TAPIR_FASTA, así como alineamiento local BLAST, fueron identificados los potenciales genes target de los miRNAs cuyo origen

podría ser chile hacia el genoma de chile CM334 y *P. capsici* LT1534. Finalmente, se continuó construyendo el modelo gráfico que explique los datos obtenidos. Con estos análisis se identificó la posible evidencia *in silico* de transferencia horizontal de RNAs no codificantes de chile hacia el patógeno denominada como memoria epigenética.

El siguiente paso del análisis de las bibliotecas de secuenciación de los aislados secundarios consistió en identificar la posible existencia de transferencia o tráfico de RNAs pequeños de la especie vegetal infectada en el primer ciclo de infección, es decir, de brócoli de manera transgeneracional hacia el aislado secundario, enfatizando el análisis en el aislado secundario A-br-ch.

4.8.4 Identificación del probable tráfico transgeneracional de RNAs pequeños y miRNAs de brócoli en el aislado A-br-ch de *P. capsici*

Se realizó la búsqueda de evidencia predictiva que indique la posible existencia de herencia epigenética transgeneracional de RNAs no codificantes de la especie vegetal brócoli hacia *P. capsici* en el aislado A-br-ch. Para ello, del archivo en formato .fastq de RNAs pequeños de A-br-ch que no se asociaron a los genomas de *P. capsici* LT1534 y chile CM334 que además fueron filtrados los stRNAs y srRNAs, se mapeó al genoma de referencia de *Brassica oleraceae* var. *oleraceae* cultivar T01000 (Parkin et al., 2014) obtenido de la base de datos genómicos del NCBI, por ser la especie vegetal más cercana a brócoli (*Brassica oleraceae* var. *italica*) ya que su genoma aún no se encontraba disponible cuando se realizó el presente análisis.

Del archivo de salida del mapeo se encontraron los potenciales RNAs pequeños preliminares asociados a *Brassica oleraceae*; en seguida, se realizó un filtrado estricto de secuencias con BLAST hacia el mismo genoma de referencia, eliminando aquellas secuencias que pudieron mapear por azar, disminuyendo los probables falsos positivos.

Los RNAs pequeños restantes del aislado A-br-ch fueron comparados con los reads de la condición A-ch-ch que no estaban asociados a ninguna base de datos a la que fueron mapeados y fueron eliminados los reads compartidos entre ambos archivos, esto se realizó como tercer punto de control para eliminar las secuencias de falsos positivos.

De los pocos RNAs pequeños restantes del aislado A-br-ch se realizó un alineamiento BLAST hacia secuencias anotadas del genoma de *Brassica oleraceae* para identificar las regiones del genoma a las que pertenecen estos sRNAs. Sólo fueron considerados como posibles RNAs pequeños provenientes de brócoli aquellos que mapearon hacia regiones anotadas del genoma que eran específicas del género de la especie vegetal brócoli (*Brassica oleraceae* var. *italica*).

En seguida, se realizó un heatmap con los datos de abundancia y caracterización de los RNAs pequeños clasificados por tamaño. De los sRNAs filtrados, se realizó un mapeo hacia más de 90 genomas de especies vegetales para confirmar de manera predictiva que los sRNAs podrían pertenecer a *Brassica oleraceae* con el programa sRNAscons (Aparicio-Puerta et al., 2022).

Posteriormente, a partir de los sRNAs asociados a *Brassica oleraceae*, fueron identificados miRNAs homólogos alojados en la base de datos PmiREN 2.0, en donde están descritos miRNAs de 88 especies vegetales, y se analizó su nivel de expresión. También, se anotaron los genes target descritos en la misma base de datos.

Enseguida, se identificaron potenciales miRNAs *de novo* con miRDeep* de los RNAs pequeños asignados a *Brassica oleraceae*, utilizando como controles para evitar falsos positivos los genomas de *P. capsici* LT1534 y chile CM334 en la opción “Genome”, finalmente se continuó construyendo el modelo gráfico integral que incorpore los datos predictivos obtenidos de este análisis. Por lo cual, el siguiente análisis bioinformático consistió en identificar familias homólogas de miRNAs reportadas de otras especies en el genoma de *P. capsici* como potencial regulatorio.

4.9 Identificación del potencial regulatorio del genoma de *P. capsici* LT1534 auxiliado por familias de miRNAs

De la base de datos publica miRBase v22.1 (Griffiths-Jones et al., 2008) se obtuvieron las secuencias de pre-miRNAs y miRNAs maduros reportados en distintos organismos, para ser mapeados y alineados con Bowtie2 v2.4.4 y BLAST v2.9.0-2 hacia bases de datos del genoma de *P. capsici* LT1534 y visualizadas en el BROWSE, con la finalidad de identificar familias homologas de miRNAs de distintos organismos en *P. capsici*, como potencial regulatorio, así como la identificación de las coordenadas genómicas del *locus* o sitio probable de origen de la familia de miRNA en el oomiceto.

Una vez que se realizó el conjunto de análisis bioinformáticos sobre la caracterización de sRNAs-miRNAs, posibles genes target de los datos de sRNA-seq, y su probable movimiento en los aislados A-ch-ch y A-br-ch de *P. capsici*, así como explorar el potencial regulatorio del genoma del patógeno, se continuó con identificar parte del mismo mediante la búsqueda y caracterización *in silico* de genes asociados a la biogénesis, transporte y procesamiento de RNAs pequeños y miRNAs a partir del genoma, transcriptoma y proteoma del microorganismo que se encuentran disponibles en el portal del JGI.

4.10 Caracterización *in silico* de genes asociados a la biogénesis y el procesamiento de RNAs pequeños-miRNAs en *P. capsici* LT1534

Se identificaron potenciales genes que codifican para las proteínas Dicer-like (DCLs), Exportina 5 (Exp5A), Argonautas (AGO) y RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR) en el proteoma de *P. capsici* LT1534, cuyos homólogos están involucrados en la biogénesis, transporte y procesamiento de miRNAs-gen target y procesamiento de RNAs pequeños, respectivamente, en otros oomicetos.

A partir de la base de datos Pfam v35.0 (Mistry et al., 2021) se identificaron los dominios RNaseIII característicos de las proteínas DCLs. Enseguida, con el programa HMMER v3.3.2 (T. J. Wheeler & Eddy, 2013) se construyó la distribución de probabilidad denominada “Modelos Ocultos de Markov” (HMM-Hidden Markov Models) del dominio RNaseIII con el comando hmmbuild y se identificaron las proteínas que contenían estos dominios conservados a partir del proteoma de *P. capsici* LT1534 v11.0 con el comando hmmsearch. Se consideraron

como proteínas DCLs aquellas que poseían los dos dominios catalíticos RNaseIII característicos en el extremo C-terminal de la proteína.

Para identificar la proteína Exp5A de *P. capsici*, primero se obtuvo la secuencia de la proteína Exp5 de *Xenopus tropicalis* con la finalidad de identificar el dominio conservado Xpo1 en Pfam, en seguida se construyó su HMM con HMMER v3.3.2 y se determinó la proteína Exp5A en el proteoma filtrado de *P. capsici* LT1534.

Para establecer los genes AGOs de *P. capsici*, se obtuvieron los dominios conservados: PAZ, MID y PIWI de la base de datos Pfam característicos de las argonautas. A continuación, se construyeron sus Modelos ocultos de Markov con HMMER v3.3.2 y a partir de los datos filtrados y no filtrados del proteoma de *P. capsici* LT1534 se determinaron las mismas. Fueron consideradas como potenciales proteínas AGOs aquellas que tenían los tres dominios característicos y pseudo genes/proteínas aquellas que carecían de uno o más dominios catalíticos.

A partir de la secuencia del dominio conservado RdRP se realizó el mismo procedimiento basado en HMM para identificar a la RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR) en el proteoma del oomiceto.

Una vez que fueron identificadas las secuencias de potenciales proteínas DCLs, Exp5A, AGOs, y RDR, se verificó su porcentaje de identidad contra homologas reportadas en otros organismos, mediante BLASTp en el NCBI. Enseguida, se realizó la reconstrucción filogenética de las cuatro familias de proteínas. Para ello, se identificaron secuencias de proteínas DCLs, Exp5A, AGOs y RDRs reportadas en otros oomicetos como *P. infestans*, *P. ramorum*, *P. sojae* y *Arabidopsis thaliana*. *H. sapiens* y *M. musculus* como grupo externo.

Además, se realizó la identificación de proteínas homologas en otras 9 especies de oomicetos que no han sido reportadas con el mismo procedimiento basado en HMM. Posteriormente, se realizó alineamiento múltiple de las secuencias para cada familia de proteínas con el programa MUSCLE, curación de las secuencias con GBlocks v0.91b (Talavera & Castresana, 2007), con PhyML se realizó la reconstrucción filogenética a través de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood-ML) utilizando los criterios de AIC (Akaike Information Criterion). Se usó el modelo de sustitución que mejor se ajustó a los datos, con soporte de las ramas basados en Bootstrap de 100 iteraciones, la visualización de la topología de los árboles se realizó con TreeDyn v198.3 y evolview (Chevenet et al., 2006; Subramanian et al., 2019).

Una vez que fueron caracterizadas las potenciales proteínas DCLs, Exp5A, AGOs y RDR de *P. capsici* LT1534 se procedió a analizar el nivel de expresión relativa de sus transcritos en algunos aislados primarios y secundarios de *P. capsici* que anteriormente fueron colectados. También se decidió validar el nivel de expresión relativa de algunos genes caracterizados por secuencia asociados a la patogenicidad, modificadores de histonas, relacionados a elementos transponibles y miRNAs que mostraron niveles de expresión cambiantes en los análisis bioinformáticos de sRNA-seq de los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch.

4.11 Análisis de la expresión relativa de genes y miRNAs en *P. capsici*

Para efectuar el análisis de expresión relativa de los genes caracterizados de DCLs, Exp5A, AGOs, efectores, modificadores de histonas, relacionados a elementos transponibles y miRNAs, se comenzó por obtener información que muestre evidencia de su expresión en transcriptomas disponibles de la cepa D3 de *P. capsici* obtenidos de investigaciones anteriores del laboratorio (Rojas Rojas et al., 2021), para entonces diseñar sus oligos específicos con respecto al genoma de referencia de *P. capsici* LT1534 con el programa Primer-BLAST del NCBI (Ye et al., 2012).

Posteriormente, se realizó un análisis de PCR *in silico* de los oligos diseñados en la plataforma web del ehu con la herramienta “*in silico* PCR amplification” para verificar que la amplificación sea específica. A continuación, se analizaron las características estructurales y termodinámicas de cada oligo y entre par de oligos en la plataforma en línea del Integrate DNA Technologies (IDT) con la herramienta “OligoAnalyzer Tool”. Finalmente, los oligos fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, México (IBT) cuando cumplieron con los criterios teóricos de especificidad: Tm entre 58-60°C, baja probabilidad de interacción y formación de estructuras secundarias.

Enseguida, fueron estandarizadas las condiciones de amplificación de los oligos mediante PCR en punto final, con el programa: 95°C por 3 minutos de desnaturalización inicial, seguido de treinta ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento en el rango de 54-68°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y 72°C por 5 minutos. En reacciones de 20 µL conformadas por: 2 µL de Buffer 10X, 0.4 µL dNTP's 10 mM, 1.2 µL MgCl₂ 25 mM, 14.1 µL de agua inyectable, 0.1 µL de Taq-polimerasa, 0.6 µL oligo Forward 10 mM, 0.6 µL oligo Reverse 10 mM y 1µL de DNA genómico (DNAg) de *P. capsici*. Para obtener el templado para la reacción de PCR se realizó extracción de DNAg de micelio fresco de *P. capsici* con el kit “Plant/seed DNA Miniprep kit” (ZYMO RESEARCH), siguiendo las recomendaciones del fabricante, mostrado en el ANEXO 3.

Una vez que se estandarizó la amplificación de cada uno de los genes, se validó la amplificación de los oligos para determinar su sensibilidad a varias concentraciones del templado en una reacción de amplificación cuantitativa. Para ello, se utilizaron cinco concentraciones conocidas de DNAg de *P. capsici* de 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 ng/µL y se construyó una curva estándar para cada gen.

La reacción de PCR cuantitativa (qPCR) se realizó en reacciones de 10 µL compuestas por 5 µL de SYBR Green Real-Time PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems | Thermo Fisher Scientific), 1 µL Oligo Forward 2 mM, 1 µL Oligo Reverse 2 mM, 1 µL DNAg (100-0,01 ng/ µL) y 2 µL de agua inyectable en el equipo StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) con el programa: primer paso de desnaturalización inicial 95°C por 10 minutos, segundo paso de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 54-68°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, tercer paso de 65°C con incremento de 0.3°C por 0.1 minutos hasta 95°C y 95°C por 15 segundos.

Después de validar la amplificación de los oligos se preparó cDNA; para esto, se extrajo el RNA total de cinco muestras de micelio de *P. capsici* de 8 días de edad, las cuales corresponden a la cepa control D3, los aislados primarios: A-chile y A-brócoli, así como de los

aislados secundarios: A-ch-ch y A-br-ch con el kit “Quick-RNA Plant Miniprep kit” (Zymo Research) siguiendo las pautas del fabricante, mostrado en el ANEXO 4. Una vez obtenidas las biomoléculas de RNA tratadas con DNase I, se analizó su integridad, identificación de posible contaminación de DNA a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% a 120 volts, 400 mA por 50 min. Por último, se evaluó que la calidad y concentración del RNA total fuera la óptima con el equipo NanoDrop2000. Para realizar el análisis de expresión, se prepararon alícuotas de 1000 ng de RNA de cada tratamiento.

La síntesis de cDNA de los cinco tratamientos de micelio del oomiceto se realizó con el kit “Revert First Strand cDNA Synthesis kit” (Thermo Scientific) mediante reacciones de retro-transcripción de 20 μ L conformados por: 4 μ L Buffer 5X, 2 μ L dNTP's 10 mM, 0.5 μ L Ribolock, 1 μ L oligo (dT)₁₈, 1 μ L Reverse Aid, 1000 ng de RNA total y restante de agua inyectable en termociclador BIORAD T100 Thermal cycler con el programa: 42°C por 60 minutos, 70°C por 5 minutos y mantener a 4°C.

Una vez que se estandarizó y validó la amplificación de los oligos, además de obtener el cDNA de los cinco tratamientos de *P. capsici*, se procedió a analizar el nivel de expresión de 22 genes conformados por las familias de DCLs, AGOs, Exp5A, RDR, efectores, transposasa Tam3 y modificadores de histonas mediante RT-qPCR. Para ello, se prepararon reacciones de 10 μ L compuestas por 5 μ L de SYBR Green Real-Time PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems | Thermo Fisher Scientific), 1 μ L Oligo Forward 2 mM, 1 μ L Oligo Reverse 2 mM, 1 μ L cDNA (50 ng/ μ L) y 2 μ L de agua inyectable en el equipo StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) con el programa: primer paso de desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, seguido de 54-68°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, tercer paso de 65°C con incremento de 0.3°C por 0.1 minutos hasta 95°C y finalmente 95°C por 15 segundos. Se utilizó el método de análisis de $2\Delta\Delta C_t$ para medir el nivel de expresión relativa de cada muestra, utilizando el gen de factor de elongación 1 α como gen house keeping.

Se utilizó el método de RT-qPCR stem loop basado en L. H. Yang et al. (2014) para validar el nivel de expresión de los miRNAs A-ch-ch_65 y A-ch-ch_102 predichos en los análisis bioinformáticos de sRNA-seq. Estos potenciales miRNAs fueron seleccionados para validar su nivel de expresión porque mostraron alta probabilidad de formación del miRNA, nivel de expresión relativamente alto e interés por el probable gen target a regular. A diferencia del método convencional de RT-qPCR, en esta técnica se requiere el diseño de un oligo en stem loop en la síntesis de cDNA para cada miRNA a partir de RNA total, sustituyendo al reactivo oligo (dT)₁₈ en el mix de retro-transcripción.

La síntesis de cDNA para cada miRNA se realizó en las muestras de micelio de D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch con el kit “Revert First Strand cDNA Synthesis kit” (Thermo Scientific) en reacciones de 20 μ L conformados por 4 μ L Buffer 5X, 2 μ L dNTP's 10 mM, 0.5 μ L Ribolock, 1 μ L oligo reverse stem loop 0.005 mM, 1 μ L Reverse Aid, 1000 ng de RNA total y restante de agua inyectable en termociclador con el programa: 42°C por 60 minutos, 70°C por 5 minutos y mantener a 4°C.

Enseguida, con PCR en punto final se estandarizó la amplificación de los oligos diseñados para cada miRNA con el cDNA previamente obtenido y se analizó el nivel de expresión de

ambos miRNAs en reacciones de 10 μ L compuestas por 5 μ L de SYBR Green Real-Time PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems | Thermo Fisher Scientific), 1 μ L Oligo Forward 2 mM, 1 μ L Oligo Reverse 2 mM, 1 μ L cDNA (50 ng/ μ L) y 2 μ L de agua inyectable en el equipo StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), con el programa: primer paso de desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 5 segundos, seguido de 59°C por 30 segundos, tercer paso de 65°C con incremento de 0.3°C por 0.1 minutos hasta 95°C y finalmente 95°C por 5 segundos.

Se utilizó el método de análisis de $2\Delta\Delta C_t$ para calcular el nivel de expresión relativa de cada muestra, utilizando el gen de factor de elongación 1 α como gen house keeping y se determinó si existen diferencias significativas de expresión con análisis estadísticos de ANOVA con $p < 0.05$. Además se realizó un análisis de correlación entre el nivel de expresión de cada miRNA contra su posible gen target.

Finalmente, se construyeron gráficos del nivel de expresión de cada gen y miRNA validados con análisis estadísticos ANOVA en RStudio v4.2.1, además se generó una matriz de correlación de los perfiles de expresión, análisis de componentes principales y clusterización de k-means de los cinco tratamientos evaluados con respecto a las variables genes y miRNAs generando, culminando con la construcción de un modelo integral del perfil de expresión génica-miRNA adicionado con los datos de patogenicidad y fenotipo de *P. capsici*.

V Resultados

5.1 Infección primaria causada por *P. capsici* D3

El análisis de patogenicidad ocasionado por la cepa D3 de *P. capsici*, mostró la capacidad infectiva que tiene el oomiceto sobre hojas de chile, pepino, brócoli y frijol (figura 8). En general, se observó aumento progresivo del área infectada a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación (hdi) en las cuatro especies vegetales evaluadas con perfil infectivo específico para cada especie, siendo chile más susceptible a ser infectada por el patógeno a las 72 hdi, seguido de frijol. Sorprendentemente, pepino demostró ligera resistencia a infección durante las primeras 48 hdi. En I-brócoli, D3 mostró poca capacidad infectiva siendo la especie vegetal con mayor resistencia al patógeno de las cuatro evaluadas.

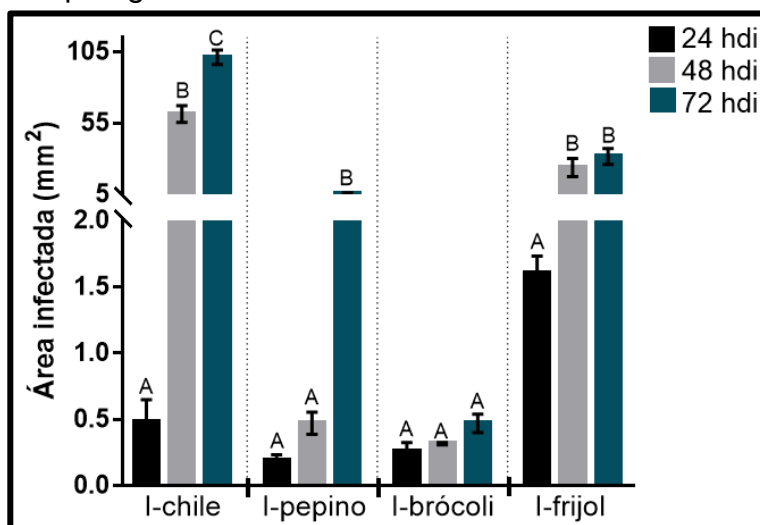


Figura 8. Infección primaria en hojas de chile, pepino, brócoli y frijol. Grafica de barras de medición de área infectada en mm² realizada en cinco experimentos independientes sobre hojas de chile, pepino, brócoli y frijol causadas por *P. capsici* D3 a las 24, 48 y 72 hdi. Las barras indican el error estándar de la media (SEM). Los grupos A, B, C indican diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$) del desarrollo de la infección dentro de cada especie vegetal.

Durante las primeras 24 hdi en I-chile, *P. capsici* manifestó lento desarrollo de infección incluso menor que I-frijol. Sin embargo, a las 48 y 72 hdi aumentó significativamente el área infectada. Durante las primeras 48 hdi, las hojas de pepino mostraron poco desarrollo de infección, en cambio, a las 72 hdi aumentó significativamente el área infectada.

Durante el tiempo en que se evaluó la infección en hojas de brócoli éstas no presentaron diferencias significativas en su desarrollo, D3 presentó poca capacidad infectiva en brócoli. En cambio, en I-frijol desde las 24 hdi mostró la mayor capacidad de infección de las especies vegetales evaluadas.

5.2 Infección secundaria causada por aislados primarios de *P. capsici*

En las infecciones secundarias, en general se observó aumento y disminución de la virulencia que produce el patógeno cuando proviene de infectar cuatro especies vegetales diferentes (figura 9).

Con respecto a la capacidad inicial de la cepa D3, en infección secundaria de chile (I-chile), no se observaron cambios significativos en el área infectada entre cada aislado primario durante las primeras 24 hdi. Sin embargo, a las 48 hdi I-ch-ch mostró disminución significativa de su progresión con respecto a I-chile. Para las 72 hdi, I-fr-ch mostró el mayor nivel de agresividad en comparación a las restantes infecciones secundarias en chile, incluyendo I-chile (figura 9A). Las comparaciones del área infectada entre tratamientos indicaron que a las 48 hdi el área que infecta *P. capsici* en I-ch-ch es estadísticamente menor que I-pe-ch.

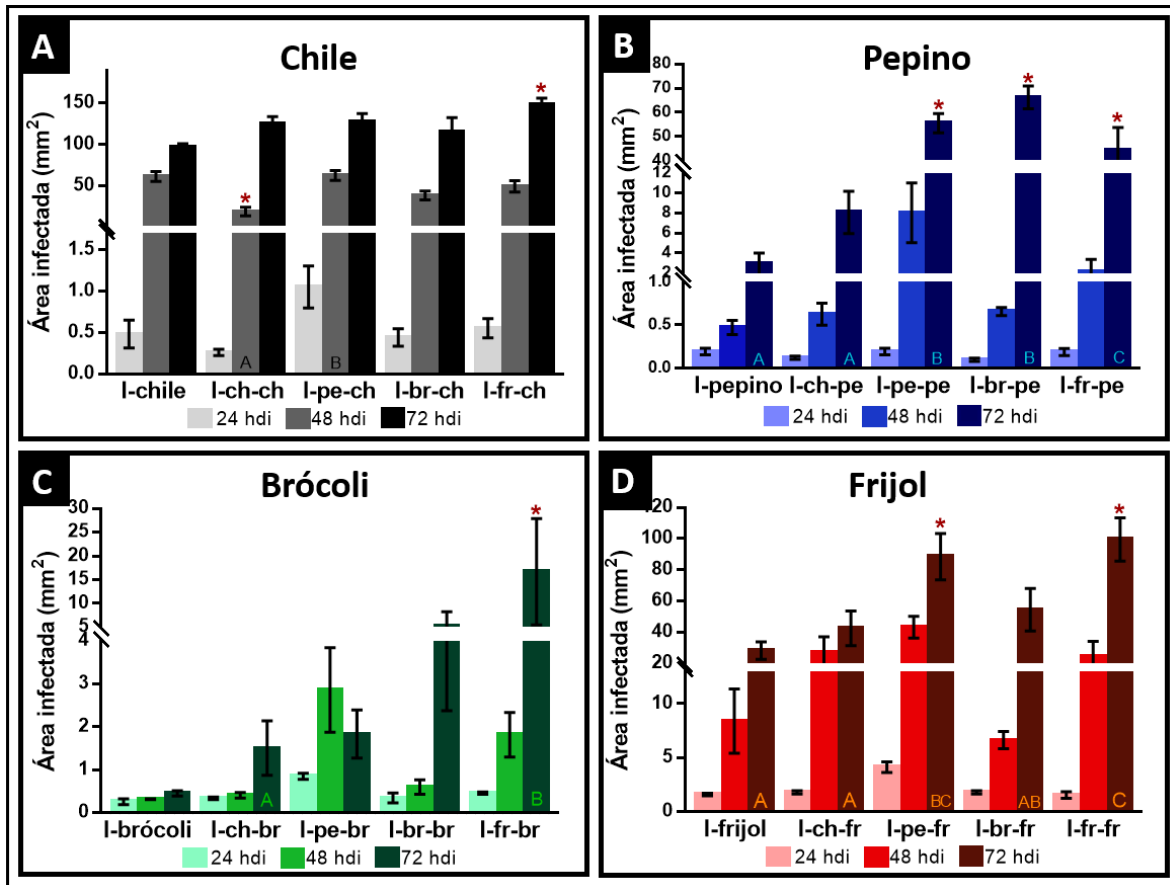


Figura 9. Medición de infección primaria y secundaria causado por aislados de *P. capsici* en hojas de chile, pepino, brócoli y frijol. Graficas de barras de área infectada en mm² generadas por *P. capsici* D3 y aislados primarios en hojas de chile, pepino, brócoli y frijol a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación (hdi). **A.** Área infectada de hojas de chile causada por *P. capsici*, I-chile: infección ocasionada por *P. capsici* D3 en hoja de chile; I-ch-ch, I-br-ch, I-pe-ch, I-br-ch, I-fr-ch: infección causada en hojas de chile por aislados primarios obtenidos de A-chile, A-pepino, A-brócoli y A-frijol, respectivamente. **B.** Área infectada de hojas de pepino causada por *P. capsici*, I-pepino: infección ocasionada por *P. capsici* D3 en hojas de pepino; I-ch-pe, I-br-pe, I-pe-pe, I-br-pe, I-fr-pe: infección causada en hojas de pepino por aislados primarios obtenidos de A-chile, A-pepino, A-brócoli y A-frijol, respectivamente. **C.** Área infectada de hojas de brócoli causada por *P. capsici*, I-brócoli: infección ocasionada por *P. capsici* D3 en hojas de brócoli; I-ch-br, I-br-br, I-pe-br, I-br-br, I-fr-br: infección causada en hojas de brócoli por aislados primarios obtenidos de A-chile, A-pepino, A-brócoli y A-frijol, respectivamente. **D.** Área infectada de hojas de frijol causada por *P. capsici*, I-frijol: infección ocasionada por *P. capsici* D3 en hojas de frijol; I-ch-fr, I-br-fr, I-pe-fr, I-br-fr, I-fr-fr: infección causada en hojas de frijol por aislados primarios obtenidos de chile, pepino, brócoli y frijol, respectivamente.

Las barras representan la desviación estándar poblacional (SEM), *indica diferencia significativa ANOVA ($p < 0.05$) en el área infectada en cada condición de infección en comparación con la infección primaria de la misma especie vegetal. Los grupos A, B, C mostrados dentro de cada barra de la gráfica indican diferencias estadísticas

significativas de ANOVA ($p < 0.05$) en el área infectada cuando el patógeno tiene diferente historial de infección entre los tratamientos dentro de la misma especie vegetal infectada por segunda ocasión.

Respecto a las infecciones secundarias de pepino, en general a las 72 hdi se observó aumento significativo de la virulencia que causa el patógeno cuando proviene de infectar hojas de pepino, frijol y brócoli, siendo este último aquel que condujo al mayor aumento de su virulencia (figura 9B). Sin embargo, el aislado recuperado de infectar chile (A-chile) en hojas de pepino (I-ch-pe) mostró comportamiento similar al control (I-pepino).

Las infecciones secundarias ocasionadas en brócoli también indicaron aumento significativo en la virulencia del patógeno con respecto a I-brócoli, principalmente a las 72 hdi (figura 9C).

Así mismo, en las infecciones secundarias en hojas de frijol se observó que a las 72 hdi I-pe-fr e I-fr-fr presentaron aumento significativo del área infectada en comparación con el resto de los tratamientos (figura 9D). En los ANEXOS 5 y 6 se muestran las mediciones y los estadísticos descriptivos, pruebas de hipótesis, respectivamente, del área infectada ocasionada por D3 y aislados primarios de *P. capsici* en hojas de chile, pepino, brócoli y frijol a las 24, 48 y 72 hdi.

En la figura 10, se muestra el fenotipo de la infección a las 48 hdi en chile, pepino, brócoli y frijol causado por D3 y aislados primarios de *P. capsici*. La infección en hojas de chile se caracterizó por la presencia de necrosis en el centro de la hoja y sobre las nervaduras en forma de regiones oscuras, presencia de biotrofia en la periferia de la hoja, mostrando color naranja en las hojas visualizadas bajo luz UV. Sin embargo, las hojas no mostraron clorosis ni marchitamiento en forma de ondulamiento. Se identificó que D3 y los aislados primarios producen un patrón del fenotipo de infección parecido sobre las hojas de chile, sólo cambiando la virulencia, es decir el grado de enfermedad en un tiempo determinado entre los tratamientos. En los ANEXOS 7, 8, 9, y 10 se muestra el fenotipo de la infección de las cuatro especies vegetales evaluadas a 24, 48 y 72 hdi.

Las hojas infectadas de pepino mostraron poco tejido necrótico en el centro de la hoja, presencia de lunares necróticos dispersos en el tejido vegetal, no se observó biotrofia en la periferia de la misma, exhibieron regiones con clorosis y marchitamiento de la hoja. I-pepino, I-ch-pe, I-pe-pe e I-br-pe presentaron el mismo patrón de fenotipo infectivo, excepto I-fr-pe que mostró un área altamente clorótica alrededor de la región necrótica del centro de la hoja.

Las infecciones en hojas de brócoli se caracterizaron por presentar necrosis o respuesta hipersensible alrededor del punto de inoculación seguido de halo clorótico, la presencia de biotrofia aledaña al sitio de inoculación y antes de la región clorótica, así como ondulamiento en la periferia de la hoja. En general, las infecciones primarias y secundarias presentaron el mismo patrón del fenotipo infectivo con variación en el área infectada dependiente del aislado con el cual fue infectada la hoja.

El fenotipo de infección en hojas de frijol indicó la presencia de un halo necrótico que inició en el punto de inoculación, seguido de un halo biotrófico, mostrado como región blanquecina en las hojas visualizadas bajo luz UV. En algunas ocasiones se observó crecimiento de micelio aéreo en el centro de la hoja. Las características de infección en frijol fueron similares entre

las infecciones primarias y secundarias, sólo en menor o mayor grado del área infectada dependiente del aislado de *P. capsici* con el que se infectó la hoja.

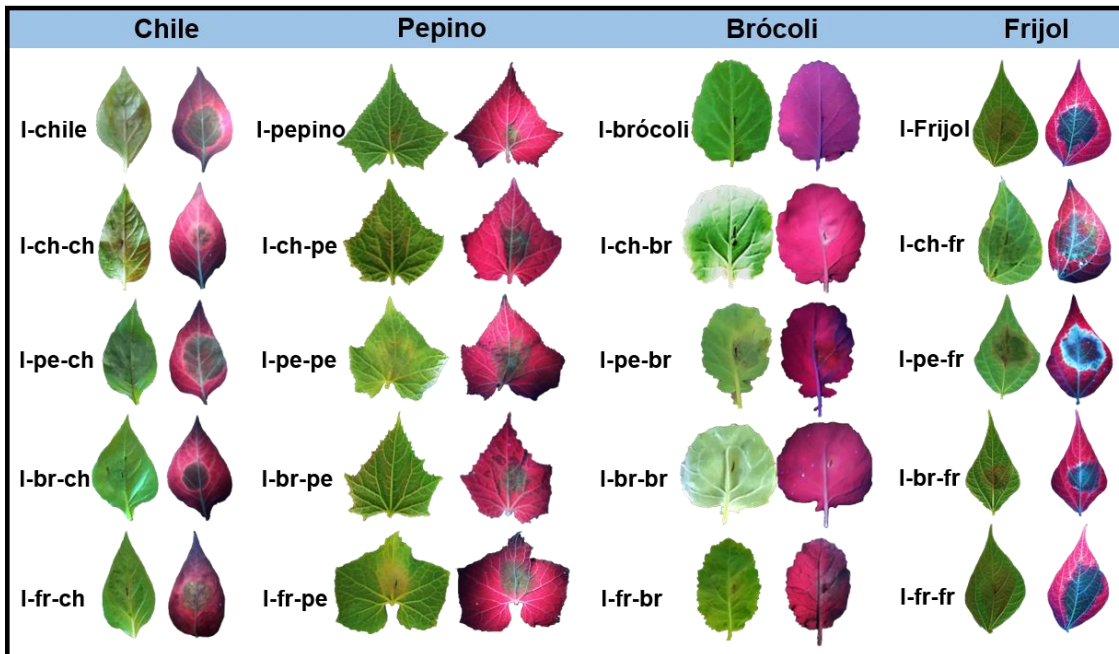


Figura 10. Fenotipo del desarrollo de infección causado por D3 y aislados primarios de *P. capsici* en hoja de chile, pepino, brócoli y frijol a las 48 hdi. La virulencia fue causada por micelio aéreo de D3 y aislados primarios de *P. capsici* sobre las cuatro especies vegetales. Hoja izquierda de cada planta fue visualizada bajo luz natural, las regiones oscuras muestran el área infectada. La hoja derecha fue visualizada a través de luz UV de longitud de onda larga de 340nm para la observación de regiones necrosadas del tejido infectado, las regiones en rojo es el tejido sano debido a que la clorofila de las células emite auto-florescencia a la longitud de onda larga del espectro de UV, las regiones oscuras muestran el área infectada en necrosis, las regiones color naranja muestran el desarrollo de la fase biotrófica de la infección.

5.3 Crecimiento diametral de D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*

Las figuras 11A y 11B indican el crecimiento diametral de D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici* a los 8 días después de la inoculación (ddi), ya que es el tiempo que tarda D3 (control) en colonizar la placa Petri. Se identificó variación en el crecimiento de los aislados primarios con respecto a la cepa progenitora D3.

A-chile y A-frijol presentaron disminución de la tasa de crecimiento con respecto al control, en contraste, A-pepino y A-brócoli mostraron mayor tasa de crecimiento comparado con la cepa progenitora, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En los cuatro aislados secundarios: A-ch-ch, A-pe-ch, A-br-ch y A-fr-ch que provienen de infectar chile, se identificó variación significativa en el crecimiento diametral entre los tratamientos. Específicamente, el crecimiento de A-pe-ch fue estadísticamente mayor que A-br-ch, A-chile y el control D3. En contraste, los aislados secundarios A-ch-ch, A-br-ch y A-fr-ch mostraron menor crecimiento que el aislado primario obtenido de chile (A-chile) y el control D3.

Los aislados secundarios: A-ch-pe, A-pe-pe, A-br-pe y A-fr-pe que provienen de infectar pepino no mostraron cambios significativos en el crecimiento diametral entre los tratamientos. Sin

embargo, el crecimiento de A-ch-pe fue mayor que A-pepino y D3, a diferencia del crecimiento de A-pe-pe, A-br-pe y A-fr-pe fue menor que A-pepino y D3.

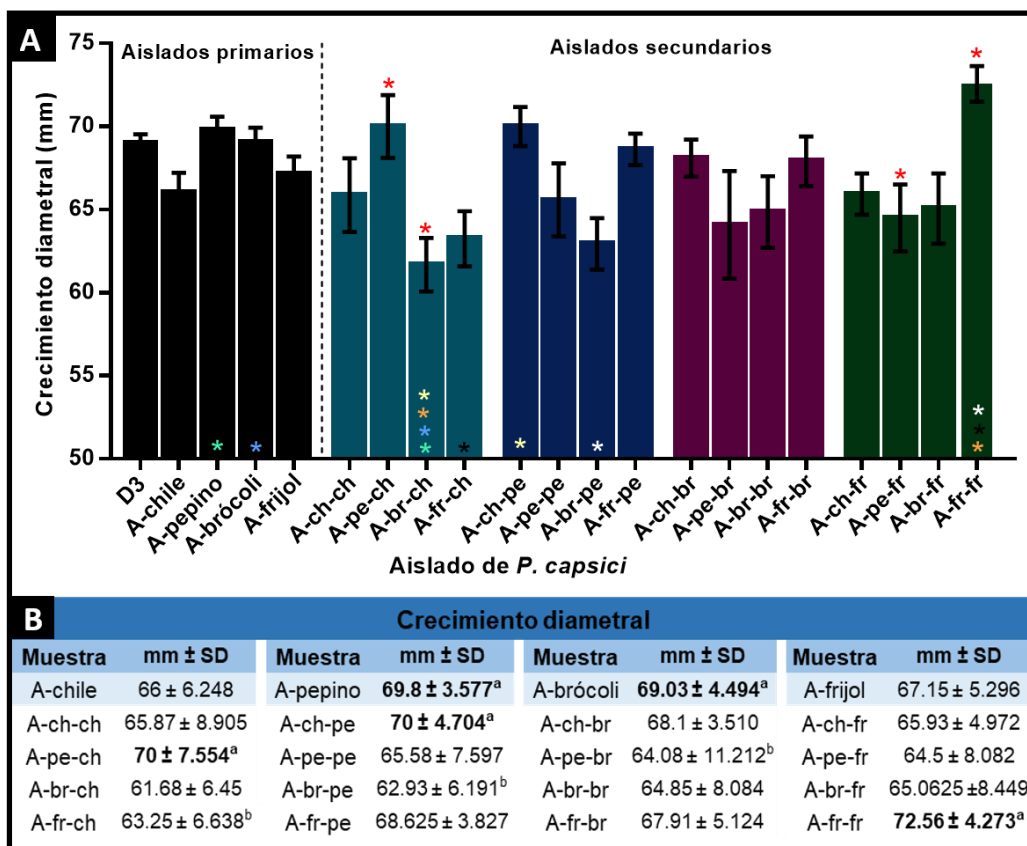


Figura 11. Crecimiento diametral de D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*. **A:** Gráfica de barras del crecimiento diametral en mm de D3, aislados primarios y secundarios a los 8 días después de la inoculación (ddi) de cuatro experimentos independientes por cuadruplicado. Las barras negras de error representan la desviación estándar poblacional (SEM), *(rojo encima de la barra de error) indica diferencia significativa de ANOVA ($p < 0.05$) en el crecimiento diametral con respecto a la especie vegetal inmediata anterior del cual se recuperó el patógeno, es decir comparado por planta. *(de colores dentro de la barra del gráfico) indica diferencia significativa ANOVA ($p < 0.05$) en el crecimiento diametral comparado con las cuatro especies vegetales por pares, cada asterisco de color tiene su par de comparación, ejemplo ***Negro** (A-fr-ch y A-fr-fr) su crecimiento es estadísticamente diferente el cual podría ser resultado del historial de hospederos del cual se recuperó al oomiceto. **B:** Estadísticos del crecimiento diametral de D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici* a los 8 ddi.

a, diferencia significativa con respecto a A-br-ch ($p < 0.05$)

b, diferencia significativa con respecto a A-fr-fr ($p < 0.05$)

Negrita, indica crecimiento diametral similar o mayor que D3 y aislados primarios

El tamaño del crecimiento diametral está expresado como media ± desviación estándar (SD) de cuatro experimentos independientes con cuatro replicas técnicas

Crecimiento diametral de D3 69 ± 2.507

Se obtuvo un comportamiento similar en el crecimiento de los aislados secundarios: A-ch-br, A-pe-br, A-br-br y A-fr-br, que provienen de infectar brócoli ya que no mostraron cambios estadísticamente significativos entre los tratamientos. Sin embargo, fue menor el crecimiento de los cuatro aislados secundarios provenientes de infección de brócoli comparados con A-brócoli y D3.

Los aislados secundarios A-ch-fr, A-pe-fr, A-br-fr y A-fr-fr que provienen de infectar frijol mostraron variación estadísticamente significativa en el crecimiento, en donde A-fr-fr fue superior que A-pe-fr mayor que A-frijol y el control, no obstante, el crecimiento de los restantes aislados provenientes de frijol fue menor comparados con A-frijol y D3.

Al realizar los análisis comparativos del crecimiento diametral entre todos los tratamientos se encontró que A-br-ch presentó la menor tasa de crecimiento y estadísticamente significativo con respecto a A-pe-ch, A-pepino, A-ch-pe, A-brócoli y A-fr-fr. En contraste, A-fr-fr fue el aislado que presentó mayor crecimiento, siendo estadísticamente significativo con respecto a A-fr-ch, A-br-pe y A-pe-br, además se encontró el patrón que sugiere que cuando *P. capsici* es recuperado de infección primaria de brócoli y después es infectado/recuperado en alguna de las especies vegetales evaluadas su crecimiento es menor comparado con la cepa progenitora D3.

5.4 Plasticidad fenotípica de conformación micelial en aislados primarios y secundarios de *P. capsici*

Se identificó en la mayoría de los aislados primarios y secundarios variación significativa en la plasticidad fenotípica de la conformación micelial entre los tratamientos y con respecto a la cepa progenitora (en el ANEXO 11 se muestra la morfología macroscópica representativa de D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*).

La figura 12A presenta la clasificación de cinco morfologías identificadas en D3, aislados primarios y secundarios del oomiceto, conformadas por la morfología denominada como estrellada, aberrante, algodonosa, rayada y semi-lisa. La figura 12B indica el porcentaje en la abundancia de las cinco morfologías descritas en 12A sobre D3, aislados primarios y secundarios a los 8 ddi. A partir de este análisis de morfologías, en general se observó que la cepa control D3 presentó morfología mayormente de tipo estrellada, seguido de morfología aberrante y en menor porcentaje del tipo algodonosa.

Al comparar la abundancia de las morfologías en los aislados primarios A-chile, A-pepino, A-brócoli y A-frijol con D3, se observó disminución de la abundancia de la morfología estrellada y aumento en la presencia de las morfologías aberrante y algodonosa en todos los aislados primarios. En A-pepino y A-brócoli se identificó morfología rayada, la cual no se encontró en el control. Por su parte, en A-pepino aumentó la abundancia de morfología tipo algodonosa en comparación con el control.

A-brócoli y A-frijol mostraron un nuevo tipo de morfología denominada semi-lisa, la cual tampoco exhibió la cepa progenitora. Encontrando entonces que la mayor plasticidad fenotípica macroscópica de los aislados primarios se presentó en A-brócoli y la morfología con mayor similitud al control fue A-chile, esto se logró comprobar al realizar prueba de hipótesis de chi-cuadrada (X^2), mostrado en el ANEXO 12 entre los aislados primarios y con respecto a D3, en donde además se encontró diferencia estadísticamente significativa en la plasticidad fenotípica entre los aislados primarios A-pepino, A-brócoli y A-frijol comparado con D3.

A-chile no mostró diferencias significativas en la plasticidad fenotípica macroscópica comparado con el control. Sin embargo, todos los aislados primarios mostraron diferencia

significativa en la plasticidad fenotípica entre ellos. Estos resultados indican que las especies vegetales pepino, brócoli y frijol mayormente inducen cambios significativos en la plasticidad fenotípica macroscópica de *P. capsici*.

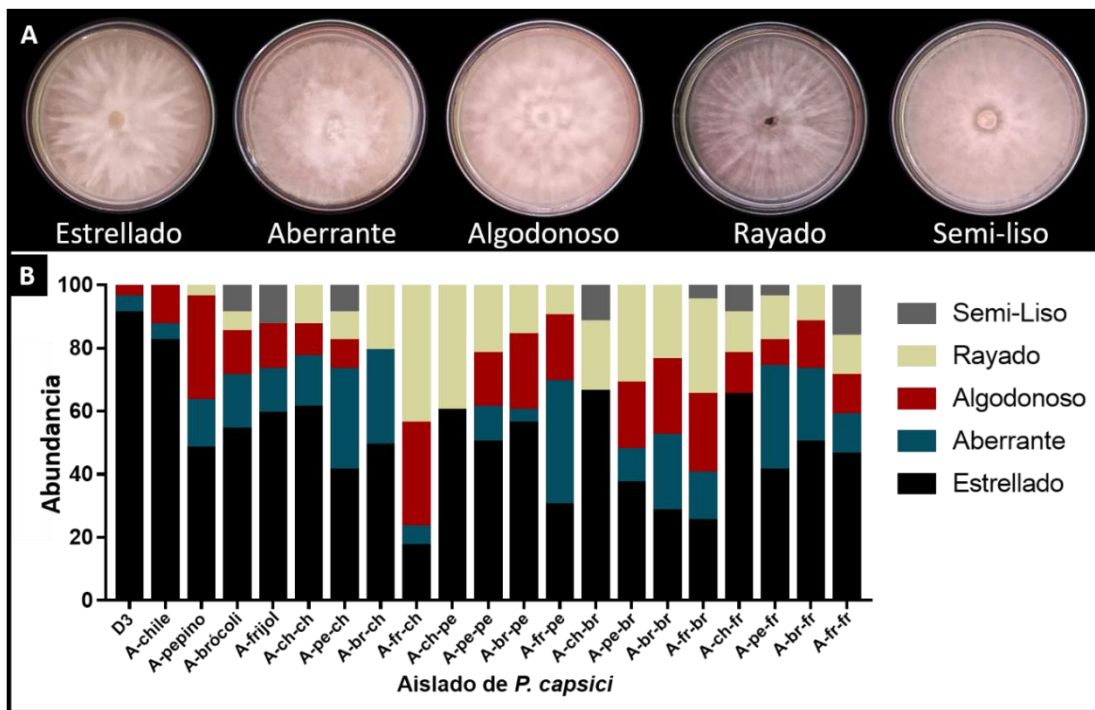


Figura 12. Plasticidad fenotípica de micelio en aislados de *P. capsici*. **A:** Clasificación de morfologías de micelio aéreo identificadas en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*, denominados: estrellado (micelio aéreo poblado que genera una conformación de picos en forma de estrella, común en especies de *P. capsici*), aberrante (micelio densamente poblado en la base de la superficie del medio de cultivo semejante a un tapete, medianamente aéreo, que genera micelio aberrante, que es señal de estrés, sin conformación de picos), algodonoso (micelio aéreo medianamente poblado, caracterizado por generar mayor volumen del espacio ocupado en la placa Petri de crecimiento), rayado (micelio medianamente aéreo y poblado con conformación colonial definido en forma de líneas o “rayas” delgadas) y semi-liso (micelio medianamente denso en la base de la superficie del medio de cultivo, baja densidad de micelio aéreo con conformación micelial difusa, sin formar líneas o picos definidos, es decir morfología semi-liso). **B:** Análisis del porcentaje de la abundancia de morfologías observadas en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*, cada color representa el porcentaje de la morfología observada en cada tratamiento efectuado en seis experimentos independientes con cuatro replicas técnicas cada uno (545 observaciones, en promedio 26 observaciones por tratamiento).

También, se evaluó la morfología macroscópica de los aislados secundarios para ser comparada con la observada en los aislados primarios y D3. La abundancia de la morfología presentada por los aislados secundarios obtenidos de infección en Chile: A-ch-ch, A-pe-ch, A-br-ch y A-fr-ch, indicaron disminución de la abundancia en la morfología estrellada y aumento en morfologías tipo aberrante, algodonoso, rayado y semi-liso. Por su parte, A-fr-ch presentó la mayor variación de la abundancia de morfologías, mayormente de tipo rayado, seguido de algodonoso y en menor porcentaje la morfología estrellada. Todos los aislados secundarios que provienen de infección de Chile presentaron diferencias significativas en la plasticidad fenotípica entre los tratamientos y con respecto al A-chile y D3, de acuerdo a X^2 ($p < 0.05$).

Los aislados secundarios A-ch-pe, A-pe-pe, A-br-pe y A-fr-pe obtenidos de infección secundaria de pepino también mostraron variación en la abundancia de las morfologías

estrellada, aberrante, algodonosa, rayada y semi-lisa. De nuevo se observó la mayor variación de la plasticidad fenotípica en el aislado A-fr-pe que tiene previa infección/recuperación en frijol seguido de infección/recuperación en pepino con respecto a los aislados secundarios que proviene de infección secundaria de pepino, A-pepino y D3. Se encontró que todos los aislados secundarios que provienen de infección secundaria de pepino son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) entre ellos, con A-pepino y D3.

El fenotipo de los aislados secundarios A-ch-br, A-pe-br, A-br-br y A-fr-br que provienen de infecciones secundarias de brócoli también mostraron variación en la abundancia de las morfologías, con disminución en la presencia de la morfología de tipo estrellada y cambios en la abundancia de morfologías tipo aberrante, algodonosa, rayada y semi-lisa. Se encontró que los aislados secundarios que provienen de infección secundaria de brócoli son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) a A-brócoli y D3, sin embargo, no se encontró plasticidad fenotípica significativa entre A-pe-br, A-br-br y A-fr-br.

La plasticidad fenotípica que presentaron los aislados secundarios A-ch-fr, A-pe-fr, A-br-fr y A-fr-fr obtenidos de infección secundaria de frijol, indicó disminución de la abundancia en la morfología estrellada. No obstante, en A-ch-fr se observó aumento de esta morfología. En general, los cuatro aislados secundarios exhibieron variación en la abundancia de la morfología tipo aberrante, algodonosa, rayada y semi-lisa entre ellos. En cambio, entre A-pe-fr y A-br-fr no fue significativa la plasticidad fenotípica. Además, se identificaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en la plasticidad macroscópica de los cuatro aislados secundarios obtenidos de infección secundaria de frijol con respecto a A-frijol y D3.

5.5 Plasticidad morfológica de esporangios en aislados primarios y secundarios de *P. capsici*

En el ANEXO 13 se muestra la plasticidad morfológica representativa de esporangios en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*. Por su parte, en la figura 13A se muestran las ocho morfologías de esporangios identificadas en el microorganismo denominadas como: limoniforme, piriforme, globoide, elipsoide, obovoide, elongada, bipapilada y otros.

La figura 13B muestra el gráfico del porcentaje de la abundancia de las morfologías de esporangios observadas en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*. La cepa progenitora presentó cuatro principales morfologías en sus esporangios, mayormente tipo ovoide, seguido de limoniforme, piriforme y globoide.

La morfología de esporangios en los aislados primarios: A-chile, A-pepino, A-brócoli y A-frijol mostró aumento de la abundancia en la morfología tipo ovoide en comparación con el control, así como variación en el porcentaje de las morfologías limoniforme, piriforme y globoide. Además, los mismos cuatro aislados primarios exhibieron morfologías no identificadas en D3 las denominadas elipsoide, obovoide, elongada, bipapilada y otras.

El análisis de prueba de hipótesis de chi-cuadrada (X^2) mostrado en el ANEXO 12, indicó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) de la morfología de esporangios entre los aislados primarios comparada con la cepa control. Sin embargo, entre los aislados primarios no se observó significancia en la plasticidad fenotípica de sus esporangios.

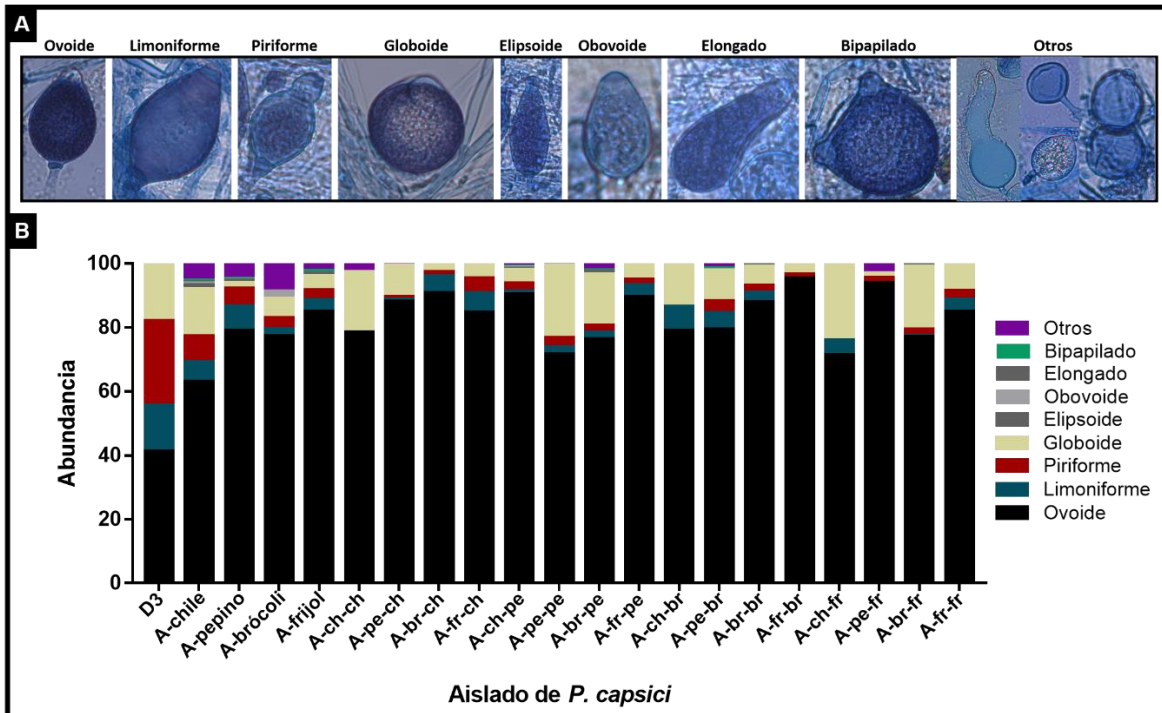


Figura 13. Plasticidad morfológica de esporangios en aislados de *P. capsici*. **A:** clasificación de morfologías de esporangios identificadas en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*, denominados como ovoide (base redonda del esporangio), limoniforme (base plana del esporangio, papilación opuesta), piriforme (base redonda del esporangio, papilación prominente), globoide (esporangio semejante a globo esférico, papilación opuesta corta), elipsoide (esporangio en forma de elipse, papilación opuesta corta), obovoide (esporangio con forma obovoide, papilación opuesta), elongado (esporangio alargado, papilación opuesta), bipapilado (esporangio con dos papilas, principalmente de tipo globoide) y otros (esporangios con cuello largo, sin papilación, forma acorazonada, menor tamaño). **B:** análisis del porcentaje de la abundancia de morfologías de esporangios observadas en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*, cada color representa el porcentaje de la morfología observada en cada tratamiento realizado en seis experimentos independientes con 4,389 observaciones en total.

Los aislados secundarios A-ch-ch, A-pe-ch, A-br-ch y A-fr-ch, mostraron plasticidad morfológica significativa en sus esporangios con respecto a A-chile y D3, sin diferencias significativas entre los aislados secundarios provenientes de infección secundaria de Chile. Los resultados indican que el historial de infección entre los aislados secundarios de Chile no está directamente relacionada con los cambios en la morfología de sus esporangios que puede presentar el oomiceto.

Los cuatro aislados secundarios A-ch-pe, A-pe-pe, A-br-pe y A-fr-pe mostraron variación en el porcentaje de la abundancia de las ocho morfologías descritas en los esporangios, además exhibieron diferencias significativas en su plasticidad fenotípica con respecto al control. Sin embargo, en A-ch-pe y A-fr-pe no fue significativa la variación morfológica de esporangios con respecto a A-pepino, además los cuatro aislados provenientes de infección secundaria de pepino no mostraron significancia entre ellos.

La plasticidad morfológica de esporangios en los aislados secundarios A-ch-br, A-pe-br, A-br-br y A-br-fr también reveló aumento en la abundancia de la morfología ovoide con respecto a D3 y variación en las restantes siete tipos de morfologías de esporangios, siendo

estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) la plasticidad fenotípica de esporangios entre aislados secundarios obtenidos de brócoli y el control D3.

Se encontró que existen diferencias significativas entre A-ch-br, A-br-br y A-br-fr comparado con A-brócoli. Sin diferencias estadísticamente significativas entre los aislados secundarios obtenidos de brócoli. Es decir, es más probable que se presente variación significativa de la morfología de esporangios en *P. capsici* a través de las generaciones que tuvieron contacto infectivo con alguna de las cuatro especies vegetales.

Al evaluar y comparar la plasticidad morfológica de esporangios en A-ch-fr, A-pe-fr, A-br-fr y A-fr-fr, se encontraron diferencias significativas en la plasticidad de esporangios con respecto a D3 y aumento en la abundancia de la morfología ovoide. A-ch-fr y A-br-fr fueron estadísticamente diferentes a A-frijol, sin diferencias significativas en la plasticidad de la morfología de esporangios entre los aislados secundarios obtenidos de infección secundaria de frijol.

Después de caracterizar la plasticidad morfológica de los esporangios de D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*, se determinaron sus microestructuras fenotípicas representativas, en donde no se encontraron diferencias sustanciales entre los tratamientos, mostrado en el ANEXO 14. Es decir, el tipo de esporangióforo, forma y posición de papilación, caducidad del esporangio y longitud del pedicelo fue similar entre D3, aislados primarios y secundarios del microorganismo.

5.6 Correlación del crecimiento, patogenicidad y morfología en D3 y aislados primarios de *P. capsici*

En la figura 14 se muestra la matriz de correlación de Pearson entre las variables crecimiento, patogenicidad, morfología micelial o colonial y morfología de esporangios en D3 y aislados primarios de *P. capsici*. Se identificaron correlaciones positivas y negativas entre las variables y su nivel de significancia con análisis ANOVA ($p < 0.05$, 0.01, 0.001). Sólo se consideraron variables correlacionadas aquellas que tuvieron un intervalo de confianza mayor al 95%.

La tasa de crecimiento de D3 y aislados primarios está correlacionada de manera positiva con la morfología piriforme de los esporangios, es decir mientras mayor es la tasa de crecimiento del patógeno éste presenta mayor abundancia en la morfología de tipo piriforme en sus esporangios y viceversa.

Se identificó correlación positiva entre la infección primaria en pepino (I-pepino) y morfología colonial aberrante e inversamente correlacionada con la aparición de morfología colonial de tipo estrellado y morfología de esporangio globoide, esto indica que cuando D3 es aislado de infección primaria de pepino es alta la correlación que el aislado obtenido (A-pepino) tenga alta abundancia de morfología colonial tipo aberrante y menor abundancia de la morfología estrellada así como menor abundancia de esporangios tipo globoides. Por su parte, se encontró que está correlacionada la infección primaria en hoja de brócoli causada por D3 con la aparición de morfología colonial de tipo semi-lisa en el aislado A-brócoli.

Cuando el patógeno es recuperado de infección primaria de frijol (I-frijol), es decir A-frijol es inversa la correlación de la abundancia morfológica en sus esporangios de tipo globoide. La morfología colonial estrellada de D3 y aislados primarios esta correlacionada positivamente con la aparición de esporangios de tipo globoide e inversamente correlacionada con la aparición de la morfología colonial de tipo aberrante y esporangios ovoideos.

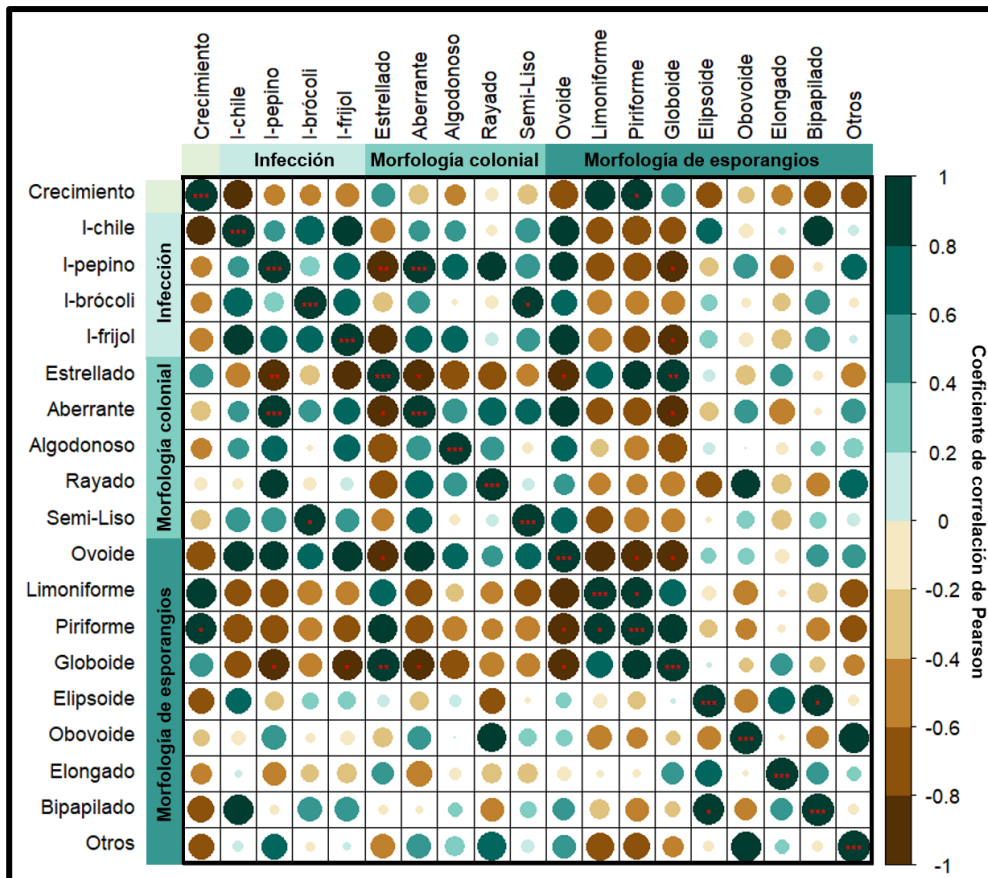


Figura 14. Matriz de correlación de Pearson de características de crecimiento, patogenicidad y morfológicas de aislados primarios. El color del círculo indica el rango del coeficiente de correlación de Pearson entre las variables, si es positiva o negativa. El tamaño del círculo indica si es alta, mediana o baja la correlación entre las variables, mientras mayor sea el tamaño del círculo, mayor es el coeficiente de correlación ya sea positiva o negativa. *diferencia estadísticamente significativa ANOVA ($p < 0.05$) entre las variables. **diferencia estadísticamente significativa ANOVA ($p < 0.01$) entre las variables. ***diferencia estadísticamente significativa ANOVA ($p < 0.001$) entre las variables.

Además, la morfología aberrante de D3 y aislados primarios está inversamente correlacionada con la aparición de esporangios tipo globoides, es decir cuando *P. capsici* muestra alta abundancia de morfología aberrante presenta baja abundancia de esporangios del tipo globoides.

Los esporangios ovoideos, están inversamente correlacionados con la morfología piriforme y globoide de los esporangios de D3 y aislados primarios. En cambio, los esporangios limoniformes están correlacionados positivamente con los esporangios de tipo piriforme. La aparición de morfología elipsoide de los esporangios en D3 y aislados primarios está correlacionada positivamente con la aparición de esporangios bipapilados.

5.7 Análisis de componentes principales de las variables patogenicidad, crecimiento y morfología en D3 y aislados primarios de *P. capsici*

El análisis de componentes principales en D3 y aislados primarios de *P. capsici* (figura 15), indicó que la varianza contribuye de manera diferente en los tratamientos al que fue sometido el oomiceto, es decir D3 mostró estar definido principalmente por la alta presencia en su crecimiento, la morfología de esporangios de tipo piriforme y limoniforme. En cambio, la varianza de A-chile fue principalmente explicada por la morfología micelial de tipo estrellado y la morfología de esporangios de tipo globoide y elongado.

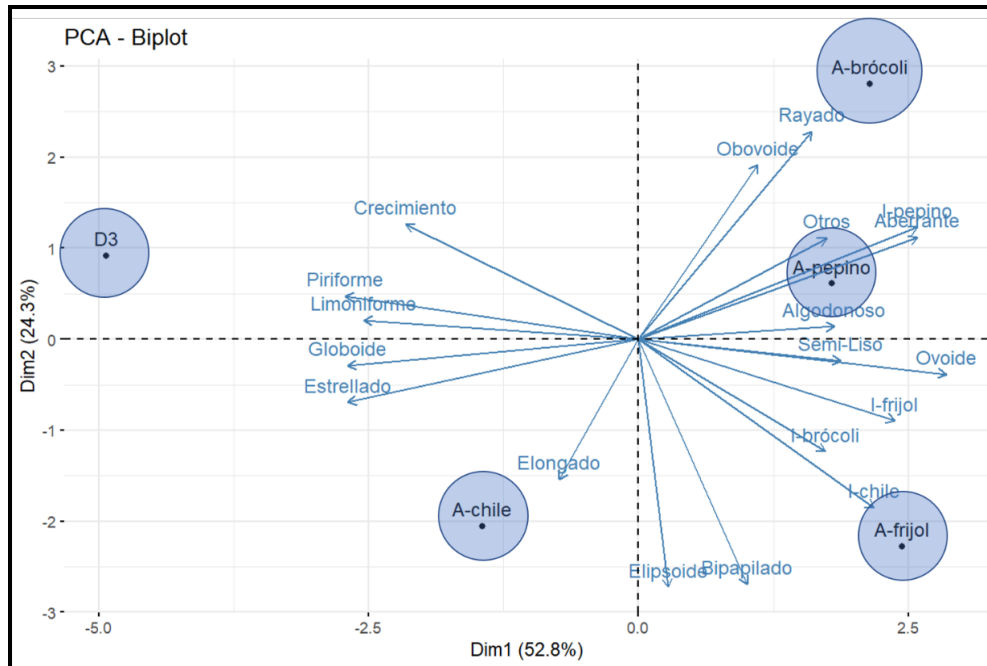


Figura 15. Análisis de componentes principales de D3 y aislados primarios de *P. capsici*. Gráfico PCA-Biplot que muestra los principales eigenvalores que contribuyen a la máxima varianza de las variables crecimiento, patogenicidad y morfología en D3 y aislados primarios.

A-pepino y A-brócoli son similares, ya que su varianza se explica principalmente por la infección primaria en pepino, la morfología micelial de tipo aberrante, algodonosa y rayada, así como por la morfología de los esporangios tipo obovoide y otros.

La varianza de A-frijol se ve influenciada por las infecciones primarias en I-chile, I-brócoli e I-frijol, la morfología colonial de tipo semi-liso, así como de la morfología de sus esporangios de tipo ovoide, elipsoide y bipapilado.

En el ANEXO 15 se muestran graficas de apoyo al PCA en donde muestran la contribución de las variables sobre los cuatro tratamientos evaluados del oomiceto, el porcentaje en que contribuyen los cuatro ejes principales identificados sobre la varianza, también se muestra que la morfología ovoide de los esporangios fue la variable que más contribuyó a explicar la varianza del eje principal uno en el PCA. El ANEXO 15 también muestra que D3 es el individuo que mayor contribuye a explicar la varianza sobre el eje principal uno. En general, estos datos indican que cada una de las variables analizadas en D3 y aislados primarios contribuye de manera diferente con cada tratamiento los cuales podrían agruparse.

5.8 Clusterización k-means en D3 y aislados primarios de *P. capsici*

En la figura 16A se observan los resultados de clusterización por k-means de D3 y aislados primarios de *P. capsici*. Los datos fueron agrupados en cuatro clústers de acuerdo al método de la silueta, clúster 1: A-chile, clúster 2: D3, clúster 3: A-brócoli y A-pepino, clúster 4: A-frijol. Estos resultados sugieren que existen diferencias entre las variables de patogenicidad, crecimiento, morfología micelial y de esporangios entre los aislados primarios y D3, siendo A-pepino y A-brócoli los aislados primarios con mayor similitud en estas variables.

En la normalización de las variables de los clústers en valores de z, se encontró que es mayor la tasa de crecimiento, morfología micelial estrellada, esporangios tipo limoniformes, piriformes y globoides en el clúster D3 comparado con los clústers de aislados primarios con diferencia entre ellos (figura 16B). Es decir, los resultados indicaron que las cuatro especies vegetales inducen la disminución del crecimiento de los aislados primarios en varios grados, y disminuyen la abundancia de la morfología estrellada característica de *P. capsici*.

El clúster D3 mostró menor capacidad infectiva en hojas de chile, pepino, brócoli y frijol, morfología colonial tipo algodonosa, esporangios ovoides, elipsoides, bipapilados y otros tipos de esporangios. Esto indica que después de una exposición hacia alguna especie vegetal, *P. capsici* tiende a aumentar su virulencia y presentar plasticidad fenotípica en ciertos tipos de conformación micelial y de esporangios.

Sin embargo, se encontró similitud en la abundancia de la morfología tipo rayada de D3 con los clústers A-chile, A-frijol y menor a la abundancia que presenta el clúster de A-pepino-A-brócoli. Estos datos indican que existen excepciones en la modificación de la abundancia de la morfología colonial en *P. capsici* dependiente de la especie inmediata de la que se obtuvo, es decir las especies vegetales pepino y brócoli pueden influenciar en mayor medida la aparición de cambios en la abundancia de morfología de tipo rayada en *P. capsici*.

Fue similar la abundancia de la morfología de esporangios tipo ovoide entre los clústers D3 y A-frijol pero menor que los clústers A-chile y A-pepino-A-brócoli, indicando que cuando *P. capsici* tiene largos periodos de tiempo sin infectar alguna especie vegetal y después infectar/ser recuperado de infección primaria de frijol, la abundancia de la morfología de esporangios tipo ovoide permanece igual. En cambio, cuando es aislado de l-chile, l-pepino y l-brócoli aumenta la abundancia de esta morfología.

La aparición de morfología elongada en esporangios del clúster D3 fue similar a los clústers A-frijol, A-pepino-A-brócoli pero menor que clúster A-chile. Es decir, fue menor la influencia que tienen las cuatro especies vegetales sobre la modificación de la abundancia de la morfología de esporangios que la morfología colonial del oomiceto.

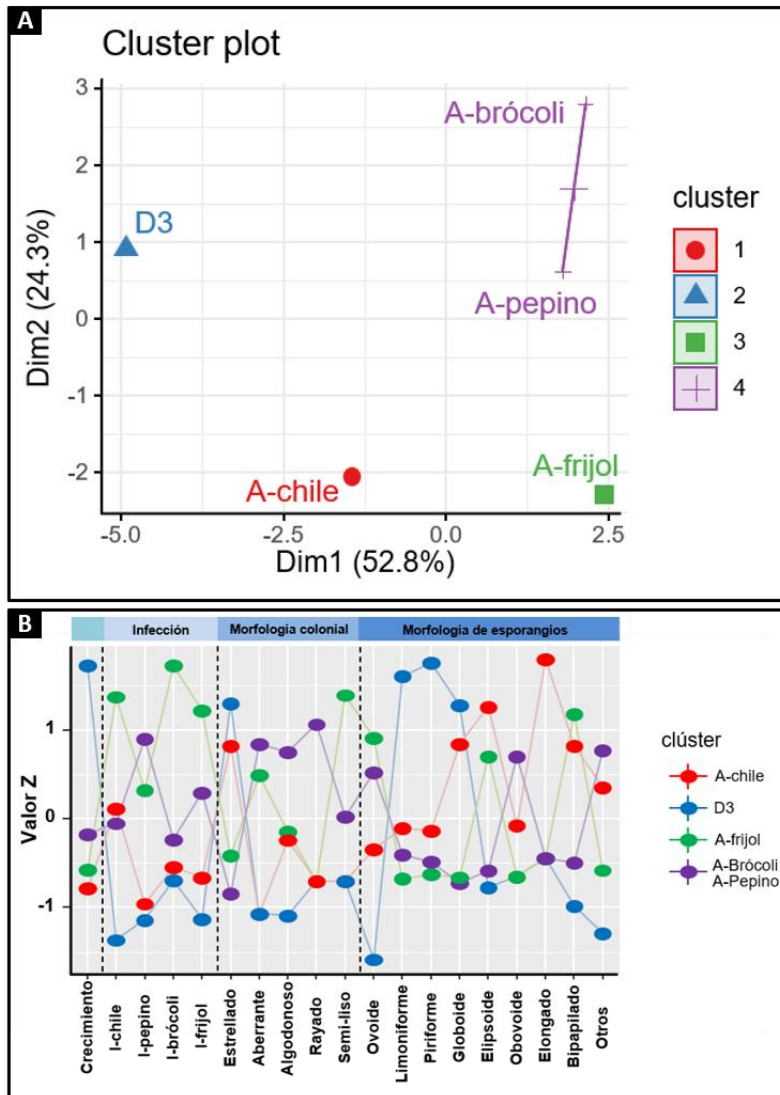


Figura 16. Clusterización k-means de D3 y aislados primarios de *P. capsici*. **A:** Agrupación en cuatro clústers mostrado en clúster plot de las variables: patogenicidad, crecimiento, morfología macroscópica y microscópica de D3 y aislados primarios de *P. capsici*. **B:** Modelo gráfico k-means, el color del punto representa el clúster de agrupamiento de D3 y aislados primarios del oomiceto, representado por los datos normalizados de k-means en valores de z de las variables crecimiento, patogenicidad (infección), morfología colonial y esporangios.

5.9 Correlación del crecimiento, patogenicidad y morfología en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*

En la figura 17 se muestra la correlación entre las variables crecimiento, morfología colonial y de esporangios de los individuos D3, aislados primarios y secundarios.

Las variables que presentaron nivel de significancia entre los tratamientos está conformada por la correlación positiva del crecimiento con la morfología colonial estrellada y esporangios limoniformes y piriformes, la cual estuvo inversamente correlacionada con la morfología ovoide. Es decir cuando *P. capsici* presentó alta tasa de crecimiento, tuvo mayormente morfología estrellada, esporangios limoniformes y piriformes.

En cambio, cuando el crecimiento del oomiceto fue lento, la morfología de los esporangios fue mayormente de tipo ovoide.

Cuando D3, aislados primarios y secundarios presentaron alta abundancia de morfología estrellada, también en esporangios limoniformes, piriformes y globoides. En cambio, disminuyó inversamente la aparición de la abundancia de morfología micelial tipo aberrante y algodonosa, así como esporangios con morfología tipo ovoide.

La abundancia de la morfología rayada de los tratamientos al que fue sometido el oomiceto estuvo correlacionada positivamente con la abundancia de esporangios tipo ovoide e inversamente correlacionada con la aparición de otros tipos de morfología de esporangios.

Por su parte, la abundancia de esporangios ovoides fue inversamente correlacionada con la aparición de esporangios limoniformes, piriformes y globoides. Es decir cuando fue alta la abundancia de esporangios ovoides en D3, aislados primarios o secundarios fue inversa la aparición de esporangios limoniformes, piriformes y globoides.

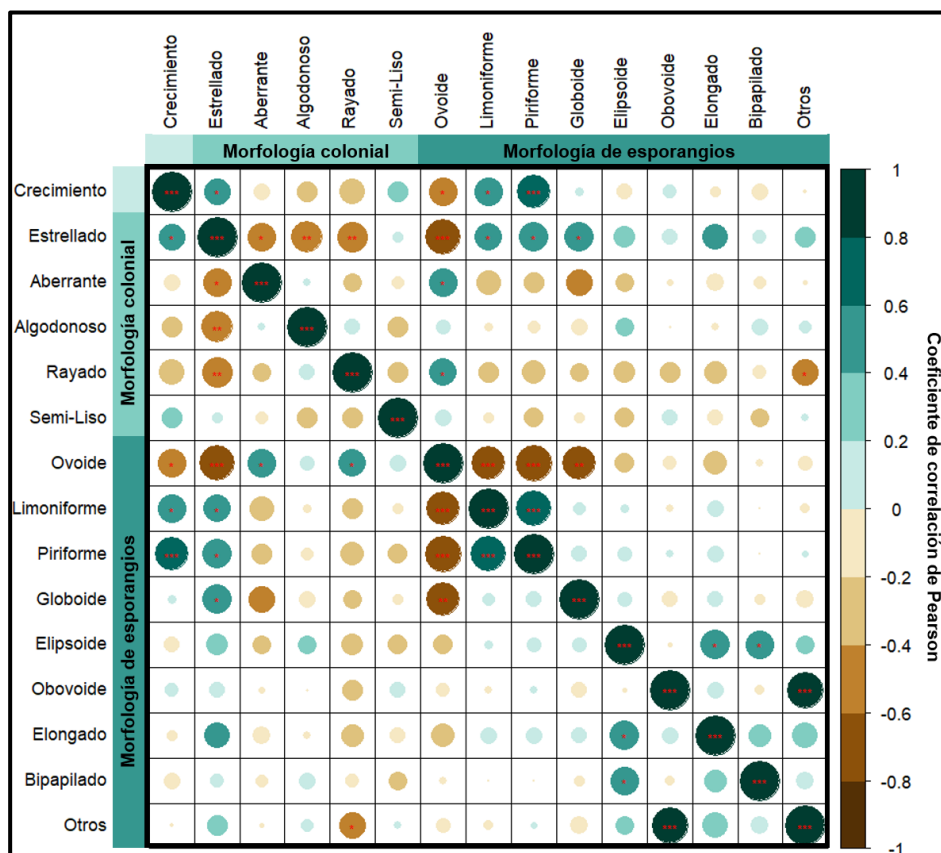


Figura 17. Matriz de correlación de Pearson del crecimiento y fenotipo macroscópico y microscópico de aislados primarios y secundarios de *P. capsici*. El color del círculo indica el rango del coeficiente de correlación de Pearson entre las variables (positiva o negativa). El tamaño del círculo indica si es alta, mediana o baja la correlación entre las variables, mientras mayor sea el tamaño del círculo, mayor es el coeficiente de correlación ya sea positiva o negativa. *diferencia estadísticamente significativa ANOVA ($p < 0.05$) entre las variables. **diferencia estadísticamente significativa ANOVA ($p < 0.01$) entre las variables. ***diferencia estadísticamente significativa ANOVA ($p < 0.001$) entre las variables.

Los esporangios limoniformes estuvieron correlacionados positivamente con la abundancia de esporangios piriformes. La abundancia de esporangios eclipsoides permanecieron correlacionados positivamente con los esporangios elongados y bipapilados, en cambio, los esporangios obovoides se encontraron correlacionados positivamente con otras morfologías de esporangios en los tratamientos del microorganismo.

5.10 Análisis de componentes principales de las variables crecimiento y morfología en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*

En la figura 18 se muestra el análisis de componentes principales de las variables crecimiento, morfología colonial y de esporangios entre D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*. En esta se observa que la máxima varianza de D3, A-ch-br, A-ch-fr, A-pe-pe está fuertemente influenciada por su crecimiento y morfología de esporangios tipo limoniforme, piriforme y globoide. Por su parte, A-chile, A-pepino, A-brócoli, A-frijol, A-br-pe, por la morfología de esporangios del tipo obovoide, elongado, elipsoide, bipapilados y otros tipos de esporangios. En cambio, la varianza de A-pe-br, A-pe-fr, A-br-br, A-br-fr, A-fr-pe está mayormente determinada por su morfología micelial aberrante, algodonosa y esporangios ovoides. Sin embargo, la morfología colonial semi-lisa y rayada representa la mayor varianza en A-ch-ch, A-ch-pe, A-pe-ch, A-br-ch, A-fr-ch, A-fr-br, A-fr-fr.

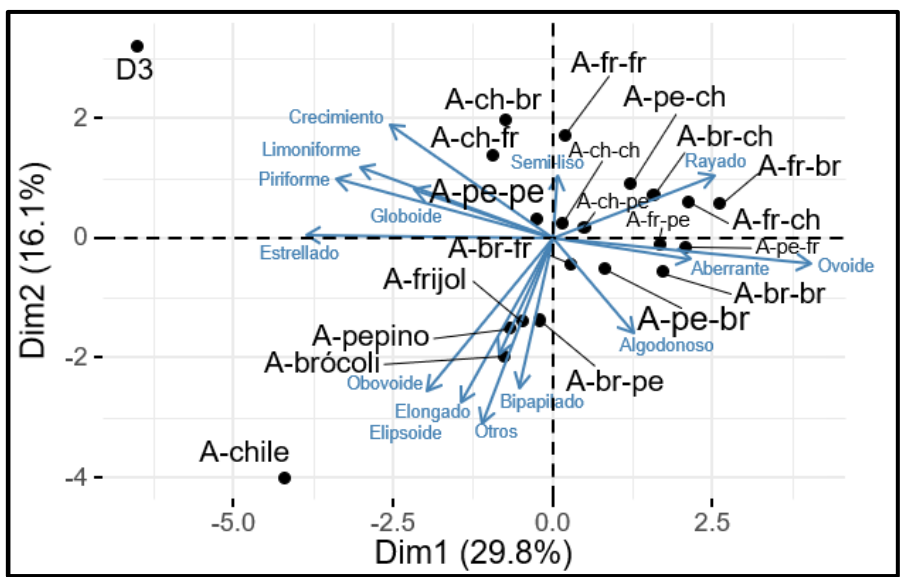


Figura 18. Análisis de componentes principales de D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*. Gráfico PCA-Biplot que muestra los principales eigenvalores que contribuyen a la máxima varianza de las variables crecimiento, morfología macroscópica y microscópica en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*.

En el ANEXO 16, se muestran las gráficas descriptivas del análisis de componentes principales, el apartado A exhibe la contribución de las variables sobre los veintinueve tratamientos evaluados del oomiceto. El gráfico B indica el porcentaje en que contribuyen los diez ejes principales identificados sobre la varianza. En C y D se muestra que de nuevo la morfología ovoide de los esporangios y D3 son la variable e individuo que más contribuyen a explicar la varianza del eje principal uno del PCA, respectivamente. Es decir, las variables contribuyen de manera diferente a la varianza en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*. Sin embargo, no se encontró un patrón definido que indique la influencia de las variables con la

especie vegetal que infecta/es recuperado el patógeno o el historial infectivo, por lo que entonces fue importante realizar análisis de clusterización por k-means.

5.11 Clusterización k-means en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*

Antes de realizar clustering en los tratamientos del oomiceto se calculó su matriz de distancias euclídeas mostrada en el ANEXO 17, para identificar si es factible realizar agrupación de los datos. En la figura 19 se muestra el clúster plot que indica la agrupación de los individuos compuesta por tres clústers. Clúster 1: D3, clúster 2: aislados primarios (A-chile, A-pepino, A-brócoli, A-frijol), clúster 3: aislados secundarios (A-ch-ch, A-pe-ch, A-br-ch, A-fr-ch, A-ch-pe, A-pe-pe, A-br-pe, A-fr-pe, A-ch-br, A-pe-br, A-br-br, A-fr-br, A-ch-fr, A-pe-fr, A-br-fr, A-fr-fr).

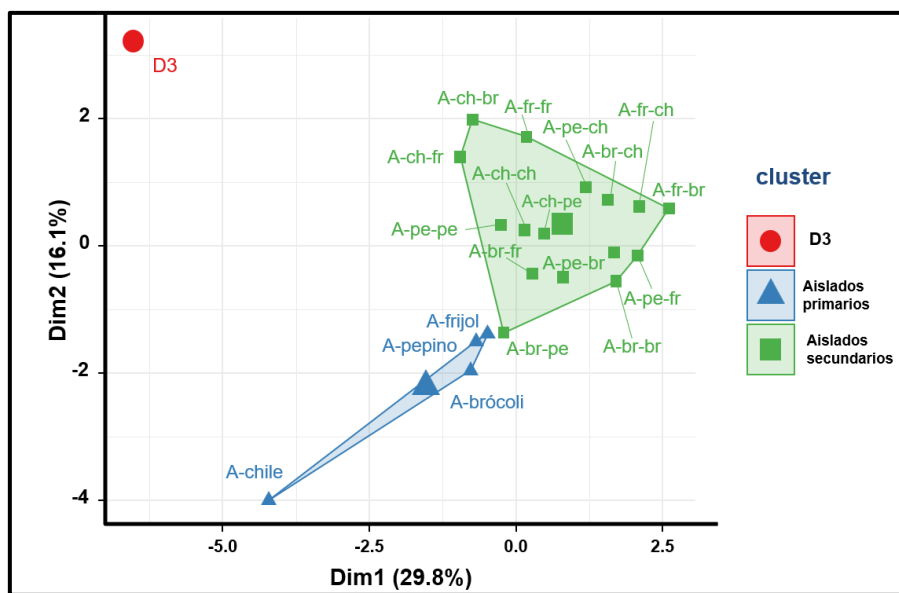


Figura 19. Clusterización por k-means de D3, aislados primarios y secundarios. Agrupación en tres clústers mostrado en clúster plot de las variables: crecimiento, morfología macroscópica y microscópica de D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*.

Fueron identificadas y comparadas las características entre clústers, para ello se normalizaron las medias de las variables en valores de z de cada grupo, mostrado en la figura 20. A partir del gráfico se identificó disminución de la tasa de crecimiento, morfología micelial estrellada, esporangios limoniformes, piriformes y globoides del oomiceto con respecto a la generación de infección. Es decir, estas variables disminuyeron en los aislados primarios con respecto al control y a su vez volvieron a decrecer en los aislados secundarios. El modelo también indicó que *P. capsici* va perdiendo progresivamente estas características iniciales en las siguientes dos generaciones que han tenido contacto con alguna combinatoria de las cuatro especies vegetales evaluadas.

Ocurrió lo contrario con la abundancia de morfología colonial aberrante, rayada y esporangios ovoides, ya que D3 presentó baja abundancia de estas morfologías. Sin embargo, en la siguiente generación de aislamiento aumentó su abundancia y de nuevo en los aislados secundarios, perdiendo algunas características fenotípicas que son sustituidas por nuevas.

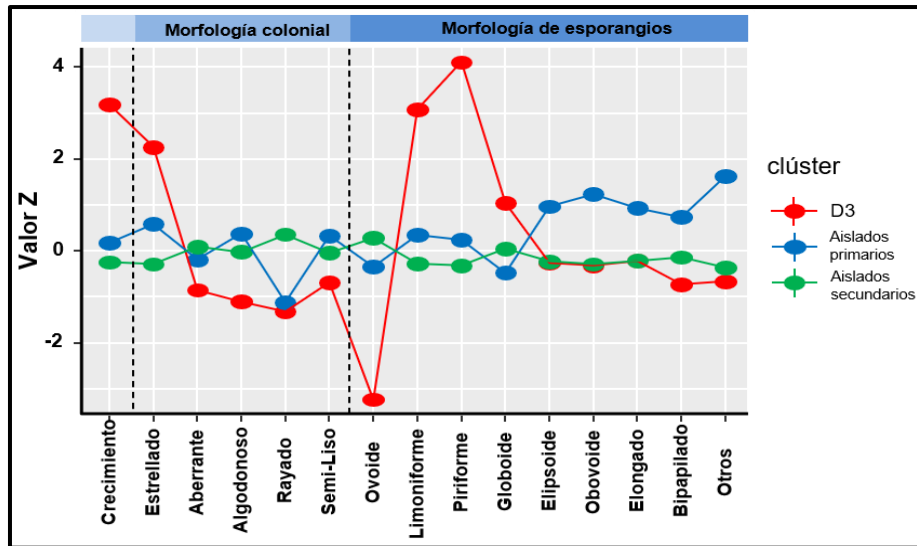


Figura 20. Modelo gráfico de k-means normalizados de clústeres en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*. El color de cada punto representa el clúster de agrupamiento de D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*, representado por los datos normalizados de k-means en valores de z de las variables crecimiento, morfología colonial y esporangios.

También, se determinó que la abundancia de la morfología micelial algodonosa, semi-lisa, esporangios bipapilados y otro tipo de esporangios fue baja en la cepa progenitora. En cambio, en los aislados primarios aumenta y en los secundarios vuelve a decrecer, pero mayor que el estado inicial. La abundancia morfológica de esporangios elipsoide, obovoide y elongado fue baja en D3, sin embargo, en los aislados primarios aumentó y en los secundarios vuelve a regresar a su estado inicial. Mostrando que *P. capsici* presenta diversos patrones de plasticidad fenotípica dependiente de la generación de aislamiento.

5.12 Análisis sRNA-seq de los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch de *P. capsici*

Para identificar la influencia de la regulación epigenética mediada por sRNAs-miRNAs en aislados de *P. capsici* con diferente historial de infección/recuperación a distintas especies vegetales, se eligieron A-ch-ch y A-br-ch por ser aislados secundarios cuyo último hospedero de recuperación fue Chile pero con diferente historial de infección que además presentaron diferencias en patogenicidad, crecimiento, plasticidad fenotípica micelial y esporangios entre ellos. Es decir, el primero proviene de historial de infección sólo en Chile, se consideró como control ya que se conoce la cepa progenitora D3 proviene de infección en Chile, el segundo aislado secundario proviene de recuperación de infección primaria de brócoli seguida de infección secundaria/recuperación de Chile.

Se obtuvieron 52,750,000 secuencias filtradas mayores a 33 nt para A-ch-ch y 81,500,000 en A-br-ch, encontrando que alrededor del 90% de las mismas pertenecen a RNAs ribosomales y de transferencia (figura 21A), con diferente porcentaje entre ambos aislados. Sin embargo, el 5% de las secuencias (5,246,351 A-ch-ch y 5,935,867 A-br-ch) se asociaron a regiones que incluyen regiones génicas, intergénicas, elementos transponibles de *P. capsici*.

En la caracterización de la abundancia de las poblaciones de sRNAs se observó mayor abundancia de sRNAs de 21 y 25 nt en ambos tratamientos (figura 21B), sin embargo, fue

mayor la abundancia de sRNAs de 27 nt en A-ch-ch comparado con A-br-ch, identificando además que fue mayor la abundancia de sRNAs menores a 26 nt en A-br-ch.

Se identificó evidente modificación del perfil de sRNAs expresados en ambos aislados, ya que el 85% y 95% son únicos en A-ch-ch y A-br-ch, respectivamente (figura 21C), ello pone de manifiesto que sólo el 6% (148,125 sRNAs) de los sRNAs de A-br-ch se comparten con el control, por lo tanto, es diferente la regulación epigenética mediada por sRNAs-miRNAs en ambos aislados.

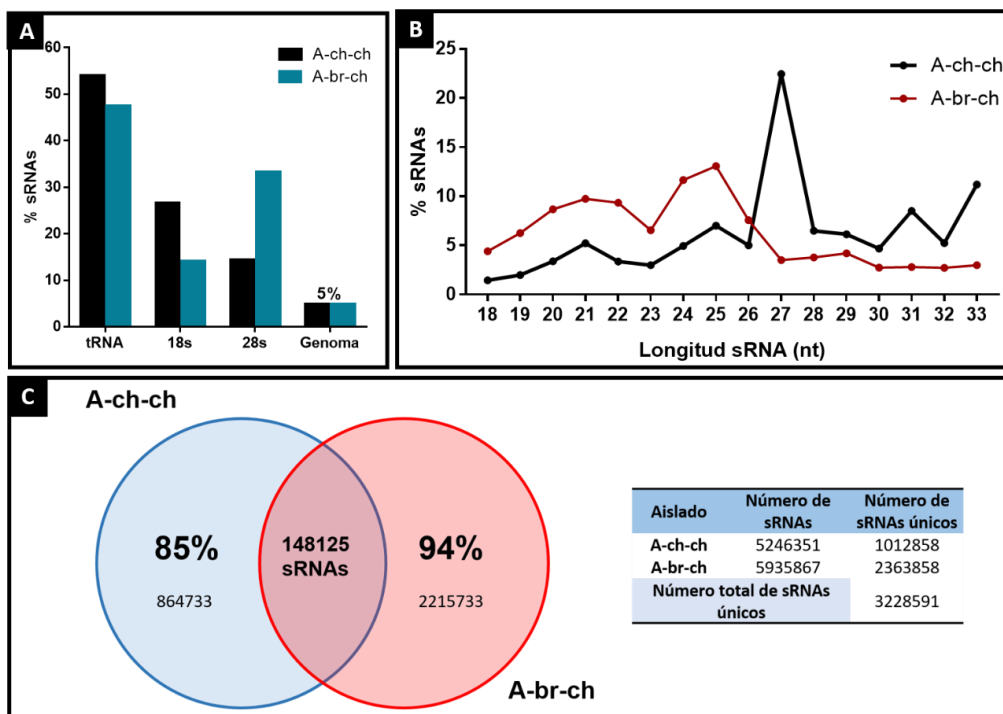


Figura 21. Características de small RNAs de A-ch-ch y A-br-ch. **A:** Gráfico de barras del porcentaje de sRNAs asociados a RNAs de transferencia, ribosomales y regiones genómicas de A-ch-ch y A-br-ch. **B:** Porcentaje de las poblaciones de sRNAs asociados al genoma de *P. capsici* en A-ch-ch y A-br-ch. **C:** Diagrama de venn de sRNAs asociados al genoma de *P. capsici* entre A-ch-ch y A-br-ch.

La visualización de la abundancia en un locus específico de los sRNAs al genoma de *P. capsici* de los tratamientos (figura 22A), mostró sRNAs asociados a regiones exónicas, intrónicas e intergénicas, con mayor abundancia en A-br-ch por locus en la mayoría de los scaffolds comparado con A-ch-ch.

En análisis del primer nucleótido 5'P de cada longitud de sRNA en los tratamientos (figura 22B), mostró mayor abundancia de uracilo y citosina en el extremo 5'P en sRNAs de 20-22 nt comparado con los nucleótidos adenina y guanina. Sin embargo, el porcentaje de uracilo 5'P en sRNAs de 24-25 nt es el más alto, en cambio disminuyó en sRNAs mayores a 25nt y en consecuencia aumentó el porcentaje de citosina.

En el ANEXO 18, se muestran las características estadísticas, densidad de sRNAs, y análisis de componentes principales del análisis de expresión diferencial de sRNAs.

En el ANEXO 19, se muestran los resultados de expresión diferencial de sRNAs de los métodos de NOISeq, edgeR y DESeq2. Se decidió utilizar el estadístico DESeq2 por presentar valores confiables del análisis.

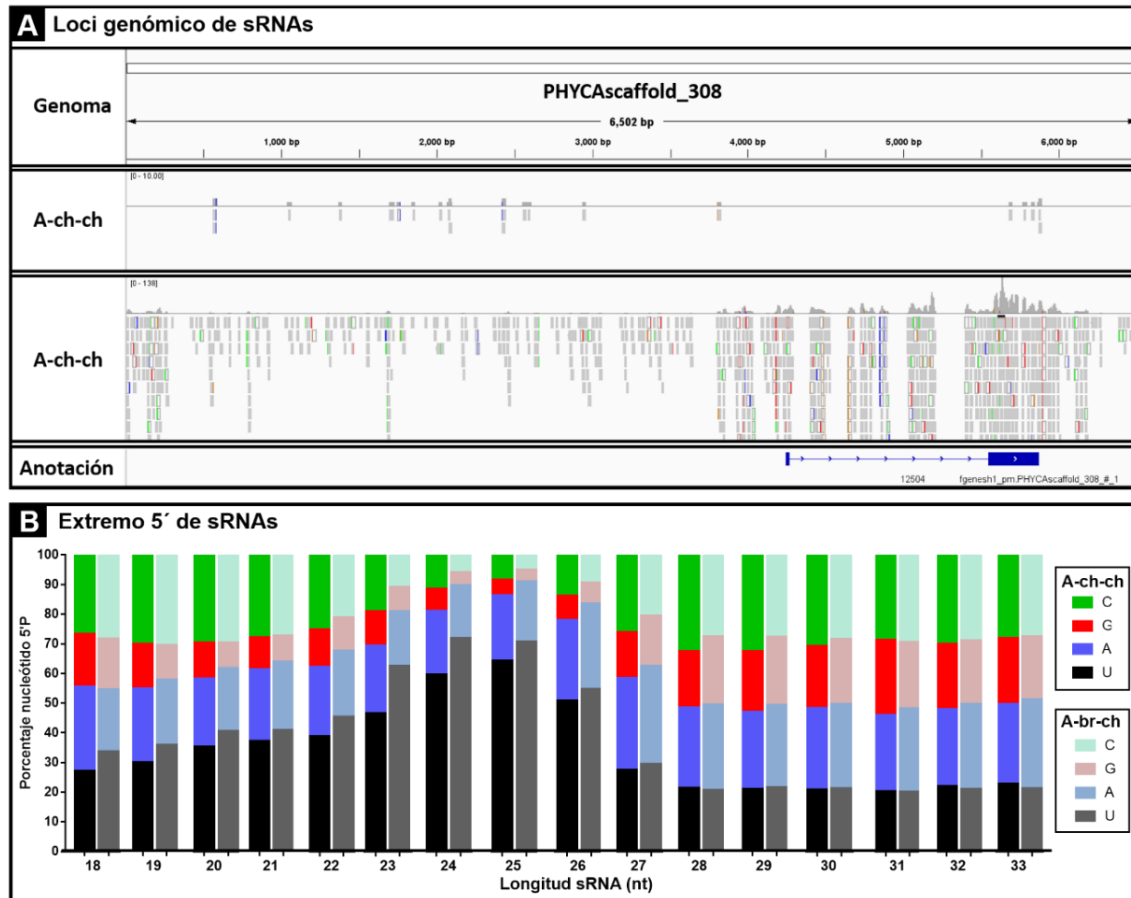


Figura 22. Small RNAs asociados a regiones genómicas de *P. capsici* y nucleótido 5'P de sRNAs. **A:** visualización en IGV de sRNAs asociados a intergénicas y genéticas de *P. capsici* en A-ch-ch y A-br-ch. **B:** Grafico abundancia del nucleótido 5'P de sRNAs asociados al genoma de *P. capsici* en A-ch-ch y A-br-ch. **C:** citosina, G: guanina, A: adenina, U: uracilo.

El análisis de expresión diferencial de sRNAs asociados a regiones génicas del oomiceto, mostrado en el heatmap de la figura 23A, indicó diferencias en la expresión de sRNAs entre los tratamientos, de los cuales 184 sRNAs fueron sobre-expresados significativamente ($\text{Log}_2\text{Foldchange} > 1$ y < -1 , $p\text{-value} < 0.05$) y 287 tipos infra-expresados en A-br-ch comparados con A-ch-ch (figuras 23B y 23C).

El enriquecimiento KEEG y análisis de relaciones de las vías celulares de los sRNAs diferencialmente expresados (figura 24A), indicó que los sRNAs infra-expresados están relacionados con procesos de metabolismo de carbohidratos que incluyen pentosas fosfato, glicolisis, biosíntesis de ribosomas, unión a metales, síntesis de tRNA y unión a ácidos nucleicos. En cambio, los sRNAs sobre-expresados fueron enriquecidos para las vías de replicación de DNA, metilación de histonas, modificaciones postraduccionales, unión a RNA y síntesis de RNA ribosomal.

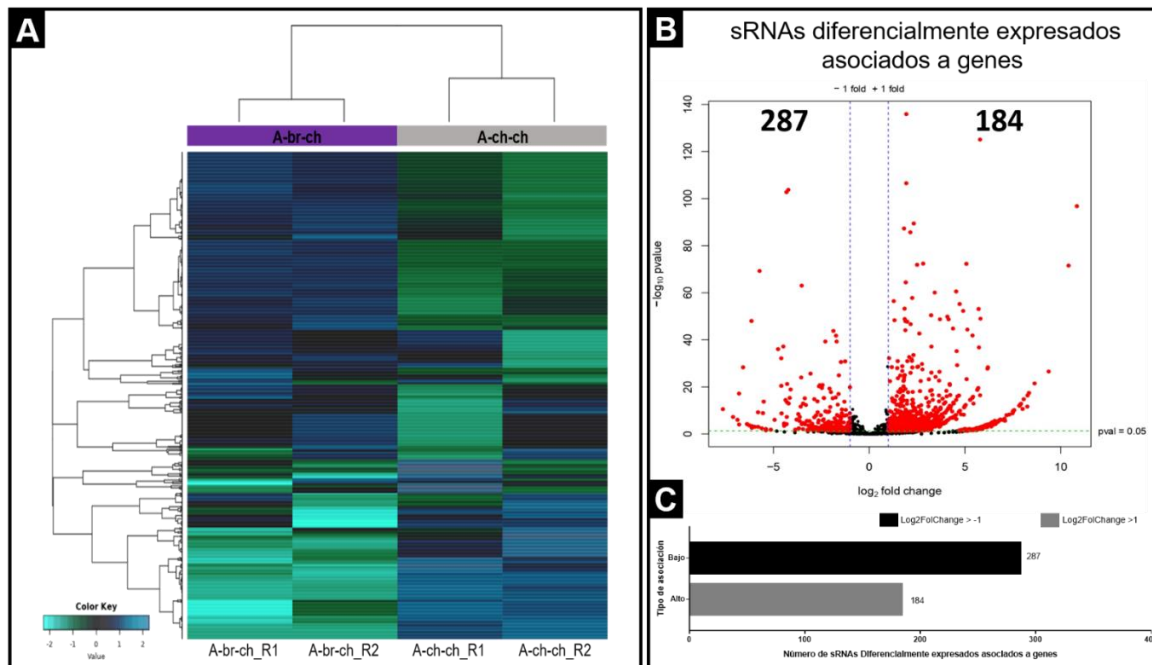


Figura 23. sRNAs diferencialmente expresados asociados a genes de *P. capsici*. **A:** Heatmap sRNAs diferencialmente expresados asociados a genes de *P. capsici* en A-ch-ch y A-br-ch. **B:** Volcan plot de sRNAs diferencialmente expresados asociados a genes de *P. capsici* en A-br-ch con Log2Foldchange $|\gt; 1, < -1|$, $p\text{-value} < 0.05$. **C:** Numero de sRNAs asociados a genes diferencialmente expresados de A-br-ch.

El análisis de las vías celulares con mayor enriquecimiento mostró que las vías relacionadas con el metabolismo de carbohidratos (figura 24B), son aquellas que podrían tener poca actividad regulatoria mediada por los sRNAs. En cambio, las vías relacionadas con genes de metilación de histonas fueron menor influenciadas a ser reguladas por sRNAs en A-br-ch.

Una vez que se caracterizaron los sRNAs asociados al genoma de *P. capsici* se identificaron miRNAs reportados en bases de datos públicas como miRBase. Sin embargo, el 99% de los sRNAs no fueron asignados a dicha base de datos en ambos tratamientos (figura 25A). El restante 1% de sRNAs estuvieron alojados como miRNAs en la base de datos, es decir se identificaron 334 miRNAs homólogos en A-ch-ch y 1360 en A-br-ch (figura 25B).

Sorprendentemente, el 98.6% (210 miRNAs) de los miRNAs identificados en el control se encontraron compartidos con A-br-ch, y sólo 3 miRNAs son únicos del control. En cambio, 761 tipos de miRNAs son únicos de A-br-ch, mostrados en la figura 25B y ANEXO 20. Estos resultados indican de manera predictiva que en *P. capsici* existe regulación génica mediada por miRNAs canónicos con mayor actividad regulatoria en A-br-ch.

El análisis del nivel de expresión de los miRNAs anotados en miRBase (Figura 25C), mostró que el miRNA mmu-miR-5124a de *M. musculus* se expresa mayormente en ambos aislados, seguido de los miRNAs ortólogos pin-miR8788-3p y pra-miR8788b-5p, los cuales pertenecen a la única familia de miRNAs reportada en el género *Phytophthora*. Además, se identificó en menor nivel de expresión los miRNAs: aly-miR774b-5p, der-miR-10, tur-miR-92-3p, ami-let-7a-5p, dqu-bantam-3p, pte-miR-71-3p, pte-miR-279-3p, entre otros (ANEXOS 21 y 22).

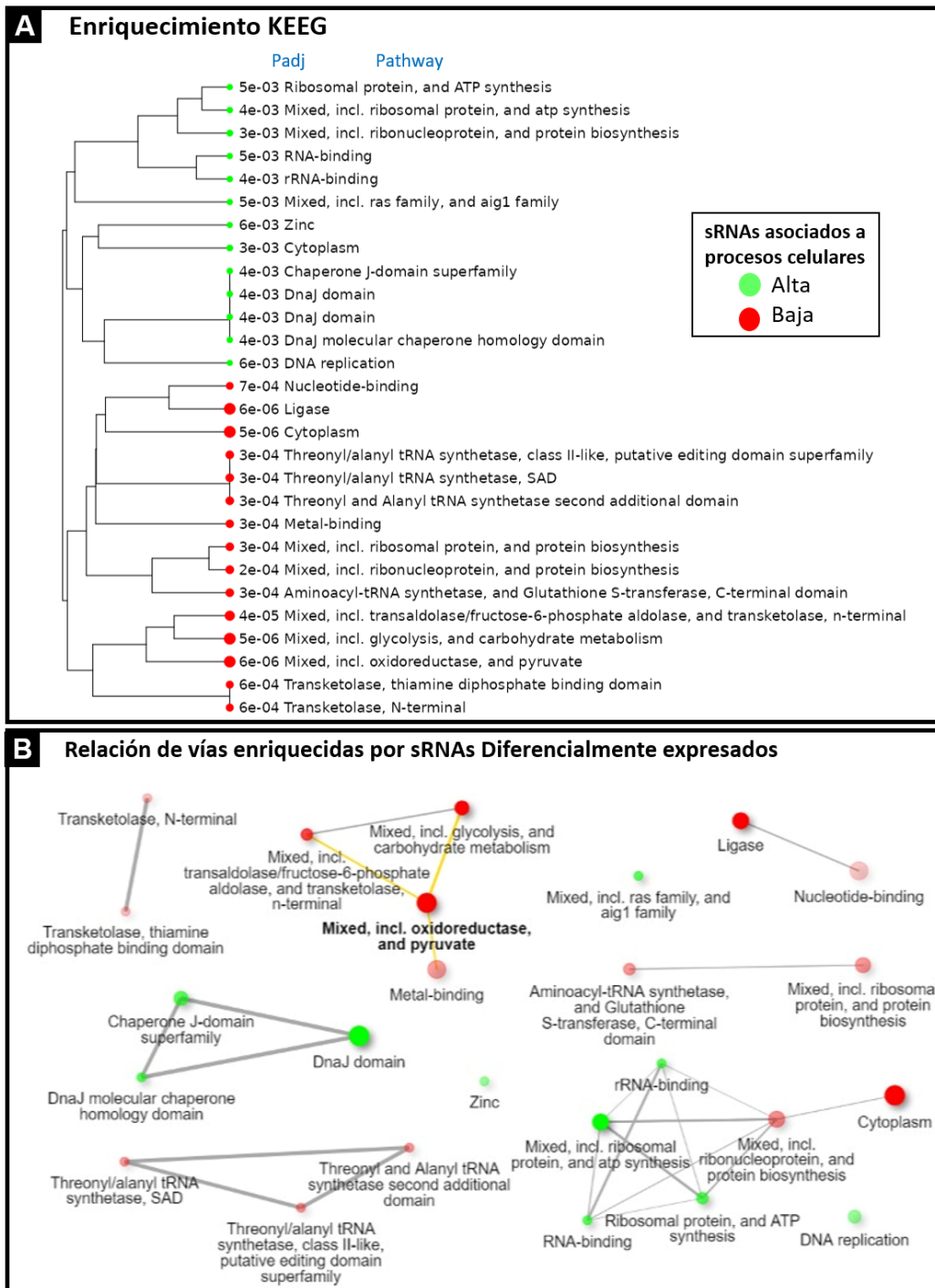


Figura 24. Enriquecimiento KEEG de sRNAs diferencialmente expresados asociados a genes de *P. capsici* en A-br-ch con respecto a A-ch-ch. **A:** Árbol de relaciones de vías celulares de sRNAs diferencialmente expresados asociados a genes de *P. capsici* en A-br-ch, los conjuntos de genes más cercanos en el árbol comparten más genes, los puntos verdes indican que es diferencialmente alta la asociación de sRNAs con la vía celular. Es decir, los sRNAs estarían regulando altamente esta vía por lo tanto sería menor la expresión de la vía. Círculos rojos indican que es baja la asociación de sRNAs con la vía celular, por lo tanto la vía estaría siendo poco regulada por los sRNAs generando que diferencialmente se exprese más la vía, ya que los sRNAs tendrían poco efecto regulatorio sobre la misma. Los tamaños de los puntos corresponden a los valores P ajustados. **B:** Relación entre vías enriquecidas por sRNAs diferencialmente expresados asociados a genes de *P. capsici* en A-br-ch. Dos vías (nodos) están conectadas si comparten un 30 % o más genes, los nodos más oscuros son conjuntos de genes

significativamente más enriquecidos, los nodos más grandes representan conjuntos de genes más grandes, los bordes más gruesos representan genes con mayor superposición.

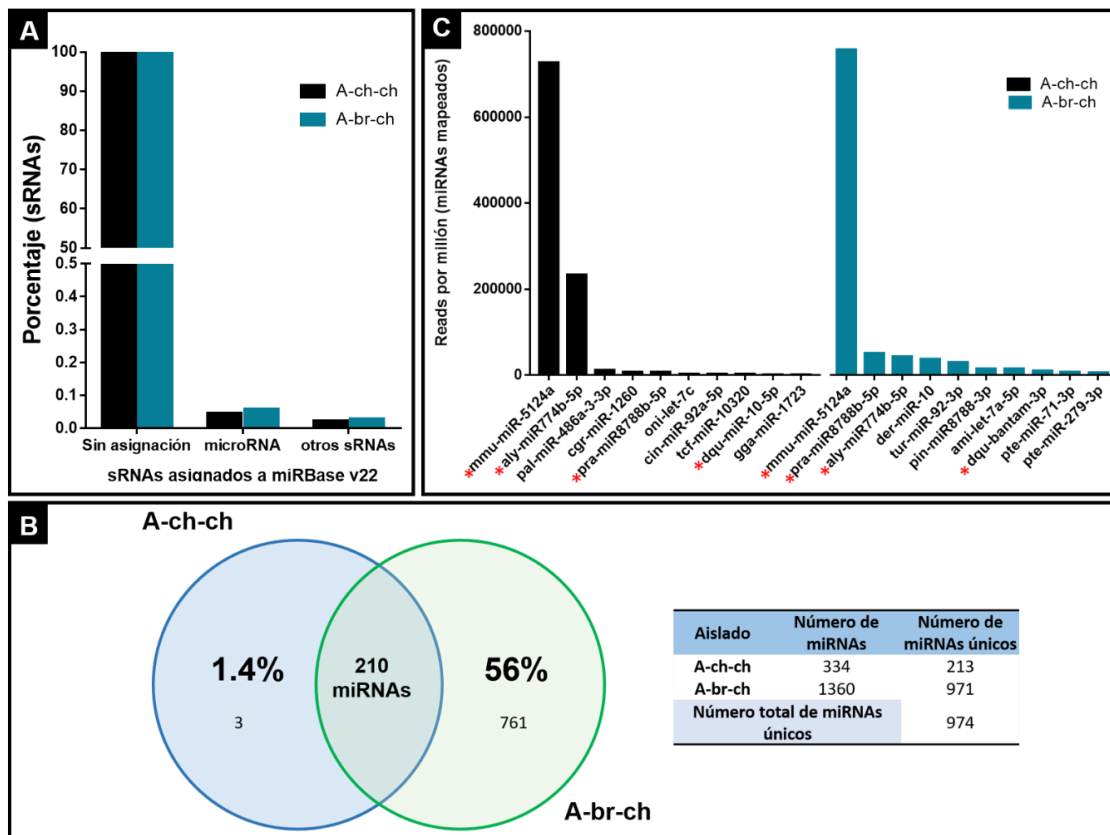


Figura 25. Identificación de miRNAs anotados en miRBase v22. **A:** Gráfica sRNAs asociados al genoma de *P. capsici* anotados a miRNAs de miRBase en A-ch-ch y A-br-ch. **B:** Diagrama de Venn miRNAs anotados en miRBase v22 únicos y compartidos entre A-ch-ch y A-br-ch. **C:** Nivel de expresión de miRNAs anotados en A-ch-ch y A-br-ch. * se encuentra en ambos tratamientos.

Enseguida, se identificaron las especies de organismos que comparten miRNAs con *P. capsici* con base a los miRNAs identificados en ambos aislados, mostrado en la figura 26. Se encontró que cerca del 75% de los miRNAs identificados en el oomiceto se encuentran alojados en el genoma de *Mus musculus* (mmu), seguido de *P. ramorum* (pra) con diferencias entre los tratamientos, y de organismos tan diversos como *Arabidopsis lyrata* (aly), *Drosophila erecta* (der), *Tetranychus urticae* (tur), *Phytophthora infestans* (pin), *Alligator mississippiensis* (ami), *Parasteotoda tepidariorum* (pte), *Dinoponera quadricaps* (dqu), *Pteropus alecto* (pal), *Cricetulus griseus* (cgr), *Oreochromis niloticus* (oni), *Triops cancriformis* (tcf), *Ciona intestinalis* (cin) y *Gallus gallus* (gga).

A partir de los miRNAs identificados en miRBase se realizó su análisis de expresión diferencial con edgeR, mostrado en la figura 27A-B. Fueron seleccionados los miRNAs con Log2Foldchange >1 y <-1, p-value<0.05, encontrando sobreexpresión en la familia de ortólogos de miR8788 de *P. ramorum* y *P. infestans* en A-br-ch comparado con el control, los cuales están relacionados con la virulencia de los oomicetos. Se identificó infra expresión de los miRNAs aly-miR774b-5p, mmu-miR-5124a y pal-miR-486a-3-3p en A-br-ch, las anotaciones de miRNAs se muestran en los ANEXOS 21 y 22.

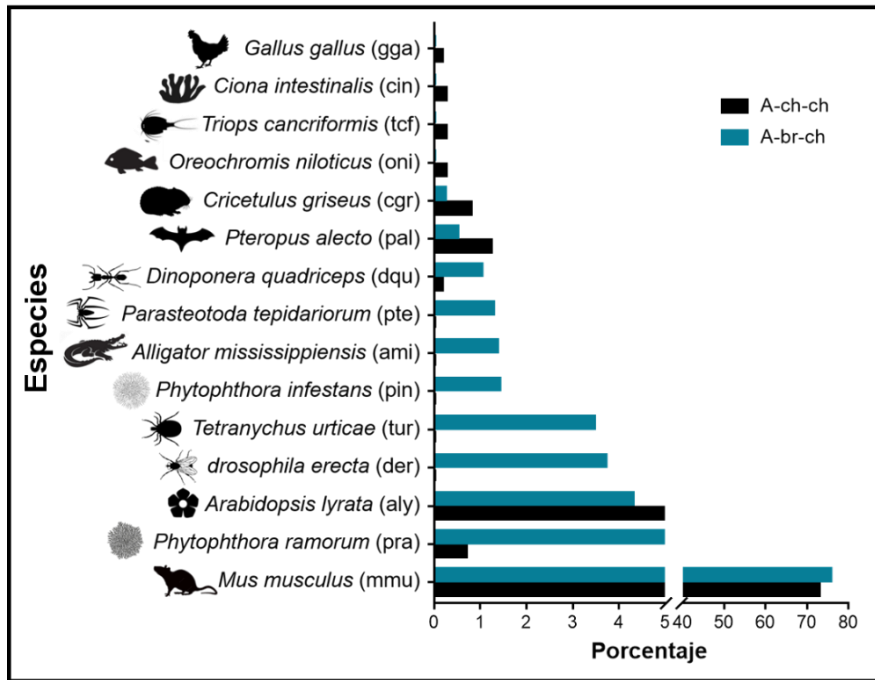


Figura 26. Potenciales miRNAs de *P. capsici* compartidos con diversas especies de organismos alojados en miRBase v22 en A-ch-ch y A-br-ch.

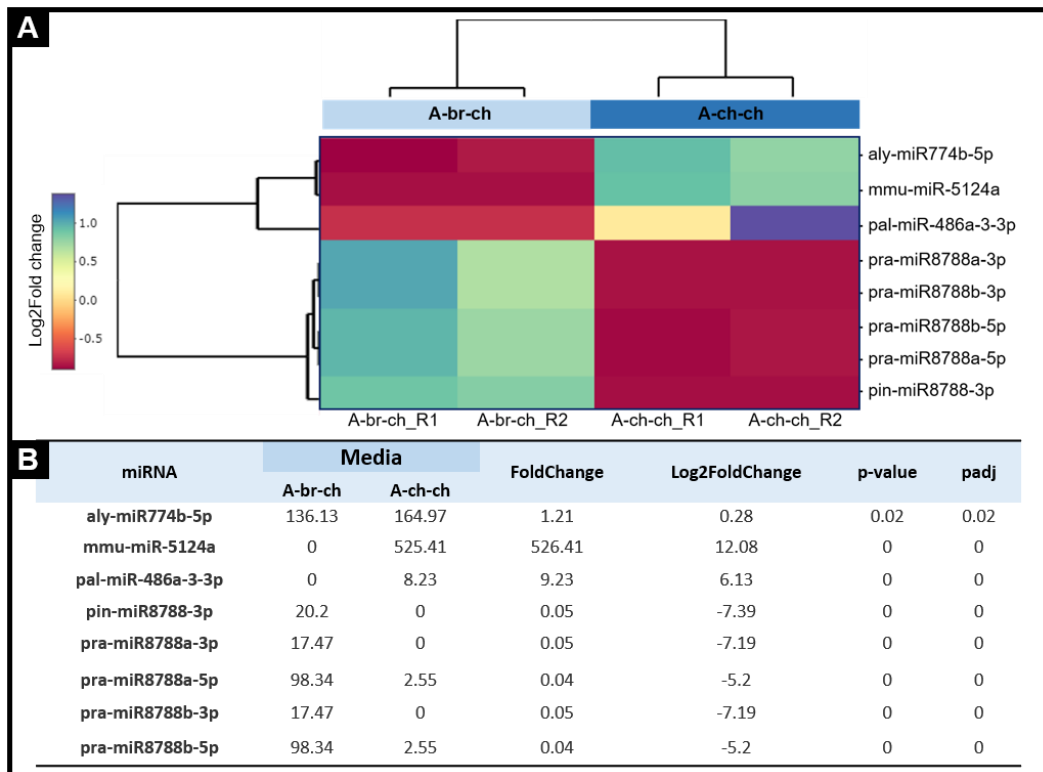


Figura 27. miRNAs diferencialmente expresados anotados en miRBase v22. **A:** Heatmap de miRNAs diferencialmente expresados en A-ch-ch y A-br-ch. **B:** Estadísticos de miRNAs diferencialmente expresados en A-br-ch.

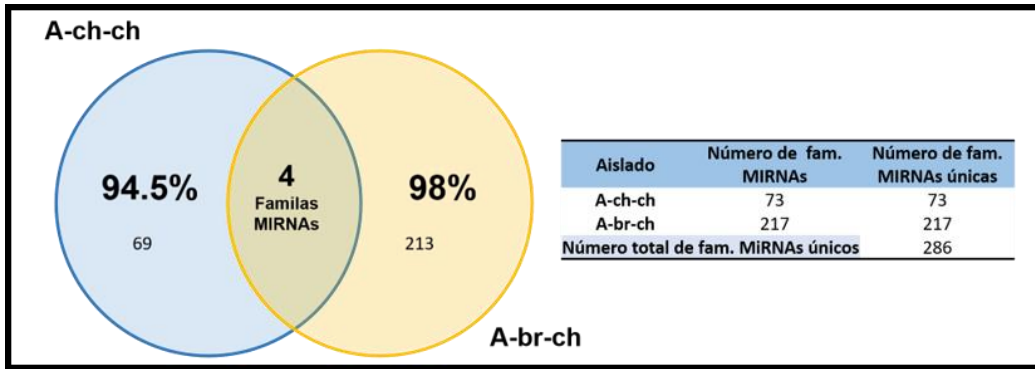


Figura 28. Diagrama de Venn miRNAs identificados *de novo* y familias de genes MIR únicos y compartidos entre A-ch-ch y A-br-ch.

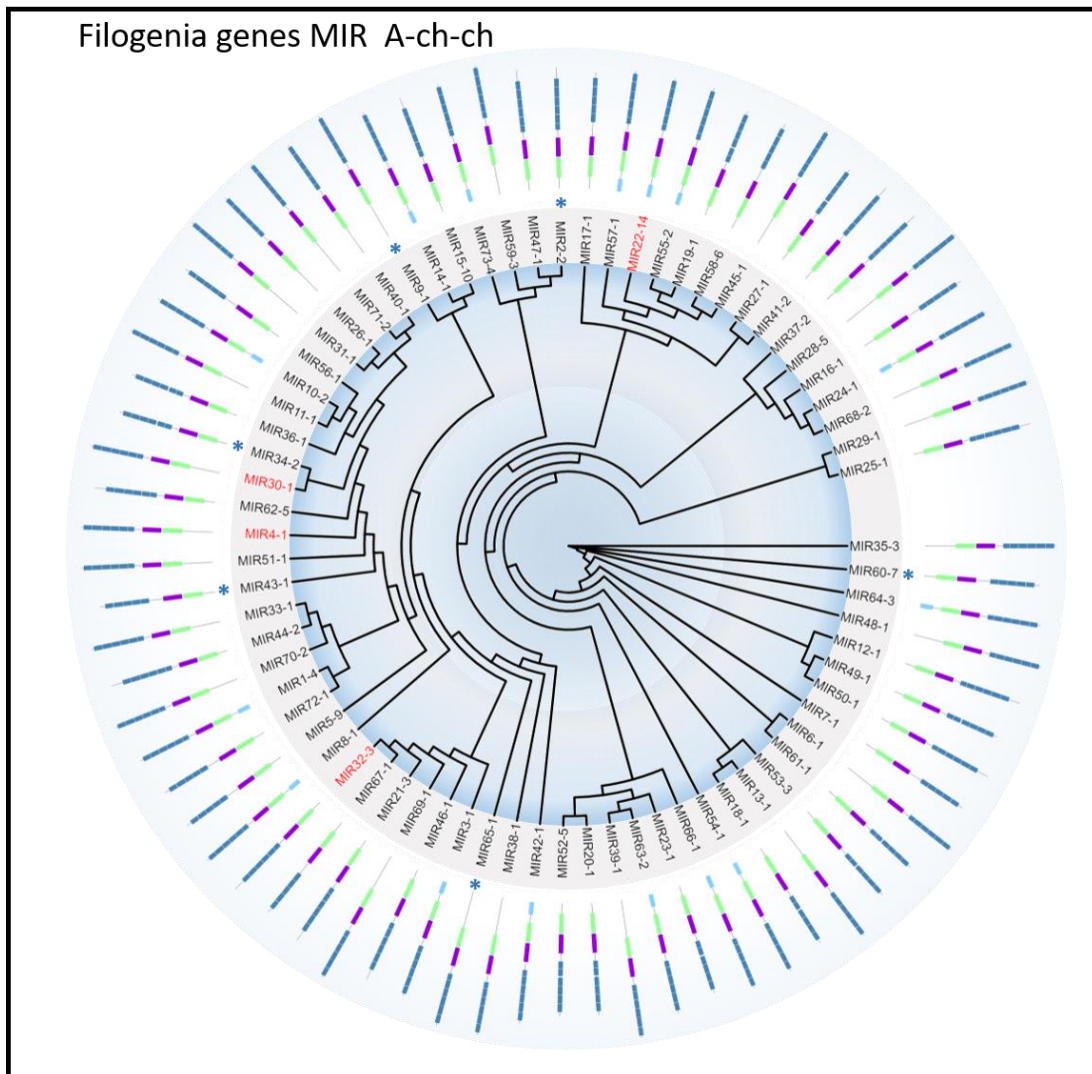


Figura 29. Relaciones filogenéticas de familias de genes MIR en A-ch-ch, reconstrucción filogenética con máxima verosimilitud usando el modelo de sustitución K80, bootstrapping: 100 iteraciones. MIR (color rojo): compartido con MIR de A-br-ch. *identificación de potencial gen target, las líneas y bloques después del nombre de la familia MIR representa los motivos conservados.

Enseguida, se identificaron 155 potenciales miRNAs *de novo* en A-ch-ch, y 288 potenciales en A-br-ch, cuyas características se muestran en los ANEXOS 23 y 24. Sugiriendo mayor actividad regulatoria en A-br-ch mediado por potenciales miRNAs aún no descritos en la literatura.

Posteriormente, los potenciales miRNAs *de novo* fueron clasificados en familias de genes MIR con base al potencial miRNA maduro resultante de la secuencia hairpin, identificando 73 familias de genes MIR en A-ch-ch y 217 familias de genes MIR en A-br-ch, mostrado en la figura 28. Sólo 4 familias de genes MIR fueron compartidas entre los tratamientos, sugiriendo características propias de genes MIR presentes en los tratamientos.

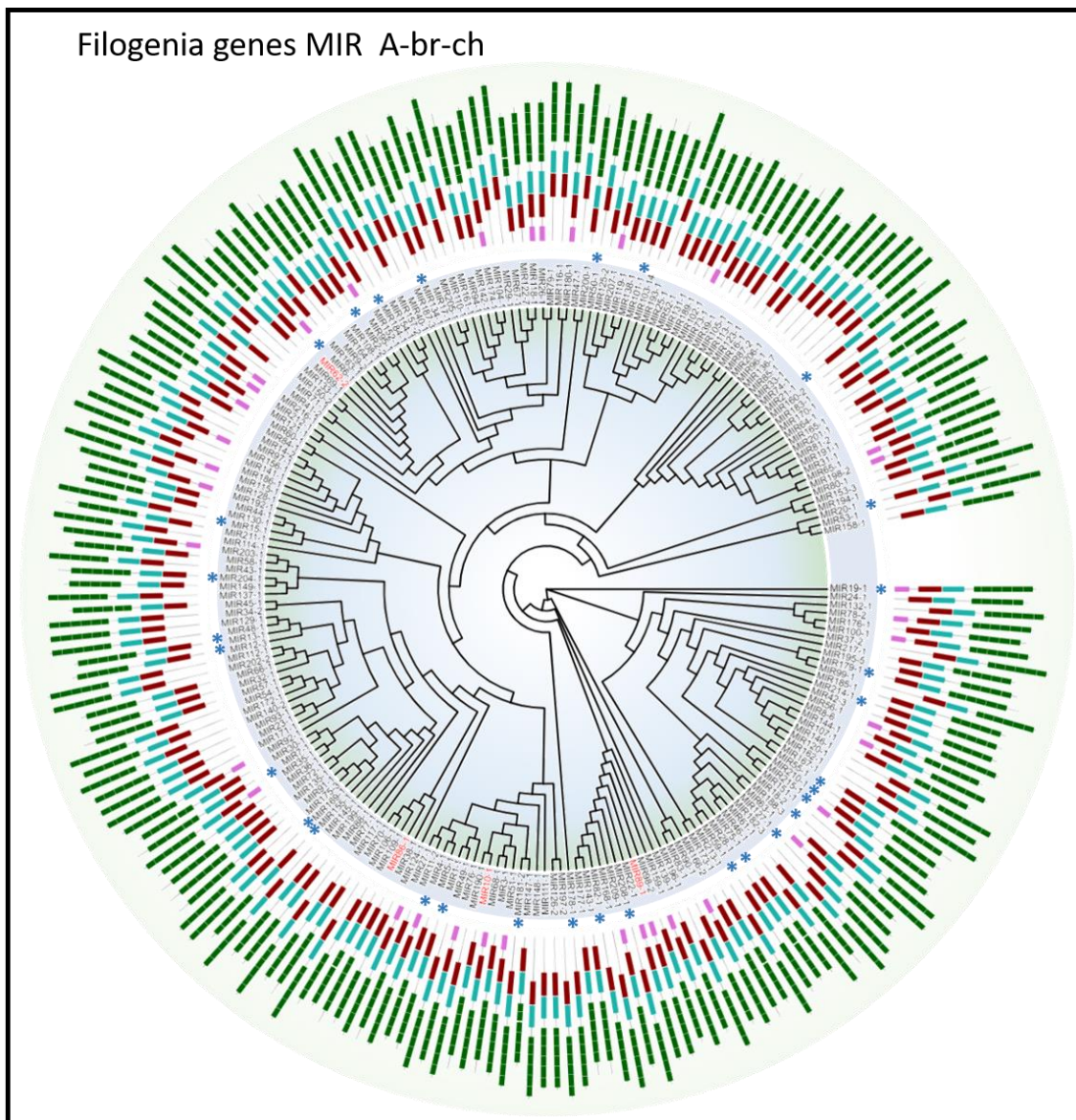


Figura 30. Relaciones filogenéticas de familias de genes MIR en A-br-ch. Reconstrucción filogenética con máxima verosimilitud usando el modelo de sustitución HKY85, bootstrapping: 100 iteraciones. MIR (color rojo): compartido con MIR de A-ch-ch. *identificación de potencial gen target. Las líneas y bloques después del nombre de la familia MIR representa los motivos conservados.

En el análisis de relaciones filogenéticas de las familias de genes MIR (figuras 29 y 30), mostró relaciones de secuencia en cada tratamiento, proponiendo la idea de la presencia de isoformas de miRNAs en *P. capsici*.

Con los programas TAPIR_FASTA, TAPIR_HYBRID y PSROBOT fueron identificados y caracterizados 19 potenciales genes target de los miRNAs *de novo* provenientes de A-ch-ch y 96 potenciales genes target para A-br-ch, mostrado en los ANEXOS 25 y 26, respectivamente. Entonces se construyó un gráfico del top 20 miRNAs *de novo* con mayor nivel de expresión, con predicción de potencial gen target y clasificados por familias de genes MIR en ambos tratamientos (figura 31).

Los potenciales miRNAs de A-ch-ch regulan en mayor nivel el gen que codifica para la ribonucleasa H, en menor nivel genes de receptores Toll, metabolismo de carbohidratos y proteínas quinasas. Por su parte el gen codificante para la proteína aldehído deshidrogenasa estaría siendo regulado por múltiples miRNAs.

En cambio, en A-br-ch los miRNAs *de novo* con mayor nivel de expresión están relacionados con regular genes sobre el control del ciclo celular, procesos de replicación, transcripción y traducción, transporte de vesículas, iones y proteínas de membrana. En general, estos resultados se relacionan con los obtenidos en los sRNAs asociados a genes del oomiceto.

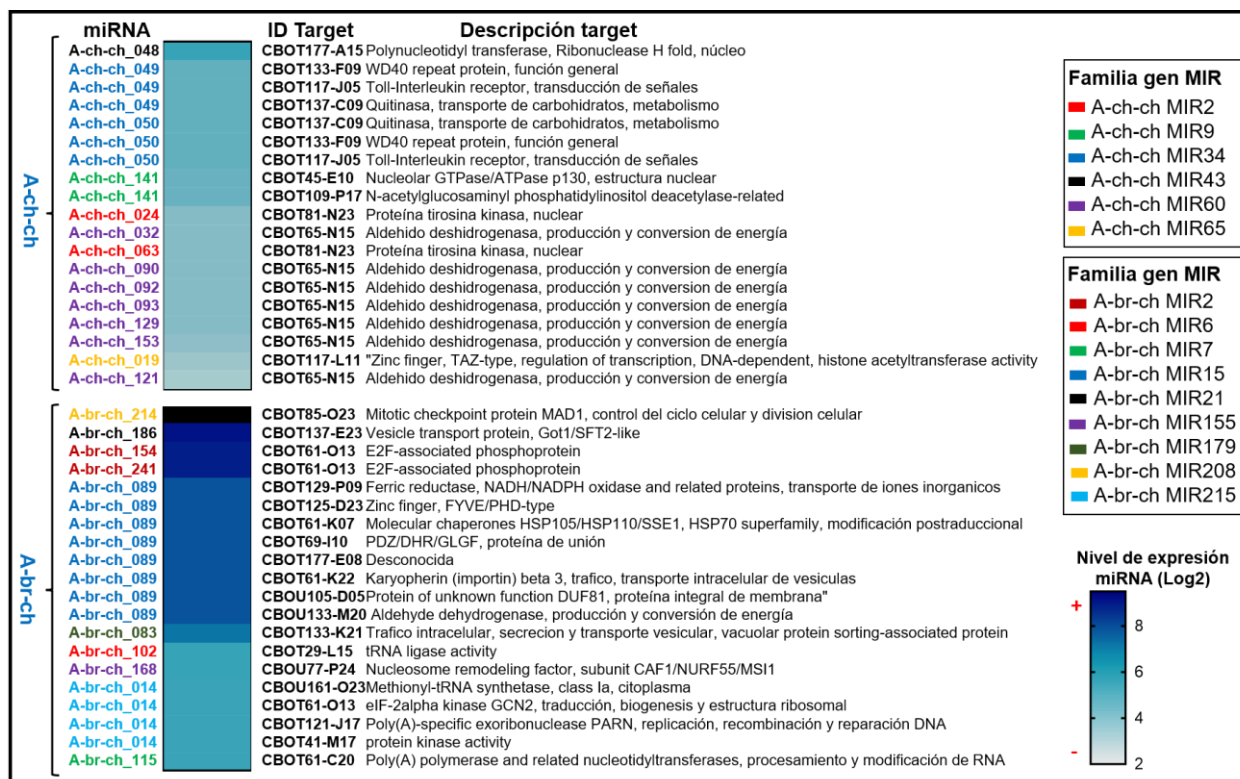


Figura 31. Análisis de expresión de miRNAs *de novo* y sus potenciales genes target, los potenciales miRNAs fueron identificados con miRDeep*, los potenciales genes target con TAPIR_FASTA, TAPIR_HYBRID y PSROBOT.

En los ANEXOS 25 y 26 se muestra que múltiples miRNAs pueden regular la expresión de un mismo gen como es el caso de los miRNAs 32, 90, 92, 93, 121, 129 y 153 de A-ch-ch cuyo potencial gen target es un aldehído deshidrogenasa, que además un miRNA puede regular varios genes como el caso de A-ch-ch_49 cuyos potenciales genes targets son genes que codifican para la proteína WD40, genes de receptores toll-interleukina y quitinasas.

Para tener una idea general sobre los procesos celulares de *P. capsici* que podrían estar siendo regulados por los miRNAs *de novo*, se construyó un modelo grafico predictivo para comparar esquemáticamente los cambios en los perfiles regulatorios entre ambos aislados de *P. capsici* (figura 32), donde se observa mayor regulación endógena de genes en A-br-ch sobre procesos de la duplicación y reparación del DNA, inicio y elongación de la transcripción, ubiquitinación, transducción de señales, síntesis de t-Metionina y ribosomas, biosíntesis de L-phenilalanina, metabolismo y transporte de carbohidratos, metabolismo y transporte de lípidos y genes relacionados con la estructura de microtúbulos.

En cambio, en A-ch-ch sobre algunos procesos de transcripción, traducción de señales y metabolismo de carbohidratos fueron identificados como potenciales genes targets por los miRNAs *de novo*.

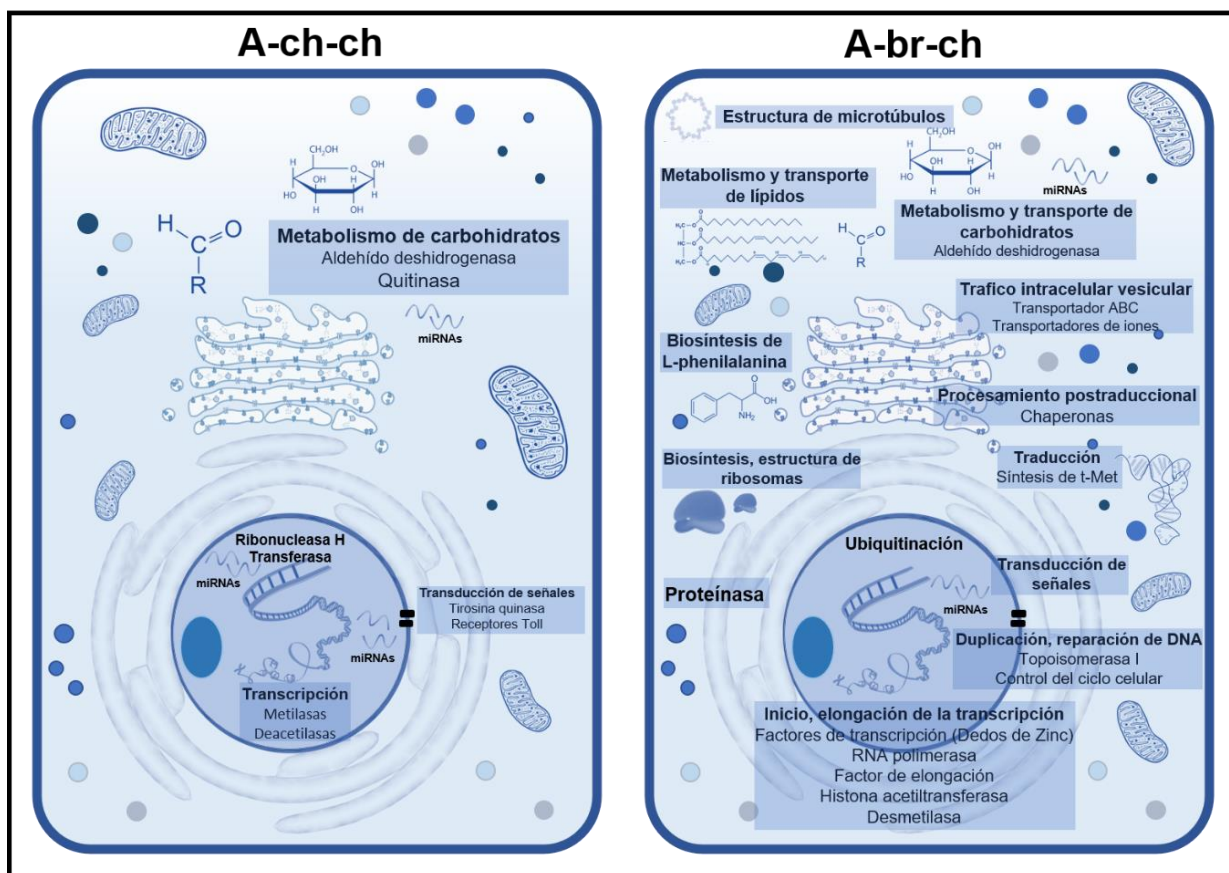


Figura 32. Modelo de perfil regulatorio mediado por potenciales miRNAs en aislados de *P. capsici*.

La caracterización de las poblaciones de sRNAs asociados a genes efectores tipo CRN, elicinas, NLP y RxLR de *P. capsici* (figura 33), mostró dos principales poblaciones sRNAs de 20-21 nt principalmente, asociados a efectores tipo RxLR, CRN, elicinas y NLP. Sin embargo, la población de 24-26 nt se relacionó en su mayoría con genes RxLR. Además, se identificó mayor abundancia de sRNAs asociados a genes efectores en A-br-ch.

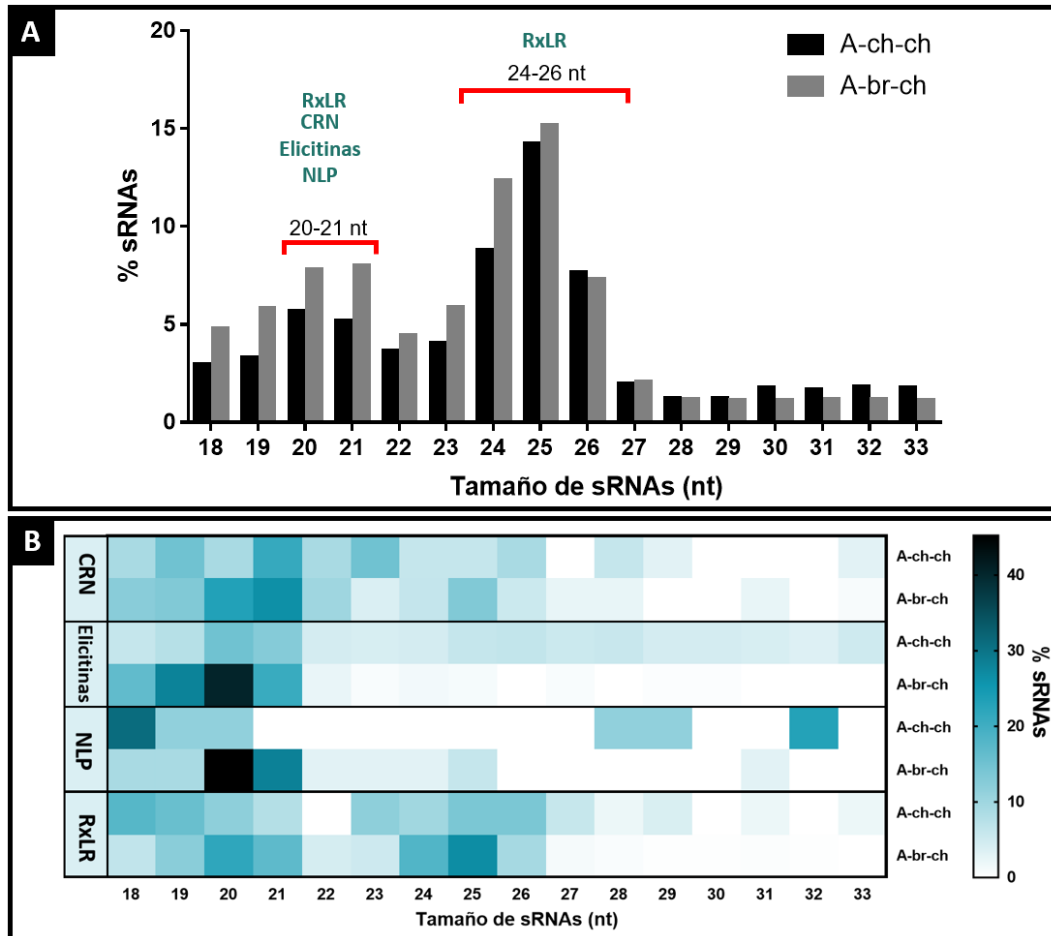


Figura 33. sRNAs asociados a genes efectores de *P. capsici*. **A:** Poblaciones de sRNAs asociados a genes efectores en A-ch-ch y A-br-ch. **B:** Porcentaje de sRNAs asociados a genes efectores tipo CRN, elicinas, NLP y RxLR de *P. capsici* en A-ch-ch y A-br-ch.

Se analizó el nivel de expresión de sRNAs asociados a efectores (figura 34), encontrando diferencias significativas en su expresión entre los tratamientos, ya que en A-br-ch aumentó la abundancia de sRNAs asociados a efectores tipo elicinas, RxLR y algunos CRN, en cambio en A-ch-ch fue mayor la asociación de sRNAs con algunos genes NLP.

Dentro de los miRNAs identificados *de novo* en *P. capsici*, se encontró que los miRNAs A-ch-ch_102 y A-br-ch_214 son isoformas cuyo potencial gen target es un gen efector del tipo RxLR, similar a Avr1b de *P. sojae* (ANEXO 27). Entonces, se caracterizó de manera *in silico* ambos miRNAs *de novo* (figura 35). Se observó en ambas isoformas energía mínima libre de formación del hairpin con valores altamente negativos de -69.90 a -79.50 kcal/mol, respectivamente, sugiriendo alta la probabilidad de formación de la estructura secundaria del pre-miRNA, la secuencia de miRNA y en formato vienna.



Figura 36. Potencial sitio de regulación del gen efector target Avr1b de A-ch-ch_102 y A-br-ch_214 en *P. capsici*.

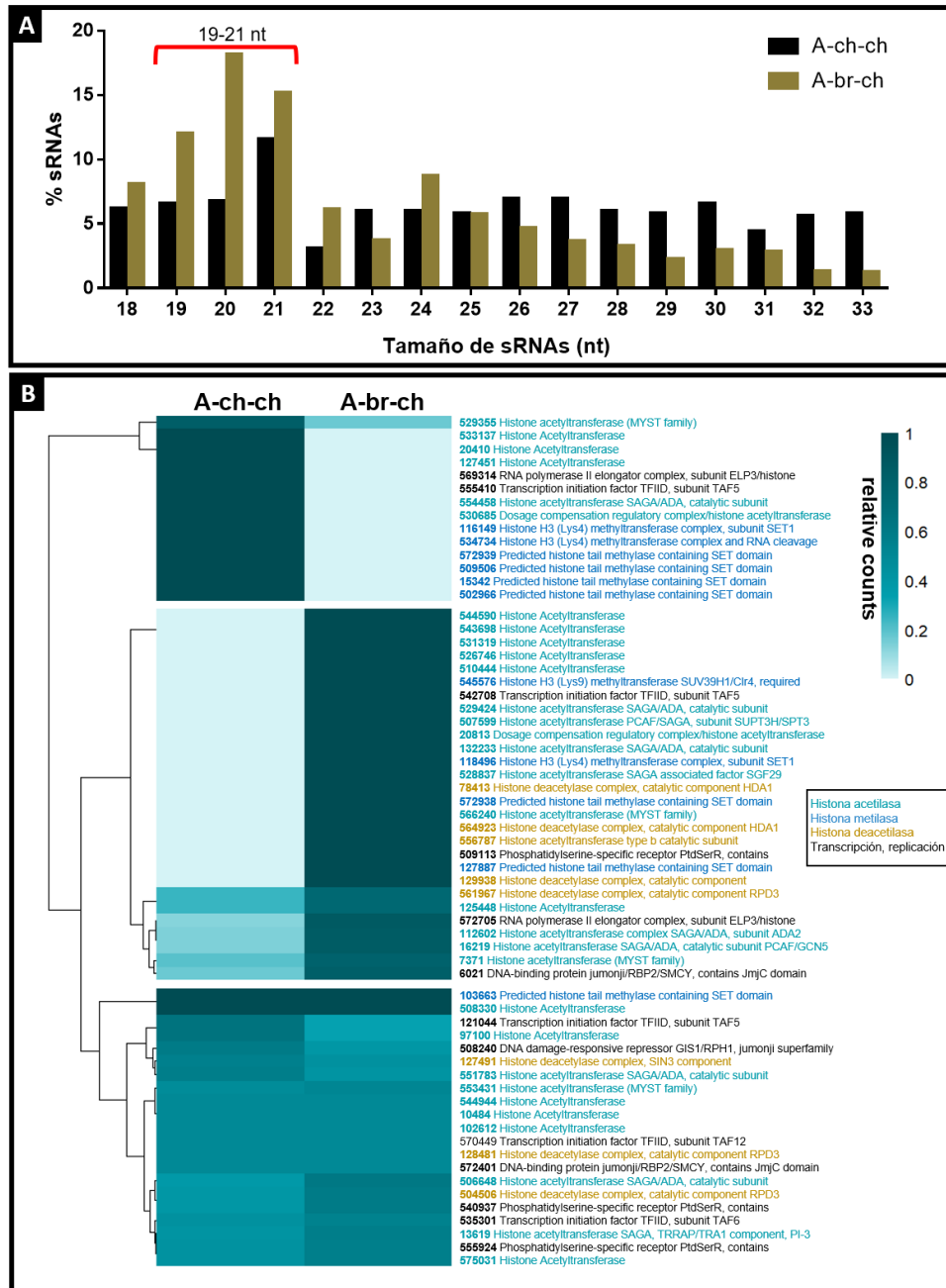


Figura 37. sRNAs asociados a genes modificadores de histonas de *P. capsici*. **A:** Poblaciones de sRNAs de asociados a genes modificadores de histonas y cromatina de *P. capsici*. **B:** Heatmap sRNAs asociados a genes acetil-transferasa, metilasas, deacetilasas de *P. capsici*.

Una vez que fueron caracterizadas las estructuras secundarias de las potenciales isoformas de estos miRNAs se procedió a identificar el sitio de regulación del gen *Avr1b*, encontrando que la actividad regulatoria de ambas isoformas encuentra en la región 3'UTR del gen efector, esto se confirmó con la búsqueda de secuencias UTR's de otros oomicetos. En resumen, estos datos indican que dos isoformas de miRNAs (*A-ch-ch_102* y *A-br-ch_214*) de *P. capsici* podrían regular la expresión del potencial gen efector *Avr1b* de *P. capsici* en la región 3'UTR (figura 36).

También se encontró que las poblaciones de sRNAs con tamaño de 19-21 nt se asocian con genes que codifican factores de transcripción, enzimas acetil-transferasas, metilasas y desmetilasas de histonas, con mayor abundancia en *A-br-ch* comparado con *A-ch-ch* (figura 37). El análisis de expresión comparativo de estos sRNAs asociados a los mismos genes, mostró claras diferencias entre los tratamientos, es decir la mayoría de genes metilasas se encontraron relacionados con *A-ch-ch*, en cambio algunos genes acetil-transferasas, deacetilasas y factores de transcripción fueron mayormente relacionados con *A-br-ch*.

Además, se identificó que el miRNA *de novo* *A-br-ch_65* se asoció con la regulación del gen que codifica para la enzima desmetilasa 509113 de *P. capsici* (ANEXO 26).

En el análisis de abundancia de las poblaciones de sRNAs asociados con regiones de elementos transponibles del genoma del oomiceto, se identificó mayor abundancia de las poblaciones de 24-25 nt de sRNAs asociados con estas regiones en ambos aislados secundarios (figura 38).

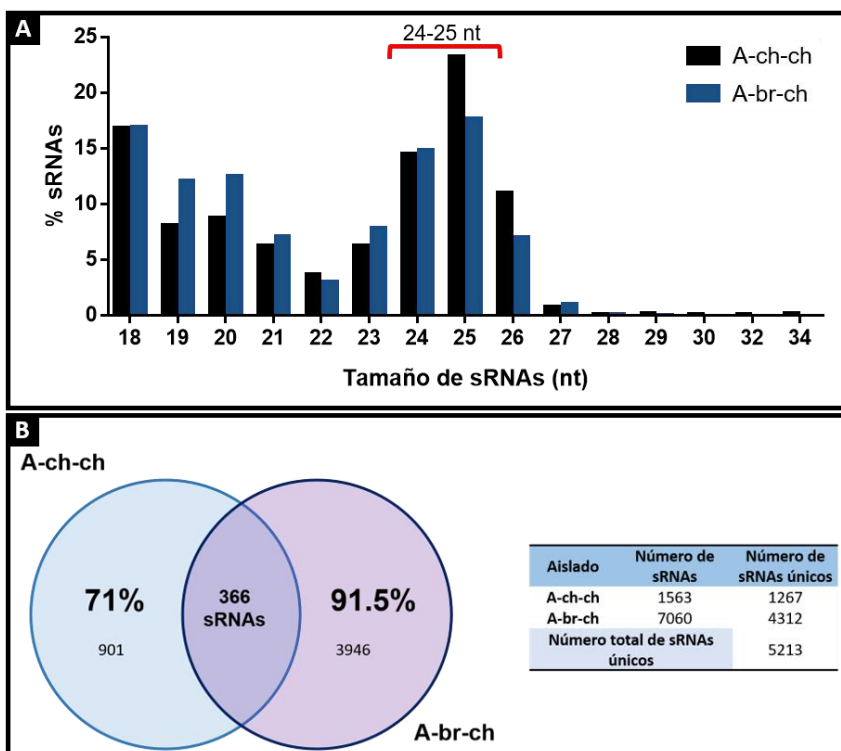


Figura 38. Características de sRNAs asociados a regiones de elementos transponibles en *P. capsici*. **A:** Poblaciones de sRNAs asociados a elementos transponibles en *A-ch-ch* y *A-br-ch*. **B:** Diagrama de Venn sRNAs únicos y compartidos entre *A-ch-ch* y *A-br-ch*.

miRNAs provenientes del patógeno, los cuales pueden ser explicados a través la existencia de reinos cruzados de sRNAs.

5.12.1 Identificación predictiva de reinos cruzados de sRNAs entre *P. capsici* y *Capsicum annuum*

Se identificaron 4 y 3 potenciales miRNAs *de novo* relacionados a *P. capsici* en A-ch-ch y A-br-ch, respectivamente (ANEXOS 31 y 32); hacia los cuales se identificaron potenciales genes target susceptibles a ser regulados de la especie vegetal, generando entonces un modelo grafico predictivo, mostrado en la figura 40.

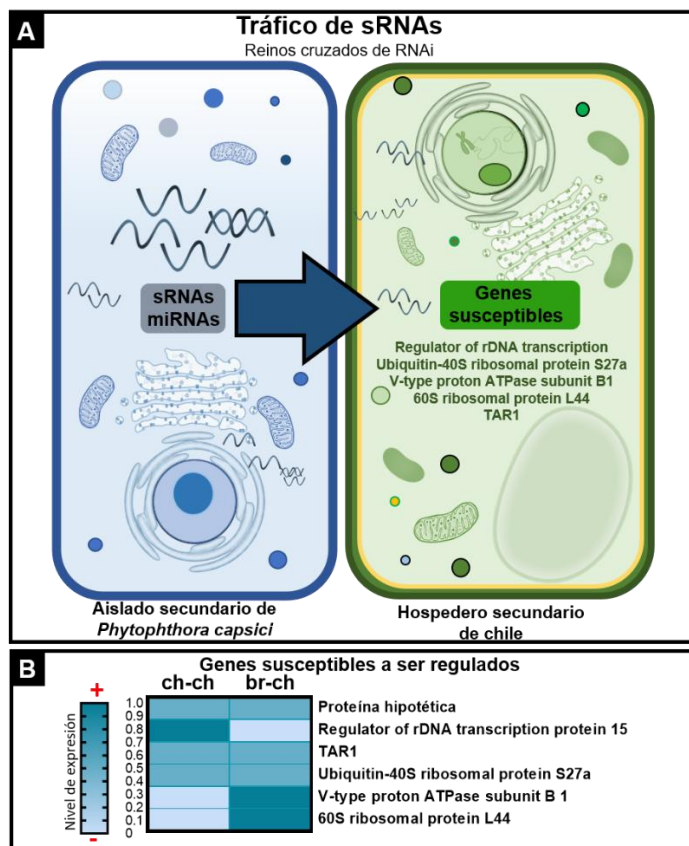


Figura 40. Potenciales sRNAs y miRNAs de *P. capsici* asociados a regular genes susceptibles de *Capsicum annuum*. **A:** Modelo predictivo de potenciales sRNAs y miRNAs de *P. capsici* a regular potenciales genes susceptibles de Chile en A-ch-ch y A-br-ch. **B:** Heatmap potenciales genes susceptibles de Chile a ser regulados por *P. capsici*.

Se identificaron que los probables genes susceptibles de *Capsicum annuum* a ser regulados por sRNAs-miRNAs del oomiceto fueron aquellos relacionados con procesos de transcripción, síntesis de ribosomas, ATPasa, ubiquitinización y TAR1 el cual es un gen involucrado en la estabilidad del mtDNA o en la regulación de la expresión génica mitocondrial a nivel postranscripcional. Estos resultados indican la posible existencia de reinos cruzados de sRNAs, en donde *P. capsici* tiene potenciales miRNAs que podrían regular genes de *Capsicum annuum*.

Se ha descrito en varios patosistemas que la regulación génica entre especies es bidireccional, por lo cual el siguiente análisis consistió en identificar potenciales sRNAs y miRNAs de *C. annuum* con capacidad de regular genes targets del oomiceto en forma de memoria epigenética, ya que los aislados se obtuvieron después del proceso de infección, entonces es probable que la especie vegetal induce cambios en la regulación de la expresión génica en el oomiceto mediante la translocación de algunos de sus potenciales sRNAs-miRNAs al patógeno y estos tienen efecto regulador aún después de la interacción patogénica, generando en el oomiceto una memoria epigenética mediada por RNAs no codificantes inducida por la especie vegetal.

5.12.2 Evidencia de memoria epigenética inducida *C. annuum* var. *annuum* a través del tráfico de miRNAs y sRNAs a *P. capsici*

Denominamos como memoria epigenética mediada por sRNAs-miRNAs al fenómeno en el que RNAs no codificantes de una especie donadora los transloca a la especie receptora durante el proceso de interacción, los cuales tienen efecto regulatorio en la especie receptora aún después de la interacción, como es el caso de los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch de *P. capsici*, los cuales tuvieron interacción patogénica con *Capsicum annuum* para entonces ser recuperados en cajas Petri, evidenciando la memoria epigenética de sRNA-miRNAs inducida por chile en *P. capsici*.

Se identificaron 14,362 sRNAs asociados al genoma de *Capsicum* en A-ch-ch y 108,505 en A-br-ch en las muestras de micelio del microorganismo; los cuales fueron asociados a 130 y 150 diferentes genes del hospedero en A-ch-ch y A-br-ch, respectivamente, mostrado en la figura 41, que describe el modelo predictivo de memoria epigenética en *P. capsici* inducido por la especie vegetal.

Enseguida se caracterizaron las poblaciones de sRNAs asociadas a *Capsicum annuum* (figura 42A), encontrando enriquecimiento de sRNAs de 19- 21 nt, de éstos sRNAs dos conjuntos correspondieron a miRNAs anotados en la base de datos PmiREN 2.0: Vvi-MIRN3354 y Ppe-MIRN2882b en A-ch-ch (figura 42B), cuyas características se describen en el ANEXO 33. Sin embargo, no se identificaron miRNAs en A-br-ch. Posteriormente, se identificaron los genes targets de ambos miRNAs reportados, encontrando que los genes targets para Vvi-MIRN3354 están relacionados con proteínas de resistencia, lo cual sugiere que *Capsicum annuum* podría estar expresando miRNAs en respuesta a la infección de *P. capsici* como posible mecanismo de regulación endógena.

Para confirmar de manera predictiva que los sRNAs son específicos de *Capsicum annuum* se realizaron mapeos con Bowtie con la opción -v que no permite mismatches entre las secuencias contra más de 90 genomas de plantas, encontrando que el genoma con mayor profundidad de conservación fue *Capsicum annuum* entre los genomas de las especies vegetales analizados, mostrado en la figura 43 y en menor porcentaje varias especies de trigo (*Triticum* sp.), reiterando que los sRNAs identificados en ambos aislados provienen de *C. annuum*, disminuyendo la posibilidad de que se trate de potenciales falsos positivos.

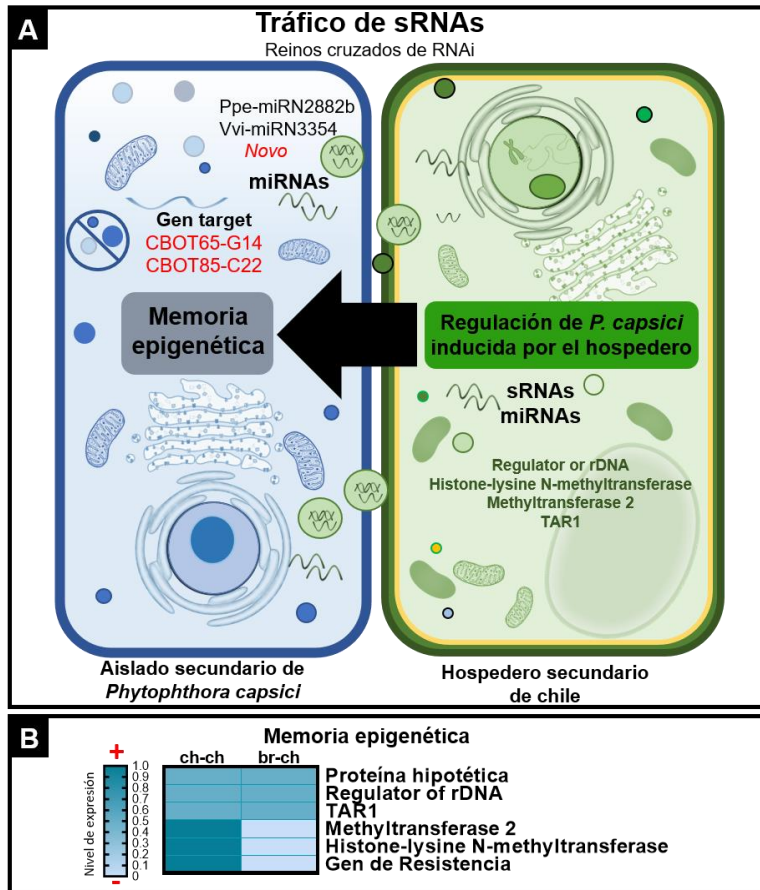


Figura 41. Modelo de memoria epigenética en *P. capsici* inducida por *Capsicum annuum*. **A:** Modelo predictivo de potenciales sRNAs y miRNAs de *Capsicum annuum* a regular potenciales genes susceptibles de *P. capsici* en A-ch-ch y A-br-ch. **B:** Heatmap potenciales genes susceptibles de *P. capsici* a ser regulados por *Capsicum annuum*.

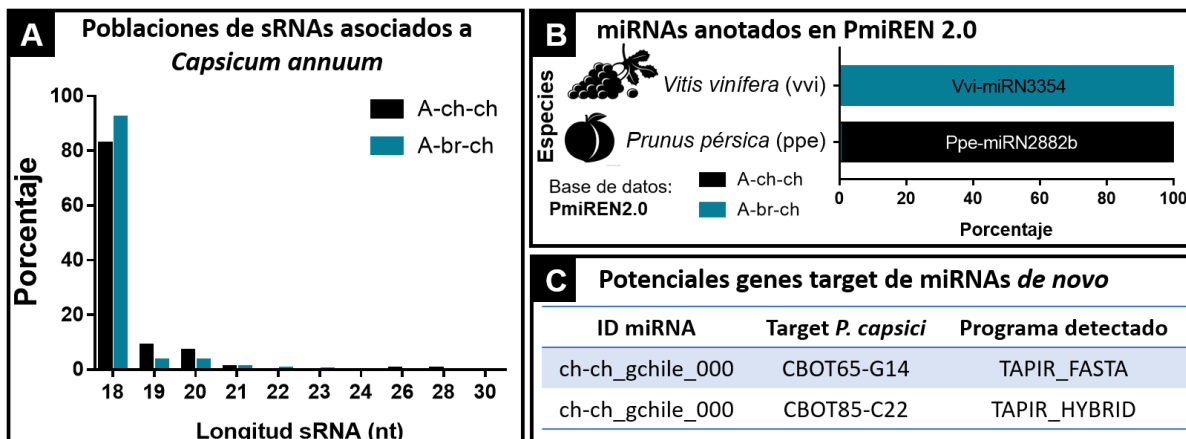


Figura 42. sRNAs y miRNAs asociados a *Capsicum annuum*. **A:** Poblaciones de sRNAs asociados a *Capsicum annuum* en A-ch-ch y A-br-ch. **B:** potenciales miRNAs de *Capsicum annuum* reportados en PmiREN 2.0 de A-ch-ch y A-br-ch. **C:** Potenciales genes target de miRNAs de novo provenientes de *Capsicum annuum* hacia genes de *P. capsici*.

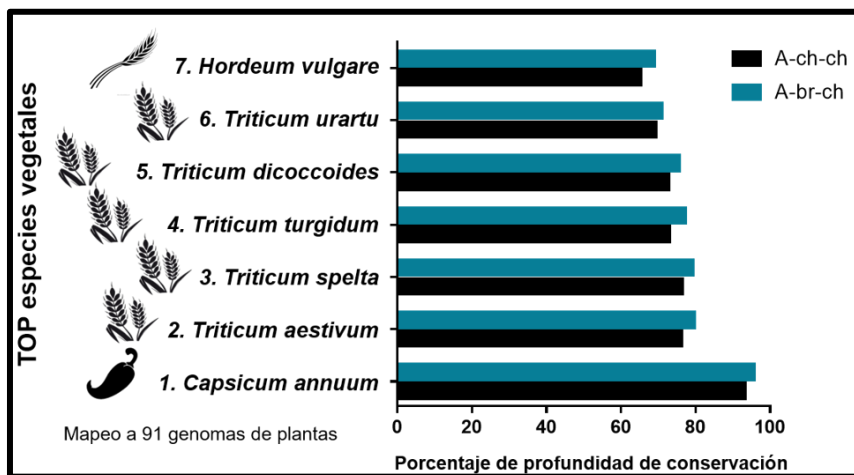


Figura 43. sRNAs asociados a *Capsicum annuum* relacionados con otras especies vegetales.

De los sRNAs asociados al genoma de *Capsicum annuum* de ambos aislados, se identificaron 6 miRNAs *de novo* en A-ch-ch (ANEXO 34), de éstos se identificaron sus potenciales genes targets, encontrando que el miRNA designado como ch-ch_gchile_000 tiene como potencial target de *P. capsici* el gen CBOT65-G14 (508267) involucrado en el tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular, mostrado en la figura 42C y ANEXO 35.

El posterior paso del análisis predictivo consistió en identificar potenciales sRNAs y miRNAs provenientes de la especie vegetal infectada en las infecciones primarias y que por alguna razón se heredaron a través las generaciones en *P. capsici*, en forma de herencia epigenética transgeneracional, los cuales podrían tener un potencial efecto regulatorio en las siguientes generaciones del patógeno.

5.12.3 Evidencia de herencia epigenética transgeneracional mediado por sRNAs inducidos por el hospedero primario en el aislado br-ch de *P. capsici*

Debido a que A-ch-ch fue infectado/recuperado por dos ocasiones en la misma especie vegetal, no fue posible identificar si existen RNAs no codificantes provenientes de la especie hospedera primaria, sin embargo, en A-br-ch se pueden rastrear potenciales RNAs no codificantes de la especie vegetal primaria en el aislado secundario ya que presenta cambio de hospedero.

Para conocer si existen sRNAs que potencialmente se heredan generacionalmente en el oomiceto, se buscaron y filtraron potenciales sRNAs que provengan de *Brassica oleraceae* en A-br-ch, encontrando 865,300 sRNAs asociados a su genoma que descienden de regiones mitocondriales, del gen que codifica para la ubiquitina E3 ligasa y factor de elongación Tu de cloroplasto. Por lo cual se construyó un modelo predictivo de herencia epigenética en *P. capsici* mediado por RNAs no codificantes de la especie vegetal primaria (figura 44).

Estos resultados indican que sRNAs de la especie vegetal primaria probablemente se heredan a través de las generaciones en *P. capsici*, los cuales podrían inducir cambios regulatorios en el oomiceto a través de las generaciones.

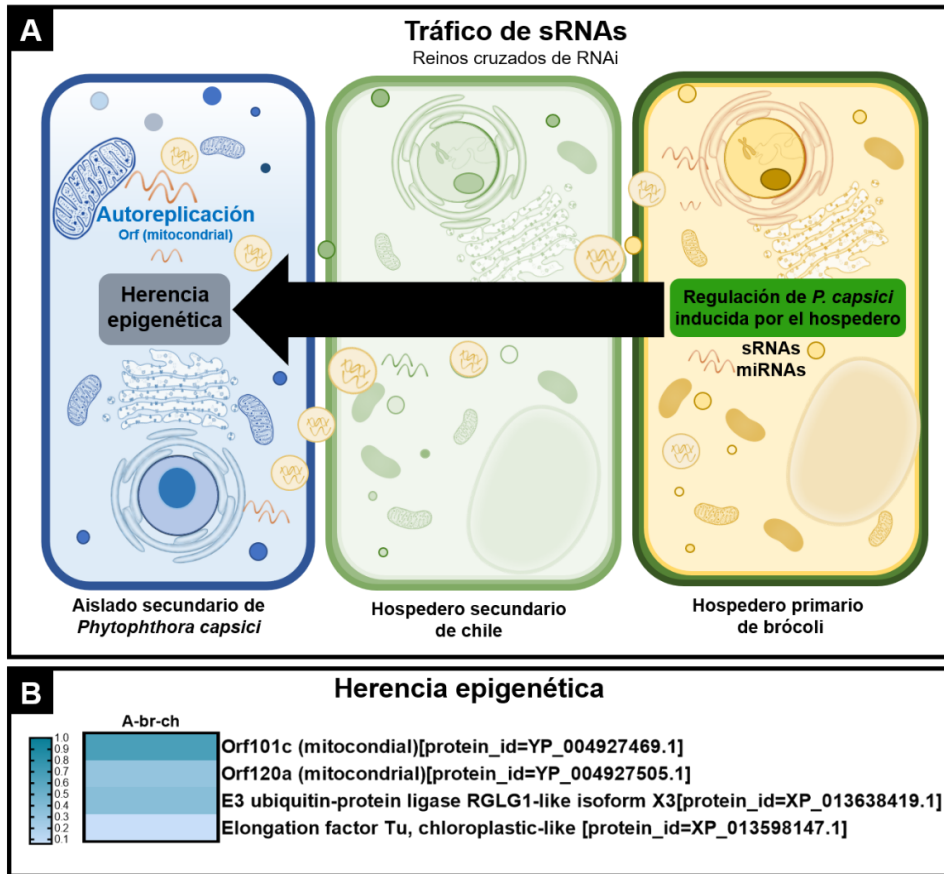


Figura 44. Herencia epigenética en *P. capsici* inducida por el aislado primario. **A:** Modelo predictivo sobre la potencial herencia epigenética mediado por sRNAs y miRNAs de *Brassica oleraceae* hacia *P. capsici* en A-br-ch. **B:** Heatmap de potenciales sRNAs de *Brassica oleraceae* heredados a *P. capsici* en A-br-ch.

Una vez que se identificaron los sRNAs asociados a *Brassica oleraceae* fueron caracterizadas sus poblaciones, encontrando sRNAs mayormente de 18-20 nt (figura 45A). A partir de los sRNAs asociados a *Brassica oleraceae* se identificaron 6 miRNAs reportados en PmiREN 2.0 (ANEXO 36), en donde el miRNA Ghi-miRN1400 de *Gossypium hirsutum* (planta de algodón) mostró el mayor nivel de expresión (figura 45B).

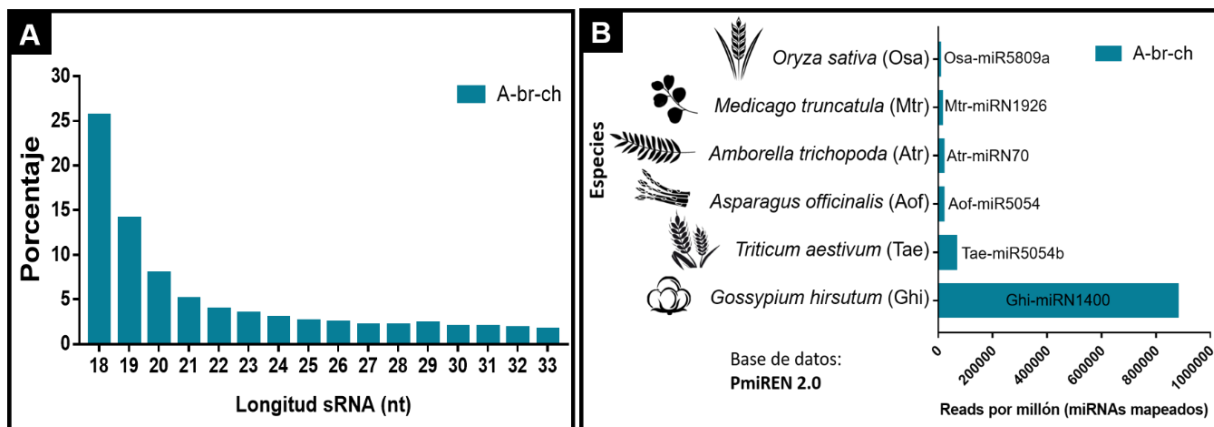


Figura 45. Características de potenciales sRNAs, miRNAs asociados a *Brassica oleraceae*. **A:** Poblaciones de sRNAs asociados a *Brassica oleraceae* en A-br-ch. **B:** Identificación de potenciales miRNAs asociados en *Brassica oleraceae* en PmiREN 2.0 de A-br-ch.

Enseguida, los sRNAs asociados a *Brassica oleraceae* fueron mapeados a 91 genomas de otras especies vegetales, encontrando mayor profundidad de conservación con *Brassica oleraceae* entre los genomas de las especies vegetales (figura 46), y en menor porcentaje con varias especies de trigo (*Triticum sp.*) y *Brassica napus*, reiterando que los sRNAs identificados en A-br-ch provienen de *Brassica oleraceae* y es poco probable que los sRNAs identificados sean de potenciales falsos positivos. En general, estos resultados predictivos siguen la posible herencia epigenética en *P. capsici* inducida por la especie vegetal que infecta el oomiceto en A-br-ch.

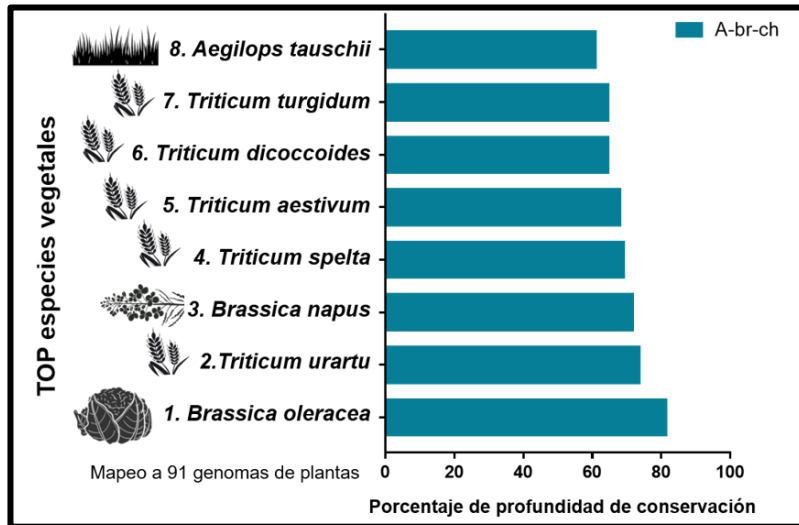


Figura 46. sRNAs asociados a *Brassica oleracea* en A-br-ch relacionados con otras especies vegetales.

Finalmente, se encontró que los sRNAs sin asignación a algún organismo están asociados con bacterias tipo *Pseudomonas pútida* en A-ch-ch y *Apiotrichum porosum* en A-br-ch, dos especies bacterianas patógenas. Es decir, estos resultados indican la posible asociación sinérgica de sRNAs entre *P. capsici* y especies bacterianas después de la interacción patogénica con chile.

5.13 Potencial regulatorio del genoma de *P. capsici* para producir miR8788 reportado en miRBase

Se identificó el loci homólogo del hairpin de miR8788 de *P. sojae*, *P. ramorum* y *P. infestans* en el genoma de *P. capsici* LT1534 (ANEXO 37), con identidad de secuencia promedio mayor al 80%. Enseguida, se identificaron las características de tamaño, locus genómico, energía mínima libre (Kcal/mol), frecuencia de la estructura con energía mínima libre y predicción secundaria del hairpin de pca-MIR8788, mostrado en la figura 47. Se encontró que el homólogo de miR8788 se aloja en el scaffold 14:311723-311846, con alta estabilidad en la formación de estructura secundaria, energía mínima libre negativa de -90.69 kcal/mol y 27.66% de la frecuencia de la estructura con energía mínima libre.

En la figura 47B se muestra la secuencia y estructura secundaria predicha de pca-MIR8788 característica de los pre-miRNAs, formación de loop, alta probabilidad de emparejamiento de bases y formación de ocho burbujas de bases desapareadas. Estos resultados apoyan el análisis predictivo de las bibliotecas de secuenciación, en donde se encontró la expresión del miRNA ortólogo en el oomiceto. Es decir, la familia del MIR8788 presente en *P. infestans*, *P.*

En el ANEXO 38 se muestran los identificadores utilizados para realizar la reconstrucción filogenética de proteínas DCL.

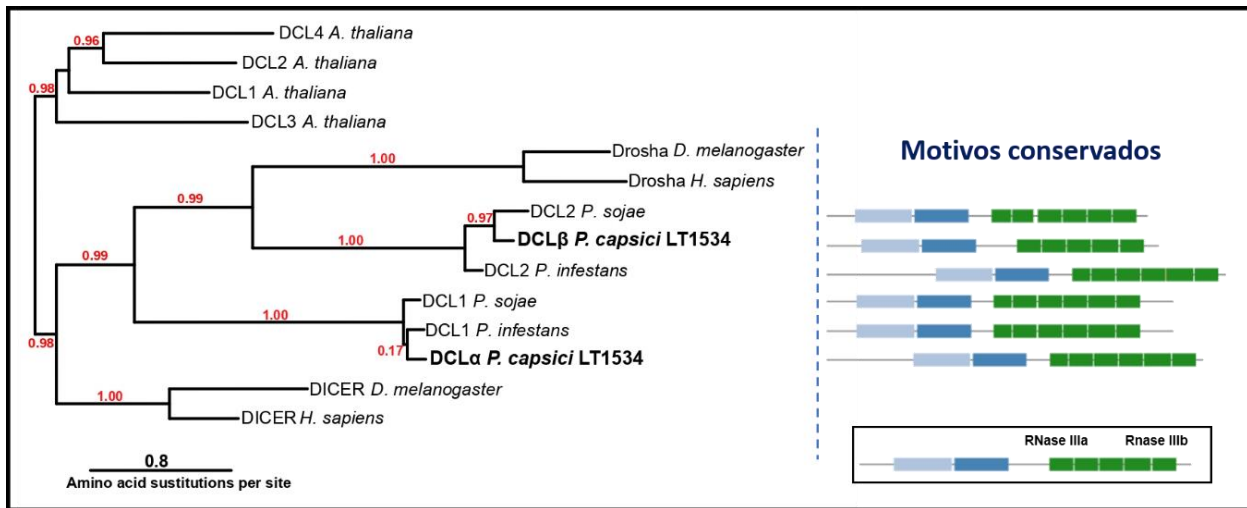


Figura 48. Filogenia de proteínas dicer-like de *Phytophthora capsici* LT1534. Reconstrucción filogenética DCLα y DCLβ de *P. capsici* utilizando los criterios de AIC (Akaike Information Criterion), de máxima verosimilitud-“Maximum Likelihood” (ML) con el modelo de sustitución VT +G+I+F, bootstrap de 100 iteraciones mostrado en el nodo de la rama. Grupo externo: proteínas DCL 1-4 de *A. thaliana*. Los motivos conservados de las proteínas se muestran en la derecha de la filogenia.

5.14.2 Reconstrucción filogenética de proteína exportina 5A

P. capsici tiene una proteína exportina-5 (Exp5A) en su genoma. La reconstrucción filogenética de exportinas 5 homologas de varios oomicetos del género *Phytophthora* identificadas en esta investigación, indicó que Exp5A de *P. capsici* LT1534 se aloja en un clado característico de la especie. Esto se comprobó al identificar una exportina 5A del genoma secuenciado de la cepa 4.1 de *P. capsici* (figura 49).

La topología del árbol mostró mayor relación de Exp5A de *P. capsici* con la exportina 5 de *P. cactorum*, seguida del grupo conformado por *P. parasítica*, *P. nicotianae* y *P. infestans*. Dentro de las exportinas de los oomicetos se observó divergencia entre *P. kernoviae* con el resto de los oomicetos. Fue relativamente larga la longitud de la rama entre los oomicetos y el grupo externo, conformado por exportina 5 de *Mus musculus* y *H. sapiens*, lo que indica características específicas entre las exportinas 5 de mamíferos y el género *Phytophthora*.

En las once especies de oomicetos se encontró una proteína exportina 5 en su genoma, sin embargo, se encontraron dos potenciales exportina 5 en *P. sojae*. Estos resultados son interesantes ya que hasta el momento no se habían descrito homólogos de la exportina 5 en los oomicetos. En el ANEXO 39 se muestran los identificadores utilizados para realizar la reconstrucción filogenética.

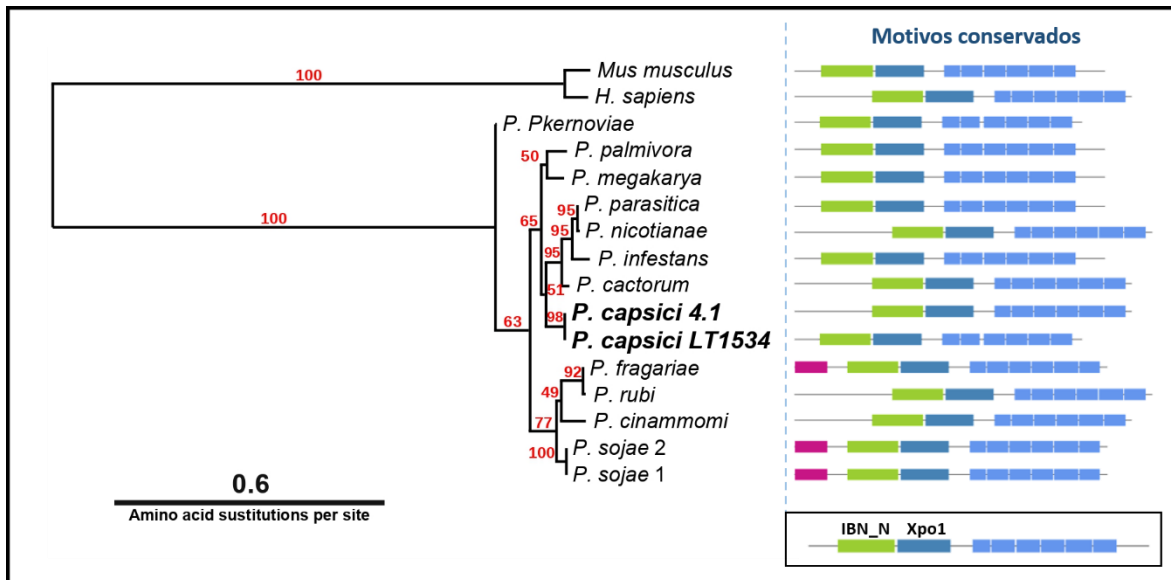


Figura 49. Filogenia de proteínas exportina 5 de *Phytophthora capsici*. Reconstrucción filogenética exportina 5A de *P. capsici* LT1535 y 4.1 utilizando los criterios de AIC (Akaike Information Criterion), de máxima verosimilitud-“Maximum Likelihood” (ML) con el modelo de sustitución Q.plant.mt, bootstrap de 100 iteraciones mostrado en el nodo de la rama. Grupo externo: proteínas exportina 5 de *M. musculus* y *H. sapiens*, los motivos conservados de las proteínas se muestran en la derecha de la filogenia.

5.14.3 Reconstrucción filogenética de proteínas argonautas

Se identificaron seis potenciales genes que codifican proteínas argonautas en el genoma de *P. capsici* LT1534, denominadas AGO-A, AGO-B, AGO-C, AGO-D, AGO-E, AGO-F. La reconstrucción de relaciones filogenéticas de argonautas en oomicetos (figura 50), indicó la separación de dos principales grupos denominados clado I y clado II. En el primero se alojó AGO-A de *P. capsici* LT1534 relacionada mayormente con AGO-1 de *P. infestans*, *P. palmivora* y *P. megakarya*, así como con AGO-2 de *P. infestans*. El clado II se caracterizó por ser diverso y contener el resto de argonautas.

AGO-B y AGO-F se relacionaron con los grupos de AGO-B *P. cinammomi*, AGO-C *P. nicotianae* y AGO-D *P. parasítica*, que a su vez se relacionaron con AGO-3 de *P. infestans*, siendo el subclado con mayor diversidad en la topología del árbol.

AGO-C y AGO-D se encontraron en un clado independiente con cercanía, sospechando que son proteínas parálogas, con la probabilidad que alguna de las dos no se exprese o sea funcional. Ambas proteínas estuvieron mayormente relacionadas con AGO-4 *P. megakarya* y AGO-12 *P. rubi*, mostrando entonces que son proteínas diferentes a nivel de secuencia comparadas con AGO-A, AGO-B y AGO-F de *P. capsici*.

En cambio, AGO-E de *P. capsici* tuvo mayor relación con AGO-5 *P. megakarya*, que a su vez se relacionaron con el clado de AGO-5 *P. infestans* y AGO-2 *P. rubi*. Estos resultados indican variación y relación a nivel de secuencia en las proteínas argonautas en *P. capsici* y otras especies de oomicetos, las cuales presumiblemente podrían tener funciones especializadas sobre diferentes vías de regulación génica mediadas por sRNAs.

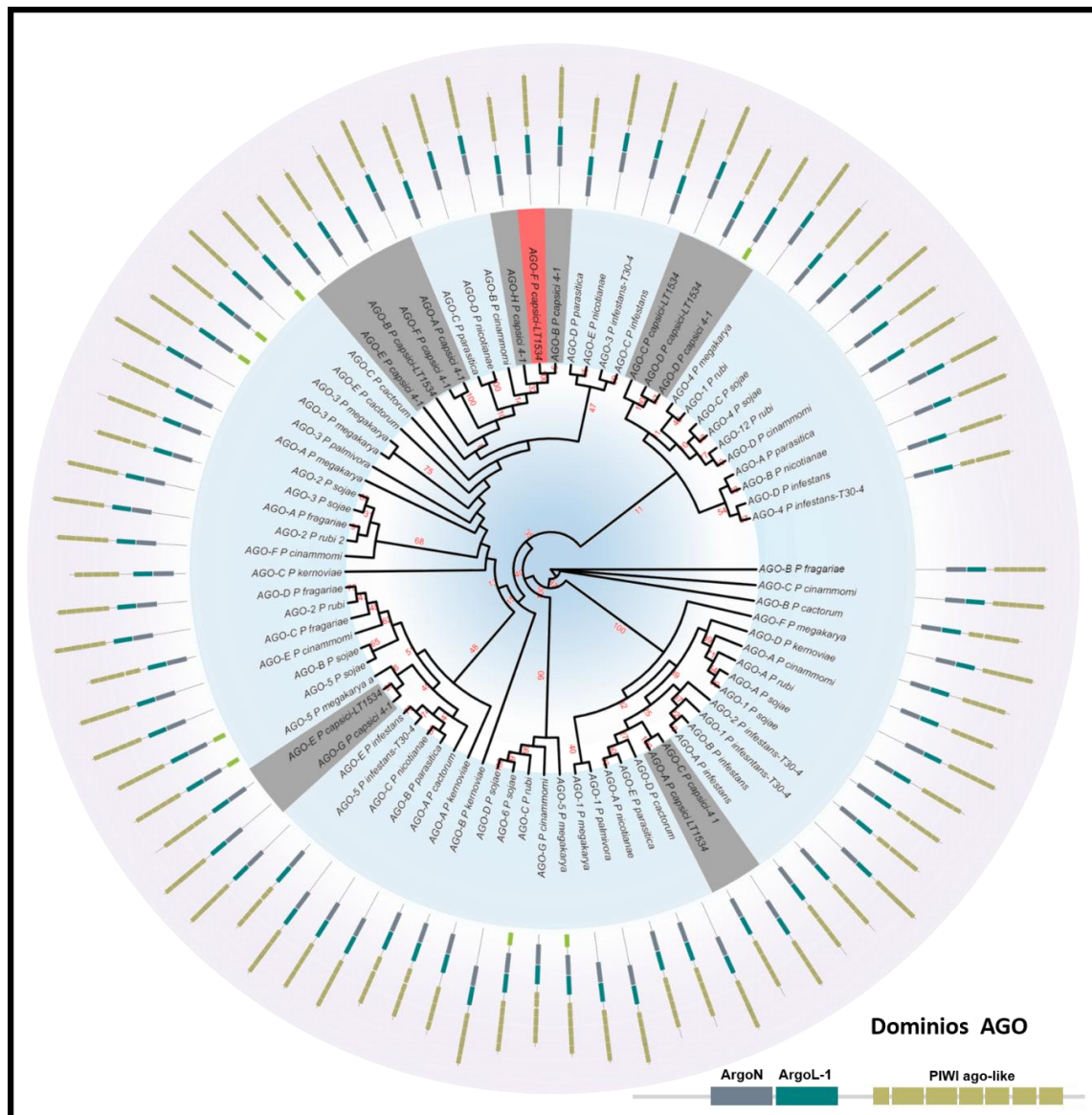


Figura 50. Reconstrucción filogenética de proteínas argonautas de *P. capsici* LT1524 y 4.1 comparada con nueve especies de oomicetos del género *Phytophthora*, utilizando los criterios de AIC (Akaike Information Criterion) de máxima verosimilitud-“Maximum Likelihood” (ML), con el modelo de sustitución LG +G+I, bootstrap de 100 iteraciones mostrado en el nodo de la rama. Los motivos conservados de las proteínas se muestran en la circunferencia mayor de la filogenia, las argonautas de *P. capsici* (A, B, C, D, E, F) están marcadas en color gris. AgoF se muestra en rojo ya que se encuentra en un caldo independiente con respecto a las proteínas argonautas de los oomicetos.

También, se identificaron proteínas argonautas en el genoma de *P. capsici* 4.1 para compararlo con *P. capsici* LT1534 (figura 50). Sin embargo, debido a que el genoma de *P. capsici* 4.1 no se encuentra filtrado es probable que se obtuvieran secuencias redundantes, por ello solo se tomaron como referencia las proteínas argonautas de *P. capsici* LT1534. En el ANEXO 40 se muestran los identificadores utilizados para realizar la reconstrucción filogenética.

5.14.4 Reconstrucción filogenética de proteínas RNA polimerasa dependiente de RNA

En la figura 51 se muestra la reconstrucción filogenética de la proteína RNA polimerasa dependiente de RNA, comparada con nueve RDR de especies *Phytophthora*. RDR de *P. capsici* presentó la mayor divergencia entre los oomicetos al ubicarse en un clado independiente.

La topología del árbol muestra dos subgrupos claramente diferenciables en el resto de las especies patógenas, lo que sugiere alta diversidad en secuencia en la proteína entre los oomicetos. En el genoma de *P. kernoviae* y *P. palmivora* no se identificó algún potencial gen relacionado con RDR, lo que sugiere que en algún momento de su historia evolutiva perdieron esta enzima. Se utilizó como grupo externo RDR-1 de *A. thaliana*, mostrando relativamente altas distancias evolutivas con el grupo de oomicetos. En el ANEXO 41 se muestran los identificadores utilizados para realizar la reconstrucción filogenética.

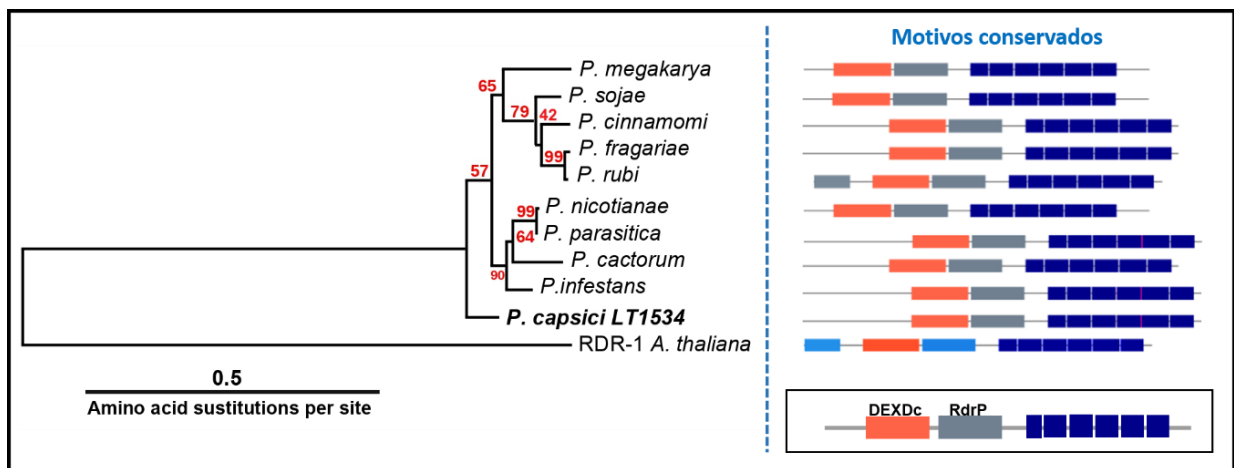


Figura 51. Filogenia de proteína RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR) de *Phytophthora capsici*, utilizando los criterios de AIC (Akaike Information Criterion), de máxima verosimilitud "Maximum Likelihood" (ML) con el modelo de sustitución LG, bootstrap de 100 iteraciones mostrado en el nodo de la rama, grupo externo proteína RDR-1 de *A. thaliana*, los motivos conservados de las proteínas se muestran en la derecha de la filogenia.

5.15 Validación de expresión relativa de genes y miRNAs en *Phytophthora capsici*

Se identificó y analizó la expresión relativa de 21 genes y 2 miRNAs en *P. capsici*, asociados a procesos celulares relacionados con la biogénesis y procesamiento de sRNAs-miRNAs, patogenicidad, procesamiento de elementos transponibles, enzimas modificadoras de histonas, de miR102 que podría estar regulando la expresión del gen de avirulencia Avr1b y miR65 cuyo potencial gen target es la transposasa Tam3 de la familia Ac.

Primero, se identificó evidencia de expresión *in silico* de los genes a partir de transcriptomas de la cepa D3, disponibles en el laboratorio. En el caso de los potenciales miRNAs no fue necesario, ya que su expresión se identificó en el análisis de las bibliotecas de sRNA-seq.

Se obtuvieron las características de dominios conservados de los genes (ANEXO 42), se caracterizó la presencia de exones, intrones, el locus en el genoma del oomiceto y su localización subcelular predicha (ANEXO 43). Entonces, se obtuvieron los oligos específicos para cada gen y miRNA (ANEXO 44).

Después, se evaluó el tamaño de amplificación y especificidad de los oligos diseñados para los genes mediante PCR en punto final a partir de DNA genómico del oomiceto (ANEXO 45) y visualización en gel de agarosa (ANEXO 46). También, se examinó el tamaño de amplificación para los miRNAs A-ch-ch_102 y A-ch-ch_65 (ANEXOS 47 y 48) a partir de cDNA, respectivamente.

Posteriormente, se extrajo RNA total de *P. capsici* (ANEXO 49) y fue retro transcrito, obteniendo cDNA y se estandarizó y validó la amplificación de los oligos mediante curva estándar con DNA genómico a cinco concentraciones y se realizó curva de amplificación del gen endógeno factor de elongación 1 α con cDNA (ANEXO 50).

Enseguida, se identificó la especificidad de amplificación de los oligos mediante curva melt de amplificación de genes y miRNAs analizados por RT-qPCR (ANEXO 51), para entonces obtener los valores de Ct (Cycle threshold) de genes y miRNAs (ANEXO 52) de cuatro tratamientos del oomiceto y el control.

La cuantificación del nivel de expresión relativa de genes y miRNAs se realizó con PCR en tiempo real de micelio aéreo de *P. capsici* expuesto a varios tratamientos. Es decir, muestra de micelio denominada D3 corresponde al oomiceto sin ningún tratamiento cuya cepa forma parte de los recursos biológicos del laboratorio con periodo semejante a 3 años sin infectar especies vegetales, por tal se consideró como control. En los aislados de *P. capsici* recuperados de infecciones primarias realizadas en hojas de chile y brócoli (A-chile, A-brócoli), el aislado obtenido de dos infecciones consecutivas en chile (A-ch-ch) y el aislado obtenido del historial de infectar/recuperación en brócoli, seguido de chile (A-br-ch).

5.15.1 Análisis de expresión relativa de genes asociados a la biogénesis de miRNAs en *P. capsici*

Al analizar la expresión relativa del gen DCL α en las cinco condiciones evaluadas en micelio de *P. capsici* (figura 52A), se encontró el mayor nivel de expresión en D3 (control), el cual fue significativo con respecto a los aislados recuperados de infecciones primarias y secundarias. Sin embargo, A-ch-ch mostró el menor nivel expresión del gen comparado con el resto de aislados. Esto sugiere variación en la síntesis de sRNAs por DCL α en los tratamientos y disminución de regulación de la expresión génica en aislados primarios y secundarios.

En la figura 52B se muestra el nivel de expresión de DCL β en D3 y cuatro tratamientos de *P. capsici*. El patrón de expresión del gen se dividió en tres grupos de acuerdo con los análisis estadísticos de ANOVA, grupo A: D3; grupo B: A-chile, A-ch-ch y grupo C: A-brócoli, A-br-ch. De nuevo, el mayor nivel de expresión del gen se encontró en el control D3 y disminuyó significativamente en los aislados obtenidos de las infecciones primarias y secundarias. Se identificaron diferencias significativas de expresión en DCL β cuando el patógeno es aislado de infecciones primarias de chile y brócoli, en este último su expresión es significativamente mayor que A-chile. Se mostró el mismo nivel de expresión de DCL β en la línea de *P. capsici* recuperado de infección primaria y secundaria de chile, es decir, ya sea que *P. capsici* fuera recuperado de una primera o segunda exposición de infección en chile, el nivel de expresión del gen fue similar.

Al comparar los niveles de expresión del gen DCLβ en los aislados A-chile y A-ch-ch con aquellos obtenidos bajo una influencia de brócoli, es decir los aislados A-brócoli y A-br-ch, se observó que el nivel de expresión del gen fue significativamente menor en el primer par (A-chile y A-ch-ch). Al comparar los perfiles de expresión entre los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch, nuevamente se encontró que el historial de hospederos que *P. capsici* infecta/fue recuperado, conduce a cambios en la expresión del gen, y en A-ch-ch el gen se expresó menos comparado con A-br-ch.

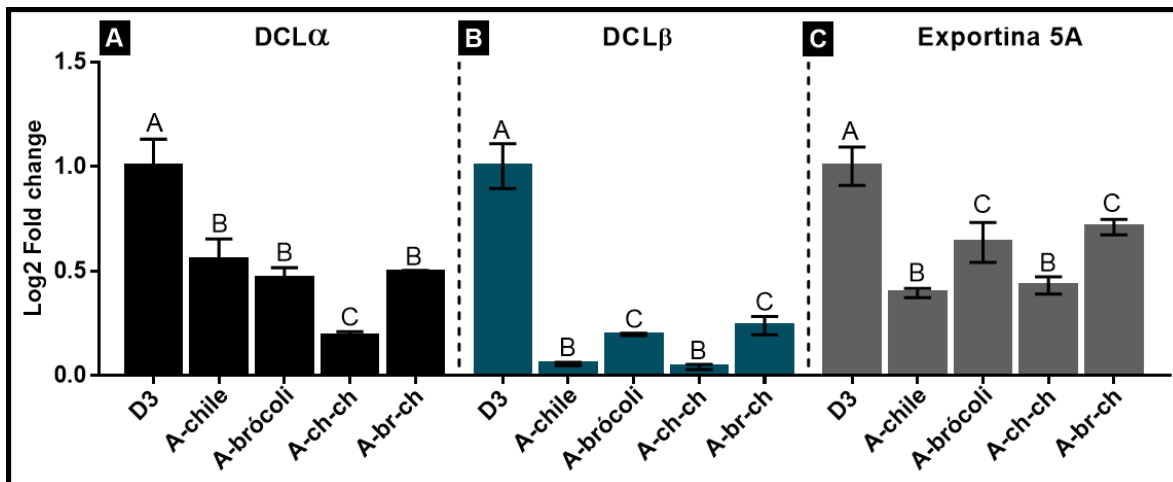


Figura 52. Nivel de expresión relativa de los genes DCLα, Exportina 5A y DCLβ de *P. capsici*. **A:** Nivel de expresión experimental del gen DCLα proveniente de micelio en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch de 8 días de edad. **B:** Nivel de expresión relativa de DCLβ de *P. capsici*. **C:** Nivel de expresión relativa de exportina 5A de *P. capsici*. Las barras de error representan la desviación estándar de lecturas en dos experimentos independientes con tres replicas técnicas. Los grupos A, B y C indican diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$) entre los tratamientos del mismo gen. Se utilizó EF-1α como gen endógeno.

En la figura 52C se muestra el nivel de expresión relativa de la exportina 5A de *P. capsici* en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch. La expresión de Exp5A, exhibió un patrón de expresión similar a DCLβ. Es decir, en D3 (control) la expresión del gen es significativamente mayor ($p < 0.05$) que en los aislados obtenidos de infecciones primarias y secundarias. Al comparar su nivel de expresión entre los aislados primarios obtenidos de chile y brócoli se evidenciaron diferencias significativas ente los tratamientos, en donde se encontró que en A-chile disminuye significativamente su expresión en comparación con A-brócoli. Además, no se observaron diferencias significativas en la expresión del gen cuando el oomiceto fue recuperado de una infección primaria o secundaria de chile.

Al comparar el perfil de expresión de Exp5A entre los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch, se mostró el mismo patrón de expresión que en DCLα y DCLβ. Es decir, disminución significativa de la expresión en A-ch-ch con respecto a A-br-ch. También, se encontró que es similar el nivel de expresión de la exportina 5A cuando el oomiceto es recuperado de una infección de A-brócoli y A-br-ch.

5.15.2 Análisis de la expresión relativa de genes argonautas en *P. capsici*

5.15.2.1 Análisis de la expresión relativa de argonauta A en *P. capsici*

Al analizar el perfil de expresión relativa de la argonauta A (AGO-A) en los aislados de *P. capsici* (figura 53A), se encontró que la enzima se expresa diferente entre los tratamientos. Sin embargo, los cambios no fueron significativos entre la cepa control D3 y los aislados de *P. capsici* obtenidos de infección en A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch. El aislado obtenido de infección en Chile (A-chile) indicó aumento significativo de la misma en comparación al restante de aislados evaluados, lo que sugiere la participación de AGO-A en la regulación epigenética de *P. capsici*.

5.15.2.2 Análisis de la expresión relativa de argonauta B en *P. capsici*

El análisis de expresión relativa de AGO-B (figura 53B) indicó cambios significativos entre los cinco aislamientos evaluados de *P. capsici*, clasificando cada tratamiento en un grupo diferente basado en los análisis de ANOVA.

En los aislados primarios obtenidos de Chile y brócoli fue significativamente menor ($p < 0.05$) la expresión del gen comparado entre el control y ambos tratamientos. En el aislado obtenido de brócoli (A-brócoli) no se evidenció expresión del gen. De manera opuesta, cuando el oomiceto es recuperado de una segunda exposición de Chile (A-ch-ch y A-br-ch) resultó en aumento significativo de la expresión de AGO-B con respecto al control, ya que la expresión del gen en el aislado A-ch-ch fue hasta 3.5 veces mayor que D3. Sin embargo, la expresión en A-br-ch aumentó hasta 33 veces más que el control, con diferencias significativas en la expresión entre los aislados secundarios y primarios, lo que sugiere que la enzima es importante en el proceso de adaptación/aclimatación de *P. capsici* hacia varias especies vegetales.

5.15.2.3 Análisis de la expresión relativa de argonauta D en *P. capsici*

No se identificó evidencia de expresión de AGO-C a partir de cDNA de *P. capsici*. Sin embargo, el análisis de la expresión relativa del gen AGO-D (figura 53C) indicó disminución significativa de la expresión de la enzima en los aislados obtenidos de Chile, ch-ch y br-ch con respecto al control, y sin diferencias significativas entre los aislados antes mencionados.

En el aislado obtenido de infección de brócoli mostró aumento significativo en la expresión del gen comparado con los cuatro aislados contrastados, por lo cual se encontró un patrón de expresión de AGO-D en los aislados analizados, indicando que si el último hospedero del cual se recuperó el oomiceto es Chile, sin importar las ocasiones que lo infectó o el historial de infección en dos generaciones, entonces el nivel de expresión de AGO-D tiende a disminuir significativamente en comparación con el control, y cuando el último hospedero del cual se recuperó es brócoli aumenta significativamente la expresión de AGO-D.

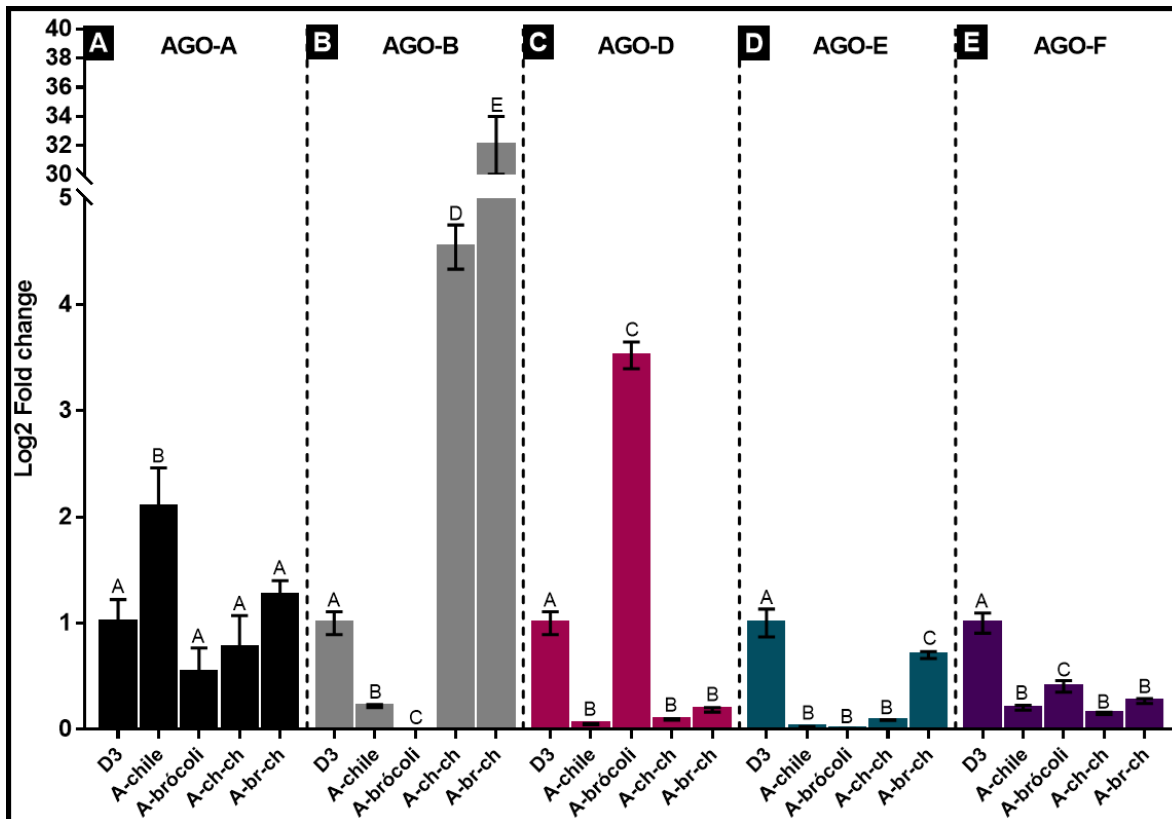


Figura 53. Niveles de expresión de genes argonautas de *P. capsici*. **A:** Nivel de expresión experimental del gen argonauta A (AGO-A) proveniente de micelio en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch de 8 días de edad. **B:** Nivel de expresión relativa de argonauta B (AGO-B) de *P. capsici*. **C:** Nivel de expresión relativa de argonauta D (AGO-D) de *P. capsici*. **D:** Nivel de expresión relativa de argonauta E (AGO-E) de *P. capsici*. **E:** Nivel de expresión relativa de argonauta F (AGO-F) de *P. capsici*. Las barras de error representan la desviación estándar de lecturas en dos experimentos independientes con tres replicas técnicas. Los grupos A, B y C indican diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$) entre los tratamientos del mismo gen. Se utilizó EF-1 α como gen endógeno.

5.15.2.4 Análisis de la expresión relativa de argonauta E en *P. capsici*

En la figura 53D que muestra un gráfico de la expresión relativa de la AGO-E, se encontró que en los aislados obtenidos de infecciones de chile, brócoli y ch-ch de *P. capsici* fue significativamente menor la expresión del gen con respecto a la cepa control D3, sin diferencias significativas entre los tres aislados antes mencionados.

Sin embargo, el nivel de expresión de AGO-E en A-br-ch fue significativamente mayor que los aislados obtenidos a partir de infección en chile, brócoli y ch-ch, pero significativamente menor que el control. Estos resultados, sugieren que el nivel de la enzima disminuye después de que *P. capsici* fue recuperado de una infección primaria o secundaria comparado cuando tiene tiempo prolongado de no infectar alguna especie vegetal.

5.15.2.5 Análisis de la expresión relativa de argonauta F en *P. capsici*

Los resultados de la expresión relativa de la AGO-F (figura 53E) indicaron que disminuye significativamente la expresión del gen ($p < 0.05$) cuando el oomiceto es recuperado de infecciones primarias de chile y brócoli (A-chile, A-brócoli), así como de infecciones secundarias de ch-ch y br-ch (A-ch-ch y A-br-ch) con respecto al control, en donde los aislados

obtenidos de chile, ch-ch y br-ch no mostraron diferencias significativas de la expresión del gen.

Sin embargo, en el aislado obtenido de infección de brócoli aumentó significativamente su expresión con respecto a estos tres últimos, sugiriendo que la enzima es importante para procesos de regulación relacionados con el proceso de adaptación/aclimatación de *P. capsici* a varias especies vegetales. Además, el patrón de expresión fue distinto al resto de las AGO, lo cual es indicativo de funciones especializadas de cada una de las AGO del oomiceto.

5.15.3 Análisis de la expresión relativa de RDR-RNA Polimerasa dependiente de RNA en *P. capsici*

En la figura 54 se muestra la gráfica que representa la expresión relativa del gen RDR, el cual no mostró diferencias significativas en la expresión entre los aislados obtenidos de infecciones en chile, ch-ch y br-ch con respecto al control. Sin embargo, en el aislado obtenido de infectar brócoli se observó aumento significativo en la expresión del gen, sugiriendo de brócoli induce el aumento significativo en la expresión de la enzima.

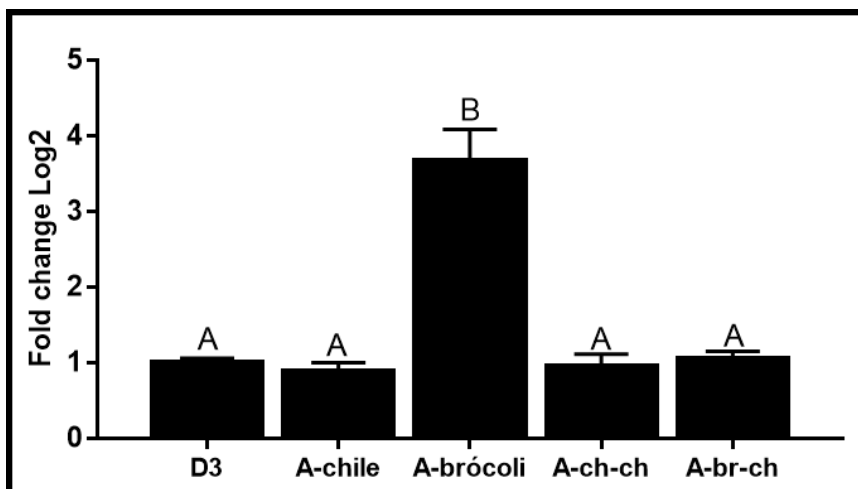


Figura 54. Nivel de expresión relativa del gen RNA polimerasa dependiente de RNA en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch. Las barras de error representan la desviación estándar de lecturas en dos experimentos independientes con tres replicas técnicas. Los grupos A y B indican diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Se utilizó EF-1 α como gen endógeno.

5.15.4 Análisis de expresión de genes asociados a la patogenicidad de *P. capsici*

De acuerdo con los análisis de sRNA-seq, varios sRNAs de A-ch-ch y A-br-ch se asociaron hacia regiones en donde se alojaban diversos genes efectores importantes en *P. capsici* con posible actividad regulatoria, por lo que entonces se analizó el nivel de expresión relativa de genes asociados a la patogenicidad con función específica en cada fase del proceso de infección, los cuales incluyen el gen elicitorina 1, GIP1, efectores tipo RxLR, NLP y CRN. El análisis de expresión génica se realizó también en los aislados obtenidos de infección primaria de chile, brócoli, infección secundaria de ch-ch, br-ch y la cepa D3 de *P. capsici*.

5.15.4.1 Análisis de la expresión relativa de elicitorina 1 en *P. capsici*

La expresión relativa del gen elicitorina 1 de *P. capsici* (figura 55A) indicó disminución significativa en los aislados obtenidos de infecciones de chile, brócoli y ch-ch comparados con

la cepa control D3, sin diferencias significativas entre los tres aislados mencionados. En cambio, el aislado A-br-ch mostró nivel similar de expresión del gen con respecto al control. Lo que sugiere que el patógeno modifica la expresión del gen por la influencia de especie vegetal que infectó, así como del historial infectivo y de aislamiento al que fue sometido.

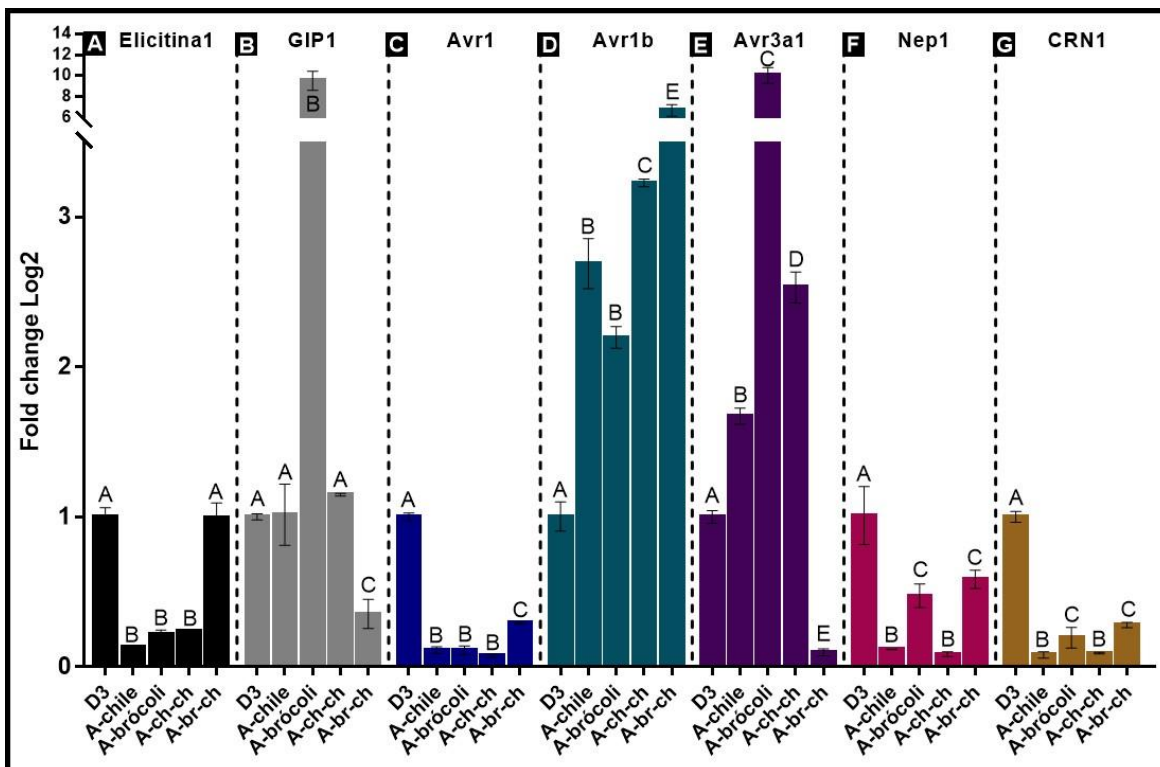


Figura 55. Nivel de expresión de genes efectores de *P. capsici*. **A:** elicítina1. **B:** GIP1. **C:** Avr1. **D:** Avr1b. **E:** Avr3a1. **F:** Nep1. **G:** CRN1. Los genes fueron evaluados en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch. Las barras de error representan la desviación estándar de lecturas en dos experimentos independientes con tres replicas técnicas. Los grupos A, B y C indican diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$) entre los tratamientos del mismo gen. Se utilizó EF-1 α como gen endógeno.

5.15.4.2 Análisis de la expresión relativa de GIP1 en *P. capsici*

En la figura 55B se muestra el nivel de la expresión relativa del gen GIP1, el cual fue similar entre la condición control D3 y cuando *P. capsici* es recuperado de una infección primaria o secundaria de Chile (A-chile, A-ch-ch).

Sin embargo, la expresión de GIP1 tiende a aumentar hasta 9 veces más que el control cuando el oomiceto es recuperado de infectar brócoli, pero disminuyó significativamente ($p < 0.05$) cuando el chromista es aislado de infección en brócoli seguido de Chile (A-br-ch) al compararlo con los aislados evaluados. Lo que sugiere que la especie vegetal brócoli induce cambios en el nivel de expresión de GIP1 en *P. capsici*.

5.15.4.3 Análisis de la expresión relativa de Avr1 en *P. capsici*

En la figura 55C se muestra el nivel de expresión relativa del gen Avr1 de *P. capsici* que indica disminución significativa en los aislados de *P. capsici* obtenidos de infección de Chile, brócoli, ch-ch y br-ch con respecto al control. Sin embargo, en la condición de A-br-ch mostró aumento significativo en la expresión del gen con respecto a los aislados obtenidos de A-chile, A-brócoli

y A-ch-ch, sin diferencias significativas de expresión en los tres últimos. Sugiriendo que los sRNAs asociados a Avr1 podrán inducir el silenciamiento del gen.

5.15.4.4 Análisis de la expresión relativa de Avr1b en *P. capsici*

La expresión relativa de Avr1b en los aislados A-chile, A-brócoli, A-ch-ch, A-br-ch y el control D3 de *P. capsici* (figura 55D) exhibió aumento significativo en la expresión sobre los tratamientos evaluados (A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch) con respecto al control, con diferencias significativas entre los aislados primarios y secundarios.

Entre los aislados obtenidos de infección primaria de chile y brócoli no se identificaron diferencias significativas en su expresión. Sin embargo, aumentó en los aislados secundarios con respecto a los aislados primarios, ésta también fue significativa entre ellos. Estos resultados sugieren que el hospedero e historial infectivo de *P. capsici* conducen a cambios en la expresión de Avr1b, el cual podría estar influenciado por miR102 ya que se predijo regula la expresión del gen.

5.15.4.5 Análisis de la expresión relativa de Avr3a1 en *P. capsici*

El perfil de expresión del gen Avr3a1 (figura 55E), mostró cambios significativos en la expresión del gen en cada tratamiento, con excepción de A-br-ch. Los aislados restantes mostraron ser significativamente mayor su nivel de expresión al compararlos con el control, siendo el mayor nivel de expresión del gen en A- brócoli del resto de los aislados evaluados. Sugiriendo que el hospedero así como el historial de expresión de los aislados de *P. capsici* inducen la variación de la expresión de Avr3a1 potencialmente mediante sRNAs.

5.15.4.6 Análisis de la expresión relativa de Nep1 en *P. capsici*

En la figura 55F se muestra disminución significativa de la expresión del gen Nep1 en los aislados obtenidos de infecciones primarias A-chile, A-brócoli y aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch con respecto al control, con diferencias significativas entre estos.

El menor nivel de expresión del gen se encontró en A-chile, A-ch-ch, pero aumentó significativamente en A-brócoli, A-br-ch. Estos resultados indican que cambios en el nivel de expresión de sRNAs de las bibliotecas de sRNA-seq de A-ch-ch y A-br-ch asociados a regular la expresión de Nep1 podrían conducir a cambios en el nivel de expresión del gen influenciado por el hospedero e historial infectivo en *P. capsici*.

5.15.4.7 Análisis de la expresión relativa de CRN1 en *P. capsici*

En la figura 55G se identificó que CRN1 disminuye significativamente su expresión en los aislados primarios y secundarios con respecto al control D3, cuyo patrón de expresión fue similar a Nep1. Es decir, disminución en la expresión del gen fue recuperado de infecciones primarias o secundarias de chile (A-chile, A-ch-ch) y aumentó significativamente cuando se obtiene de infectar brócoli y br-ch (A-brócoli, A-br-ch). Sugiriendo entonces que el hospedero e historial de infección/recuperación de *P. capsici* conduce a cambios en la expresión del gen potencialmente a través de sRNAs.

5.15.5 Análisis de expresión de genes asociados a modificaciones de histonas

Los análisis de sRNA-seq arrojaron alta abundancia de sRNAs asociados a genes cuya actividad está relacionada con modificaciones de histonas a través de metilaciones, desmetilaciones y acetilaciones que recientemente fueron descubiertas en el genoma de *P. capsici* de estudios previos del equipo del laboratorio.

Por lo cual, se evaluó el nivel de expresión de tres potenciales desmetilasas (HdM-1, HdM-2 y HdM-3) y una metilasa de histona (H metilasa 1) en los aislados A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch, usando como control la cepa D3.

5.15.5.1 Análisis de la expresión relativa de HdM-1 6021 en *P. capsici*

En la figura 56A se muestra el nivel de expresión de HdM-1 (6021), en la cual se observó aumento significativo de la expresión del gen en los aislados obtenidos como ultimo hospedero chile con respecto al control. Es decir, en los aislados A-chile, A-ch-ch y A-br-ch. Sin embargo, el aislado obtenido de infección de brócoli (A-brócoli) mostró nivel de expresión de HdM-1 similar al control. Esto sugiere que el hospedero chile induce la expresión de la enzima.

5.15.5.2 Análisis de la expresión relativa de HdM-2 509113 en *P. capsici*

El perfil de expresión de la HdM-2 (ID 509113) (figura 56B) indicó que A-chile obtenido de infección en chile es similar al control. Sin embargo, cuando el oomiceto es recuperado de infección primaria de brócoli (A-brócoli), aumentó significativamente ($p < 0.05$) la expresión del gen.

En cambio, en los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch mostró aumento significativo con respecto al control, sin diferencias significativas entre ambos tratamientos. Esto sugiere que brócoli induce el aumento de la expresión del gen a través de cambios en el nivel de expresión de sRNAs.

5.15.5.3 Análisis de la expresión relativa de HdM-3 572401 en *P. capsici*

En la figura 56C se muestra el patrón de expresión de la HdM-3 de *P. capsici*, el cual mostró aumento significativo en su expresión en los aislados primarios y secundarios con respecto al control D3.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de la HdM-3 entre A-chile y A-brócoli. En cambio, mostró el mayor aumento de expresión del gen cuando es recuperado de dos infecciones consecutivas de chile (A-ch-ch) y disminuyó cuando tiene una previa infección en brócoli seguido de chile (A-br-ch), sugiriendo que la especie vegetal e historial de infección inducen el aumento de la expresión del gen mediados potencialmente por sRNAs.

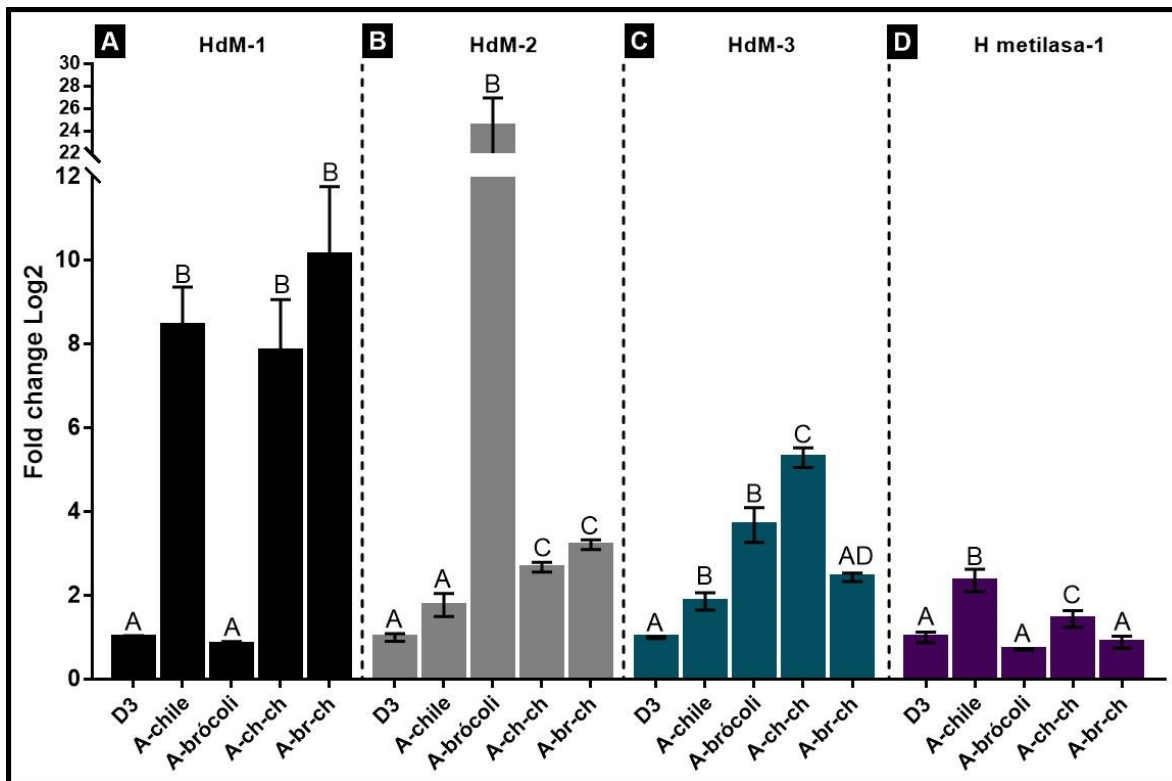


Figura 56. Nivel de expresión de genes modificadores de histonas de *P. capsici*. **A:** Histona desmetilasa 1 (HdM-1). **B:** Histona desmetilasa 2 (HdM-2). **C:** Histona desmetilasa 3 (HdM-3). **D:** Histona metilasa 1 (H metilasa-1). Los genes fueron evaluados en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch. Las barras de error representan la desviación estándar de lecturas en dos experimentos independientes con tres replicas técnicas. Los grupos A, B, C y D indican diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$) entre los tratamientos del mismo gen. Se utilizó EF-1 α como gen endógeno.

5.15.5.4 Análisis de la expresión relativa de histona metilasa-1 118496 en *P. capsici*

En la figura 56D se muestra el patrón de expresión de la enzima H metilasa-1 en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch. Se observaron cambios significativos en la expresión del gen con respecto a la especie vegetal del cual tuvo interacción el oomiceto en su infección primaria. Es decir, en A-chile mostró aumento significativo de su expresión comparado cuando fue recuperado de infección primaria de brócoli (A-brócoli), y éste último fue similar al control.

Cuando el patógeno fue recuperado de dos infecciones consecutivas de chile (A-ch-ch) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el nivel de expresión del gen comparado con A-chile, pero mayor que A-br-ch. Sin embargo, A-br-ch no mostró cambios en el nivel de expresión de la H metilasa-1 con respecto a A-brócoli y D3. Estos resultados indican que el historial del cual *P. capsici* fue aislado contribuye a cambios significativos en la expresión del gen como posible mecanismo de aclimatación/adaptación a diferentes especies vegetales.

5.15.6 Análisis de co-expresión de miR102 y potencial gen target Avr1b

Los análisis predictivos sRNA-seq indicaron la existencia del miRNA *de novo* A-ch-ch_102 (miR102) cuyo potencial gen target es el gen efector Avr1b (ID 567591) en el sitio de escisión de la región 3'UTR, el cual se aloja en el scaffold 25: 689103-689666 del genoma en *P. capsici*.

Se evidenció experimentalmente la expresión del potencial miRNA miR102 en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch mediante RT-qPCR stem loop y se comparó con el nivel de expresión del potencial gen target Avr1b.

En la figura 57 se muestra el nivel de co-expresión relativa entre miR102 y Avr1b de *P. capsici*. Se observó menor nivel de expresión de miR102 en A-chile, A-ch-ch y A-br-ch comparado con D3. El nivel de expresión de Avr1b fue mayor que miR102 en los tres tratamientos, sugiriendo una posible correlación negativa. Además, estos datos indican que la especie vegetal inmediata de la que se recuperó al patógeno, es decir chile, podría estar asociada con disminuir significativamente ($p < 0.05$) el nivel de expresión de miR102.

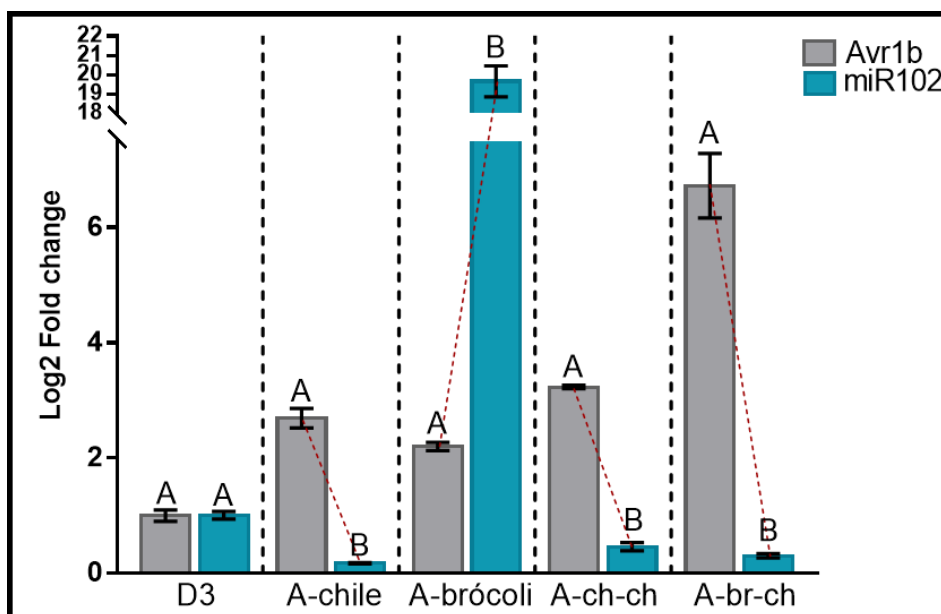


Figura 57. Nivel de expresión relativa de Avr1b y A-ch-ch-102 de *P. capsici* en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch. Las barras de error representan la desviación estándar de lecturas en dos experimentos independientes con tres replicas técnicas. Las líneas punteadas indican la pendiente del promedio en el nivel de expresión entre miR102 y Avr1b. Los grupos A y B indican diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$) entre miR102 y Avr1b en el mismo tratamiento. Se utilizó EF-1 α como gen endógeno.

En cambio, miR102 mostró el mayor nivel de expresión en A-brócoli, sugiriendo que el aislado recuperado de infección primaria de brócoli conduce al aumento de la expresión del potencial miRNA.

Al comparar el nivel de co-expresión de miR102 con el potencial gen target, se observó correlación negativa de co-expresión en todos los tratamientos evaluados. Es decir, cuando es mayor el nivel de expresión de miR102 disminuye significativamente el nivel de Avr1b. En general, estos datos apoyan la posible regulación de la expresión del potencial efector Avr1b por miR102, la cual a su vez podría ser influenciada por las especies vegetales de las cuales se recuperó al oomiceto.

5.15.7 Análisis de co-expresión de miR65 y potencial gen target transposasa Tam3

En el análisis bioinformático de sRNA-seq se predijo la existencia del miRNA *de novo* A-ch-ch_065 (miR65) en *P. capsici* cuyo potencial gen target es la transposasa Tam3 (ID 133604) con posible actividad regulatoria en el exón 1 situado en el scaffold 585:286-2814.

Al ser una enzima asociada con elementos transponibles e importante en la evolución del genoma del oomiceto, se decidió validar el nivel de co-expresión del potencial miRNA miR65 y la transposasa Tam3.

En la figura 58 se muestra el nivel de co-expresión entre miR65 y la transposasa Tam3 en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch. La transposasa Tam3 exhibió altos niveles de expresión en los aislados que tuvieron interacción en alguna ocasión con brócoli (A-brócoli y A-br-ch) con respecto al control.

En cambio, los aislados A-chile y A-ch-ch los cuales provienen de infectar chile, presentaron niveles de expresión similar al control. En los aislados primarios obtenidos de infección en chile y brócoli (A-chile, A-brócoli) se observó diferencia significativa en la expresión de la enzima. En A-brócoli fue hasta 340 veces mayor el nivel de expresión que A-chile, siendo el aislado con mayor nivel de expresión del gen comparado con los tratamientos evaluados.

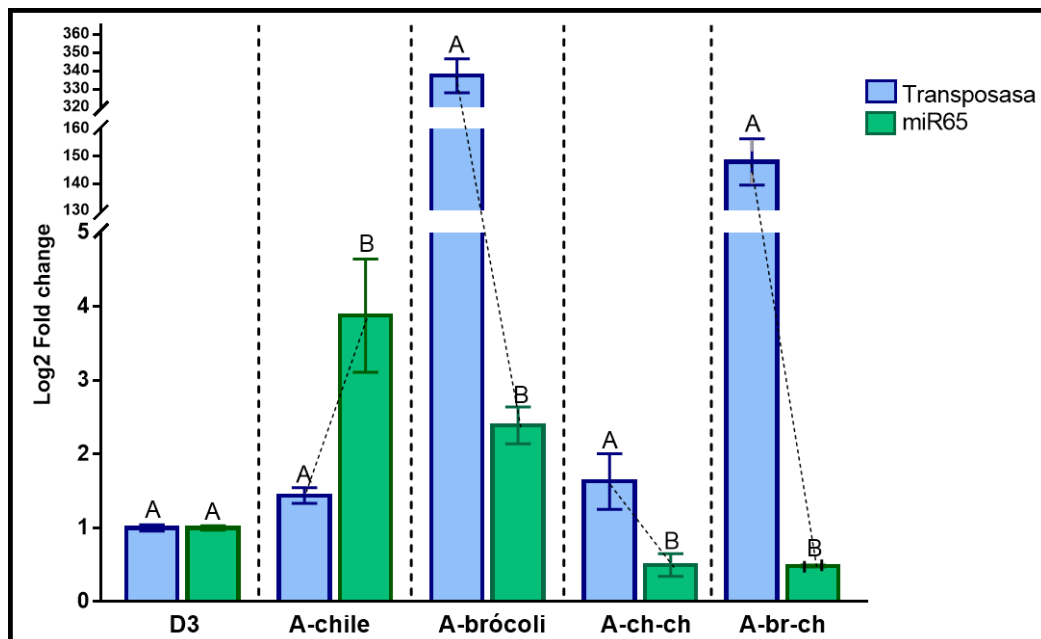


Figura 58. Nivel de co-expresión relativa de A-ch-ch_65 y transposasa Tam3 de *P. capsici* en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch. Las barras de error representan la desviación estándar de lecturas en dos experimentos independientes con tres replicas técnicas. Las líneas punteadas indican la pendiente del promedio en el nivel de expresión entre miR65 y transposasa Tam3. Los grupos A y B indican diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$) entre miR65 y transposasa Tam3 en el mismo tratamiento. Se utilizó EF-1 α como gen endógeno.

Entre los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch también se mostraron diferencias significativas en la expresión del gen TPasa ya que A-br-ch exhibió hasta 150 veces mayor el nivel de expresión del gen con respecto a A-ch-ch pero menos que A-brócoli.

Se logró validar el nivel de expresión experimental del potencial miRNA *de novo* miR65 en *P. capsici*, encontrando que en los aislados primarios fue mayor su nivel de expresión comparado con los aislados secundarios y el control D3. Sin embargo, fue menor en aislados secundarios, sin diferencias entre estos tratamientos.

Al relacionar el nivel de expresión de miR65 con su potencial gen target transposasa Tam3 se encontró el patrón de correlación negativa en todos los aislados. Es decir, en A-brócoli, A-ch-ch, A-br-ch se observó que fue menor el nivel de expresión de miR65 comparado con su potencial gen target, en cambio en A-chile fue mayor el nivel de expresión de miR65 y menor de la transposasa Tam3. Lo que sugiere posible actividad reguladora del potencial miRNA miR65 hacia la transposasa Tam3.

5.15.8 Análisis de co-expresión entre miR102 y miR65 de *P. capsici*

Se comparó el perfil de expresión relativa entre miR102 y miR65 para conocer sus diferencias y similitudes (figura 59), encontrando niveles de expresión opuestos de los potenciales miRNAs en los aislados primarios.

miR102 se expresó significativamente menor en A-chile comparado con miR65. De manera opuesta, miR65 se expresó menos en A-brócoli que miR102, indicando que el perfil de expresión de ambos miRNAs podría depender de su función biológica así como de la especie vegetal de la cual fue recuperado el oomiceto.

En cambio, los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch con diferencias en el historial de especies vegetales por las cuales pasó el oomiceto, no mostraron diferencias significativas en la expresión de ambos miRNAs y su nivel de expresión fue menor que el control. En conjunto, los datos sugieren que los miRNAs miR102 y miR65 responden de manera específica a la condición experimental asociada a la especie vegetal y al historial de especies vegetales por el cual fue recuperado el oomiceto.

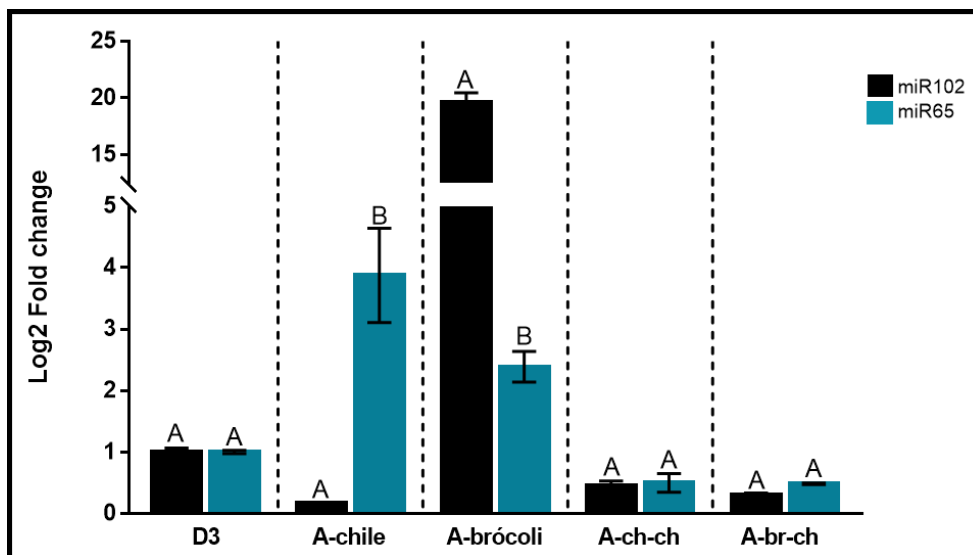


Figura 59. Niveles de expresión de A-ch-ch_102 y A-ch-ch_65 de *P. capsici* en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch. Las barras de error representan la desviación estándar de lecturas en dos experimentos independientes

con tres replicas técnicas. Los grupos A y B indican diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$) entre miR102 y miR65 en el mismo tratamiento. Se utilizó EF-1 α como gen endógeno.

5.15.9 Matriz de correlación de Pearson del perfil de expresión de los genes y miRNAs evaluados por RT-qPCR en *P. capsici*

A partir de los datos de expresión relativa de 21 genes y 2 miRNAs se construyó un perfil global de expresión (ANEXO 53) para identificar similitudes y diferencias. También, se construyó una matriz de correlación de Pearson (figura 60), en la cual se distinguieron correlaciones positivas y negativas entre las variables y su nivel de significancia con análisis ANOVA ($p < 0.05$, 0.01, 0.001). Sólo se consideraron variables correlacionadas aquellas que tuvieron un intervalo de confianza mayor al 95%.

Se encontró que el perfil de expresión de DCL α está correlacionada positivamente con el nivel de expresión de DCL β , AGO-F, Avr1, CRN1. Es decir, cuando aumenta el nivel de expresión de DCL α también amentó la expresión de genes de biogénesis, procesamiento de sRNAs y dos genes efectores. Sin embargo, se encontró correlación negativa con la HdM-3, en otras palabras, cuando aumentó el nivel de expresión de DCL α en los tratamientos evaluados de *P. capsici* tiende a disminuir proporcionalmente el nivel de expresión de la HdM-3.

La expresión de la exportina 5A de *P. capsici* se correlacionó positivamente con el nivel de expresión de DCL β , AGO-E, AGO-F, Avr1, Nep1 y CRN1. Por su parte, el nivel de expresión de DCL β también se correlacionó fuertemente con los genes AGO-F, Avr1, Nep1 y CRN1, poniendo de manifiesto que la biogénesis y procesamiento de sRNAs está directamente relacionada con el nivel de expresión de algunos genes efectores.

La expresión de AGO-A no se correlacionó con la expresión de algún gen. En cambio, AGO-B con la expresión de Avr1b. Por su parte AGO-D se correlacionó positivamente con los genes RDR, GIP1, Avr3a1, HdM-2 y miR102, lo que sugiere que la expresión de genes AGO podría influenciar la expresión de otros genes.

La expresión de la RNA polimerasa dependiente de RNA se correlacionó positivamente con el nivel de expresión de GIP1, Avr3a1, transposasa Tam3, HdM-2 y miR102. Por su parte la AGO-D se correlacionó de manera positiva con el nivel de expresión del gen RDR, GIP1, Avr3a1, HdM-2 y miR102, sugiriendo una posible red de conexiones entre genes de procesamiento de sRNAs, genes efectores, modificadores de histonas y miRNAs en el oomiceto.

AGO-E y AGO-F se correlacionaron positivamente con los genes efectores elicitora1, Avr1, Nep1 y CRN1, indicando una asociación funcional de AGO-E y AGO-F con estos genes efectores.

GIP1 se correlacionó positivamente con el nivel de expresión de Avr3a1, HdM-2 y miR102. En cambio, Avr1 con Nep1, CRN1; Avr3a1 se asoció con el nivel de expresión de HdM-2 y miR102. El nivel de expresión de Nep1 se conectó positivamente con CRN1, sugiriendo una actividad sinérgica entre los genes efectores, modificaciones de histonas para el aumento de la transcripción con el proceso de patogénesis.

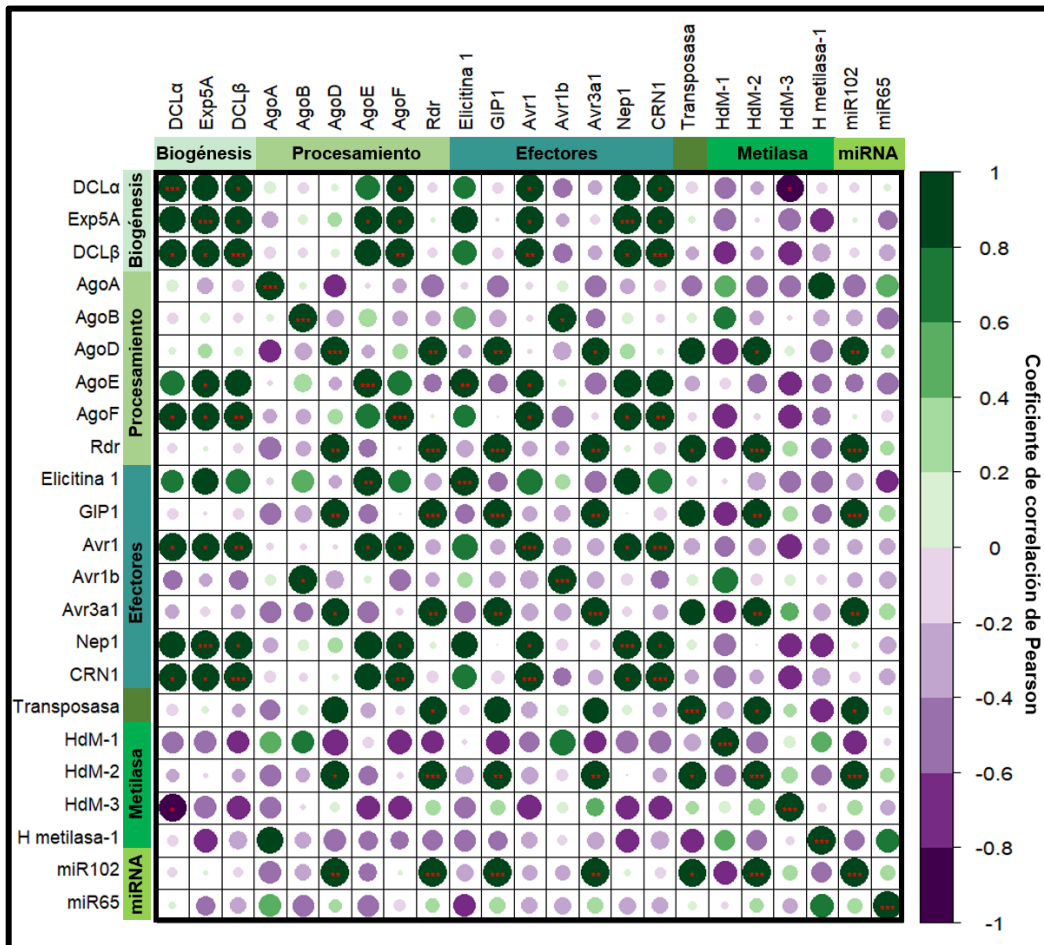


Figura 60. Matriz de correlación de Pearson del perfil de expresión de los genes y miRNAs evaluados por RT-qPCR en *P. capsici*. El color del círculo indica el rango del coeficiente de correlación de Pearson entre las variables, si es positiva o negativa. El tamaño del círculo indica si es alta, mediana o baja la correlación entre las variables, mientras mayor sea el tamaño del círculo, mayor es el coeficiente de correlación ya sea positiva o negativa. *diferencia estadísticamente significativa ANOVA ($p < 0.05$) entre las variables. **diferencia estadísticamente significativa ANOVA ($p < 0.01$) entre las variables. ***diferencia estadísticamente significativa ANOVA ($p < 0.001$) entre las variables.

Por su parte, el nivel de expresión de la transposasa Tam3 se correlacionó positivamente con el nivel de expresión de HdM-2 y miR102, sugiriendo que cuando mayor es la actividad de la transposasa, es proporcional a la desmetilación de histonas mediado por HdM-2 y disminución de la expresión del gen Avr1b mediado por la actividad regulatoria de miR102.

En general, estos resultados indican que el patógeno tiene patrones complejos de expresión que están correlacionados entre los procesos de biogénesis y procesamiento de sRNAs con la actividad regulatoria de miRNAs, las modificaciones de histonas, evolución del genoma basado en la actividad de elementos transponibles, así como la expresión de genes asociados con la patogenicidad.

5.15.10 Análisis de componentes principales del perfil de expresión de genes y miRNAs evaluados por RT-qPCR en *P. capsici*

En la figura 61 se muestra el PCA del perfil de expresión de genes y miRNAs evaluados por RT-qPCR, el cual indicó que la varianza o dispersión de las variables contribuye en mayor o menor medida en los tratamientos al que fue sometido el oomiceto.

El control D3 mostró estar altamente influenciado por el nivel de expresión de los genes DCL α , Exp5A, AGO-E, AGO-F y los genes efectores elicetina1, Avr1, Nep1 y CRN1. La varianza de A-chile y A-ch-ch fue mayormente explicada por el nivel de expresión del gen efector Avr1b y los genes modificadores de histonas denominados HdM-1, HdM-3 e H metilasa-1.

En cambio, la varianza de A-brócoli estuvo principalmente influenciada por la expresión de AGO-D, transposasa Tam3 y miR65, y en el aislado A-br-ch por las argonautas A y B.

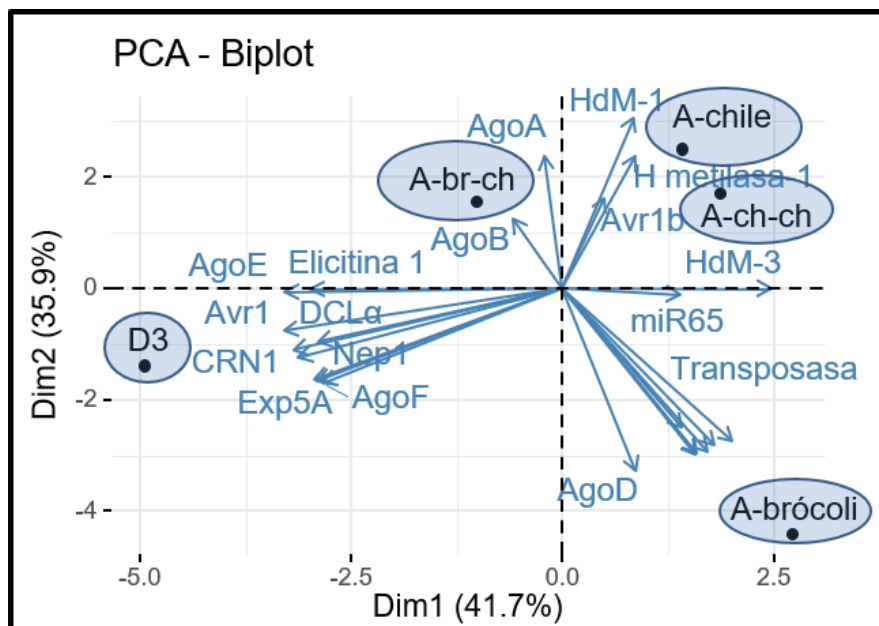


Figura 61. Análisis de componentes principales de perfiles de expresión de genes y miRNAs evaluados por RT-qPCR en cinco aislados de *P. capsici*. Gráfico PCA-Biplot que muestra los principales eigenvalores que contribuyen a la máxima varianza de las variables DCL α , DCL β , Exportina 5A (Exp5A), RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR), Argonauta A (AgoA), Argonauta B (AgoB), Argonauta D (AgoD), Argonauta E (AgoE), Argonauta F (AgoF), Elicetina1, GIP1, Avr1, Avr1b, Avr3a1, Nep1, CRN1, Transposasa Tam3, Histona desmetilasa 1 (HdM-1), Histona desmetilasa 2 (HdM-2), Histona desmetilasa 3 (HdM-3), Histona metilasa 1 (H metilasa-1), miR102 y miR065 en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch de *P. capsici*.

En general, estos resultados indican que se modifica el perfil de genes asociados a la biogénesis y procesamiento de sRNAs-miRNAs, modificadores de histonas, asociados a elementos transponibles y algunos miRNAs cuando el patógeno tiene periodos largos sin infectar alguna especie vegetal y cuando es recuperado de infección primaria de chile, brócoli o alguna combinatoria de las mismas en la siguiente generación.

En el ANEXO 54 se muestran graficas de apoyo al PCA en donde muestran la contribución de las variables sobre los tratamientos evaluados del oomiceto, el porcentaje en que contribuyen los cuatro ejes principales identificados sobre la varianza. También se muestra que el nivel de

expresión de AGO-E fue la variable que más contribuye a explicar la varianza del eje principal uno en el PCA, y que D3 representó el individuo que mayor contribuye a explicar la varianza sobre el eje principal uno.

5.15.11 Clusterización K-means de perfiles de expresión de genes y miRNAs evaluados por RT-qPCR en *P. capsici*

Antes de realizar clustering en los tratamientos del oomiceto se calculó su matriz de distancias euclídeas, mostrada en el ANEXO 55 para identificar si es factible realizar agrupación de los datos. En la figura 62A se muestra el clúster plot que indicó agrupación de los individuos en tres clústers, clúster 1: A-brócoli, clúster 2: A-chile, A-ch-ch y A-br-ch, clúster 3: D3 (control). El clúster 2 indicó mayor similitud en el perfil de expresión de genes y miRNAs evaluados entre los aislados A-chile, A-ch-ch y A-br-ch, diferentes al perfil de expresión entre el control D3 y A-brócoli.

A partir de los valores normalizados de los clústers (figura 62B), se identificó que el clúster D3 presentó el mayor nivel de expresión de genes de biogénesis y transporte de miRNAs, conformado por DCL α , DCL β , Exp5A, argonauta F y efectores inductores de necrosis: Nep1 y CRN1. El clúster A-brócoli y el clúster conformado por los A-chile, A-ch-ch y A-br-ch en general se expresaron en menor medida.

El gráfico también indicó mayor nivel de expresión de los genes AGO-E, elicítina1 y Avr1 en el clúster D3. Expresión intermedia en el clúster conformado por A-chile, A-ch-ch y A-br-ch, en menor medida se expresaron estos genes en el clúster A-brócoli. En cambio, el clúster A-brócoli expresó mayormente AGO-D, relacionada con la vía del RNAi, sin embargo disminuyó en el clúster D3 y el clúster A-chile, A-ch-ch, A-br-ch.

También se observó que el clúster A-brócoli presentó el mayor nivel de expresión de los genes Avr3a1, transposasa Tam3, HdM-2, HdM-3 y miR65, en menor nivel lo exhibió el clúster A-chile, A-ch-ch, A-br-ch y clúster D3. Se encontró que el clúster A-brócoli tiene el mayor nivel de expresión de la RNA polimerasa dependiente de RNA, el gen efector GIP1 y miR102. Por su parte, los clústers D3 y A-chile, A-ch-ch, A-br-ch mostraron el mismo nivel de expresión.

El mayor nivel de expresión de los genes AGO-A, B e H metilasa-1 se encontraron en el clúster A-chile, A-ch-ch, A-br-ch, en menor nivel en el clúster D3, seguido del clúster A-brócoli. Además, los genes Avr1b e HdM-1 se expresaron mayormente en el clúster A-chile, A-ch-ch, A-br-ch y en menor medida en los clúster A-brócoli y D3, lo que podría indicar actividad específica de las argonautas A y B asociadas al hospedero chile así como de la H metilasa 1, HdM-1 y Avr1b.

Los resultados sugieren que los cambios en la patogenicidad, crecimiento, plasticidad fenotípica, expresión de genes relacionados con la biogénesis y procesamiento de sRNAs-miRNAs, genes efectores, transposasa Tam3, genes de metilación y desmetilación de histonas, miR65, miR102 de *P. capsici* están asociados, los cuales están influenciados por la especie vegetal e historial de infección al que fue sometido el oomiceto.

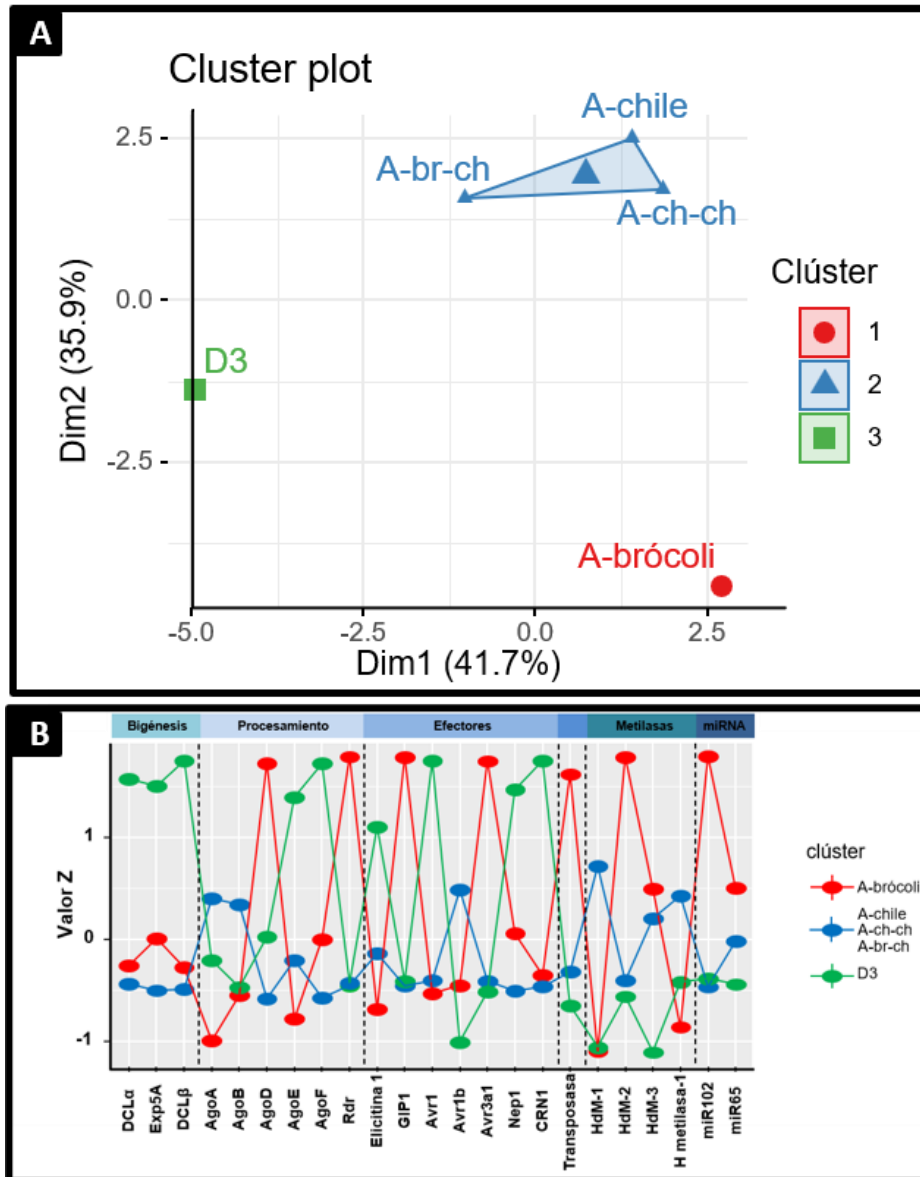


Figura 62. Clusterización K-means de perfiles de expresión de genes evaluados por RT-qPCR en cinco aislados de *P. capsici*. **A:** Agrupación en tres clústers mostrado en clúster plot de las variables DCL α , DCL β , Exportina 5A (Exp5A), RNA polimerasa dependiente de RNA (Rdr), Argonauta A (AgoA), Argonauta B (AgoB), Argonauta D (AgoD), Argonauta E (AgoE), Argonauta F (AgoF), Elicitina1, GIP1, Avr1, Avr1b, Avr3a1, Nep1, CRN1, Transposasa Tam3, Histona desmetilasa 1 (HdM-1), Histona desmetilasa 2 (HdM-2), Histona desmetilasa 3 (HdM-3), Histona metilasa 1 (H metilasa-1), miR102 y miR065 en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch de *P. capsici* en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch. **B:** Modelo gráfico k-means, el color del punto representa el clúster de agrupamiento de D3, A-brócoli y A-chile, A-ch-ch, A-br-ch, representado por los datos normalizados de k-means en valores de z de las variables evaluadas del perfil de expresión relativa de genes y miRNAs en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch de *P. capsici*.

5.15.12 Matriz de correlación entre características de crecimiento, patogenicidad, plasticidad fenotípica, genotípica, regulación génica en D3, A-chile y A-brócoli

En la figura 63 se muestra la matriz de correlación de Pearson de las variables crecimiento, patogenicidad, plasticidad fenotípica, genotípica y regulación mediada por miR102 y miR65 en D3, A-chile y A-brócoli de *P. capsici*.

Se encontró que el crecimiento del oomiceto está altamente correlacionado con el nivel de expresión de los genes DCLβ y AGO-F. Por su parte, el desarrollo de la infección primaria en chile se correlacionó de manera negativa con el nivel de expresión de la exportina 5A y el gen efector Nep1, y positivamente con la expresión del efector Avr1b.

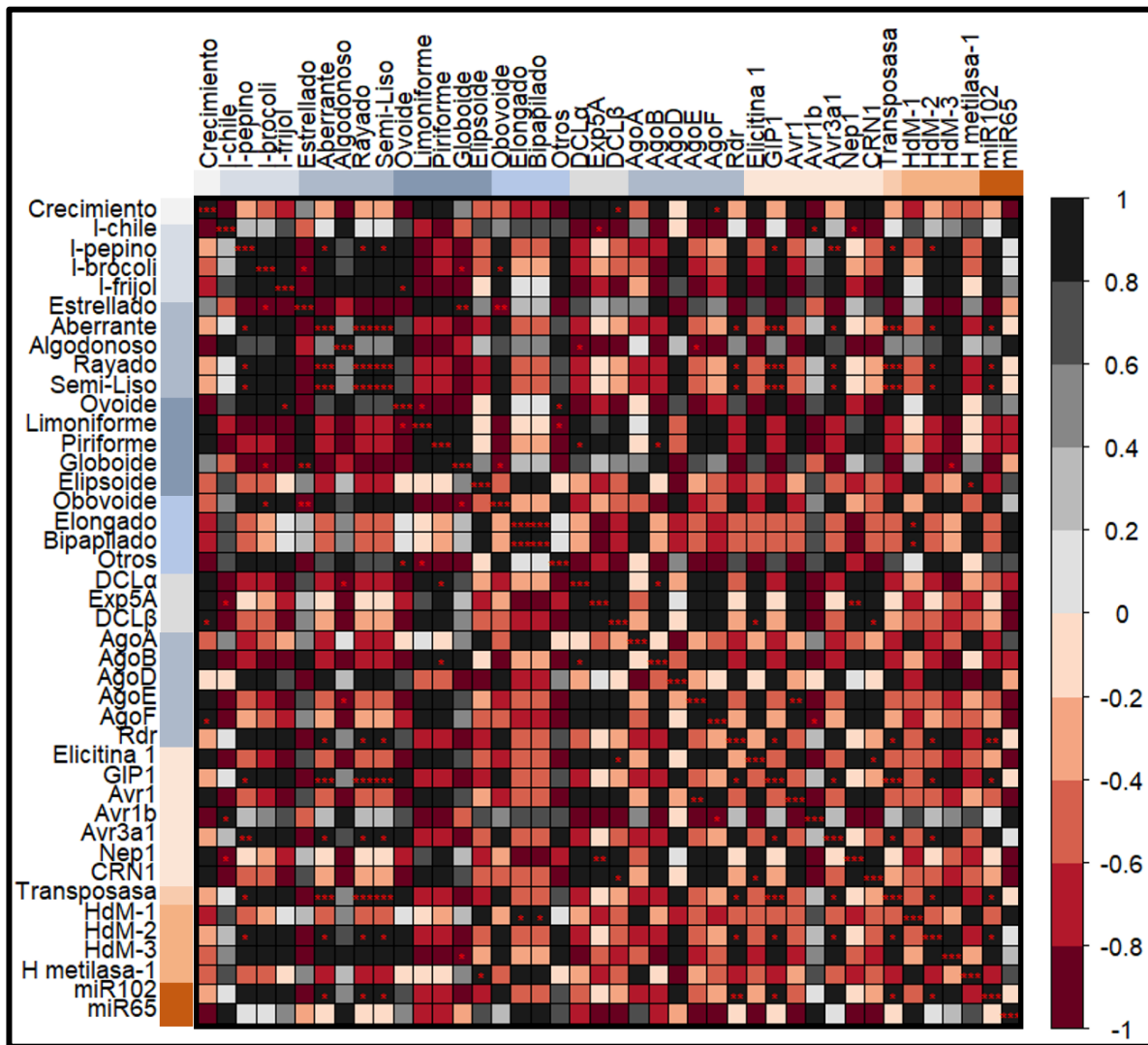


Figura 63. Matriz de correlación entre características de desarrollo, patogenicidad, fenotípicas y genotípicas en D3, A-chile y A-brócoli de *P. capsici*. El color de la celda indica el rango del coeficiente de correlación de Pearson entre las variables, si es positiva o negativa, si es alta, mediana o baja la correlación entre las variables. *diferencia estadísticamente significativa ANOVA ($p < 0.05$) entre las variables. **diferencia estadísticamente significativa ANOVA ($p < 0.01$) entre las variables. ***diferencia estadísticamente significativa ANOVA ($p < 0.001$) entre las variables.

La infección primaria en pepino se correlacionó fuertemente con la abundancia de la morfología colonial de tipo aberrante, rayada y semi-lisa, así como con el nivel de expresión de los genes efectores GIP1, Avr3a1, transposasa Tam3 e histona desmetilasa-2 (HdM-2).

La infección en brócoli fue correlacionada de manera negativa con la morfología macroscópica de tipo estrellada y esporangios globoides. Positivamente con el aumento de la abundancia de esporangios de ovoide, así como en la infección primaria de frijol.

Por su parte, la abundancia de la morfología colonial de tipo estrellada fue altamente correlacionada con los esporangios de tipo globoides e inversamente con los esporangios obovoides.

Sin embargo, la abundancia de la morfología aberrante, rayada y semi-lisa del oomiceto se encontró altamente correlacionada con el aumento del nivel de expresión de los genes RNA polimerasa dependiente de RNA, los genes efectores GIP1, Avr3a1, transposasa Tam3, HdM-2 y miR102. La morfología del micelio de tipo algodonoso se correlacionó inversamente con el nivel de expresión de los genes DCL α y argonauta F.

La abundancia de esporangios ovoides del oomiceto se correlacionaron proporcionalmente con los esporangios de tipo limoniformes y de manera negativa con otros tipos de morfologías de esporangios. Los esporangios de tipo piriformes se correlacionaron positivamente con el aumento del nivel de expresión de los genes DCL α y AGO-B.

La morfología de esporangios tipo globoide se correlacionó de manera negativa con el nivel de expresión de la HdM-3 y la aparición de esporangios ovoides. La morfología de esporangios de tipo elipsoide se correlacionó de manera positiva con el aumento de la expresión del gen histona metilasa-1. Los esporangios elongados fueron correlacionados positivamente con la aparición de esporangios bipapilados y con el nivel de expresión de la HdM-1.

El nivel de expresión de Exp5A estuvo correlacionado positivamente con el nivel de expresión del gen efector Nep1, lo mismo ocurrió entre AGO-B y DCL α , DCL β hacia la elicina1 y CRN1; la argonauta E con Avr1. RNA polimerasa dependiente de RNA con GIP1, transposasa Tam3, HdM-2 y miR102.

Avr3a1 se correlacionó con la transposasa Tam3 e HdM-2, transposasa Tam3 con miR102; e inversamente entre la argonauta F con el efector Avr1b. En conjunto, estos resultados sugieren que los cambios en la patogenicidad, virulencia y fenotipo de *P. capsici* están correlacionados con la expresión de genes efectores y mecanismos epigenéticos.

VI Discusión

En el presente trabajo de investigación se encontró por primera vez información predictiva y experimental de la expresión de potenciales miRNAs en *P. capsici* después de estar expuesto por dos generaciones a diferentes especies vegetales, de los cuales algunos están asociados con la modulación de la variación de su patogenicidad. Potencialmente miR102 regula la expresión del gen efector Avr1b y el PcapmiR8788 homólogo a otras especies de *Phytophthora* está asociado con la patogenicidad y el proceso de adaptación/aclimatación a varias especies vegetales. La expresión *in silico* de miRNAs homólogos de distintos organismos están relacionados con redes regulatorias en el desarrollo que pueden conducir a la variación del fenotipo. Sin embargo, es necesario realizar experimentos adicionales para validar la función de los potenciales miRNAs expresados por *P. capsici*.

6.1 *P. capsici* modifica su virulencia después de infectar diversas especies vegetales

La cepa D3 de *P. capsici* infecta de manera progresiva y específica las hojas de chile, pepino, brócoli y frijol en su primer ciclo de patogenicidad, con síntomas característicos de la enfermedad para cada especie vegetal evaluada.

D3, presenta mayor virulencia en chile comparado con las cuatro especies vegetales evaluadas, produce los síntomas típicos de la enfermedad del tizón tardío con la presencia de regiones oscuras y necrosadas como lo reportado en la vasta bibliografía que hace referencia a la enfermedad de marchitez del chile (Davidson et al., 2002; A. Gevens & Hausbeck, 2004; Kreutzer et al., 1940; kreutzer W. A., 1937; Kreutzer & Bryant, 1946; Tompkins & Tucker, 1937; Wiant, 1940).

En cambio, es menos virulento en hojas de pepino debido a los síntomas reducidos de infección que fueron observados. Nuestros resultados demuestran que el patógeno es capaz de infectar las hojas de pepino porque se logró aislar del pato-sistema. Esta observación es similar a lo reportado por Mary K. Hausbeck y Kurt H. Lamour (2004), en donde plantas de pepino infectadas con *P. capsici* también mostraron pocos síntomas de infección, incluso algunas plantas fueron asintomáticas.

Los resultados de infección en hojas de brócoli, indican que el patógeno lo infecta con mayor lentitud, comparado con las infecciones de chile y pepino, ya que se logró recuperar al patógeno de la infección. Al inicio de la infección, brócoli muestra rasgos de respuesta de hipersensibilidad. Sin embargo, *P. capsici* es capaz de sobre pasar los sistemas de defensa de brócoli y lentamente coloniza la hoja. Dentro de los mecanismos de defensa que se han descrito a nivel de campo en brócoli para evitar ser infectado por *P. capsici* es la producción de isotiocianatos volátiles y otros productos de hidrólisis que poseen propiedades biocidas y entran en contacto directo con los propágulos de patógenos después de la incorporación al suelo, haciendo que el patógeno no infecte la planta (Kirkegaard & Sarwar, 1998; Larsen, 1980; Smolinska et al., 1997).

Sin embargo, nuestros resultados indican que bajo condiciones controladas de laboratorio y óptimas para el crecimiento del patógeno, éste es capaz de infectar hojas de brócoli, una especie considerada como resistente. Estos resultados, coinciden con lo reportado por

Krasnow & Hausbeck (2015), en donde encontraron que bajo condiciones controladas de laboratorio, el oomiceto es capaz de infectar plantas de la familia de las Brassicáceas.

En el mismo estudio, Krasnow & Hausbeck (2015) reportaron que los síntomas de la enfermedad observados de las plantas de *Brassica* incluyeron atrofia, marchitamiento, clorosis y muerte de la planta, en donde las plantas de brócoli gravemente afectadas exhibieron una decoloración púrpura del follaje. Los síntomas iniciales de marchitamiento y clorosis se hicieron evidentes típicamente dentro de los 3 días posteriores a la inoculación, es decir encontraron que a las 72 hdi la infección causada por *P. capsici* en brócoli fue evidente, como lo muestran los resultados de esta investigación.

Fue sorprendente observar la gran capacidad infectiva que tiene *P. capsici* sobre frijol, ya que se creía era resistente al patógeno. Estos datos coinciden con lo reportado en un estudio de Critopoulos y colaboradores (1955) de plantas de frijol susceptibles a *P. capsici*. Recientemente, A. J. Gevens et al. (2008) bajo condiciones de laboratorio, encontraron que seis aislamientos de *P. capsici* fueron patógenos en diferentes cultivares comerciales de frijol, en donde las plantas de frijol infectadas exhibieron lesiones, necrosis foliar y marchitez sistémica.

Estudios anteriores de Foster y Hausbeck en (2010), también informaron diferencias en los niveles de virulencia y agresividad de aislamientos de *P. capsici* dirigidos a varios hospederos. Es decir, existe basta evidencia que sugiere que el patógeno infecta de manera específica a cada especie vegetal (S. Z. Islam et al., 2005; Granke et al., 2012).

L. J. Pons-Hernández et al. (2020), sugieren que la alta diversidad en la virulencia de la cepa D3 de *P. capsici* utilizada en esta investigación, podría estar relacionada con el tipo de hospedero que infecta. La cepa D3 fue recuperada de cultivos de chile cuya variedad es criolla y prácticamente cada productor del área en que se aisló el patógeno tiene su propia variedad y produce su semilla, lo que genera un proceso de selección hacia diferentes genotipos de plantas. Esto pudo haber originado que cada criollo desarrollara diferentes mecanismos de defensa para evitar o limitar el daño producido por *Phytophthora*. Así, *P. capsici* tendría que evolucionar para generar nuevos mecanismos de virulencia que le permitan eludir las defensas de los hospederos. Provocando que éstos, tengan que evolucionar para generar nuevas defensas para enfrentar los nuevos mecanismos de virulencia del oomiceto. Estas presiones de selección recíprocas entre los mecanismos de patogenicidad del patógeno y de defensa de la planta, se vería reflejado en la diversidad del grado de infección que se encontró en esta investigación.

6.2 En las infecciones secundarias *P. capsici* modifica su virulencia dependiente del historial de infección

Las infecciones secundarias en hojas de chile revelaron que *P. capsici* modifica su virulencia cuando proviene de infectar las cuatro especies vegetales evaluadas con respecto a la capacidad inicial de la cepa progenitora D3. La planta de frijol induce el aumento de la virulencia del oomiceto sobre la infección secundaria en chile. Es decir, la especie vegetal inmediata anterior que infectó el patógeno puede modificar la virulencia del *P. capsici* en la siguiente generación.

Estos resultados ofrecen una visión más amplia sobre la complejidad de las interacciones patógeno-planta, ayudando a comprender porque varias especies de *P. capsici* pueden presentar variación en la virulencia hacia un mismo hospedero. Nuestros datos sugieren que la virulencia de *P. capsici* no sólo está determinada por el arsenal estructural y genético de defensa de la planta, también por la “memoria infectiva” que puede tener el patógeno, talvez se encuentre más “alerta” para responder con mayor rapidez y eficacia para evadir los sistemas de defensa de las plantas evaluadas.

Por ejemplo, tres aislamientos KPC-7, JHA11-7 y MY-1 de *P. capsici*, mostraron claras diferencias en el desarrollo de síntomas y niveles de agresividad en plantas de chile susceptibles (J. H. Lee et al., 2021), lo cual indica, que incluso entre diversas cepas de *P. capsici* existe variación de la virulencia hacia un mismo hospedero. Entonces, es importante conocer el historial de hospederos por el cual pasó el oomiceto para relacionarlo con cambios en su virulencia.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Ulloa & Vega (2017), en donde demostraron que *P. capsici* es capaz de modificar su virulencia después de infectar diversas especies vegetales en una segunda generación infectiva sobre hojas de chile, como un posible mecanismo de adaptación.

Las infecciones secundarias en hojas de pepino demostraron que los aislados primarios tienden al aumento significativo de la virulencia, principalmente cuando proviene de infectar hojas de pepino, frijol y brócoli, siendo este último aquel que conduce al mayor aumento de su virulencia. Estos datos sugieren que el patógeno se podría comenzar a aclimatar/adaptar a pepino en forma de “memoria”, ya que de alguna manera a *P. capsici* le es más sencillo sobre pasar las barreras de defensa de pepino e infectarlo con mayor facilidad en la segunda generación. Estos datos son interesantes, ya que se logra observar de nuevo la tendencia que indica modificación de la virulencia del patógeno puede estar influenciada por la especie vegetal inmediata anterior de la cual se recuperó al oomiceto.

El reporte realizado por Ristaino (1990a), indicó que la virulencia de *P. capsici* de aislados obtenidos de plantas de chile fueron altamente virulentos en chile, mientras que otros aislamientos obtenidos de cucurbitáceas como pepino y calabaza fueron menos virulentos en chile, es decir *P. capsici* modifica su virulencia dependiente de la especie vegetal inmediata anterior de la cual se aisló, como lo que se encontró en esta investigación.

Las infecciones secundarias en brócoli muestran que *P. capsici* también tiende al aumento de su virulencia con respecto a la infección primaria en la misma especie vegetal, sugiriendo de nuevo que cuando el patógeno infecta por primera vez alguna de las cuatro especies vegetales y después infecta brócoli tiende a aumentar su virulencia, aunque se trate de una especie reportada como resistente al oomiceto.

Se encontró que en la infección primaria de brócoli (I-brócoli), *P. capsici* tiene poca capacidad infectiva en la hoja. Sin embargo, en la siguiente generación de infección en la misma especie vegetal (I-br-br), aumenta su virulencia, lo que sugiere que *P. capsici* se encuentra en el proceso inicial de adaptación.

A menudo, las verduras *Brassica* como el repollo, rábano y brócoli son utilizados para la biofumigación al ser plantadas en campos infestados con *P. capsici* con el supuesto que estos cultivos no se ven afectados por el patógeno y reducirán los niveles de inóculo (Krasnow & Hausbeck, 2015). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que es importante reconsiderar esta posibilidad.

Planteamos la hipótesis que si en regiones con historial de infestación de *P. capsici* se cultiva brócoli como sistema de biofumigación, y potencialmente el patógeno logra colonizarlo, entonces en las siguientes generaciones posiblemente sea más virulento. Esto podría conducir a la aparición de cepas más agresivas o adaptadas a brócoli, aumentando la problemática del control de la enfermedad, y que incluso si se dispersan las potenciales nuevas cepas hacia cultivos susceptibles, potencialmente podrá ocasionar síntomas de infección más devastadores que su progenitor. Similar a lo reportado en cultivos de soja por A. Gevens & Hausbeck (2003) y A. J. Gevens et al. (2008) en donde dicho cultivo también se utilizaba como rotación ante *P. capsici*, entonces a través de los años, el oomiceto se comenzó adaptar a la planta, produciendo que la soja sea infectable, contribuyendo a la problemática de especies de importancia alimentaria susceptibles.

Las infecciones secundarias en frijol también demuestran que *P. capsici* tiende a aumentar su virulencia en la siguiente generación, principalmente del aislado primario obtenido de frijol. El aumento de la virulencia en *P. capsici* inducida por frijol también ha sido descrita por Gevens et al. (2008), al obtener diferentes aislados de frijol y otros cultivos e infectar pepino, los aislados obtenidos de frijol fueron más virulentos hacia pepino, comparados con aquellos que no fueron aislados de frijol. Dichos resultados coinciden con lo encontrado en esta investigación; es decir, los aislados obtenidos de frijol que infectaron hojas de alguna especie vegetal evaluada ocasionaron mayor virulencia que aquellos aislados que no fueron obtenidos de frijol.

Por lo anterior, proponemos a frijol como una especie vegetal que induce el aumento de la virulencia del oomiceto mediante mecanismos que aún desconocemos, posiblemente a través de mecanismos epigenéticos, ya que son cambios relativamente rápidos que ocurren en *P. capsici* en respuesta al historial de infecciones. Estos mecanismos epigenéticos podrían ser desde modificaciones de histonas, hasta la participación de RNAs no codificantes, por lo cual es un área de la ciencia para continuar explorando.

Diversos estudios alrededor del mundo han documentado la variación de la virulencia de *P. capsici* cuando es aislado de varias especies vegetales y después es infectado en la misma u otra especie vegetal (Iribarren et al., 2015; Yin et al., 2012; Sun et al., 2008), lo que sugiere que la variación en la virulencia de aislamientos de *P. capsici* alrededor del mundo también es influenciado por la especie vegetal de la cual se recuperó.

6.3 La especie vegetal e historial de infección inducen cambios en el crecimiento de *P. capsici*

Se identificó variación en el crecimiento en los aislados primarios y secundarios con respecto a la cepa progenitora D3. Los resultados sugieren que *P. capsici* modifica significativamente la

tasa de crecimiento, principalmente en los aislados secundarios, los cuales proponemos están influenciados por la especie vegetal inmediata anterior de la cual se aisló al oomiceto, así como por el historial de infección/recuperación de las cuatro especies vegetales.

A-br-ch presentó la menor tasa de crecimiento que todos los aislados, a diferencia de A-fr-fr que exhibió la tasa de crecimiento más acelerada. En experimentos realizados por D. Hu et al. (2001), también encontraron que los aislamientos de *P. capsici* tienen diferentes tasas de crecimiento, por lo cual parece ser una cualidad del oomiceto. Sin embargo, en *P. ramorum*, algunos aislamientos obtenidos de infección de roble exhiben generalmente crecimiento más lento, incluso se vuelven senescentes, es decir, dejan de crecer tras el subcultivo por la influencia del hospedero (Brasier et al., 2006; Kasuga, Kozanitas, Bui, Hüberli, et al., 2012).

Estos datos son interesantes, ya que sugieren en específico que brócoli induce el retraso del crecimiento en la siguiente generación en la mayoría de los aislados obtenidos, comparados con D3. En cambio, frijol fomenta el crecimiento, principalmente en los aislados secundarios.

Estos resultados son consistentes con los encontrados por Ulloa & Vega (2017), en donde se evaluó el crecimiento de aislados de *P. capsici* que fueron recuperados de varios hospederos, lo que pudiera significar que es una característica plástica del oomiceto, posiblemente como una evidencia del proceso de adaptación/aclimatación a varias especies vegetales, ya que los fenotipos con crecimiento más acelerado como es el caso de A-fr-fr, podrían representar la plasticidad que conduce a rasgos de selección positiva en dirección a la evolución y aparición de fenotipos “pre-adaptados”, lo cual es el caso contrario de A-br-ch. Sin embargo, es necesario realizar experimentos adicionales a través de más generaciones para abordar con mayor profundidad esta aseveración.

6.4 La especie vegetal e historial infectivo inducen plasticidad fenotípica en la morfología del crecimiento colonial de *P. capsici*

La mayoría de aislados primarios y secundarios tienen variación significativa en la abundancia del patrón de crecimiento de la colonia comparado con D3. La variación de la abundancia de las morfologías estrellada, aberrante, algodonosa, rayada y semi-lisa sugieren que dicha plasticidad fenotípica es inducida por la especie vegetal de la cual fue recuperado el patógeno y por su historial de infección/aislamiento como respuesta rápida del oomiceto hacia el proceso de adaptación/aclimatación a los mismos.

Estos cambios en la abundancia de morfología inducida por el hospedero también han sido observados en los experimentos de Iribarren et al. (2015) sobre aislamientos de *P. capsici* provenientes de cultivos infectados de chile, calabaza, jitomate y berenjena que mostraron variación en el patrón de morfología colonial.

Se ha reportado que incluso una misma especie vegetal como chile puede inducir la aparición de varias morfologías en diferentes aislados de *P. capsici*, como lo demostraron L. J. Pons-Hernández et al. (2020), en donde varios aislamientos obtenidos de cultivos de chile del estado de Guanajuato presentaron variación en la abundancia de cinco formas de crecimiento de tipo estrellada (62.5%), turuloso (15.62%), estolonífera (12.5%), filamentosos (6.25%) y petaloide (3.12%); sin embargo, nuestros resultados no mostraron las morfologías turuloso, estolonífera

y petaloide. En Chihuahua, México también se ha reportado variación en el patrón de crecimiento en aislados de *P. capsici* con tipos de colonia de tipo estrellado (74%), ligeramente petaloide (14%) y radial (12%) (Sánchez-Gurrola, Gómez-Dorantes, Rodríguez-Alvarado, & Fernández-Pavía, 2019).

Por lo cual, la variación en la morfología de la colonia se ha observado en *P. capsici* desde hace varios años y es considerada un primer indicio de la diversidad (Bowers et al., 2007; Ramírez-Delgado, 2015).

La variación de la plasticidad fenotípica suele ser también característica en otras especies de *Phytophthora* ya que algunos aislamientos de *P. ramorum* (Brasier et al., 2006; Kasuga, Kozanitas, Bui, Hüberli, et al., 2012), *P. nicotianae* (G. Hall, 1993), *P. infestans* (Caten, 1970; Caten & Jink, 1968; Zarzycka, 1996), *P. sojae* (F. S. Rutherford et al., 1985) obtenidos de infección de varias especies vegetales han exhibido varios tipos de colonias.

Nuestros resultados indican que los aislados con morfologías coloniales con mayor similitud a D3 son aquellos que provienen de infección de Chile. En cambio, los aislados primarios y secundarios con mayor diferencias que la cepa progenitora son los que descienden del historial infectivo/recuperación de brócoli y frijol. Proponiendo entonces que la mayor abundancia de la morfología de tipo estrellada estaría determinada en parte por la historia de interacción con Chile, coincidiendo con los trabajos de Sánchez-Gurrola, et al. (2019), en donde el crecimiento estrellado fue más frecuente en *P. capsici* cuando es aislado de Chile.

Con los análisis de X^2 , se demostró que la mayoría de los aislados secundarios de obtenidos de pepino y brócoli son estadísticamente diferentes entre ellos, el aislado primario de pepino, brócoli y D3 al disminuir significativamente la abundancia de la morfología estrellada típica de la cepa progenitora. En cambio, los aislados secundarios obtenidos de frijol mostraron diferencias significativas en la abundancia de sus morfologías sólo a través de las generaciones.

En general, estos datos sugieren la existencia de plasticidad fenotípica estadísticamente significativa entre los aislados primarios comparados con el control, además de diferencias demostrativas en la plasticidad fenotípica de los aislados secundarios con respecto a los aislados primarios y D3. Es decir, el patógeno va modificando su morfología cuando tiene diferentes combinatorias en el historial infección/recuperación a través de las generaciones.

Es importante el estudio de la plasticidad fenotípica ya que sugiere que la especie vegetal induce cambios que permanecen en el patógeno, aunque ya no se encuentren en interacción. Creemos que los cambios inducidos por la especie vegetal sobre el oomiceto podrían ser explicados por cambios a nivel de genoma, regulación de la expresión génica, epigenética, entre otras, ya que los experimentos de Farrer et al. (2013) y Rancati et al. (2008) demostraron por primera vez que la variación de la plasticidad fenotípica en *P. ramorum* está relacionada por alteraciones genómicas de aneuploidía, pérdida de heterocigocidad inducida por el hospedero roble (Kasuga et al., 2016).

6.5 *P. capsici* modifica la morfología de sus esporangios después de infectar varias especies vegetales por dos generaciones

Los aislados obtenidos de esta investigación tienen esporangios limoniformes, piriformes, globoides, elipsoides, obovoides, elongados, bipapilados y otros, en diferente abundancia. La cepa progenitora presentó en su mayoría esporangios ovoides. En cambio, fue mayor esta morfología en los aislados primarios y secundarios, con variación significativa en el porcentaje del resto de morfologías. Estos datos indican que se ve modificada la morfología de esporangios en *P. capsici* después de exponer al patógeno hacia alguna de las cuatro especies vegetales evaluadas.

Ramírez-Delgado (2015) observaron principalmente esporangios piriformes y ovoides en *P. capsici*, cuyas características morfológicas empatan con las descritas por D. C. Erwin & Ribeiro, 1996; Fernández-Pavía et al. (2004) y las encontradas en esta investigación.

La variación de la morfología de esporangios del oomiceto después de infectar varias especies vegetales también ha sido reportada por Iribarren et al. (2015) en aislados de *P. capsici* obtenidos de cultivos de chile, calabaza, jitomate y berenjena que mostraron morfología de los esporangios variable, presentándose en algunos aislamientos esporangios bipapilados y deformantes, los que en esta investigación clasificamos como “otros” tipos de morfologías. Nuestros resultados también son similares a lo encontrado por Frezzi (1950).

La variación de la morfología de esporangios inducida por la especie vegetal parece ser una característica de *Phytophthora*, ya que en el estudio realizado por G. Hall (1993) en 81 cepas de *P. nicotianae* provenientes de Asia, Europa, África, y varias partes de América que provienen de infectar diversos hospederos, también se observaron variación en la ocurrencia general de morfologías de esporangios.

Nuestros datos demuestran que la abundancia de morfologías de esporangios en aislados secundarios obtenidos de infección/recuperación de chile, pepino, brócoli y frijol es significativa a través de las generaciones. Este fenómeno apoya la idea que relaciona la variación significativa en la plasticidad fenotípica de esporangios de *P. capsici* con las generaciones en que patógeno infectó/fue recuperado de varias especies vegetales y no directamente con la especie vegetal que infecta. Sin embargo, se observaron algunas excepciones.

Los resultados sugieren que existe mayor plasticidad fenotípica significativa en la conformación micelial que en la plasticidad morfológica de esporangios en *P. capsici* después de infectar las cuatro especies vegetales y su combinatoria por dos generaciones. Estos cambios morfológicos que puede presentar el oomiceto podrían estar asociados al proceso de aclimatación/adaptación a varias especies vegetales, influenciado por cambios a nivel epigenético ya que el “ambiente-alimentación”; es decir, la especie vegetal conduce a cambios en el comportamiento del patógeno sobre su patogenicidad, virulencia, plasticidad fenotípica micelial y en ocasiones en sus esporangios a través de las generaciones.

Especulamos que la variación de la morfología de los esporangios observada en los aislados primarios y secundarios de *P. capsici* podrían ser explicados por cambios en el DNA del oomiceto, y principalmente mediados mecanismos complejos de redes de regulación

epigenética, en donde la expresión de genes claves conducen a cambios en la morfología en el patógeno, por ello se sugiere realizar la construcción de potenciales redes de regulación génica que pudieran explicar con mayor profundidad los cambios del fenotipo y sus respectivos análisis funcionales.

6.6 En los aislados primarios y secundarios de *P. capsici* existen varios tipos de correlación entre sus características plásticas

Los resultados de correlación de las variables plásticas entre D3, aislados primarios y secundarios sugieren que existen patrones de correlación positiva y negativa entre la patogenicidad, virulencia, crecimiento, morfología colonial y esporangios de *P. capsici*, las cuales están influenciadas por la especie vegetal hacia la cual fue infectado/recuperado el patógeno, así como de su historial de infecciones.

Los resultados son de gran interés ya que se comienzan a dilucidar posibles patrones de patogenicidad, desarrollo y morfológicos de *P. capsici* después de infectar hojas de chile, pepino y frijol, en donde actualmente se desconoce a profundidad este tipo de patrones correlacionales.

En *P. ramorum* y otros patógenos, Kasuga et al. (2016), Elliott et al. (2018) y Linde et al. (1997) también encontraron que la morfología de colonia, el crecimiento y la virulencia son variables altamente correlacionadas bajo condiciones de laboratorio.

La aparición de nuevas morfologías en los aislados primarios y secundarios pueden ser indicativo de efecto plástico adaptativo de *P. capsici* a las especies vegetales evaluadas. Sin embargo, se desconoce la explicación molecular de la correlación en la capacidad infectiva y plasticidad morfológica del oomiceto, es necesario esclarecerlas. Por ello, proponemos que podrían deberse a un conjunto complejo de interacciones intermoleculares en el patógeno, en los cuales posiblemente también pueden estar involucradas moléculas del hospedero, que en su conjunto podrían estar participando en los cambios fenotípicos observados, así como cambios en elementos de regulación de la expresión génica, factores de transcripción, conjunto de enzimas especializadas, mecanismos epigenéticos como la modificación de la estructura de la cromatina, DNA, RNAs no codificantes, elementos transponibles, entre otros.

Es importante continuar explorando estrategias para dilucidar con mayor profundidad las correlaciones entre las características plásticas de *P. capsici*, mediante el desarrollo de modelos matemáticos especializados sobre machine-learning, redes de correlaciones, random forest, etc. para conocer más acerca de la biología del chomista desde una perspectiva diferente.

6.7 D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici* se agrupan de acuerdo a sus características plásticas

El análisis de componentes principales demostró que las variables analizadas de la plasticidad que puede presentar *P. capsici* contribuyen de manera específica a explicar la varianza entre D3, aislados primarios y secundarios. Encontrando que la morfología ovoide de los esporangios y D3 son la variable e individuo que más contribuye a explicar la varianza del eje principal uno del PCA. Fue esperado encontrar que D3 contribuye mayormente a explicar la

varianza debido a las diferencias que se observaron durante los experimentos. Sin embargo, fue inesperado encontrar que la morfología ovoide conduce a la varianza de los datos, demostrando que el estudio de la morfología de esporangios es importante en el proceso de adaptación/aclimatación de *P. capsici* hacia diferentes hospederos, cuya cualidad normalmente no se estudia con profundidad en estudios tradicionales.

El análisis de clustering por k-means reveló que D3 (clúster 1), A-chile (clúster 2), A-pepino-A-brócoli (clúster 3) y A-frijol (clúster 4) tienen características similares en su capacidad infectiva, crecimiento, morfología colonial y de esporangios. Sin embargo, cuando se realizó el mismo análisis con la adición de los aislados secundarios se encontró que D3, aislados primarios y secundarios se agrupan en tres clústeres dependiente de la generación. Es decir, D3 presenta características específicas que son diferentes a los aislados primarios y secundarios, que a su vez también son diferentes entre los aislados primarios y secundarios.

Los resultados sugieren la existencia de diferencias distinguibles de crecimiento y morfológicas entre las generaciones de *P. capsici* cuando es infectado/recuperado de varias especies vegetales y que ciertas características en general son compartidas entre las generaciones, las cuales podrían ser impulsadas por fuerzas evolutivas para seleccionar los fenotipos más adaptables.

La construcción de un modelo estadístico que explique los cambios de las variables plásticas en *P. capsici* a través de las generaciones basado en los resultados de clustering k-means, reveló que el oomiceto va perdiendo o disminuyendo la presencia de morfología estrellada, esporangios limoniformes, piriformes y globoides a través de las generaciones que tuvieron en contacto con las especies vegetales y distintos historiales de infección. En compensación, va aumentando la abundancia de morfología colonial aberrante, rayada y esporangios ovoides, estos resultados podrían ser aplicables para distinguir distintos grados de adaptación de *P. capsici* a diferentes hospederos.

También se encontró que la abundancia morfológica de esporangios elipsoide, obovoide y elongado es baja en D3, sin embargo, en los aislados primarios aumenta y en los secundarios vuelve a regresar a su estado inicial. Estos datos muestran la existencia de diferentes perfiles de morfologías que son modificados fuertemente en la primera infección, pero en la siguiente generación de aislamiento estas vuelven a su estado inicial. Esto sugiere que el aumento de la abundancia de estas morfologías se encuentra fuertemente influenciada por las especies vegetales de las cuales fue recuperado el patógeno en su primera exposición, en la siguiente generación como el patógeno ya tiene esa predisposición, tal vez le es más sencillo responder sin modificar tanto esta morfología, pero sin llegar a la abundancia morfológica del estado inicial. Es decir, creemos que la especie vegetal puede inducir un tipo de memoria morfológica en estos casos.

En general, los perfiles de la abundancia morfológica y crecimiento son variables en el oomiceto que pueden ser disminuidos, aumentados, modificados o aumentar para después permanecer igual en las siguientes generaciones. Es decir, la aparición de cierto tipo de morfologías, tasa de crecimiento de los tratamientos está influenciada de manera específica por la especie vegetal que infecta el patógeno a través de las generaciones.

Creemos que estos cambios morfológicos están asociados con el proceso de adaptación de *P. capsici* a nuevos ambientes u hospederos, los cuales pueden estar influenciados por complejos mecanismos de la evolución del genoma, herencia genética, epigenética, entre otros, con los que responde el oomiceto. Puesto que el análisis fenotípico de Xu et al. (2022) en mutantes silenciadas de AGO3 en *P. parasítica* (PpAGO3) cuya proteína forma parte de los mecanismos epigenéticos, mostraron mayor vigor de crecimiento y cambios fenotípicos coloniales y de esporangios.

6.8 *P. capsici* tiene poblaciones de sRNAs relacionados con el proceso de adaptación/aclimatación a especies vegetales

El análisis de secuenciación de sRNAs de A-ch-ch y A-br-ch reveló que *P. capsici* tiene sRNAs asociados a regiones génicas, intergénicas, elementos transponibles del genoma, con mayor abundancia en A-br-ch, sugiriendo que en esta condición existe potencialmente mayor regulación epigenética. De estos sRNAs, más del 85% son únicos en cada condición evaluada, lo que pone de manifiesto la importancia de la regulación epigenética de los RNAs no codificantes en *P. capsici* sobre el proceso de aclimatación/adaptación a varias especies vegetales.

P. capsici tiene principalmente dos poblaciones de sRNAs de 21 y 25 nt en ambos tratamientos. Sin embargo, difiere su abundancia entre A-ch-ch y A-br-ch, ya que este último expresa más sRNAs. Además, el oomiceto expresa con mayor intensidad sRNAs de 27 nt en A-ch-ch, por lo cual el aumento significativo de poblaciones de sRNAs podrían estar relacionadas con el proceso de adaptación/aclimatación de *P. capsici* a varias especies vegetales. Sin embargo, es necesario realizar experimentos adicionales sobre la función de los mismos y profundizar en su conocimiento.

La presencia de dos poblaciones principales de sRNAs parece ser característico de las especies de *Phytophthora* ya que el estudio realizado por Fahlgren et al. (2013) reportó una distribución bimodal de tamaños de RNA pequeños en *P. infestans*, *P. sojae* y *P. ramorum* con picos centrados en RNAs pequeños de 21 y 25 nucleótidos de longitud. En el mismo estudio, los sRNAs de 25 nt se asociaron predominantemente con loci que codifican elementos transponibles u otro DNA repetitivo, mientras que la clase de 21 nt se asoció con varias familias de genes, incluidos los efectores Crinkler y fibronectinas tipo III, repeticiones invertidas y una nueva familia de miARN conservada en las tres especies de *Phytophthora*. Una caracterización adicional de las poblaciones de sRNAs de 21nt en *P. infestans*, *P. sojae*, *P. ramorum* y *P. parasítica* identificó que corresponden a miRNAs y los sRNAs de 25 nt a siRNAs (Fahlgren et al., 2013; J. Jia et al., 2017), lo cual puede ser similar en *P. capsici*.

La presencia de dos clases de tamaño de RNA pequeño y dos ortólogos de DCL en *P. capsici* plantea la posibilidad que cada DCL sintetiza sRNAs de diferente tamaño, similar a la forma en que las plantas dividen las vías de RNA pequeño con proteínas DCL especializadas. De acuerdo con este modelo, se demostró que PiDCL1 interrumpe la acumulación de sRNAs de 21 nt, pero no de 25/26 nucleótidos (Fahlgren et al., 2013).

Nuestros resultados sugieren que los perfiles de expresión de sRNAs se modifica por el historial de infección/recuperación a varias especies vegetales del oomiceto, los sRNAs de 21

nt normalmente están asociados con miRNAs canónicos en la mayoría de los organismos (Fahlgren et al., 2013) y los sRNAs de 25-26 nt están relacionados con la vía del RNAi (A. Hamilton et al., 2002; H. Wang et al., 2011), lo que sugiere que la regulación génica vía miRNA y RNAi se modifica principalmente en A-br-ch.

Los resultados de sRNA-seq obtenidos de esta investigación son de gran relevancia para el conocimiento de la biología de los patógenos de plantas, ya que hasta el momento de la escritura de esta investigación no existen reportes de sRNAs-miRNAs en *P. capsici*, de hecho se desconocía si el oomiceto puede expresar sRNAs o miRNAs. En el estudio de los oomicetos tampoco existía algún experimento reportado que explique la relación de la regulación epigenética mediada por RNAs no codificantes con el proceso de adaptación/aclimatación de patógenos a varias especies vegetales a través de las generaciones.

6.9 Las poblaciones de sRNAs de *P. capsici* tienen un extremo 5' característico

Los RNAs pequeños a menudo exhiben preferencias específicas de nucleótidos o modificaciones químicas que son características de la vía involucrada en su procesamiento y clasificación por parte de las proteínas AGO. Esto puede observarse como una preferencia por uracilo en la base terminal 5' de numerosos organismos (Ghildiyal et al., 2008; C. C. Nunes et al., 2011; X. Wang et al., 2010).

En *P. capsici*, sRNAs de 20-22 nt tienen más abundancia de uracilo y citosina en el extremo 5' y los sRNAs de 24-25nt predomina sólo el uracilo, estos resultados sugieren que al menos tres proteínas argonautas podrían estar involucradas en la actividad regulatoria de sRNAs en *P. capsici*.

La primera para los sRNAs de 20-22 nt asociados con miRNAs por la preferencia 5' uracilo y citosina mediado por AGO-A ya que es homóloga a PiAGO1, la cual de acuerdo a Åsman et al. (2016), PiAGO1 está relacionada con la preferencia de sRNAs de 21nt con extremo 5' citosina, predominantemente en la vía en la vía de miRNAs.

La segunda para sRNAs 24-25 nt relacionados con la vía del RNAi con preferencia sólo para extremos 5' con uracilo mediado potencialmente por AGO-D, puesto que esta enzima mostró mayor homología con PiAGO4, por lo que Åsman et al. (2016) indican que esta proteína tiene prevalencia con sRNAs de 25/26nt de extremo 5' uracilo.

La tercera AGO estaría involucrada en el procesamiento del resto de los sRNAs identificados en los análisis de sRNA-seq, por vías alternativas como la síntesis de siRNAs secundarios mediados por la RDR, sin embargo es necesario realizar análisis adicionales que lo demuestren experimentalmente.

Nuestros resultados contrastan con lo reportado por Fahlgren et al. (2013), ya que *P. infestans* los sRNAs de 21 nt tienen mayor prevalencia de citosina en el extremo 5', sin embargo, nuestros resultados mostraron prevalencia similar entre citosina y uracilo para el mismo tamaño de sRNAs. La observación de Fahlgren et al. (2013) en los sRNAs 25/26 nt, del extremo 5' es más frecuente de uracilo, lo cual coincide con lo encontrado en este estudio. Es decir, podrían existir pequeñas diferencias en los sRNAs en el extremo 5' entre los oomicetos

que fomenten una especificidad característica en las poblaciones de sRNAs y AGOs entre los oomicetos.

6.10 *P. capsici* expresa diferencialmente sRNAs relacionados con el proceso de adaptación/aclimatación a diferentes hospederos

El análisis de expresión diferencial en A-br-ch mostró que 184 sRNAs están sobre expresados, los cuales fueron asociados con la vías de replicación de DNA, metilación de histonas, modificaciones postraduccionales, unión a RNA, síntesis de RNA ribosomal, lo que sugiere que *P. capsici* regula altamente estas vías en A-br-ch mediante poblaciones de sRNAs. En cambio, se encontraron 287 tipos de sRNAs infra expresados asociados con los procesos de metabolismo de carbohidratos que incluyen pentosas fosfato, glicolisis, biosíntesis de ribosomas, unión a metales, síntesis de tRNA y unión a ácidos nucleicos. Es decir, los datos sugieren aumento de la actividad que estas rutas metabólicas al estar asociados sRNAs en menor nivel de expresión en A-br-ch comparado con A-ch-ch.

La potencial regulación de sRNAs diferencialmente expresados para diversos genes también fue reportada en micelio de mutantes PpAGO3 de *P. parasítica* (Xu et al., 2022) asociados con 2508 genes relacionados con la respuesta al estímulo biótico externo, patogénesis, y la interacción entre especies, lo que sugiere que diversos sRNAs pueden asociarse a diferentes tipos de genes dependiendo el tratamiento al que fue sometido el organismo.

Nuestros resultados exhiben de manera predictiva que *P. capsici* puede regular diversos genes endógenos mediante sRNAs, disminuyendo potencialmente la expresión de procesos sobre replicación, transcripción y traducción en A-br-ch comparado con A-ch-ch, lo cual podría explicar parte de la disminución de la tasa de crecimiento que se observó en la caracterización del aislado secundario. Además, A-br-ch estaría aumentando la actividad de genes relacionados con el catabolismo de carbohidratos, sugiriendo que el microorganismo se encuentra en un estado diferente de adquisición de nutrientes, ya que requiere obtener mayor energía mediante la degradación de carbohidratos, lo cual se podría relacionar con los cambios en la patogenicidad que presentó con respecto a A-ch-ch.

6.11 *P. capsici* tiene poblaciones de sRNAs asociados con la regulación de genes efectores del tipo elicinas, RXLR, CRN y NLP

Los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch tienen dos principales poblaciones de sRNAs asociados a genes efectores con diferencias en cada tratamiento. sRNAs de 20-21 nt a efectores tipo RXLR, CRN, elicinas y NLP, en cambio las poblaciones de 24-26 nt relacionada en su mayoría sólo con genes RXLR. Estos resultados sugieren que RNAs pequeños de *P. capsici* pueden regular la expresión de genes efectores como mecanismo epigenético influenciado por el historial de especies vegetales por el cual *P. capsici* fue sometido, además de la posible existencia de dos vías de regulación de efectores, la primera potencialmente mediada por miRNAs y la segunda por la vía del RNAi a través de siRNAs.

Nuestros resultados son comparables con los encontrados en *P. infestans* por Fahlgren *et al.* (2013) y W. Wang & Jiao (2019), ya que encontraron que la clase de 21 nt se derivan principalmente de genes efectores CRN, en cambio los sRNAs de 21, 24/25 nt están asociados con efectores RXLR.

De manera similar, los sRNAs de 25 a 26 nt están implicados en el silenciamiento de los genes efectores RXLR y CRN en *P. parasítica* durante el crecimiento vegetativo (J. Jia et al., 2017). Sin embargo, nuestros resultados contrastan con lo identificado en el mismo patógeno, ya que en los experimentos de J. Jia et al. (2017) no identificaron genes efectores CRN asociados con sRNAs de 21 nt. Esto podría ser indicativo que existen potencialmente diferencias en la función de los sRNAs entre las especies de *Phytophthora*.

Cada vez existe más evidencia que sugiere que los RNAs pequeños de 25 a 26 nt, son la clase de RNAs de tamaño dominante en *Phytophthora* involucrados en la regulación de la expresión de genes efectores (J. Jia et al., 2017; Qutob et al., 2013; R. Vetukuri et al., 2012; W. Wang & Jiao, 2019) como lo encontrado en esta investigación.

Nuestros datos de secuenciación de sRNAs indican que existe mayor abundancia de sRNAs asociados a regular genes efectores en A-br-ch del tipo elicinas, RXLR y algunos CRN, en cambio es mayor la asociación de sRNAs con algunos genes NLP en A-ch-ch. Lo que sugiere que la virulencia basada en la expresión de genes efectores de *P. capsici* puede ser modificada por RNAs no codificantes relacionado con el proceso de adaptación a diferentes especies vegetales. Estas diferencias podrían explicar parte la variación de la virulencia que tiene *P. capsici* en las infecciones secundarias.

Estudios recientes han acreditado que los sRNAs derivados de patógenos desempeñan un papel activo en la virulencia del patógeno (Adkar-Purushothama et al., 2015; Avina-Padilla et al., 2015; B. Navarro et al., 2012). Por ejemplo, en el efector *PiAvr3a* que suprime la apoptosis de la planta por virulencia al estabilizar la ubiquitina ligasa E3 del hospedador, está bajo la regulación de los sRNAs (Bos et al., 2010). Curiosamente, R. R. Vetukuri et al. (2012a), han observado diferentes niveles de virulencia entre dos cepas de *P. infestans*, asociados al cambio en la expresión de sRNAs. Lo que apoya la importancia de los sRNAs en la virulencia en oomicetos, como lo sugieren nuestros resultados.

Estos mecanismos de regulación epigenética de efectores por sRNAs también ocurre en otros patógenos, como lo demostrado en el estudio de X. Nunes et al. (2011), sobre la expresión global de sRNAs en *Magnaporthe oryzae*. En general, nuestros resultados y de diversos reportes apoyan la noción que los sRNAs endógenos tienen un papel importante en la regulación de la virulencia en fitopatógenos (Weiberg, Wang, Lin, Zhao, & Zhang, 2013; J. Zhou et al., 2012; Q. Zhou et al., 2012).

Nuestros resultados también sugieren que el potencial silenciamiento de genes efectores del tipo elicinas, RXLR y CRN es un mecanismo adaptativo de *P. capsici* para ser o no reconocido por el sistema inmune de la planta, basado en la infección previa en forma de “memoria adaptativa” y lograr colonizar la planta con mayor facilidad. Mecanismo similar utilizado por el patógeno de la soja, *P. sojae*, ya que Qutob et al., (2009) y Shan et al., (2004) revelaron que el patógeno utiliza sRNAs para el silenciamiento endógeno del gen efector *PsAvr3a*, lo que permite que el patógeno evite ser reconocido por parte de la proteína de resistencia *Rps3a* de la soja y logre infectarla.

El mecanismo que inicia el silenciamiento endógeno de genes por sRNAs aún no se ha determinado de manera concluyente en *Phytophthora*. Sin embargo, estudios de R. R. Vetukuri et al. (2013) especulan que puede iniciarse mediante el silenciamiento de los TE cercanos.

Una pregunta es por qué estos genes efectores necesitan ser regulados por las vías de silenciamiento de sRNAs, para ello Xu et al. (2022) propusieron tres escenarios posibles. El primero, considera que algunos efectores podrían desencadenar la inmunidad de la planta como factores de avirulencia, y la supresión de estos efectores ayudaría a evadir la percepción por parte de las plantas hospedantes. De manera consistente, algunos genes efectores de avirulencia se suprimen en *P. infestans* y *P. sojae* (Shan et al., 2004; Wang et al., 2019).

En segundo lugar, algunos efectores pueden ser súper virulentos para las plantas huésped, y se requiere silenciar estos genes efectores para establecer un equilibrio entre la infección exitosa y la evolución continua en el hospedero. El último escenario es que, para conservar energía, algunos efectores se suprimen en la etapa de micelio pero se activan cuando es necesario durante el proceso de infección. Sin embargo, se necesitan más estudios para validar estas hipótesis.

6.12 *P. capsici* tiene sRNAs y un miRNA asociados con la regulación enzimas modificadores de histonas y factores de transcripción

Los aislados A-ch-ch y A-br-ch tienen poblaciones de sRNAs de 19-21 nt asociados con la posible regulación de genes que codifican factores de transcripción, enzimas acetiltransferasas, metilasas y desmetilasas de histonas, con mayor abundancia en A-br-ch. Sugiriendo que el historial diferente de infección/recuperación en la segunda generación de *P. capsici* contribuye a cambios en la expresión de genes y re-arreglos de la cromatina del oomiceto, lo cual puede conducir al proceso de adaptación/aclimatación a los hospederos.

En micelio de *P. infestans*, Fahlgren et al. (2013) también encontraron altos niveles de sRNAs asociados a genes metiltransferasas. En *P. parasítica*, J. Jia et al. (2017) encontraron RNAs pequeños altamente expresados asociados con genes de metilación de histona, por lo cual existe evidencia computacional en otros oomicetos que este proceso es regulado por sRNAs y se encuentra compartido en la biología de *P. infestans*, *P. parasítica* y *P. capsici*.

Nuestros resultados son interesantes, puesto que sugieren que en *P. capsici* podría existir la vía de metilación del DNA dirigida por RNA (RdDm) (Downen et al., 2012; Yu et al., 2013), cuya modificación del material genético no se ha descrito en el oomiceto. Por ello, es necesario realizar experimentos adicionales sobre funcionalidad e interacción de sRNAs con estas enzimas, para validar experimentalmente que metilación del ADN y la modificación de histonas dirigida por siRNA heterocromático conduce al silenciamiento de genes en fase transcripcional (Cui et al., 2014).

6.13 *P. capsici* tiene sRNAs asociados con la regulación de elementos transponibles

Los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch tienen principalmente sRNAs de 24-25 nt asociados con elementos transponibles (TE) del tipo retro-transposones que son únicos entre cada tratamiento. Esto sugiere que la regulación de la evolución del genoma de basado en retro-transposones podría estar presente en *P. capsici* y modulada por sRNAs, contribuyendo

a explicar los cambios en la virulencia y adaptabilidad que tiene *P. capsici* a varias especies vegetales, ya que es conocido que los TEs son elementos genómicos móviles que impulsan la evolución del genoma (R. Vetukuri et al., 2012). Por lo cual, los elementos transponibles activos podrían provocar mutaciones, niveles de transcripción alterados y recombinación ectópica del DNA (R. R. Vetukuri et al., 2013).

Es probable que estos sRNAs derivados de TE modulen en el silenciamiento de TE, ya que en general, la expresión de elementos transponibles conducen a la generación de sRNAs, que posteriormente silencian los genes con efectos cercanos y alteran la virulencia de *P. infestans* (Weiberg et al., 2014). Además, existe evidencia que la diversificación en la adaptación de patógenos está impulsada por el control epigenético de los TE a través de sRNAs (Weiberg, Wang, Lin, Zhao, & Zhang, 2013)

Nuestros resultados son comparables con lo obtenido por J. Jia et al. (2017), ya que encontraron que las poblaciones de sRNAs de 25/26 nt en *P. parasítica* se asociaron con regiones genómicas ricas en repeticiones de elementos transponibles. Sin embargo, las poblaciones de sRNAs asociados a TE de este estudio difieren con lo encontrado por R. Vetukuri et al. (2012) en *P. infestans*, puesto que en este oomiceto, los sRNAs de 30-33 nt se asignaron principalmente a TE. Estas diferencias entre especies sugieren que los distintos tipos de sRNAs tienen funciones potencialmente diferentes entre los oomicetos.

Los estudios de Weiberg et al. (2014) en *P. infestans* sugieren que muchos sRNAs se generan a partir de regiones de elementos transponibles, que probablemente contribuyen a la rápida evolución de la virulencia y la adaptación a hospederos, lo cual podría explicar los resultados que se encontraron en esta investigación.

R. Vetukuri et al., (2012) identificaron que más de la mitad de los genes efectores RXLR predichos a partir del genoma de *P. infestans* están dentro de los 2 kb de las secuencias derivadas de transposones, por lo que plantearon la hipótesis de que el silenciamiento de los transposones por sRNAs también puede influir en la expresión de los efectores RXLR cercanos a través de la formación de heterocromatina (S. , Raffaele & Kamoun, 2012; S. Whisson et al., 2012), por lo cual sería interesante explorar si también ocurre en *P. capsici*.

Por todo lo anterior, creemos que los cambios en la expresión de sRNAs asociados a elementos transponibles pueden conducir a cambios en la virulencia y la rápida adaptación de *P. capsici* a diferentes especies vegetales, similar a la respuesta que ocurre en el patógeno *B. cinérea*, ya que M. Wang et al. (2015) encontraron que la mayoría de los Bc-sRNA de *B. cinérea* que se predice silencian los genes de la planta también se derivan de una clase de elementos transponibles de retro-transposición (LTR), como los encontrados en esta investigación, los llamados elementos similares a Boty. Tal disposición de genes sugiere que los LTR de Boty desempeñan un papel positivo en la conducción de la rápida evolución de los efectores Bc-sRNA en *Botrytis*. Lo que podría conducir a la rápida adaptación de *Botrytis* a una amplia gama de plantas hospederas, convirtiendo a este hongo en un patógeno de amplio espectro altamente agresivo, similar a *P. capsici*.

6.14 *P. capsici* tiene miRNAs reportados en miRBase diferencialmente expresados

Phytophthora capsici tiene 334 miRNAs homólogos a los reportados en miRBase v22 que provienen de diferentes organismos en A-ch-ch y 1360 miRNAs en A-br-ch, de los cuales el 56% de los miRNAs son diferentes con la condición control. Lo que sugiere que el perfil de expresión de miRNAs en *P. capsici* se ve modificado cuando tiene historial de infección diferentes, poniendo de manifiesto que los miRNAs son importantes en *P. capsici* para el proceso de adaptación a diferentes especies vegetales.

Fue sorprendente encontrar miRNAs homólogos de organismos tan diversos que van desde mamíferos, plantas, otros oomicetos, aves, insectos, reptiles que comparten procesos biológicos con *P. capsici*. Por ello, los miRNAs son de gran relevancia en los organismos, sin importar que tengan estilos de vida completamente diferentes, estos convergen en relaciones evolutivas de la expresión génica basados en miRNAs.

En el estudio realizado por Cui et al. (2014) también identificaron potenciales miRNAs en *P. infestans* los cuales son homólogos a los reportados en otras especies que incluyen *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, *Gallus gallus*, *Arabidopsis lyata*, *Solanum lycopersicum* como los identificados en esta investigación. En el mismo estudio, Cui et al. (2014) encontraron que los miRNAs de *P. infestans* pi-miR124, pi-miR181 y pimiR281 están altamente conservados en la mayoría de los metazoos, lo que sugiere que los miARN de oomicetos como *P. infestans* y *P. capsici* son tan diversos como los miARN de plantas y metazoos.

El miRNA homólogo a mmu-miR-5124a se expresó mayormente en ambos aislados, lo que podría indicar que es un miRNA importante para procesos basales de *P. capsici*, ya se conoce que este miRNA se expresa altamente en etapas del desarrollo de células de ratón (Spierings et al., 2011).

El análisis de expresión diferencial de miRNAs reportados en miRBase de A-ch-ch y A-br-ch arrojó la sobre-expresión de la familia de ortólogos de miR8788 de *P. ramorum* y *P. infestans* en A-br-ch comparado con el control, ésta familia de miRNAs está relacionada con la patogenicidad en *Phytophthora* al suprimir la expresión permeasas de aminoácidos/auxinas y alfa/beta hidrolasa de papa (StABH1) durante la infección (X. Hu et al., 2022), estos resultados apoyan la idea de modificación de la patogenicidad mediado por miRNAs en *P. capsici*.

Además, se identificó infra expresión de los miRNAs aly-miR774b-5p, mmu-miR-5124a y pal-miR-486a-3-3p en A-br-ch, los cuales están relacionados con el desarrollo celular (Cowled et al., 2014). Es decir, estos miRNAs podrían estar modulando los cambios en el crecimiento observado en los aislados, por lo que cambios en el nivel de expresión de estos miRNAs podrían modificar procesos de desarrollo celular del patógeno, como es la tasa de crecimiento.

6.15 *P. capsici* expresa potenciales miRNAs únicos que regulan diversos procesos celulares del desarrollo, patogénesis y evolución de su genoma

En A-ch-ch se identificaron y clasificaron en familias de genes MIR 155 potenciales miRNAs *de novo* y 288 en A-br-ch, sugiriendo mayor actividad regulatoria en A-br-ch mediado por

potenciales miRNAs que son únicos de *P. capsici* y proponiendo la idea de la presencia de isoformas de miRNAs.

Recientemente, seis pi-miRNAs únicos han sido identificados en *P. infestans* (R. Vetukuri et al., 2012). Esta evidencia sugiere que hay un cierto número de potenciales miRNAs no descubiertos en otros oomicetos como *P. capsici*. En diatomeas y las algas verdes, organismos ancestrales de *P. capsici*, Norden-Krichmar et al. (2011) han identificado miRNAs los cuales no tienen conservación con ningún miARN conocido, lo que sugiere que estos pueden representar una nueva clase de miARN. En el caso de *P. capsici* nuestra evidencia indica que tiene miRNAs conservados con diversas especies, de los cuales algunos son específicos de los oomicetos y otros potencialmente únicos de la especie.

Los potenciales miRNAs *de novo* de A-ch-ch regulan en mayor proporción el gen que codifica para la ribonucleasa H, en menor nivel genes de receptores Toll, metabolismo de carbohidratos, proteínas kinasas. En cambio, los miRNAs *de novo* con mayor nivel de expresión en A-br-ch tienen como potenciales genes target los relacionados con el control del ciclo celular, procesos de replicación, transcripción y traducción, transporte de vesículas, iones y proteínas de membrana. Esto exhibe que el historial de infección por el cual fue sometido el oomiceto conduce de manera predictiva a cambios significativos en los procesos regulatorios mediados por miRNAs.

Estos resultados indican mayor regulación endógena de genes mediado por miRNAs en A-br-ch, los cuales están relacionados con el historial de infección/recuperación al que fue sometido el oomiceto. Es decir, cambios en la expresión de estos miRNAs podrían estar relacionados con el proceso de adaptación/aclimatación de *P. capsici* a varias especies vegetales.

En un estudio realizado por Cui et al. (2014) identificaron potenciales miRNAs en *P. infestans* cuyos potenciales genes targets son diversos que incluyen: proteína quinasa, arginina N-metiltransferasa, hidrolasa de glucósido, helicasa de ARN de caja DEAD/DEAH, superfamilia de cassettes de unión a ATP (ABC), RNA helicasa dependiente de ATP, algunos genes homólogos también se identificaron como potenciales genes target de los miRNAs *de novo* de esta investigación.

En nuestros resultados no se logró identificar potenciales genes target para todos los miRNAs *de novo*. Sin embargo, los estudios sobre miRNAs de animales y plantas han sugerido que los miRNAs de evolución reciente pueden originarse sin una homología diana preexistente y adquirir dianas en el curso de la evolución (M. J. Axtell et al., 2011), es posible que sea el caso para varios miRNAs *de novo* identificados en *P. capsici*.

En bibliotecas de sRNA-seq encontramos las isoformas de los miRNAs A-ch-ch_102 y A-br-ch_214 cuyo potencial target es el gen efector RXLR Avr1b sobre la región 3'UTR, las características termodinámicas predicativas de la estructura secundaria de las isoformas de los miRNAs evidenció la formación del hairpin, por lo cual es muy probable que se trate de un miRNA verdadero. En general, este resultado indica que miRNAs canónicos de *P. capsici* conducen a modificar su virulencia.

En el estudio realizado por Cui et al. (2014), identificaron de manera *in silico* que los potenciales miRNAs pi-miR466f y pi-miR1918 de *P. infestans* se dirigen a genes efectores RXLR, es decir todos estos datos respaldan la idea que los miRNAs son potencialmente importantes en los patógenos para regular genes efectores.

Los resultados de R. Vetukuri et al. (2012) sugieren que la unión de los candidatos a miARN de *P. infestans* a los ARNm objetivo podría ocurrir de una manera más similar a la de los miARN animales, ya que los objetivos para los candidatos a miARN de *P. infestans* se predijeron predominantemente en las UTR y las regiones codificantes, como lo muestran nuestros resultados.

El aislado A-br-ch expresa el miRNA *de novo* A-br-ch_65, el cual potencialmente regula la expresión de la enzima desmetilasa (509113) de *P. capsici*. Estos resultados sugieren la importancia que tienen los miRNAs en la regulación de la expresión de diversas familias de genes. Actualmente, que no existen reportes en el género *Phytophthora* que exploren mecanismos de regulación de reguladores epigenéticos como las desmetilasas basados en miRNAs. Por lo cual, en esta investigación sentamos las bases para proponer que en *P. capsici* existen potencialmente miRNAs que podrían regular procesos epigenéticos como la desmetilación de histonas de manera indirecta a través de la regulación de la expresión de desmetilasas.

En el aislado A-ch-ch, el miRNA *de novo* A-ch-ch_65 tiene como potencial target el gen de la transposasa Tam3 (familia Ac) en el primer exón de la región CDS. En *Antirrhinum*, la transposasa Tam3 (TPasa) puede transcribirse en ARNm y luego traducirse en proteína (Fujino et al., 2011; Uchiyama et al., 2008). Esto nos lleva a plantear la hipótesis que miRNAs de *P. capsici* al regular la expresión de enzimas tan importantes como las transposasas, podrían modular la evolución de los genes y regiones importantes del genoma en el oomiceto en respuesta al historial de especies vegetales de infección/recuperación asociados al proceso de adaptación. En general, estos resultados son bastante interesantes ya que en los oomicetos no se había planteado esta posibilidad de regulación epigenética indirecta, por lo cual esta investigación abre la posibilidad de explorar con mayor profundidad esta área de investigación.

Nuestros resultados indican que el aislado A-ch-ch expresa 4 potenciales miRNAs *de novo* a partir de sRNAs asociados a elementos transponibles y 32 miRNAs *de novo* en A-br-ch. Estos datos sugieren nuevamente que existe mayor regulación epigenética en A-br-ch comparado con A-ch-ch, poniendo de manifiesto que los miRNAs son candidatos importantes como reguladores de la evolución y diversificación del genoma de *P. capsici* sobre en el proceso de adaptación/ aclimatación a diferentes especies vegetales.

La identificación de potenciales miRNAs *de novo* y explorar el papel que pueden tener en diversos procesos celulares, patogenicidad y evolutivos en *P. capsici* demuestran su importancia, por lo cual es interesante continuar profundizando a nivel funcional estos análisis predictivos para generar conocimiento que pueda ser aplicable en estrategias del control de la enfermedad causada por *P. capsici*.

6.16 Existencia predictiva de reinos cruzados de sRNAs de *P. capsici* hacia *C. annuum*

P. capsici tiene sRNAs y miRNAs *de novo* en asociados a regular genes susceptibles de *Capsicum annuum*, relacionados con procesos de transcripción, síntesis de ribosomas, ATPasa, ubiquitinización y TAR1, el cual es un gen involucrado en la estabilidad del mtDNA. Estos resultados sugieren la existencia predictiva de reinos cruzados de sRNAs, en donde *P. capsici* tiene potenciales sRNAs y miRNAs, denominados efectores sRNAs que potencialmente pueden ser transferidos hacia el hospedero chile y regular la actividad de genes del hospedero, que posiblemente mejoran el proceso infectivo.

En *P. infestans* se han identificado candidatos de miRNAs que tienen características de miRNA para plantas y animales, lo cual sugiere de reinos cruzados de RNAi conservado en especies de *Phytophthora* (Bos et al., 2010). Además, Weiberg, Wang, Lin, Zhao, & Zhang (2013) han encontrado que ocasionalmente, sRNAs son capaces de silenciar genes del hospedero que favorecen la virulencia. En *Botritis cinérea*, el perfil de sRNAs de tejidos vegetales infectados han identificado un conjunto de sRNAs (Bc-sRNA) que se predice que se dirigen a genes del huésped en *Arabidopsis* y tomate (Nowara et al., 2010).

En el oomiceto biotrófico *Hyaloperonospora arabidopsidis* también se han identificado sRNAs que guían el silenciamiento del gen objetivo en su planta huésped (Qiao et al., 2021). Sin embargo, no se ha explorado cómo se secretan y translocan estos sRNA desde el patógeno a las células huésped. Por lo tanto, los mecanismos que subyacen al movimiento de sRNAs, que es un proceso central del silenciamiento de genes transespecies, siguen sin estar claros (Qiao et al., 2021), siendo un área interesante para continuar explorando en *P. capsici* en futuras investigaciones.

6.17 Evidencia de memoria epigenética inducida por xeno-miRNAs de *C. annuum* hacia *P. capsici*

Los aislados A-ch-ch y A-br-ch contienen RNAs no codificantes provenientes de *Capsicum annuum*, enriquecidos en la longitud 19-21 nt, lo cual se confirmó de manera *in silico* con el mapeo hacia más de 90 genomas de otros vegetales. Algunos sRNAs específicos de *C. annuum* en A-ch-ch son miRNAs homólogos a Ppe-MIRN2882b y Vvi-MIRN3354, cuyos genes targets de este último están relacionados con proteínas de resistencia. Esto sugiere que *Capsicum annuum* expresa miRNAs en respuesta a la infección de *P. capsici* como posible mecanismo de regulación endógena para evadir factores de virulencia del patógeno. Estos resultados coinciden con las funciones descritas de los miRNAs en plantas como reguladores de la inmunidad contra ataques de patógenos (W. Islam et al., 2017).

En A-ch-ch se identificaron 6 miRNAs *de novo*, en donde el miRNA designado como ch-ch_gchile_000 tiene como potencial gen target CBOT65-G14 (508267) de *P. capsici*, involucrado en el tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular. Es decir, por medio de algún mecanismo (talvez a través de vesículas extracelulares), *Capsicum annuum* transloca miRNAs hacia *P. capsici*, lo que conduce potencialmente a la disminución del tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular del oomiceto como respuesta a la infección. Lo interesante de estas observaciones es que los miRNAs de la planta pueden potencialmente continuar con el efecto regulador sobre el patógeno después de la interacción.

Se ha identificado que sRNAs mejoran la inmunidad de las plantas a través del silenciamiento de genes del patógeno inducido por el huésped (Qiao et al., 2021). El primer ejemplo de transferencia de sRNAs de la planta hacia el patógeno para el silenciamiento de factores de virulencia se denominó HIGS, descrito en planta de algodón como mecanismo de defensa natural contra patógenos no virales como los oomicetos, donde se descubrió que dos miRNAs, miR159 y miR166, silenciaban los genes relacionados con la virulencia en el patógeno fúngico *V. dahliae* (T. Zhang, Zhao, et al., 2016). Los mutantes de *V. dahliae* con Clp-1 o HiC-15 desactivados mostraron una virulencia reducida, lo que concuerda con la hipótesis que miR159 y miR166 producidos por las plantas de algodón infectadas ingresaron a las células fúngicas invasoras y desencadenaron la escisión de las transcripciones de patógenos específicos que se requieren para la virulencia (T. Zhang, Jin, et al., 2016; T. Zhang, Zhao, et al., 2016).

Además, fue descrito por Hou et al. (2019) que un grupo de siRNA secundarios derivados de un subconjunto de transcripciones de genes PPR de *A. thaliana* pueden potencialmente apuntar a múltiples genes asociados con la esporulación y la virulencia de *P. capsici*.

Los potenciales miRNAs de *C. annuum* detectados en A-ch-ch y A-br-ch, son en realidad potenciales xeno-miRNAs, los cuales son definidos como microRNAs que se originan a partir de especies exógenas detectadas en otro organismo. Un número creciente de estudios ha sugerido que muchos de estos xeno-miRNAs pueden estar involucrados en interacciones y manipulaciones entre especies. Hasta la fecha, se han informado cientos de xeno-miRNAs en varios organismos (Fan et al., 2018), incluidos humanos (L. Zhang et al., 2012), ratones (L. Zhang et al., 2012), cerdos (Luo et al., 2017), panda (Ma et al., 2017) y gusanos de seda (L. Jia et al., 2015).

Chin et al. (2016) encontraron miRNAs de plantas que naturalmente pueden transferirse y mantenerse estables en las células de los cuerpos de los animales, ya que encontraron que el miR159 de plantas, es capaz de transferirse a células de cáncer de mama humano y mantenerse. Sin embargo, los descubrimientos de Masood et al. (2016); Y. Zhang et al. (2012) sugieren que existe absorción selectiva de miRNAs de plantas por parte de los animales. Es decir, sólo miRNAs de plantas con una secuencia específica son absorbidos por especies específicas de animales. Además, J. Yang et al. (2016) sugirieron que no todos los miRNAs, pero si algunos miRNAs de plantas con ciertas características podrían mantenerse estables en el tracto gastrointestinal de los animales, por lo cual es importante realizar este tipo de análisis en posteriores estudios de la interacción *P. capsici*-planta basados en miRNAs para conocer el mecanismo por el cual miRNAs de la planta son “seleccionados” por el patógeno y como es que los miRNAs de la planta se mantienen en el oomiceto después del proceso de patogénesis.

Continuamente, se han propuesto nuevas hipótesis sobre miRNAs extracelulares, por ejemplo, miRNA exosomal (Camussi et al., 2011; Turchinoyich et al., 2016), miARN circulante (X. Chen et al., 2008; Witwer, 2015) y miRNA exógeno (xenomiR) (Witwer & Zhang, 2017; L. Zhang et al., 2012), por lo cual esta investigación abre la posibilidad de continuar explorando esta fascinante actividad regulatoria entre reinos de *P. capsici* con varias especies vegetales y viceversa.

6.18 Evidencia de herencia epigenética transgeneracional en *P. capsici* inducido por sRNAs y miRNAs exógenos del hospedero primario

En el aislado A-br-ch se encontraron poblaciones de sRNAs mayormente de 18-20 nt del aislado primario (brócoli), comprobados *in silico* por tener mayor conservación con *Brassica oleracea* al compararlos con más de 90 genomas plantas. Estos sRNAs provienen principalmente de regiones mitocondriales, del gen que codifica para la ubiquitina E3 ligasa y factor de elongación Tu de cloroplasto de la planta brócoli, de los cuales 6 tipos fueron identificados como miRNAs.

En general, los resultados sugieren que el aislado primario transfiere sRNAs y miRNAs a *P. capsici*, los cuales son heredados a la siguiente generación, contribuyendo a potenciales cambios en el oomiceto. Esto podría explicar, parte de los cambios observados sobre su patogenicidad, plasticidad fenotípica cuando infecta varias especies vegetales a través de las generaciones cuando el hospedero primario es brócoli. Es decir, estos resultados predictivos sugieren la existencia de posible herencia epigenética transgeneracional mediada por sRNAs y miRNAs en *P. capsici* inducida por *Brassica*.

La herencia epigenética transgeneracional mediada por sRNAs se informó recientemente en *C. elegans*, donde se demostró que la descendencia de cepas expuestas a dsRNA tenían modificaciones de cromatina directas en el sitio objetivo y generaban más sRNAs en generaciones posteriores (N. O. Burton et al., 2011; Castel & Martienssen, 2013). Además, el estado silenciado pudo mantenerse en la progenie y transmitirse a través de generaciones incluso en ausencia del disparador original de dsRNA. Existen vías similares de herencia epigenética en *Drosophila* y *Arabidopsis* (Cecere, 2021), por ello, creemos que mecanismos similares podrían operar en *P. capsici*.

T. Zhang, Zhao, et al., (2016), encontraron evidencia de herencia epigenética, a través de la identificación de los miR159 y miR166 de la planta de algodón hacia hifas del hongo *V. dahliae* en la siguiente generación, como lo encontrado en esta investigación

Cecere, (2021) informó que la herencia de los RNA pequeños puede ocurrir de una generación a otra a lo largo de múltiples generaciones. Sin embargo, Grishok et al. (2000) y Gu, Pak, et al. (2012) indican que la herencia epigenética no es permanente, y el gen silenciado que es el objetivo del RNAi restaura su expresión después de algunas generaciones, por lo cual múltiples factores pueden influir en la duración transgeneracional de la respuesta de RNAi.

El mecanismo por el cual los miRNAs heredados pueden ejercer funciones epigenéticas prolongadas a lo largo de múltiples generaciones no está claro, especialmente considerando la ausencia de cualquier mecanismo de amplificación (Cecere, 2021). Por lo cual, la pregunta fundamental es qué protege a los sRNA entre reinos de la degradación. En los mamíferos, los sRNAs extracelulares a menudo se asocian con complejos de proteínas protectoras de ARN y/o se encapsulan en vesículas extracelulares evitando ser degradados (Mittelbrunn & Sanchez-Madrid, 2012; M. Wang et al., 2015).

Se desconoce el mecanismo por el cual los sRNAs y miRNAs de la planta podrían continuar en la siguiente generación en *P. capsici*, una alternativa podría ser mediante un

comportamiento similar a los sRNAs de viroide (vd-sRNA), ya que son una clase única de sRNA que se acumulan dentro del huésped y conducen a la interrupción de la expresión genética y al establecimiento de la infección a través de su diseminación sistémica (Ding, 2009; Ding & Itaya, 2007). Estos vd-sRNA se replican dentro del núcleo a través de círculos rodantes con la participación activa de complejos intermedios de RNA de doble cadena (J.-A. Navarro et al., 1999; OWENS, 2007).

Otra posibilidad es por medio de la presencia de elementos especializados en su conservación, como es el caso de enzimas HRDE-1, en donde N. Burton et al. (2011) encontraron que en mutantes de HRDE-1 de *C. elegans* no pueden heredar la respuesta de RNAi, lo que indica que se requiere HRDE-1 para las respuestas hereditarias de RNAi (Buckley et al., 2012). En el mismo organismo modelo han encontrado que se requiere la enzima NRDE-3 para transmitir el silenciamiento de RNAi hereditario en las células somáticas de animales F1 no expuestos a dsRNA en la línea germinal (N. Burton et al., 2011), por lo cual es importante la búsqueda de proteínas homologas en *P. capsici* para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de herencia epigenética transgeneracional basado en sRNAs.

Otra alternativa, para explicar la herencia epigenética transgeneracional en *P. capsici*, es por medio de la actividad de la enzima RDR, ya que los RNA pequeños, en particular los RNA de interferencia pequeños (siRNA) y los RNAs que interactúan con Piwi (piRNA), son fundamentales para muchos de los paradigmas de herencia epigenética transgeneracional mejor establecidos, como la paramutación y la interferencia del RNA (RNAi). En estos sistemas, los niveles de RNAs pequeños generalmente se mantienen mediante un mecanismo que involucra RNA polimerasa dependiente de ARN (RDR): los RNAs pequeños estimulan la copia dependiente de RDR de transcritos más largos del huésped, después estos transcritos se procesan para producir varias especies de RNA secundario que se mantienen. Por lo cual, la mutación de los genes que codifican RDR impide el silenciamiento epigenético estable en muchos sistemas de herencia transgeneracional (Bošković & Rando, 2018).

Vastenhouw et al. (2006), demostraron que la introducción de sRNAs exógenos hacia *C. elegans* mediante la alimentación tuvieron un efecto regulador el cual duró varias generaciones y que además estos dsRNAs fueron capaces de viajar a través de tejidos y órganos somáticos hasta la línea germinal y a través de los gametos hasta las próximas generaciones del nemátodo. Por ello, otra posibilidad es la migración de sRNAs y miRNA a sitios celulares que sean heredables, como es el caso de los esporangios y zoosporas de *P. capsici*.

La absorción transgeneracional de sRNAs y miRNAs identificados en A-br-ch podría ser explicada a través de enzimas especializadas del patógeno, ya que McEwan et al. (2012); Winston et al., (2007b) han documentado que los dsRNA exógenos liberados por las bacterias hacia *C. elegans* son transportados dentro de las células por la proteína SID-2 a través de la endocitosis. También demostraron que la liberación de los dsRNAs en el citosol de las células intestinales y la propagación de dsRNA a otros tejidos u órganos está mediada por la proteína transmembrana SID-1, la cual es selectiva para dsRNA (Feinberg & Hunter, 2003; McEwan et al., 2012). Por lo tanto, SID-1 participa tanto en la liberación como en la captación de dsRNA en las células del donante y del receptor. Es importante explorar la existencia de proteínas homólogas con función similar en *P. capsici* para profundizar en el conocimiento del reino cruzado de sRNAs y miRNAs sobre la herencia epigenética transgeneracional.

Creemos que los sRNAs y miRNAs de *Brassica* encontrados en A-br-ch podrían ser translocados desde el aislado primario al patógeno por medio de vesículas extracelulares, entonces mediante un mecanismo desconocido permanecen los sRNAs en el oomiceto, y son heredados a la siguiente generación. Posiblemente mediante un mecanismo de autorreplicación de sRNAs desconocido que les permita mantenerse en *P. capsici*, incluso mediante la migración de algunas proteínas de unión a RNA que probablemente pueden proporcionar estabilidad, y ayudar a la replicación de los mismos, o por medio de la utilización de enzimas propias del patógeno para autorreplicarse, por ejemplo vía RDR y generar sRNAs secundarios. También, esto podría ser explicado, por medio del alojamiento de sRNAs y miRNAs exógenos en comportamientos celulares específicos, que les permitan su estabilización, replicación y mantener una potencial actividad reguladora en el oomiceto, incluso mediante la acción de enzimas y mecanismos aún desconocidos.

Por ello, es necesario realizar futuras investigaciones que profundicen en algunos de estos posibles mecanismos de mantenimiento de sRNAs y actividad reguladora a través de las generaciones, para dilucidar cuáles son los mecanismos moleculares subyacentes de la exportación de sRNA desde una célula vegetal y la absorción a la célula del patógeno, ¿cómo se mueven los sRNA a través de diversos límites celulares?, el mecanismo de herencia de los sRNAs y miRNAs exógenos y su papel en la adaptación de *P. capsici* a varias especies vegetales a través de las generaciones.

6.19 *P. capsici* codifica enzimas centrales en la biogénesis, transporte y procesamiento de sRNAs y miRNAs en su genoma

El análisis de genómica comparativa indicó que *P. capsici* codifica dos genes dicer-like (DCL α y DCL β), un gen exportina 5 (Exp5A), seis genes argonautas (AGO-A, AGO-B, AGO-C, AGO-D, AGO-E y AGO-F) y una RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR) con los dominios funcionales característicos para cada enzima. Estos resultados sugieren que en *P. capsici* existen mecanismos epigenéticos basados en RNAs no codificantes que son canónicos a los reportados en diversos organismos, como mamíferos, plantas, humanos, insectos, hongos y otros oomicetos patógenos (Pabón-Martínez, 2011).

La identificación de estas enzimas es de gran importancia para el estudio de *P. capsici* ya que anteriormente no se habían descrito en este organismo, lo cual abre la posibilidad de profundizar en el estudio de estas enzimas mediante el análisis de expresión y función para conocer su papel sobre el proceso de adaptación/ aclimatación a diferentes especies vegetales del chromista.

En *P. infestans*, *P. sojae* y *P. ramorum* también se han identificado dos DCL y una RDR (Bollmann et al., 2016; Fahlgren et al., 2013), sugiriendo la conservación e importancia de estas enzimas entre los oomicetos patógenos. Hasta el momento de la escritura de esta investigación no se había descrito una enzima exportina-5 entre los oomicetos patógenos, la identificación del homólogo Exp5A en *P. capsici* conduce a ampliar el conocimiento sobre las vías de regulación epigenéticas en los oomicetos que faltan por explorar.

P. infestans, *P. ramorum*, *P. sojae* y *P. parasítica* codifican cinco, seis, nueve (Bollmann et al., 2018) y cinco (Xu et al., 2022) genes AGO, respectivamente, en cambio *P. capsici* codifica seis genes AGO, sugiriendo actividades funcionales conservadas y específicas entre las enzimas de cada especie.

La identificación de los genes DCL, Exp5, AGO y RDR conducen a explicar de manera consistente la identificación de sRNAs y miRNAs expresados por *P. capsici* en las bibliotecas de secuenciación de sRNA-seq, las cuales sugerían que el oomiceto debería tener algunas de estas enzimas claves de biogénesis, transporte y procesamiento de RNAs pequeños.

6.20 Las enzimas DCL de *P. capsici* están relacionadas filogenéticamente con otros oomicetos

P. capsici tiene las enzimas DCL α y DCL β , en donde la primera tiene mayor relación filogenética con DCL1 de *P. infestans* y *P. sojae*, en menor relación con Dicer de *D. melanogaster* y *H. sapiens*. En cambio, DCL β tiene mayor similitud con DCL2 de *P. sojae* y *P. infestans*, a su vez este grupo se encuentra relacionado con las proteínas Drosha de *D. melanogaster* y *H. sapiens*.

Nuestros resultados coinciden con los análisis filogenéticos realizado por Bollmann et al. (2018) de DCL1 y DCL2 en varias especies de *Phytophthora*, los cuales revelaron tener un origen evolutivo divergente. Además, nuestros resultados indican que las proteínas DCL se encuentran conservadas entre los principales oomicetos, sugiriendo entonces una función similar por clado. De acuerdo a la topología de la reconstrucción filogenética, DCL α al asociarse con DCL1 de *P. infestans* y *P. sojae* sugiere que se trata de una potencial proteína homóloga cuya función en *P. infestans* se conoce está relacionada con la biogénesis de sRNAs de 21 nt en la vía de miRNAs (R. R. Vetukuri et al., 2012a).

Es decir, creemos que DCL α es responsable de la biogénesis de miRNAs, en cambio DCL β al asociarse con DCL2 de *P. infestans* y *P. sojae* las cuales potencialmente llevan a cabo la biogénesis de sRNAs de 25 nt, de la vía del RNAi (Bollmann et al., 2016), estos resultados sugieren que DCL β podría ser la enzima encargada en la biogénesis de sRNAs de 25 nt en *P. capsici* que se encontraron en los análisis de sRNA-seq. Sin embargo, es necesario realizar experimentos adicionales para el esclarecimiento de la función de ambas enzimas.

La topología del árbol sugiere que el par de proteínas son características de los oomicetos *Phytophthora*, ya que fueron lejanamente relacionadas con los grupos de Drosha y Dicer de *D. melanogaster* y *H. sapiens*, así como de DCL 1-4 de *A. thaliana*. En concreto, existen relaciones evolutivas entre las familias de proteínas DCL, Dicer y Drosha entre organismos con funciones potencialmente específicas pero similares.

Nuestros resultados predictivos (ANEXO 43) indican que DCL α se localiza en el núcleo y DCL β en las mitocondrias. Éste último contrasta con lo encontrado en *P. sojae* y *P. infestans*, ya que Nakai & Horton (1999) y Bollmann et al. (2016), encontraron que DCL1 y DCL2 de ambos oomicetos están localizados en el núcleo, por lo cual es necesario realizar futuras investigaciones para validar la localización subcelular de DCL α y DCL β en *P. capsici*.

6.21 La exportina-5A de *P. capsici* está relacionada con homólogas de otros oomicetos

La reconstrucción filogenética de la exportina 5A de *P. capsici* reveló que se aloja en el clado con mayor diversidad de especies *Phytophthora*, con mayor similitud a la Exp5 de *P. cactorum*, seguida del grupo conformado por *P. parasítica*, *P. nicotianae* y *P. infestans*. También, se encontró que Exp5A de *P. capsici* y en general de los oomicetos, está separada filogenéticamente de los mamíferos, lo que sugiere características específicas entre las Exp5 de mamíferos y el género *Phytophthora*. Sin embargo, su origen evolutivo no está esclarecido completamente, por lo cual proponemos realizar análisis filogenéticos con la adición de organismos diversos para profundizar en el conocimiento de los orígenes evolutivos de Exp5 en *P. capsici*.

En mamíferos, la exportina 5 es una proteína miembro de la familia de las carioferinas encargada de transporte nuclear de miRNAs a través del poro nuclear, desde el núcleo hacia el citoplasma en la presencia del cofactor Ran-GTP44 (Pabón-Martínez, 2011). El estudio de Bollmann et al. (2016) mostró que DCL1 y DCL2 se localizan en el núcleo y algunas proteínas argonautas en el citoplasma, abriendo la posibilidad que la función de la Exp5A sea el transporte de sRNAs del núcleo al citoplasma en *P. capsici* y demás especies de oomicetos.

6.22 *P. capsici* tiene seis enzimas argonautas relacionadas con otros oomicetos

Las seis AGO de *P. capsici* están separadas en dos principales grupos. En el clado I se encuentra AGO-A, relacionada mayormente con AGO-1 de *P. infestans*, *P. palmivora* y *P. megakarya*, y el parálogo AGO-2 de *P. infestans*. En el clado II se encuentran las restantes cinco AGO de *P. capsici*, caracterizado por su diversidad al incluir distintas AGO de otras especies de *Phytophthora*. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Bollmann et al. (2018), ya que encontraron que las proteínas AGO de diferentes oomicetos *Phytophthora*, están separados por dos clados principales, en el clado I que consta principalmente de homólogos únicos de AGO1 de cada especie. Las excepciones son *P. infestans*, que tiene dos homólogos casi idénticos. Y el clado II conformado por el resto de AGO de los oomicetos.

AGO-C y AGO-D de *P. capsici* se encontraron en un clado independiente, con bastante cercanía, sospechando que se trata de proteínas parálogas con la probabilidad que alguna de las dos no se exprese o no sea funcional. En cambio, AGO-E de *P. capsici* tiene mayor relación con AGO-5 *P. megakarya*, que a su vez se relacionan con el clado de AGO-5 de *P. infestans* seguido de AGO-2 *P. rubi*. Estos resultados sugieren que la diversidad de secuencia existente en las proteínas argonautas en *P. capsici* y otras especies de oomicetos presumiblemente podría conducir a funciones especializadas, estando implicadas en diferentes vías de regulación génica mediadas por sRNAs.

Los hallazgos de Ásman et al. (2016) y Xu et al. (2022), sugieren que en *Phytophthora*, las proteínas del clado AGO I pueden ser específicas para la clase de sRNAs de tamaño más pequeño (miRNAs), y las proteínas del clado AGO II pueden ser específicas para la clase de tamaño de sRNAs más grande (siRNAs), lo cual podría aplicar a *P. capsici*.

Nuestros resultados predictivos sugieren que las seis AGO de *P. capsici* se localizan en el citoplasma, lo cual es consistente con lo encontrado por Ásman et al. (2016). Sin embargo, se

sugiere realizar experimentos adicionales para demostrar experimentalmente la localización subcelular experimental de AGOs en *P. capsici*.

6.23 La RDR de *P. capsici* se agrupa en un clado separado entre los oomicetos

La RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR) de *P. capsici* presentó la mayor divergencia entre los oomicetos al ubicarse en un clado separado del resto de las especies *Phytophthora* analizadas, lo que sugiere diferencias en las secuencias en las RDRs entre los oomicetos. Sin embargo, no está claro si estas diferencias pueden conducir a especificidad en la función de las RDR, para ello es necesario realizar experimentos adicionales.

En mamíferos, la RDR es responsable de la biogénesis de sRNAs secundarios utilizando ssRNA como plantillas que AGO no degrada completamente del RNAm, entonces la RDR recrea un dsRNA del RNAm diana y DCL procesa nuevamente en siRNAs, para ser cargados a RISC y por medio de AGO potenciar el silenciamiento génico (Axtell et al., 2006).

En especies de oomicetos como *P. infestans* (R. R. Vetukuri et al., 2013), *P. sojae* y *P. ramorum* su genoma codifican una sola proteína RDR (Fahlgren et al., 2013) al igual que en *P. capsici*. En cambio, se ha reportado que el hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* codifica tres RDR y *A. thaliana* tienen seis homólogos de RDR (Jin et al., 2019), lo que sugiere que las RDR podrían cumplir funciones específicas en los diferentes organismos, así como de vías de regulación génica únicas entre los seres vivos.

El análisis filogenético en varios oomicetos *Phytophthora* del dominio característico de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) sugiere que el ancestro común de los oomicetos tenía un solo gen RDR (Fahlgren et al., 2013), el cual no se ha perdido entre las especies de *Phytophthora*. Esto sugiere que la RDR que es una enzima importante para los oomicetos incluido *P. capsici*, por ello es importante realizar análisis funcionales, ya que se desconoce el papel experimental de la RDR en *P. capsici* y varios oomicetos.

Estos resultados son importantes debido a que anteriormente no se había reportado alguna RDR en *P. capsici*. Además, que también se identificó por primera vez enzimas RDR que tampoco habían sido reportadas en otros oomicetos como *P. megakarya*, *P. cinammomi*, *P. rubi* y *P. nicotianae*. Así mismo, se encontró que los genomas de *P. kernoviae* y *P. palmivora* no codifican homólogos de RDR, abriendo la posibilidad a nuevas preguntas de investigación, acerca de eventos de pérdida y mantenimiento de la RDR entre especies de *Phytophthora*.

6.24 Las enzimas centrales de biogénesis, transporte y procesamiento de sRNAs se expresan significativamente entre varios aislados de *P. capsici*

Los análisis de expresión relativa de los genes DCL α , DCL β , Exp5A mostraron niveles variables de expresión en micelio de D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch, lo que sugiere disminución de la biogénesis y transporte de sRNAs en el oomiceto comparado con el control. En *P. infestans* (R. R. Vetukuri, Avrova, et al., 2011) y *P. sojae* (Bollmann et al., 2018) también se han realizado experimentos de expresión de los genes DCL1 y DCL2 en micelio, mostrando niveles de expresión estables. Lo cual apoya la idea que el hospedero e historial de infección en *P. capsici* conducen a cambios significativos en la expresión de DCL α , DCL β y Exp5A.

Nuestros resultados de expresión sugieren que AGO A, B, D, E y F son importantes en *P. capsici* al identificar variación en su expresión entre los tratamientos evaluados. Lo que además sugiere función diferente entre las distintas AGO.

En micelio de *P. sojae* Bollmann et al. (2018), también encontraron variación en la expresión de los niveles de transcripción y los patrones de los diversos genes AGO (AGO 1, AGO 3, AGO 5, AGO 6, AGO 8) resaltando aún más las divergencias en la función potencial entre los genes AGO. También en *P. infestans* Åsman et al. (2016) realizaron análisis RT-qPCR, midiendo el nivel de expresión de PiAGO1, PiAGO3, PiAGO4 y PiAGO5, encontrando variación en la expresión relativa de sus AGO.

El papel de la expresión de las enzimas AGO fue reportado Xu et al. (2022) sobre el aumento de la virulencia de *P. parasítica*, en donde mutantes PpAGO3 está relacionada con la expresión activada de los genes efectores regulados por sRNAs. En conjunto, los resultados de Xu et al. (2022) proporcionaron pruebas convincentes de que PpAGO3, junto con sRNA de 25–26 nt, desempeñan un papel importante en la virulencia. Por ello, proponemos que los cambios observados en los niveles de expresión en las distintas AGO de *P. capsici* están relacionadas con la regulación de genes mediante sRNAs que modulan la virulencia de los aislados del oomiceto, en donde la especie vegetal e historial infectivo inducen estos cambios y/o es la forma de adaptación de *P. capsici* a diferentes hospederos.

Por su parte, en el reporte de Bollmann et al. (2018) encontraron que RDR de *P. sojae* se expresa en micelio como lo encontrado en esta investigación. Sin embargo, identificamos variación en la expresión del gen debido a los tratamientos evaluados ya que sugieren que brócoli inducen el aumento de la expresión de RDR.

Estos experimentos de expresión relativa son de gran relevancia ya que anteriormente su expresión no se había reportado en *P. capsici*, por lo cual el siguiente paso es realizar experimentos funcionales de estas enzimas.

6.24.1 El hospedero e historial de infecciones reducen la expresión de DCL α en aislados de *P. capsici*

Los análisis de expresión de DCL α en micelio de *P. capsici*, sugieren que la enzima es funcional ya que se evidenció su expresión, la cual varió entre los tratamientos evaluados. Los resultados también indican que cuando *P. capsici* tiene periodos largos sin infectar alguna especie vegetal, la regulación génica mediada por DCL α es mayor que después de infectar/ser recuperado de infecciones primarias y secundarias. Esto podría ser porque *P. capsici* D3 tiene los medios óptimos para crecer en placa Petri, la cual está adicionada con nutrientes provenientes de varios vegetales, entonces tal vez sólo requiere expresar algunos genes claves para su crecimiento y desarrollo, por ello podría regular la expresión de genes que no requiere en ese momento influenciado por DCL α .

En cambio, en aislados primarios y secundarios los resultados sugieren relajación de la regulación de la expresión génica. Sin diferencias significativas en la expresión del gen DCL α entre los aislados obtenidos de infectar chile, brócoli y br-ch, lo cual indica que cambios en la

expresión de DCL α no está directamente influenciada por el tipo de especie vegetal del cual se recuperó el oomiceto.

En A-ch-ch se encontró disminución significativa de la expresión del gen comparado con el resto de tratamientos, sugiriendo que la influencia de consecutivas infecciones del patógeno en chile lo llevan a disminuir aún más la expresión de la enzima, lo que podría desencadenar aumento de la expresión de genes comparado con la infección primaria en chile.

Además, se observó que el historial de infección/recuperación al que fue sometido el oomiceto en diferentes especies vegetales lo lleva a presentar cambios significativos en el nivel de expresión del DCL α , como es el caso comparativo entre los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch, en donde el patógeno responde de manera diferente, expresando significativamente mayor la enzima en A-br-ch. En general, los datos de expresión concuerdan los resultados obtenidos en las bibliotecas de sRNA-seq en donde se encontró mayor nivel de expresión de sRNAs en A-br-ch comparado con A-ch-ch, los cuales podrían estar influenciados por la expresión de DCL α .

6.24.2 El hospedero e historial de infecciones disminuyen el nivel de expresión de DCL β en *P. capsici*

El mayor nivel de expresión del gen DCL β se encontró en el control D3 y disminuyó significativamente en los aislados obtenidos de las infecciones primarias y secundarias, lo cual fortifica la idea de relajación de la regulación de la expresión génica mediada por sRNAs en *P. capsici* después de ser aislado del patosistema.

Se identificaron diferencias significativas de expresión en DCL β cuando el patógeno es aislado de infecciones primarias de chile y brócoli, en este último su expresión es significativamente mayor que A-chile, lo cual pone en manifiesto que la especie vegetal de la cual se recupera el patógeno tiene influencia sobre la expresión del gen.

Se mostró el mismo nivel de expresión de DCL β en la línea de *P. capsici* recuperado de infección primaria y secundaria de chile. Es decir, ya sea que *P. capsici* fuera recuperado de una primera o segunda exposición de infección en chile, el nivel de expresión del gen es similar. Esto podría indicar que la influencia de chile como hospedero del cual se recuperó el oomiceto está fuertemente relacionada con los mecanismos moleculares de regulación de la expresión génica basado en sRNAs.

Al comparar los niveles de expresión del gen DCL β en los aislados A-chile y A-ch-ch con aquellos obtenidos bajo una influencia de brócoli (A-brócoli y A-br-ch), se logra observar que el nivel de expresión del gen es significativamente menor en el primer par (A-chile y A-ch-ch), esto supone que en la línea de infección en chile existen cambios en la regulación de la expresión de genes basado en sRNAs en comparación con la línea de infectar brócoli y que además su expresión permanece relativamente similar por línea vegetal.

Al comparar los perfiles de expresión entre los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch, nuevamente se logra observar que el historial de hospederos que infecta/es recuperado *P. capsici* conducen a cambios en la expresión del gen, en A-ch-ch el gen se expresa menos en

comparación a A-br-ch. Es decir, el patógeno desactiva la expresión del gen lo que en consecuencia conduciría al aumento de la expresión de genes, potencialmente para aclimatarse/adaptarse a la especie vegetal.

Estos resultados coinciden con los datos de secuenciación, en donde se observó mayor abundancia de sRNAs de 25nt nt en A-br-ch comparado con A-ch-ch, lo cual pone de manifiesto que el hospedero que infecta el oomiceto así como el historial de infección conducen a cambios en el comportamiento de la regulación de la expresión génica basada en sRNAs en *P. capsici*.

6.24.3 El hospedero e historial de infección/aislamiento de *P. capsici* producen disminución en la expresión de Exp5

Se conoce que la actividad de la exportina 5 en organismos como *Xenopus tropicalis* está asociada con el transporte de sRNAs del núcleo hacia el citoplasma para ser reconocidos por proteínas argonautas y llevar a cabo la regulación génica (BOHNSACK et al., 2004). La expresión relativa de exportina 5A, exhibió un patrón de expresión similar a DCL β , es decir, fue significativamente mayor en D3 (control) que en los aislados obtenidos de infecciones primarias y secundarias, lo cual refuerza la idea que sugiere disminución de la síntesis y transporte de sRNAs en *P. capsici* después de ser recuperado de infecciones primarias y secundarias, lo cual potencialmente podría causar el aumento del nivel de expresión de genes relacionados con el proceso de adaptación/aclimatación a especies vegetales.

Al comparar el nivel de expresión de la exportina 5A entre los aislados primarios obtenidos de chile y brócoli se evidenciaron diferencias significativas ente los tratamientos, en donde se encontró que en A-chile disminuye significativamente su expresión en comparación con A-brócoli. En otras palabras, cambios en el nivel de expresión del gen sobre el transporte de sRNAs podría estar influenciado por la especie vegetal del cual se recuperó el oomiceto.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de la exportina 5A cuando el oomiceto es recuperado de una infección primaria o secundaria de chile, lo cual indica la existencia de un posible patrón de expresión del gen asociado al transporte de sRNAs con respecto a la especie vegetal (chile) de la cual se recuperó el oomiceto, ya que su expresión tiende a ser significativamente menor con respecto a los aislados obtenidos de infección en A-brócoli y A-br-ch.

En general, los datos sugieren relajación de la regulación de expresión génica influenciada por el hospedero (chile) a través del transporte de sRNAs. Al comparar el perfil de expresión de la exportina 5A entre los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch, se muestra el mismo patrón de expresión que en DCL α y DCL β . Esto es, disminución significativa de la expresión en A-ch-ch con respecto a A-br-ch, lo que sugiere que existe una influencia marcada en la expresión del gen con respecto al historial de hospederos que infecta el patógeno, estos datos de expresión sugieren que en A-ch-ch existe menor regulación de la expresión génica y en consecuencia potencialmente *P. capsici* expresa más genes comparado con A-br-ch.

El nivel de expresión de la exportina 5A cuando el oomiceto es recuperado de una infección de A-brócoli y A-br-ch tiende a ser similar (no presenta cambios significativos), lo cual indica

en el caso de A-br-ch que el hospedero primario puede contribuir a cambios en el comportamiento del oomiceto sobre la expresión del gen en la siguiente generación clonal al infectar un hospedero distinto (chile), indicando que el hospedero primario (brócoli) conduce a una posible herencia epigenética sobre la expresión de la exportina 5.

En resumen, los datos de expresión relativa de DCL α , β y exportina 5A indican una posible correlación en su expresión sobre los aislados D3, A-chile, A-ch-ch y A-br-ch de *P. capsici*. Ya que después que el oomiceto es recuperado de infecciones primarias y secundarias, disminuye significativamente la expresión de estos genes, aumentando potencialmente la expresión de genes que antes de infectar alguna especie vegetal no se encontraban activados.

6.24.4 El nivel de expresión relativa de genes argonautas cambia por el historial de infección y hospederos

El análisis de la expresión relativa de los cinco genes argonautas evaluados en la cepa control D3 y los aislados de *P. capsici* obtenidos de infecciones primarias de chile y brócoli (A-chile, A-brócoli), así como de los derivados de infecciones secundarias A-ch-ch, A-br-ch mostraron que son susceptibles a cambios significativos en su expresión por la influencia del hospedero e historial infectivo, ya que se encontró que sólo el hospedero chile induce aumento significativo de la expresión de AGO-A.

En cambio, en AGO-B, AGO-D, AGO-E y AGO-F, se observó la tendencia que cuando *P. capsici* tiene periodos largos sin infectar o interactuar con hospederos, la expresión de los genes es relativamente elevada, como posible mecanismo para controlar o administrar la expresión de genes. Sin embargo, cuando el oomiceto es recuperado de infectar en una primera o mezcla de hospederos como chile y brócoli, lo conduce generalmente a disminuir la expresión de los genes comparado con el control, con algunas excepciones. Esto sugiere que aumenta la actividad génica del oomiceto, basada en la disminución de la expresión de genes argonautas.

Es decir, la expresión de los genes argonautas está influenciada por el hospedero a través de una memoria e incluso una posible herencia epigenética, lo cual podría generar que el oomiceto se encuentre “alerta” para que se reactiven procesos celulares que antes de la interacción no estaban en funcionamiento.

De manera particular, cada gen argonauta muestra un patrón característico de expresión poniendo de manifiesto una posible funcionalidad específica para cada gen argonauta analizado.

Por todo lo anterior, creemos que la expresión de los genes argonautas son importantes en el proceso de adaptación/ aclimatación en *P. capsici*. Ya que el aumento de la expresión de AGO-D es inducida por brócoli y disminuida por chile. En cambio, el nivel de expresión de AGO-E disminuye dependiente del hospedero e historial de infección/aislamiento y la expresión AGO-F disminuye significativamente en aislados primarios y secundarios de *P. capsici*.

No se identificó evidencia de expresión de AGO-C a partir de cDNA de *P. capsici*, sin embargo, se encontró amplificación a partir de DNA genómico. Esto indica que el gen no es potencialmente funcional, debido probablemente a la falta de componentes necesarios para su

expresión, o bien de acuerdo al análisis filogenético, AGO-C al ser ortólogo de AGO-D, es probable que el genoma de *P. capsici* albergue dos versiones del mismo gen argonauta (AGO-C y AGO-D) en donde sólo AGO-D es el gen funcional, al encontrar evidencia experimental de su expresión.

Se encontró un patrón de expresión de AGO-D que indica que si el último hospedero del cual se recuperó el oomiceto es chile, sin importar las ocasiones que lo infectó o el historial de infección de dos generaciones, el nivel de expresión de AGO-D tiende a disminuir significativamente comparado con el control. Es decir, la expresión de AGO-D está fuertemente influenciada por el hospedero inmediato anterior del cual se obtuvo el oomiceto como parte de una posible memoria epigenética, ya que en el momento del análisis de expresión génica el oomiceto no se encontraba directamente en interacción con el hospedero, por lo que éste podría ser capaz de generar cambios en el comportamiento en forma de recuerdo o “memoria” epigenética influenciado por el ambiente, es decir el hospedero.

Los datos de expresión de genes argonautas en *P. capsici* son de gran importancia e interés ya que se desconocía sobre su implicación sobre el oomiceto, por lo que ahora es conocido que el patógeno tiene plasticidad genotípica inducida por el hospedero a través de cambios en la expresión de genes argonautas, por medio de su regulación basada en RNAs no codificantes.

Los patrones de expresión de los genes argonautas sugieren una posible correlación expresión con genes de biogénesis DCL α , DCL β y Exp5A, lo cual podría indicar que *P. capsici* tiene redes complejas de regulación génica colaborativas en la patogenicidad, desarrollo y adaptación/aclimatación del patógeno a diversos hospederos. Esto lo convierte en un organismo interesante de continuar estudiando, ya que se desconocen diversos procesos que podría utilizar para continuar habitando un determinado nicho ecológico.

6.24.5 Brócoli induce el aumento significativo de la expresión de RDR en *P. capsici*

P. capsici no mostró diferencias significativas en la expresión de RDR en tres tratamientos y el control D3, sin embargo, en A-brócoli se observó aumento significativo. Esto indica que el hospedero brócoli influye sobre a cambios reveladores en la expresión del gen.

Nuestros resultados sugieren la posibilidad que brócoli podría transferir RNAs no codificantes a *P. capsici*, lo que conduce a la generación de dsRNAs secundarios a través de la expresión de la RDR como mecanismo para regular sRNAs exógenos.

Además, estos resultados coinciden con la idea que brócoli induce cambios en el comportamiento de *P. capsici* en forma de memoria epigenética, ya que la muestra de micelio que se utilizó para medir el nivel de la expresión relativa del gen no se encontraba en interacción con brócoli. Sugiriendo que potencialmente, a través de algún mecanismo de translocación/conducción, posibles RNAs no codificantes de brócoli podrían estar presentes en gran parte del tejido de *P. capsici*, como lo identificado en los datos de sRNA-seq A-br-ch.

6.25 La expresión de genes efectores asociados a sRNAs cambia en aislados primarios y secundarios de *P. capsici*

La expresión relativa de genes efectores tipo elicinas, RXLR, NLP y CRN asociados a ser regulados por sRNAs en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch indica que cambia su expresión con características particulares de cada condición experimental y gen analizado.

Los genes relacionados con la fase biotrófica conformados por elicina1 y GIP1 de *P. capsici* no indicaron un patrón definido de expresión. En cambio, los genes asociados a la interfase de la infección Avr1b y Avr3a1 mostraron el mayor nivel de expresión al resto de genes de patogenicidad, sin embargo, Avr1 indicó menor nivel de expresión. En general, los resultados sugieren que brócoli induce el aumento significativo de la expresión de GIP1.

En los genes Nep1 y CRN1 asociados con la fase necrotrófica de infección se identificó un patrón definido de expresión, en donde disminuye cuando el oomiceto es recuperado de infecciones primarias o secundarias de chile, pero se aumenta significativamente cuando es recuperado de infecciones de brócoli o tiene previa infección de brócoli seguido de chile.

Todo lo anterior, refuerza la idea que el historial y el hospedero del cual se aísla al patógeno conduce a cambios en los niveles de expresión de genes efectores, y que estos además muestran un patrón de aumento en la virulencia en infecciones secundarias, lo cual es consistente con la datos de infección mostrados anteriormente.

Es decir, cambia la virulencia en *P. capsici* debido a la influencia del hospedero inmediato anterior del cual se aisló al patógeno, así como de su historial de infecciones en varias plantas, a través de mecanismos epigenéticos basados en sRNAs que conducen a cambios en el nivel de expresión de efectores.

Nuestros resultados coinciden con los reportado por R. R. Vetukuri et al. (2012), en donde examinaron mediante RT-qPCR la expresión del efector PiAvr3a en dos cepas *P. infestans* con diferencias en patogenicidad, en el cual sRNAs estaban altamente asociados con la cepa menos virulenta, encontrando entonces que el nivel de expresión del gen PiAvr3a en la cepa menos virulenta no era detectable, por lo tanto sus resultados sugirieron que los altos niveles de sRNAs asociados con PiAvr3a conducen a la disminución de la virulencia en el patógeno.

El nivel de expresión de los genes elicina1, GIP1, Nep1 y CRN1 coincidieron con los análisis de sRNA-seq, ya que se observó una correlación negativa entre el nivel de expresión de sRNAs con el nivel de expresión del gen, similar a lo reportado por Xu et al. (2022) en *P. parasítica*. Sin embargo, el resto de los genes efectores no mostraron esta cualidad, esto coincide además con lo reportado por R. R. Vetukuri et al. (2012), Gonzalez-Tobon et al. (2021) y Oh et al. (2009), en donde no siempre existe una correlación inversa entre el nivel de expresión de sRNAs con su potencial gen target en oomicetos. Por lo cual, los mismos autores sugieren que pueden estar involucrados factores adicionales que pueden contribuir al nivel de su acumulación de transcritos.

Otra consideración es que los sRNA pueden requerir acumulación hasta un nivel de umbral para influir en la expresión génica (Gonzalez-Tobon et al., 2021). Alternativamente, muchos

genes efectores RXLR para los que se han detectado sRNAs están presentes como familias de genes que comprenden miembros muy estrechamente relacionados (B. Haas et al., 2009). Por lo cual podría ser difícil distinguir si los sRNAs que se asignan a las familias RXLR se pudieron originar de miembros transcripcionalmente activos o inactivos y sobre qué parólogo(s) pueden actuar estos sRNAs. Qutob et al. (2013) indican que el silenciamiento reversible de efectores por sRNAs es más ventajoso que la pérdida irreversible de la función efectora por una mutación genética, porque la reactivación de un efector silenciado puede fortalecer la virulencia.

En general, estos resultados representan el primer registro de genes efectores asociados a ser regulados por sRNAs en *P. capsici*. Sin embargo, es necesario realizar análisis posteriores que confirmen el espacio físico de la regulación del gen e importancia de regulación en la virulencia del patógeno.

6.26 *P. capsici* expresa diferencialmente enzimas modificadoras de histonas asociadas a sRNAs

Se observó un patrón de expresión relativa de genes modificadores de histonas entre los tratamientos de *P. capsici*. Es decir, en las condiciones de A-chile, A-ch-ch y A-br-ch aumentó significativamente la expresión de la HdM-1 y en A-brócoli permaneció similar al control, por lo cual chile induce el aumento de la expresión del gen.

En cambio, en HdM-2 ocurre lo opuesto, es decir en A-brócoli aumenta significativamente la expresión del gen y permanece similar entre las condiciones de A-chile, A-ch-ch y A-br-ch comparado con la cepa progenitora, por lo cual, brócoli induce la expresión de HdM-2.

El nivel de expresión de HdM-3 aumenta significativamente en aislados primarios y secundarios comparado con D3, lo que sugiere relajación de la regulación génica en los aislados de *P. capsici* inducido por la especie vegetal a través de modificaciones en las histonas.

H metilasa-1 indicó que cuando el patógeno es aislado de una primera o segunda infección de chile tiende a aumentar significativamente la expresión del gen, pero cuando proviene de infección primaria de brócoli o algún antecedente de infección de brócoli como es el caso de A-br-ch, la expresión del gen permanece similar al control. Es decir, podrían existir cambios en el estado de la cromatina influenciados por H metilasa-1 dependiente de chile.

En los análisis de sRNA-seq se encontró que sRNAs están potencialmente asociados con la regulación de la expresión HdM-1, HdM2, HdM-3 e H. metilasa-1. Sin embargo, los datos de expresión del gen no mostraron resultados concluyentes en la correlación negativa, por ello es necesario realizar estudios adicionales.

En general, estos resultados sugieren que el hospedero e historial de infección/recuperación conducen a cambios en el nivel de expresión de genes asociados con modificaciones en la metilación de histonas en *P. capsici*. Esto indica que el patógeno responde de manera diferente después de interactuar con diferentes especies vegetales, contribuyendo a cambios en la memoria de expresión de genes.

Además, esto sugiere que la plasticidad de la regulación genética está asociada con el proceso de aclimatación/adaptación del patógeno a varias especies vegetales a través de modificaciones del estado de la cromatina e indirectamente con el nivel de expresión de sRNAs que potencialmente regulan estos genes.

6.27 Existe correlación negativa entre la expresión relativa de miR102 y Avr1b en *P. capsici*

En los análisis de sRNA-seq se encontró que el potencial miR102 podría regular el gen Avr1b en la región 3'UTR, por lo que se consiguió evidenciar experimentalmente la expresión de miR102 en *P. capsici*, el cual mostró menor nivel de expresión en A-chile, A-ch-ch y A-br-ch comparado con D3, sin diferencias significativa entre ellos, sugiriendo que el hospedero inmediato anterior o chile inducen la disminución de la expresión de miRNA. En cambio, aumentó significativamente la expresión de miR102 en A-brócoli, lo que sugiere que brócoli induce el aumento de la expresión del miRNA.

Encontramos correlación negativa en la co-expresión de miR102 y Avr1b en todos los tratamientos evaluados, lo que sugiere que potencialmente miR102 regula la expresión de Avr1b. Sin embargo, es necesario realizar experimentos funcionales para explicar con mayor profundidad el mecanismo de silenciamiento.

Esta co-expresión representa la primera evidencia experimental de la existencia de miRNAs en *P. capsici* que regulan potenciales genes efectores, los cuales son importantes en el proceso de adaptación/ aclimatación a diferentes especies vegetales. En otros oomicetos como *P. infestans*, también se ha identificado la expresión de miRNAs como miR8788 (R. R. Vetukuri et al., 2012a), pi-miR466 y pi-miR1918 (Cui et al., 2014), lo cual sugiere son importantes en *Phytophthora*.

El nivel de expresión de miR102 coincide con encontrado en los análisis sRNA-seq validando experimentalmente los análisis *in silico*. Así mismo, estos resultados sugieren que la expresión de miR102 conduce potencialmente a cambios en la virulencia del patógeno al modificar la expresión del potencial efector Avr1b.

Por lo anterior, demostramos que *P. capsici* expresa el miR102 cuyo nivel de expresión coincidió con los resultados de sRNA-seq. miR102 potencialmente regula el efector Avr1b, debido a la co-expresión de tipo negativa en todos los tratamientos evaluados, es decir mostramos evidencia experimental del mecanismo epigenético mediado por miRNA que puede conducir a cambios en la virulencia del oomiceto a través de la potencial regulación de Avr1b. Estos resultados son de gran relevancia ya que abren la posibilidad de continuar explorando en investigaciones futuras los mecanismos de interacción y regulación entre miR102 y Avr1b, y conocer con mayor profundidad su papel funcional en *P. capsici*.

6.28 Existe correlación negativa entre la expresión de miR65 y transposasa Tam3 en los aislados de *P. capsici*

La transposasa Tam3 exhibió altos niveles de expresión en aislados de *P. capsici* que tuvieron interacción en alguna ocasión con brócoli (A-brócoli y A-br-ch) con respecto al control. En

cambio, los aislados A-chile y A-ch-ch presentaron niveles de expresión similar al control. Los resultados sugieren que el patógeno modifica regiones de su genoma mediado por la transposasa Tam3 en respuesta o inducido por la especie vegetal brócoli en su mayoría, contribuyendo a su plasticidad genotípica, posiblemente como un mecanismo de adaptación/aclimatación.

El aumento significativo de la expresión de la transposasa Tam3 en A-br-ch, sugiere que el historial de especies vegetales por las cuales pasó el patógeno lo conducen a cambios significativos en el nivel de expresión del gen en la siguiente generación.

Se han identificado varias TPasas de DNA pertenecientes a la superfamilia HAT (hobo, Ac, Tam3) en *Antirrhinum*, (Calvi et al., 1991), animales y hongos (Rubin et al., 2001), sin embargo, este es el primer reporte que presenta experimentalmente la expresión de una transposasa en *P. capsici*.

En este estudio, se logró validar experimentalmente el nivel de expresión del potencial miRNA *de novo* miR65 en *P. capsici*, cuyo potencial target es la Transposasa Tam3. En los aislados primarios, el nivel de expresión de miR65 es mayor comparado con D3 y aislados secundarios. Lo que sugiere que la expresión del potencial miRNA está asociada con la especie vegetal que infecta el patógeno e historial infectivo a través de las generaciones.

Se encontró patrón de co-expresión negativa entre miR65 y transposasa Tam3 en todos los tratamientos evaluados. Lo que sugiere que potencialmente la función de miR65 es regular la expresión de la transposasa Tam3, como lo indicaron los análisis *in silico* de sRNA-seq, sin embargo, es necesario realizar análisis de interacción que prueben la actividad regulatoria. Estos análisis de co-expresión son interesantes ya que en los oomicetos no se había descrito experimentalmente la actividad reguladora de un potencial miRNA hacia una transposasa.

Las regiones genómicas ricas en transposones comúnmente contienen genes efectores involucrados en la adaptación evolutiva del patógeno al hospedero (Dale et al., 2019; de Jonge et al., 2013), por lo cual cambios significativos en la expresión de la transposasa Tam3 potencialmente puede conducir al proceso de la adaptación/aclimatación de *P. capsici* a varias especies vegetales.

Estos resultados demuestran que los compartimentos del genoma ricos en repeticiones como lo son los elementos transponibles son dinámicas y sustentan la evolución genética acelerada (S. Raffaele et al., 2010) después de los saltos del hospedero en *P. capsici*. Zeh et al. (2009) han propuesto la "hipótesis del epi-transposón", en la que los TE juegan un papel importante en los equilibrios puntuados que permite a poblaciones de patógenos como *P. capsici* colonizar nuevos hospederos y presenten cambios morfológicos.

Es decir, la hipótesis de epi-transposón puede ayudar a explicar los cambios morfológicos y de patogenicidad encontrado en *P. capsici*, los cuales están asociados al proceso de adaptación/aclimatación a especies vegetales, a través de cambios significativos en la expresión de la transposasa Tam3. En resumen, mostramos evidencia que miR65 potencialmente puede conducir a cambios de la virulencia, plasticidad fenotípica y adaptación a hospederos en *P. capsici*.

6.29 Usualmente es positiva la correlación significativa entre los genes y miRNAs expresados relativamente en *P. capsici*

El perfil de expresión de los genes y miRNAs analizados en *P. capsici*, mostró que la mayoría se encuentran positivamente correlacionados de manera significativa, ya que se encontró correlación positiva en la expresión DCL α , DCL β y Exp5A asociadas con la biogénesis y transporte de miRNAs-sRNAs y algunos genes argonautas, lo que sugiere que el conjunto de genes participan en la misma red regulatoria.

Sin embargo, DCL α , DCL β y Exp5A no se correlacionaron con la expresión de RDR lo que indica, existe una vía de regulación independiente de RDR. El nivel de expresión de las enzimas de la vía de biogénesis de miRNAs se relacionó negativamente con la expresión de enzimas metilasas, sugiriendo que éstas podrían ser reguladas por sRNAs, como también lo indicó el análisis de sRNA-seq.

En cambio, las enzimas AGO no mostraron correlación en su expresión, lo que propone tienen funciones diferentes. Sin embargo, algunas AGO mostraron correlación positiva con algunos efectores, revelando que las enzimas podrían regular la expresión de ciertos efectores. También se encontró que la transposasa Tam3 tiene correlación positiva con HdM-2, sugiriendo que potenciales cambios genómicos influenciados por la TPase están acompañados de modificaciones de histonas.

En general, estos resultados de correlación son la base para la elaboración de nuevas hipótesis, las cuales se pueden responder en futuros experimentos abriendo la posibilidad de nuevos enfoques en el estudio de *P. capsici*.

6.30 La expresión relativa de genes y miRNAs se agrupan por hospedero inmediato anterior en los aislamientos de *P. capsici*

El análisis de componentes principales demostró que AGO-E es la variable que más contribuye a explicar la varianza del eje principal uno en el PCA. Es decir, AGO-E es el gen que mayor variación presentó entre los tratamientos, por lo cual es un gen clave en *P. capsici* para el proceso de adaptación/aclimatación a diferentes hospederos, mostrando que la epigenética es importante en *P. capsici*.

Por su parte, D3 contribuye a explicar la mayor varianza entre los individuos, sugiriendo que el nivel de expresión entre D3 y los aislados primarios y secundarios es diferente, lo que indica que el perfil de expresión de los genes y miRNAs se modifica por la influencia del hospedero así como del historial de infección.

El análisis de clustering por k-means indicó que A-brócoli (clúster 1), A-chile, A-ch-ch, A-br-ch (clúster 2) y D3 (clúster 3) tienen características similares en el perfil de expresión relativo. Por ello, estos resultados indican mediante métodos matemáticos que la especie vegetal e historial de infección inducen cambios significativos en la expresión de los genes y miRNAs evaluados.

Por su parte, la construcción de un modelo estadístico explicó los cambios en el perfil de expresión de los genes y miRNAs basado en los resultados de clustering, revelando que

disminuye la regulación génica mediada por miRNAs en los aislados primarios y secundarios comparado con D3. Se encontró que el clúster control podría estar regulando mayormente genes por acción de la argonauta E, así como aumento de la expresión de genes efectores relacionados con la fase biotrófica. En cambio, brócoli induce la expresión de AGO-D y chile induce la reduce.

También se observa que el clúster A-brócoli presenta el mayor nivel de expresión de los genes Avr3a1, transposasa Tam3, HdM-2, HdM-3 y miR65, sugiriendo mayor actividad de cambios en el genoma inducido por la especie vegetal brócoli, desmetilación de histonas y cambios en la patogenicidad.

Se encontró el mayor nivel de expresión de los genes AGO-A, B e H metilasa-1 en el clúster 2 (A-chile, A-ch-ch, A-br-ch), estos resultados sugieren que el hospedero chile induce mecanismos de regulación basados en sRNAs que son procesados por AGO-A, así como posible aumento de la metilaciones de histonas.

En general, los resultados PCA, clustering y modelo estadístico muestran patrones de agrupamiento que destacan las diferencias y similitudes en el nivel de expresión de los 21 genes y 2 potenciales miRNAs evaluados entre los aislados analizados comparados con D3.

6.31 Existe correlación entre la virulencia, crecimiento, plasticidad fenotípica con la expresión de genes y miRNAs inducida por el hospedero en *P. capsici*

La matriz de correlación de Pearson indica que algunas de las características fenotípicas plásticas del oomiceto después de infectar dos hospederos distintos tienen correlación con cambios en la expresión de algunos genes de biogénesis, transporte y procesamiento de sRNAs, genes efectores, enzimas modificadoras de histonas y potenciales miRNAs.

Los resultados sugieren que la variación del crecimiento entre los aislados A-chile, A-brócoli y D3 está correlacionada con la síntesis y procesamiento de sRNAs-miRNAs mediados por la expresión de DCL β y AGO-F. En cambio, el aumento de la virulencia en A-chile y A-pepino están correlacionadas con el aumento en la expresión de efectores Avr1b, Avr3a1, cambios en el genoma mediado por la TPase y desmetilaciones de histonas por la HdM-2.

Por su parte, la plasticidad fenotípica colonial esta principalmente correlacionada con el aumento de la regulación basada en sRNAs, en donde participan los genes DCL α , AGO-F, RDR, así como cambios en el genoma mediados por la TPase Tam3 y aumento en la desmetilación de histonas por la expresión de HdM-2.

El aumento de diferentes morfologías de esporangios está correlacionado con el incremento de las vías de biogénesis y procesamiento de sRNAs, mediado por los genes DCL α , AGO-B, aumento en la desmetilación de histonas a través de los genes: HdM-1, HdM-3 y metilación de histonas por el gen histona metilasa-1.

Nuestros resultados sugieren que el aumento de la virulencia y la aparición de ciertas morfologías en aislados obtenidos de chile y brócoli de *P. capsici* tienen correlación con el incremento de la expresión de genes efectores y regulación de sRNAs, cambios en el genoma

mediados por la TPase Tam3 y modificaciones de histonas, similar con lo mostrado en un estudio realizado por Kasuga, Kozanitas, Bui, Hüberli, et al. (2012), en donde encontraron que la expresión reducida de genes efectores en aislados de *P. ramorum* obtenidos de roble y el tamaño de la lesión ocasionada en las especies vegetales tenían correlación positiva.

Por todo lo anterior, estos resultados son de gran importancia ya que anteriormente no se había descrito la correlación entre aspectos de virulencia, plasticidad fenotípica inducida por el hospedero con niveles de expresión génica y miRNAs en *P. capsici*. Sin embargo, es necesario profundizar en el estudio de correlaciones de las variables analizadas para aumentar la comprensión sobre los procesos involucrados a través de modelos matemáticos sofisticados, redes neuronales, algoritmos de machine learning, entre otros.

Conclusiones

- *P. capsici* expresa miRNAs y sRNAs diferencialmente inducidos por la especie vegetal que infecta así como del historial infectivo.
- *P. capsici* mostró capacidad infectiva progresiva específica sobre las hojas de las cuatro especies vegetales evaluadas. Las hojas de chile y frijol son altamente susceptibles al patógeno, mientras que pepino tiene susceptibilidad intermedia y reacción de hipersensibilidad inicial en brócoli.
- Se modifica la virulencia del patógeno en las infecciones secundarias, en donde la especie vegetal frijol conduce al aumento significativo de la virulencia del oomiceto.
- En los aislados primarios y secundarios del microorganismo se altera la tasa de crecimiento, la plasticidad fenotípica colonial dependiente de la especie vegetal inmediata anterior de la cual se recuperó al oomiceto, así como del historial de infección/aislamiento al que fue sometido, con disminución de la abundancia de morfología colonial estrellada.
- Se relacionó la presencia de plasticidad significativa de la morfología en los esporangios a través de las generaciones de *P. capsici* y no directamente con la especie vegetal inmediata que infecta, con algunas excepciones como es el caso de la aparición de esporangios bipapilados.
- Existe mayor plasticidad fenotípica en la conformación micelial que en la morfología de esporangios en el patógeno.
- *P. capsici* tiene dos principales poblaciones de sRNAs de 21 y 25 nt, con evidentes perfiles diferenciables en la expresión de sRNAs entre los tratamientos A-ch-ch y A-br-ch, con mayor potencial regulación en este último.
- El aislado A-br-ch presentó 184 sRNAs sobre-expresados asociados a genes de procesos de replicación y transcripción de ácidos nucleicos y 287 tipos de sRNAs infra-expresados relacionados con procesos de metabolismo de carbohidratos.
- *P. capsici* expresa miRNAs homólogos a los reportados en miRBase de especies de mamíferos, insectos, oomicetos, reptiles, plantas, peces, parásitos y plantas. Con sobreexpresión en la familia de ortólogos de miR8788 de *P. ramorum* y *P. infestans* en A-br-ch comparado con A-ch-ch, los cuales están involucrados en el desarrollo del proceso infectivo. Además, se estableció el locus genómico en *P. capsici* de PcamiR8788.
- El oomiceto expresa 155 potenciales miRNAs *de novo* en A-ch-ch y 288 potenciales miRNAs *de novo* en A-br-ch, los cuales tienen potenciales genes target en el patógeno con mayor regulación endógena en A-br-ch comparado con A-ch-ch.
- *P. capsici* tiene poblaciones de sRNAs y potenciales miRNAs *de novo* asociados con genes efectores tipo elicinas, RxLR, NLP, CRN, genes acetil-transferasas, metilasas, desmetilasas de histonas, factores de transcripción y elementos transponibles.
- Las dos isoformas caracterizadas de miRNAs *de novo* (A-ch-ch_102 y A-br-ch_214) de *P. capsici* podrían regular la expresión del potencial gen efector Avr1b en la región 3'UTR. Además, el miRNA *de novo* con estructura de hairpin A-ch-ch_65 (miR65) tiene como potencial target el gen de la transposasa Tam3 (familia Ac), y el potencial miRNA

de novo A-br-ch_65 podría regular la expresión de la enzima desmetilasa 509113 de *P. capsici*.

- Se identificó de manera predictiva la existencia de reinos cruzados de sRNAs y miRNAs entre *P. capsici* y *Capsicum annuum* con sus probables genes susceptibles a ser regulados, así como la existencia de herencia epigenética transgeneracional mediado por poblaciones de sRNAs-miRNAs inducidos por el hospedero primario en el aislado br-ch de *P. capsici*.
- *P. capsici* tiene dos genes DCLs, un gen exportina 5A, seis argonautas y una RNA polimerasa dependiente de RNA en su genoma que se expresan diferencialmente en diferentes tratamientos del oomiceto, los cuales están relacionados filogenéticamente con genes homólogos de otros oomicetos patógenos.
- Disminuye significativamente la expresión de los genes DCLs, Exp5A, AGOs y RDR en aislados primarios y secundarios de *P. capsici* comparados con el control D3.
- El oomiceto, mostró cambios significativos en el nivel de expresión relativa de los genes efectores elicina1, GIP1, Avr1, Avr1b, Avr3a1, Nep1 y CRN1, así como de los genes HdM-1, HdM-2, HdM-3 e Histona metilasa-1 recuperado de infecciones primarias de Chile y brócoli, así como de aislados A-ch-ch y A-br-ch, que fueron asociados a sRNAs en los análisis de sRNA-seq.
- El chromista expresa diferencialmente los miRNAs miR102 y miR65 en correlación negativa con sus potenciales genes target Avr1b y la transposasa Tam3, respectivamente.
- Existe correlación principalmente positiva en la expresión de los 21 genes y 2 miRNAs analizados por RT-qPCR y en stem loop, respectivamente en los aislados A-chile, A-brócoli, A-ch-ch, A-br-ch y D3 de *P. capsici*.
- Las características de crecimiento, patogenicidad, plasticidad fenotípica colonial y abundancia de morfología de esporangios están correlacionadas con la con el nivel de expresión de genes efectores, modificadores de histonas, regulación de elementos transponibles y dos miRNAs en aislados de *P. capsici*.
- En *P. capsici* existen mecanismos complejos de regulación basados en miRNAs que influyen en su crecimiento, patogenicidad y morfología en respuesta a la especie vegetal que infectó y el historial de infección/recuperación al que fue sometido el oomiceto.

Perspectivas

Algunas de las actividades futuras a realizar a partir de la presente investigación consisten en ejecutar análisis funcionales de las enzimas DCLs, Exp5A, AGO y RDR mediante clonación y marcaje con gen reportero, para conocer su localización subcelular. Silenciamiento génico mediado por la tecnología CRISPRcas9, para evaluar el fenotipo resultante en transformantes de *P. capsici* sobre su desarrollo, patogenicidad y proceso de adaptación/aclimatación a diferentes especies vegetales. Así como, secuenciación de sus sRNAs para conocer la influencia de las proteínas de biogénesis, transporte y procesamiento de sRNAs sobre la síntesis de RNAs no codificantes.

También, validar funcionalmente el sitio específico de la actividad regulatoria de miRNAs hacia potenciales genes target a través ensayos de northern blot, clonación de miRNAs de 5´RACE (System for Rapid Amplification of cDNA Ends). Silenciamiento de miRNAs a través del diseño de mimetizadores específicos y análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR stem loop.

Evaluar experimentalmente la evidencia predictiva de reinos cruzados de sRNAs entre *P. capsici* y la especie vegetal, así como de la herencia transgeneracional de sRNAs y miRNAs, y dar seguimiento a su localización subcelular, posible transcolocación entre especies y posible herencia generacional en el patógeno mediante marcaje con sondas y microscópica confocal.

Así mismo, identificar posibles vehículos de transferencia de sRNAs-miRNAs y potenciales mecanismos de autorreplicación de sRNAs entre el oomiceto y la especie vegetal, a través de la identificación de posibles proteínas de unión a sRNAs presentes en vesículas extracelulares, mediante su extracción e identificación por centrifugación diferencial por densidades, geles de poliacrilamida y visualización microscópica con SEM.

Finalmente, inducir la regulación génica específica en el patógeno mediante la incorporación de sRNAs sintéticos en el oomiceto y evaluar el fenotipo resultante como mecanismo de resistencia en plantas susceptibles a *P. capsici*.

Referencias bibliográficas

- Abad, G., Burgess, T., Bienapfl, J. C., Redford, M. C., & Knight, L. (2019). *Phytophthora capsici* IDphy: Molecular and Morphological Identification of *Phytophthora* Based on the Types. <http://idtools.org/id/phytophthora/factsheet.php?name=7926>
- Abu-El Samen, F. M., Secor, G. A., & Gudmestad, N. C. (2003). *Genetics and Resistance Variability in Virulence Among Asexual Progenies of Phytophthora infestans* (Vol. 93, Issue 3).
- Adkar-Purushothama, C. R., Brosseau, C., Giguère, T., Sano, T., Moffett, P., & Perreault, J.-P. (2015). Small RNA Derived from the Virulence Modulating Region of the Potato spindle tuber viroid Silences callose synthase Genes of Tomato Plants. *The Plant Cell*, 27(8), 2178–2194. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00523>
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J.-W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Computational and Systems Biology | Genomics and Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005.001>
- Agosta, S. J., Janz, N., & Brooks, D. R. (2010). How specialists can be generalists: resolving the “parasite paradox” and implications for emerging infectious disease. *Zoologia (Curitiba)*, 27(2), 151–162. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702010000200001>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Burlington, Massachusetts: Elsevier Academic Press Publications.
- Alder, M. N., Dames, S., Gaudet, J., & Mango, S. E. (2003). Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference. *RNA*, 9, 25–32.
- Alemdehy, M. F., Haanstra, J. R., de Looper, H. W. J., van Strien, P. M. H., Verhagen-Oldenampsen, J., Caljouw, Y., Sanders, M. A., Hoogenboezem, R., de Ru, A. H., Janssen, G. M. C., Smetsers, S. E., Bierings, M. B., van Veelen, P. A., von Lindern, M., Touw, I. P., & Erkeland, S. J. (2015). ICL-induced miR139-3p and miR199a-3p have opposite roles in hematopoietic cell expansion and leukemic transformation. *Blood*, 125(25), 3937–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-612507>
- Alptekin, B., Langridge, P., & Budak, H. (2017). Abiotic stress miRNomes in the Triticeae. *Functional & Integrative Genomics*, 17(2–3), 145–170. <https://doi.org/10.1007/s10142-016-0525-9>
- Altschup, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. In *J. Mol. Biol* (Vol. 215).
- Amselem, J., Cornut, G., Choisne, N., Alaux, M., Alfama-Depauw, F., Jamilloux, V., Maumus, F., Letellier, T., Luyten, I., Pommier, C., Adam-Blondon, A. F., & Quesneville, H. (2019). RepetDB: A unified resource for transposable element references. *Mobile DNA*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0150-y>
- An, J., Lai, J., Lehman, M. L., & Nelson, C. C. (2013). MiRDeep*: An integrated application tool for miRNA identification from RNA sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 41(2), 727–737. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1187>
- Aparicio-Puerta, E., Gómez-Martín, C., Giannoukakos, S., Medina, J. M., Scheepbouwer, C., García-Moreno, A., Carmona-Saez, P., Fromm, B., Pegtel, M., Keller, A., Marchal, J. A., & Hackenberg, M. (2022). sRNAbench and sRNAtoolbox 2022 update: accurate miRNA and sncRNA profiling for model and non-model organisms. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W710–W717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac363>
- Aragaki, M., & Uchida, J. Y. (2001). Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. nov. . *Mycology*, 93, 137–145.
- Åsman, A. K. M., Fogelqvist, J., Vetukuri, R. R., & Dixelius, C. (2016). *Phytophthora infestans* Argonaute 1 binds microRNA and small RNAs from effector genes and transposable elements. *New Phytologist*, 211(3), 993–1007. <https://doi.org/10.1111/nph.13946>

- Avina-Padilla, K., Martinez de la Vega, O., Rivera-Bustamante, R., Martinez-Soriano, J. P., Owens, R. A., Hammond, R. W., & Vielle-Calzada, J.-P. (2015). In silico prediction and validation of potential gene targets for pospiviroid-derived small RNAs during tomato infection. *Gene*, *564*(2), 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.03.076>
- Avrova, A. O., Boevink, P. C., Young, V., Grenville-Briggs, L. J., van West, P., Birch, P. R. J., & Whisson, S. C. (2008). A novel *Phytophthora infestans* haustorium-specific membrane protein is required for infection of potato. *Cell. Microbiol.*, *10*, 2271–2284.
- Axtell, M. J. (2013). Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(1), 137–159. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120043>
- Axtell, M. J., Jan, C., Rajagopalan, R., & Bartel, D. P. (2006). A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell*, *127*, 565–577.
- Axtell, M. J., Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*, *12*(4), 221. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-221>
- Bailey, B. A. (1995). Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology*, *85*, 1250–1255.
- Bannister, A., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, *21*, 381–395.
- Barnett, D. W., Garrison, E. K., Quinlan, A. R., Strömberg, M. P., & Marth, G. T. (2011). BamTools: a C++ API and toolkit for analyzing and managing BAM files. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*, *27*(12), 1691–1692. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr174>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, *136*(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, *173*(1), 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Baulcombe, D. (2015). VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts. *Curr. Opin. Plant Biol.*, *26*, 141–146.
- Baum, J., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G., Feldmann, P., & et al. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, *25*, 1322–1326.
- Berezikov, E., Chung, W.-J., Willis, J., Cuppen, E., & Lai, E. C. (2007). Mammalian Mirtron Genes. *Molecular Cell*, *28*(2), 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.028>
- Birch, P. R., Boevink, P. C., Gilroy, E. M., Hein, I., Pritchard, L., & Whisson, S. C. (2008). Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Plant Biology*, *11*, 373–379.
- Birch, P. R., Rehmany, A. P., Pritchard, L., Kamoun, S., & Beynon, J. L. (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends Microbiology*, *14*, 8–11.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, *16*, 6–21.
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S. Y., Geiser, D. M., & Kang, S. (2008). A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics Biology*, *45*, 266–277.
- Bohnert, H.U., Fudal, I., Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J.L., & Lebrun M.H. (2004). A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. *Plant Cell*, *16*(2), 2499–2523.
- BOHNSACK, M. T., CZAPLINSKI, K., & GÖRLICH, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, *10*(2), 185–191. <https://doi.org/10.1261/rna.5167604>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

- Bollmann, S. R., Fang, Y., Press, C. M., Tyler, B. M., & Grünwald, N. J. (2016). Diverse evolutionary trajectories for small RNA biogenesis genes in the oomycete genus *Phytophthora*. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00284>
- Bollmann, S. R., Press, C. M., Tyler, B. M., & Grünwald, N. J. (2018). Expansion and divergence of argonaute genes in the oomycete genus *Phytophthora*. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02841>
- Bologna, N., & Voinnet, O. (2014). The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol*, 65, 473–503.
- Bonnet, E., He, Y., Billiau, K., & van de Peer, Y. (2010). TAPIR, a web server for the prediction of plant microRNA targets, including target mimics. *Bioinformatics*, 26(12), 1566–1568. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq233>
- Bos, J., Armstrong, M., Gilroy, E., Boevink, P., & Hein, I. (2010). *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 9909–1400.
- Bošković, A., & Rando, O. J. (2018). Transgenerational Epigenetic Inheritance. *Annual Review of Genetics*, 52(1), 21–41. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031404>
- Bossdorf, O., Richards, C., & Pigliucci, M. (2008). Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters*, 11, 106–115.
- Bowers, J. H., Martin, F. N., Tooley, P. W., & Luz, E. D. M. N. (2007). Genetic and morphological diversity of temperate and tropical isolates of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, 97, 492–503.
- Bowers, J. H., Papavizas, G. C., & Johnston, S. A. (1990). Effect of soil temperature and soil-water matric potential on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil. *Plant Disease*, 74, 771–778.
- Brasier, C., Kirk, S., & Rose, J. (2006). Differences in phenotypic stability and adaptive variation between the main European and American lineages of *Phytophthora ramorum*. *Friesing, Germany. Farnham: Forest Research*, 166.
- Braun, L., Cannella, D., Ortet, P., Barakat, M., Sautel, C. F., Kieffer, S., Garin, J., Bastien, O., Voinnet, O., & Hakimi, M.-A. (2010). A Complex Small RNA Repertoire Is Generated by a Plant/Fungal-Like Machinery and Effected by a Metazoan-Like Argonaute in the Single-Cell Human Parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, 6(5), e1000920. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000920>
- Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F., le Bihan, T., Kumar, S., Abreu-Goodger, C., Lear, M., Harcus, Y., Ceroni, A., Babayan, S. A., Blaxter, M., Ivens, A., & Maizels, R. M. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications*, 5(1), 5488. <https://doi.org/10.1038/ncomms6488>
- Buckley, B., Burkhart, K., Gu, S., Spracklin, G., Kershner, A., Fritz, H., Kimble, J., Fire, A., & Kennedy, S. (2012). A nuclear Argonaute promotes multigenerational epigenetic inheritance and germline immortality. *Nature*, 489, 447–451.
- Budak, H., Kantar, M., Bulut, R., & Akpınar, B. A. (2015). Stress responsive miRNAs and isomiRs in cereals. *Plant Science*, 235, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.008>
- Burton, N. O., Burkhart, K. B., & Kennedy, S. (2011). Nuclear RNAi maintains heritable gene silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), 19683–19688. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113310108>
- Burton, N. O., & Greer, E. L. (2022). Multigenerational epigenetic inheritance: Transmitting information across generations. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 127, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2021.08.006>
- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F., & et al. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, 360, 1126–1129.

- Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. (2009). A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 7(4), 147–154.
- Calvi, B., Hong, T., Findley, S., & Gelbart, W. (1991). Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: hobo, Activator, and Tam3. *Cell*, 66, 465–471.
- Camussi, G., Deregibus, M., Bruno, S., Grange, C., Fonsato, V., Tetta, C., & Am, J. (2011). Exosome/ microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Cancer Res.*, 1(1), 98–110.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Castel, S. E., & Martienssen, R. A. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 14(2), 100–112. <https://doi.org/10.1038/nrg3355>
- Castro, R. A., Fernández, P. S. P., & Osuna, A. P. (2012). Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum- Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30, 49–65.
- Caten, C. E. (1970). Spontaneous variability of single of single isolates of *Phytophthora infestans*. II Pathogenic variation. *Can. J. Bot.*, 48, 897–905.
- Caten, C. E., & Jink, J. L. (1968). Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variations. *Can. J. Bot.*, 46, 329–348.
- Cecere, G. (2021). Small RNAs in epigenetic inheritance: from mechanisms to trait transmission. In *FEBS Letters* (Vol. 595, Issue 24, pp. 2953–2977). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14210>
- Chen, H., Shu, H., Wang, L., Zhang, F., Li, X., Ochola, S. O., Mao, F., Ma, H., Ye, W., Gu, T., Jiang, L., Wu, Y., Wang, Y., Kamoun, S., & Dong, S. (2018). *Phytophthora* methylomes are modulated by 6mA methyltransferases and associated with adaptive genome regions. *Genome Biology*, 19(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1564-4>
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., & et al. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.*, 18(10), 997–1006.
- Chevenet, F., Brun, C., Bañuls, A. L., Jacq, B., & Christen, R. (2006). TreeDyn: Towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics*, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-439>
- Chevin, L., Lande, R., & Mace, G. (2010). Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS Biol* 8, 8, e1000357.
- Chi, S. W., Zang, J. B., Mele, A., & Darnell, R. B. (2009). Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*, 460(7254), 479–486. <https://doi.org/10.1038/nature08170>
- Chin, A., Fong, M., Somlo, G., Wu, J., Swiderski, P., Wu, X., & Wang, SE. (2016). Crosskingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159. *Cell Res.*, 26(2), 217–228.
- Cogoni, C., & Macino, G. (1999). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, 399, 166–169.
- Cogoni, C., & Macino, G. (2000). Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10, 638–643.
- Conover, D. O., Duffy, T. A., & Hice, L. A. (2009). The covariance between genetic and environmental influences across ecological gradients: reassessing the evolutionary significance of countergradient and cogradient variation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1168, 100–129.
- Cowled, C., Stewart, C. R., Likic, V. A., Friedländer, M. R., Tachedjian, M., Jenkins, K. A., Tizard, M. L., Cottee, P., Marsh, G. A., Zhou, P., Baker, M. L., Bean, A. G., & Wang, L. (2014). Characterisation of novel microRNAs in the Black flying fox (*Pteropus alecto*) by deep sequencing. *BMC Genomics*, 15(1), 682. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-682>

- Crews, D., Gore, A., Hsu, T., Dangleben, N., Spinetta, M., Schallert, T., Anway, M., & Skinner, MK. (2007). Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*, 5942–5946.
- Crews, D. (2008). Epigenetics and its implications for behavioral neuroendocrinology. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *29*, 344–357.
- Critopoulos, P. D. (1955). Foot rot of tomato incited by *Phytophthora capsici*. *Bull. Torrey Bot. Club*, *82*(3), 168–182.
- Crossan, D. F., Haasis, F. A., & Ellis, D. E. (1954). *Phytophthora* blight of summer squash. *Plant Disease*, *38*, 557–559.
- Cui, J., Luan, Y., Wang, W., & Zhai, J. (2014). Prediction and validation of potential pathogenic microRNAs involved in *Phytophthora infestans* infection. *Molecular Biology Reports*, *41*(3), 1879–1889. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3037-5>
- Cunnac, S., Chakravarthy, S., Kvitko, B. H., Russell, A. B., Martin, G. B., & Collmer, A. (2011). Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(7), 2975–2980. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013031108>
- Czech, B., & Hannon, G. J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature Reviews Genetics*, *12*(1), 19–31. <https://doi.org/10.1038/nrg2916>
- Dale, A. L., Feau, N., Everhart, S. E., Dhillon, B., Wong, B., & Sheppard, J. (2019). Mitotic recombination and rapid genome evolution in the invasive forest pathogen *Phytophthora ramorum*. *MBio*, *10*, 1–19.
- Damasceno, C. M. B., Bishop, J. G., Ripoll, D. R., Win, J., Kamoun, S., & Rose, J. K. C. (2008). Structure of the Glucanase Inhibitor Protein (GIP) Family from *Phytophthora* Species Suggests Coevolution with Plant Endo- β -1,3-Glucanases. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, *21*(6), 820–830. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Davidson, C. R., Carroll, R. B., Evans, T. A., Mulrooney, R. P., & Kim, S. H. (2002). First report of *Phytophthora capsici* infecting lima bean (*Phaseolus lunatus*) in the Mid-Atlantic Region. *86*, 1049.
- Day, T., & Bonduriansky, R. (2011). A unified approach to evolutionary consequences of genetic and nongenetic inheritance. *Am. Nat.*, *178*, E18–E36.
- de Fine Licht, H. (2018). Does pathogen plasticity facilitate host shifts? . *PLoS Pathog*, *14*(5), e1006961.
- de Haro, J., Calo, S., Cervantes, M., Nicola's, F., Torres-Martinez, S., & et al. (2009). A single dicer gene is required for efficient gene silencing associated with two classes of small antisense RNAs in *Mucor circinelloides*. *Eukar Cell*, *8*, 1486–1497.
- de Jonge, R., Bolton, M. D., Kombrink, A., van den Berg, G. C., Yadeta, K. A., & Thomma, B. P. (2013). Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome Res.*, *23*, 1271–1282.
- de Jonge, R., Bolton, M. D., & Thomma, B. P. (2011). How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, *14*(4), 400–406.
- Delanoë, D. (1972). Biologie et Epidemiologie du mildiou du tournesol (in French). *CETIOM Inform. Tech.*, *26*, 1–61.
- Denli, A. M., & Hannon, G. J. (2003). RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends in Biochemical Sciences*, *28*(4), 196–201. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00058-6)
- DeWitt, T., & Scheiner, S. (2004). Phenotypic variation from single genotypes: a primer. In: DeWitt TJ, Scheiner SM (eds.), Phenotypic plasticity: functional and conceptual approaches. *Oxford University Press, Inc., New York*.
- Ding, B. (2009). The Biology of Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, *47*(1), 105–131. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081927>

- Ding, B., & Itaya, A. (2007). Viroid: A Useful Model for Studying the Basic Principles of Infection and RNA Biology. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(1), 7–20. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-0007>
- Dong, S., R. S., & Kamoun, S. (2015). The two-speed genomes of filamentous pathogens: Waltz with plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 35, 57–65.
- Dong, S., & Ma, W. (2021). How to win a tug-of-war: the adaptive evolution of *Phytophthora* effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 62, 102027.
- Dou, D., Kale, S. D., Wang, X., Chen, Y., Wang, Q., Jiang, R. H., Arredondo, F. D., Anderson, R. G., Thakur, P. B., McDowell, J. M., Wang, Y., & Tyler, B. M. (2008). Conserved C-terminal motifs required for avirulence and suppression of cell death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *Plant Cell*, 20, 1118–1133.
- Downen, R. H., Pelizzola, M., Schmitz, R. J., Lister, R., Downen, J. M., Nery, J. R., Dixon, J. E., & Ecker, J. R. (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(32). <https://doi.org/10.1073/pnas.1209329109>
- Dudzinski, M. J., Old, K. M., & Gibbs, R. J. (1993). Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal Bot.*, 41, 721–732.
- Dunker, F., Trutzenberg, A., Rothenpieler, J., Kuhn, S., Prols, R., & et al. (2020). Oomycete small RNAs bind to the plant RNA-induced silencing complex for virulence. *ELife* 9:56096.
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J. C., & Voinnet, O. (2010). Small RNA Duplexes Function as Mobile Silencing Signals Between Plant Cells. *Science*, 328(5980), 912–916. <https://doi.org/10.1126/science.1185880>
- Dutheil, J. Y., Mannhaupt, G., Schweizer, G., Sieber, C. M. K., Münsterkötter, M., & Güdener, U. (2016). A tale of genome compartmentalization: The evolution of virulence clusters in smut fungi. *Genome Biology Evolution*, 8, 681–704.
- Elliott, M., Yuzon, J., C, M. M., Tripathy, S., Bui, M., Chastagner, G. A., Coats, K., Rizzo, D. M., Garbelotto, M., & Kasuga, T. (2018). Characterization of phenotypic variation and genome aberrations observed among *Phytophthora ramorum* isolates from diverse hosts. *BMC Genomics*, 19(1), 320. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4709-7>
- Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora* Diseases Worldwide. *American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA*.
- Erwin, J., Marchetto, M., & Gage, F. (2014). Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nat Rev Neurosci*, 15, 497–506.
- Fahlgren, N., Bollmann, S. R., Kasschau, K. D., Cuperus, J. T., & Press, C. M. (2013). *Phytophthora* have distinct endogenous small RNA populations that includes hort interfering and microRNAs. *PLoS ONE*, 8, e77181.
- Fan, Y., Habib, M., & Xia, J. (2018). Xeno-mirNet: A comprehensive database and analytics platform to explore xeno-miRNAs and their potential targets. *PeerJ*, 2018(9). <https://doi.org/10.7717/peerj.5650>
- Farrer, R., Henk, D., Garner, T., Balloux, F., Woodhams, D., & Fisher, M. (2013). Chromosomal copy number variation, selection and uneven rates of recombination reveal cryptic genome diversity linked to pathogenicity. *PLoS Genet.*, 9(8), e1003703.
- Fei, Q., Zhang, Y., Xia, R., & Meyers, B. (2016). Small RNAs add zing to the zig-zag-zig model of plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 29, 165–169.
- Feinberg, E., & Hunter, C. (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301, 1545–1547.
- Felix, K. (2019). *Babraham Bioinformatics - Trim Galore!* https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/
- Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M., & Nürnberger, T. (2002). NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant*, 32, 375–390.

- Fellous, S., Duncan, A. B., Quillery, E., Vale, P. F., & Kaltz, O. (2012). Genetic influence on disease spread following arrival of infected carriers. *Ecology Letters*, *15*(3), 186–192. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01723.x>
- Feng, B., L. P., Wang, H., & Zhang, X. (2010). Functional analysis of pcpme6 from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microbiology Phytopathology*, *49*, 23–31.
- Feng, B. Z., Li, P. Q., Fu, L., Sun, B. B., & Zhang, X. G. (2011). Methodology identification of 18 genes encoding necrosis-inducing proteins from the plant pathogen *Phytophthora capsici* (Pythiaceae: Oomycetes). *Genet. Mol. Res.*, *10*, 910–922.
- Fernández-Pavía, S. P., Biles, C. L., Waugh, M., Onsurez-Waugh, K., Rodríguez-Alvarado, G., & Liddell, C. (2004). Characterization of Southern New Mexico *Phytophthora capsici* Leonian Isolates from Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana De Fitopatología*, *22*(1), 82–89.
- Fieldes, M., Schaeffer, S., Krech, M., & Brown, JCL. (2005). DNA hypomethylation in 5-azacytidine-induced early-flowering lines of flax. *Theoretical and Applied Genetics*, *111*, 136–149.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S., & Mello, C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*, 806–811.
- Fornaris, G. J. (2001). Conjunto Tecnológico para la Producción de Pepinillo de Ensalada. *Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez, Colegio de Ciencias Agrícolas Estación Experimental Agrícola*.
- Foster, J. M., & Hausbeck, M. K. (2010). Resistance of pepper to *Phytophthora* crown, root, and fruit rot is affected by isolate virulence. *Plant Disease*, *94*, 24–30.
- Frezzi, M. J. (1950). Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. *Rev. Invest. Agríc.*, *4*(1), 47–134.
- Fudal, I., Collemare, J., Bohnert, H., Melayah, D., & Lebrun MH. (2007). Expression of Magnaporthe grisea avirulence gene ACE1 is connected to the initiation of appressorium-mediated penetration. *Eukaryot. Cell*, *6*, 546–549.
- Fujino, K., Hashida, S., Ogawa, T., Natsume, T., Uchiyama, T., Mikami, T., & Kishima, Y. (2011). Temperature controls nuclear import of Tam3 transposase in *Antirrhinum*. *Plant J* *65*, 65, 146–155.
- Ge, S. X., Son, E. W., & Yao, R. (2018). iDEP: An integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2486-6>
- Gevens, A., & Hausbeck, M. K. (2003). *Phytophthora capsici* in irrigation water and isolation of P. capsici from snap beans in Michigan. *Michigan. State University Ext. Veg. Crop Advisory Team Alert*, *18*, 3.
- Gevens, A., & Hausbeck, M. K. (2004). *Phytophthora capsici* isolated from snap bean is pathogenic to cucumber fruit and soybean. *APS North Central Division Meeting*.
- Gevens, A. J., Donahoo, R. S., Lamour, K. H., & Hausbeck, M. K. (2008). Characterization of *Phytophthora capsici* Causing Foliar and Pod Blight of Snap Bean in Michigan. *Plant Disease*, *92*(2), 201–209.
- Ghalambor, C., Hoke, K., Ruell, E., Fischer, E., Reznick, D., & Hughes, KA. (2015). Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature. *Nature*, *525*, 372.
- Ghalambor, C. K., McKAY, J. K., Carroll, S. P., & Reznick, D. N. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, *21*(3), 394–407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01283.x>
- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M., Li, C., Du, T., & et al. (2008). Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in Drosophila somatic cells. *Science*, *320*, 1077–1081.
- Gijzen, M., & Nürnberger, T. (2006). Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NLP1 domain across taxa. *Phytochemistry*, *6*, 1800–1807.

- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *43*, 205–227.
- Glosier, B. R., Ogundiwin, E. A., Sidhu, G. S., Sischo, D. R., & Prince, J. P. (2008). A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica*, *162*, 23–30.
- Gobena, D., Roig, J., Galmarini, C., Hulvey, J., & Lamour, K. H. (2012). Genetic diversity of *Phytophthora capsici* isolates from pepper and pumpkin in Argentina. *Mycologia*, *104*, 102–107.
- Gonzalez-Tobon, J., Rodriguez-Jaramillo, A., Forero, L. M., González, L. N., & Restrepo, S. (2021). STATUS: IN REVIEW Evaluation of small ncRNAs as a possible epigenetic mechanism mediating the transition from biotrophy to necrotrophy in the life cycle of *Phytophthora infestans*. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.21203/rs.2.12907/v2>
- Granke, L. L., Quesada-Ocampo, L., Lamour, K., & Hausbeck, M. K. (2012). Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. *Plant Disease*, *96*(11), 1588–1600. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0211-FE>
- Granke, L. L., Quesada-Ocampo, L. M., & Hausbeck, M. K. (2011a). Differences in virulence of *Phytophthora capsici* isolates from a worldwide collection on host fruits. *Eur. J. Plant Pathol.*, *132*, 281–296.
- Granke, L. L., Quesada-Ocampo, L. M., & Hausbeck, M. K. (2011b). Variation in phenotypic characteristics of *Phytophthora capsici* isolates from a worldwide collection. *Plant Disease*, *95*(9), 1080–1088. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0190>
- Granke, L. L., Windstam, S. T., Hoch, H. C., Smart, C. D., & Hausbeck, M. K. (2009). Dispersal and movement mechanisms of *Phytophthora capsici* sporangia. *Phytopathology*, *99*, 1258–1264.
- Grether, G. F. (2005). Environmental change, phenotypic plasticity, and genetic compensation. *Am. Nat.*, *166*, E115–E123.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, *36*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkm952>
- Grishok, A., Tabara, H., & Mello, C. (2000). Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science*, *287*, 2494–2497.
- Gu, S., Pak, J., Guang, S., Maniar, J., Kennedy, S., & Fire, A. (2012). Amplification of siRNA in *Caenorhabditis elegans* generates a transgenerational sequence-targeted histone H3 lysine 9 methylation footprint. *Nat Genet*, *44*, 157–164.
- Guigón-López, C., & González-González, P. A. (2004). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, *22*, 117–124.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., Pour, A., & Bioinformatique, L. (2010). *New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0*. <http://www.lirmm.fr/~gascuel>
- Gunderson, J. H., Elwood, H., Ingold, H., Kindle, A., & Sogin, M. L. (1987). Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *84*, 5823–5827.
- Guo, Z., Kuang, Z., Zhao, Y., Deng, Y., He, H., Wan, M., Tao, Y., Wang, D., Wei, J., Li, L., & Yang, X. (2022). PmiREN2.0: From data annotation to functional exploration of plant microRNAs. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D1475–D1482. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab811>
- Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H. Y., Handsaker, R. E., Cano, L. M., Grabherr, M., Kodira, C. D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T. O., Ah-Fong, A. M., Alvarado, L., Anderson, V. L., Armstrong, M. R., Avrova, A., Baxter, L. B. J., Boevink, P. C., Bollmann, S.

- R., ... Nusbaum, C. (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, *461*, 393–398.
- Hackett, J., Sengupta, R., Zylitz, J., Murakami, K., Lee, C., Down, T., & Surani, M. (2013). Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science*, *339*, 448–452.
- Hall, G. (1993). An integrated approach to the analysis of variation in *Phytophthora nicotianae* and a redescription of the species. *Mycological Research*, *97*(5), 559–574. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81179-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81179-9)
- Hall, G. S. (1998). Examination of some morphologically unusual cultures of *Phytophthora* species using a mitochondrial DNA miniprep technique and a standardised sporangium caducity assessment. In *Mycopathologia* (Vol. 140).
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., & Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNAs in RNA silencing. *EMBO J*, *21*, 4671–4679.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, *404*(6775), 293–296. <https://doi.org/10.1038/35005107>
- Harvard College. (2008). *FAS Center: Scriptome Home (UNIX)*. <http://archive.sysbio.harvard.edu/CSB/resources/computational/scriptome/UNIX/>
- Hausbeck, M. K., & Lamour, K. H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Disease*, *88*, 1292–1303.
- Heike, V. (2009). *Phaseolus vulgaris* L., frijol silvestre. *CONABIO*, <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-vulgaris/fichas/ficha.htm#9.%20Referencias>.
- Hein, I., Gilroy, E. M., Armstrong, M. R., & Birch, P. R. (2009). The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions. *Molecular Plant Pathology*, *10*, 547–562.
- Hinas, A., Reimegard, J., Wagner, E., Nellen, W., Ambros, V., & et al. (2007). The small RNA repertoire of *Dictyostelium discoideum* and its regulation by components of the RNAi pathway. *Nucleic Acids Res.*, *35*, 6714–6726.
- Hou, Y., Zhai, Y., Feng, L., Karimi, H., Rutter, B., & et al. (2019). A *Phytophthora* effector suppresses transkingdom RNAi to promote disease susceptibility. *Cell Host Microbe*, *25*, 153–165.e5.
- Hu, D., Berli, Tommerup, I. C., Dobrowolski, M. P., Calver, M. C., St, G. E., & Hardy, J. (2001). Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycol. Res.*, *105*(9), 1053–1064. <https://doi.org/10.1017/S0953756201004658>
- Hu, X., Persson Hodén, K., Liao, Z., Åsman, A., & Dixelius, C. (2022). *Phytophthora infestans* Ago1-associated miRNA promotes potato late blight disease. *New Phytologist*, *233*(1), 443–457. <https://doi.org/10.1111/nph.17758>
- Huang, C. Y., Wang, H., Hu, P., Hamby, R., & Jin, H. (2019). Small RNAs – Big Players in Plant-Microbe Interactions. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 26, Issue 2, pp. 173–182). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.021>
- Huang, G., Allen, R., Davis, E., Baum, T., & Hussey, R. (2006). Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *PNAS*, *103*, 14302–14306.
- Hüberli, D., & Garbelotto, M. (2012). *Phytophthora ramorum* is a generalist plant pathogen with differences in virulence between isolates from infectious and dead-end hosts. *Forest Pathology*, *42*(1), 8–13. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2011.00715.x>
- Hudzik, C., Hou, Y., Ma, W., & Axtell, M. (2020). Exchange of small regulatory RNAs between plants and their pests. *Plant Physiol.*, *182*, 51–62.

- Hurtado-González, O., Aragon-Caballero, L., Apaza-Tapia, W., Donahoo, R., & Lamour, K. (2008). Survival and spread of *Phytophthora capsici* in coastal Peru. *Phytopathology*, 98(6), 688–694. <https://doi.org/10.1094/PHTO-98-6-0688>
- Hurtado-Gonzales, O. P., & Lamour, K. H. (2009). Evidence for inbreeding and apomixis in close crosses of *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*, 58, 715–722.
- Hwang, B. K., & Kim, C. H. (1995). *Phytophthora* blight of pepper and its control in Korea. *Plant Disease*, 79, 221–227.
- Iribarren, M. J., Steciow, M. M., & González, B. A. (2015). *Caracterización de Phytophthora capsici como patógeno de especies hortícolas presentes en la zona noreste de la provincia de buenos aires*. Universidad Nacional de la Plata.
- Islam, S. Z., Babadoost, M., Lambert, K. N., Ndeme, A., & Fouly, H. M. (2005). Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from processing pumpkin in Illinois. *Plant Disease*, 89(2), 191–197. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0191>
- Islam, W., Islam, S. ul, Qasim, M., & Wang, L. (2017). Host-Pathogen interactions modulated by small RNAs. In *RNA Biology* (Vol. 14, Issue 7, pp. 891–904). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1318009>
- Jablonka, E., & Lamb, M. (2007a). Bridging the gap: The developmental aspects of evolution. *Behav. Brain Sci.*, 30(4), 378–389.
- Jablonka, E., & Lamb, M. J. (2007b). Précis of evolution in four dimensions. *Behav. Brain Sci.*, 30(4), 353–365.
- Jablonka, E., & Raz, G. (2009). Transgenerational epigenetic inheritance: Prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Quarterly Review of Biology*, 84, 131–176.
- Jaramillo-Pineda, J., Guerrero-Olazarán, M., Antonio Fuentes-Garibay, J., María Viader-Salvadó, J., Lorenzo Meza-García, J., Hortencia Morales-Ramos, L., & Morales-Ramos, M.-G. J. (2015). *Identificación de especies de Meloidogyne utilizando la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal de estadios juveniles* (Vol. 33).
- Jia, J., Lu, W., Zhong, C., Zhou, R., Xu, J., Liu, W., Gou, X., Wang, Q., Yin, J., Xu, C., & Shan, W. (2017). The 25-26 nt small RNAs in *Phytophthora parasitica* are associated with efficient silencing of homologous endogenous genes. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00773>
- Jia, L., Zhang, D., Xiang, Z., & He, N. J. (2015). Nonfunctional ingestion of plant miRNAs in silkworm revealed by digital droplet PCR and transcriptome analysis. *Sci Rep.*, 5, 122290.
- Jia, Y. J., Feng, B. Z., & Zhang, X. G. (2008). Polygalacturonase, Pectate lyase and pectin methylesterase activity in pathogenic strains of *Phytophthora capsici* incubated under different conditions. *Phytopathology*, 157, 585–591.
- Jiang, R. H. Y., & Tyler, B. M. (2012). Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 295–318.
- Jin, Y., Zhao, J., Zhao, P., Zhang, T., Wang, S., & Guo, H. (2019). A fungal miRNA mediates epigenetic repression of a virulence gene in *Verticillium dahliae*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, 374, 20180309.
- Johannes, F., Colot, V., & Jansen, R. C. (2008). Epigenome dynamics: A quantitative genetics perspective. *Nature Reviews Genetics*, 9, 883–890.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323–329.
- Jung, T., Jung, M. H., Scanu, B., Seress, D., Kovács, G. M., Maia, C., Pérez-Sierra, A., Chang, T.-T., Chandelier, A., Heungens, K., Van Poucke, K., Abad-Campos, P., Léon, M., Cacciola, S. O., & Bakonyi, J. (2017). Six new *Phytophthora* species from ITS Clade 7a including two sexually functional heterothallic hybrid species detected in natural ecosystems in Taiwan. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 38(1), 100–135. <https://doi.org/10.3767/003158517X693615>

- Kalisz, S., & Purugganan, MD. (2004). Epialleles via DNA methylation: Consequences for plant evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 309–314.
- Kalvari, I., Nawrocki, E. P., Ontiveros-Palacios, N., Argasinska, J., Lamkiewicz, K., Marz, M., Griffiths-Jones, S., Toffano-Nioche, C., Gautheret, D., Weinberg, Z., Rivas, E., Eddy, S. R., Finn, R. D., Bateman, A., & Petrov, A. I. (2021). Rfam 14: Expanded coverage of metagenomic, viral and microRNA families. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D192–D200. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1047>
- Kamoun, S. (2001). Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 295–300.
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review Phytopathology*, 44, 41–60.
- Kamoun, S. (2007). Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Plant Biology*, 10, 358–365.
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J. D. G., Judelson, H. S., Ali, G. S., Dalio, R. J. D., Roy, S. G., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., Cahill, D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X. R., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B. M., ... Govers, F. (2015). The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16(4), 413–434. <https://doi.org/10.1111/mpp.12190>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, Issue 1). <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
- Kanneganti, T. D., Huitema, E., Cakir, C., & Kamoun, S. (2006). Synergistic interactions of the plant cell death pathways induced by *Phytophthora infestans* Nep1-like protein PiNPP1.1 and INF1 elicitor. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 19, 854–863.
- Kasuga, T., Bui, M., Bernhardt, E., Swiecki, T., Aram, K., Cano, L. M., Webber, J., Brasier, C., Press, C., Grünwald, N. J., Rizzo, D. M., & Garbelotto, M. (2016). Host-induced aneuploidy and phenotypic diversification in the Sudden Oak Death pathogen *Phytophthora ramorum*. *BMC Genomics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2717-z>
- Kasuga, T., Kozanitas, M., Bui, M., Hüberli, D., Rizzo, D., & Garbelotto, M. (2012). Phenotypic diversification is associated with host-induced transposon derepression in the Sudden Oak Death pathogen *Phytophthora ramorum*. *PLoS One*, 7(4), e34728.
- Katiyar-Agarwal, S., & Jin, H. (2010). Role of Small RNAs in Host-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 225–246. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114457>
- Kehr, M. E., & Díaz, R. P. (2012). Producción de brócoli para la agroindustria. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura Noviembre, Temuco - Chile N° 61*. [Http://Biblioteca.Inia.Cl/Medios/Biblioteca/Informativos/NR38925.Pdf](http://Biblioteca.Inia.Cl/Medios/Biblioteca/Informativos/NR38925.Pdf).
- Keyte, A., Percifield, R., Liu, B., & Wendel, JF. (2006). Intraspecific DNA methylation polymorphism in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Heredity*, 97, 444–450.
- Kim, S., Park, J., Yeom, S. I., Kim, Y. M., Seo, E., Kim, K. T., Kim, M. S., Lee, J. M., Cheong, K., Shin, H. S., Kim, S. B., Han, K., Lee, J., Park, M., Lee, H. A., Lee, H. Y., Lee, Y., Oh, S., Lee, J. H., ... Choi, D. (2017). New reference genome sequences of hot pepper reveal the massive evolution of plant disease-resistance genes by retroduplication. *Genome Biology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1341-9>
- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 126–139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>
- King, M., & Wilson, A. (1975). Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science*, 188, 107–116.
- Kirkegaard, J. A., & Sarwar, M. (1998). Biofumigation potential of Brassicas: Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown Brassicas. *Plant Soil*, 201, 71–89.
- Kleinbaum, X., Keeper, X., & Morgenstem, X. (1984). *Manual sobre el enfoque de riesgo en la atención de la salud*.

- Klironomos, F., Berg, J., & Collins, S. (2013). How epigenetic mutations can affect genetic evolution: model and mechanism. *BioEssays*, *35*, 571–578.
- Knip, M., Constantin, M., & Thordal-Christensen, H. (2014). Trans-kingdom crosstalk: small RNAs on the move. *PLoS Genetics*, *10*, e1004602.
- Ko, W. (1988). Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. *Annual Review Phytopathology*, *26*, 57–73.
- Koch, A., & Kogel, K.-H. (2014). New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnology Journal*, *12*(7), 821–831. <https://doi.org/10.1111/pbi.12226>
- Koch, A., Kumar, N., Weber, L., Keller, H., Imani, J., & Kogel, K.-H. (2013). Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase–encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(48), 19324–19329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306373110>
- Krasnow, C. S., & Hausbeck, M. K. (2015). Pathogenicity of *Phytophthora capsici* to *Brassica* vegetable crops and biofumigation cover crops (*Brassica* spp.). *Plant Disease*, *99*, 1721–1726.
- Krek, A., Grun, D., Poy, M., & et al. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, *37*(5), 495–500.
- Kreutzer W. A. (1937). *Phytophthora* rot of cucumber fruit. *Phytopathology*, *27*, 955.
- Kreutzer, W. A., Bodine, E. W., & Durrel, L. W. (1940). Cucurbit diseases and rot of tomato fruit caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, *30*, 972–976.
- Kreutzer, W. A., & Bryant, L. R. (1946). Certain aspects of the epiphytology and control of tomato fruit rot caused by *Phytophthora capsici* Leonian. *Phytopathology*, *36*, 329–339. *Phytopathology*, *36*, 329–339.
- Krings, M., Taylor, T. N., & Dotzler, N. (2011). The fossil record of the Peronosporomycetes (Oomycota). *Mycologia*, *103*, 455–457.
- Kronholm, I., Johannesson, H., & Ketola, T. (2016). Epigenetic control of phenotypic plasticity in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *6*(12), 4009–4022. <https://doi.org/10.1534/g3.116.033860>
- Kronholm, I., Johannesson, H., & Ketola T. (2016). Epigenetic control of phenotypic plasticity in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Genes Genomes Genetics*, *6*, 4009–4022.
- Kuan, T., Zhai, Y., & Ma, W. (2016). Small RNAs regulate plant responses to filamentous pathogens. *Semin. Cell Dev. Biol.*, *56*, 190–200.
- Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O., Santos, I., Solórzano, F., & Miranda, G. (2009). Infectología Clínica Kumate-Gutiérrez. In E. Méndez (Ed.), *Capítulo 3: Mecanismos patógenicos* (17th ed.). ISBN 968-5328-77-3.
- Kvitko, B. H., Park, D. H., Velásquez, A. C., Wei, C.-F., Russell, A. B., Martin, G. B., Schneider, D. J., & Collmer, A. (2009). Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS Pathogens*, *5*(4), e1000388. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000388>
- L. H. Leonian. (1922). Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology*, *12*, 401–408.
- Lachke, S., Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., & Soll, DR. (2000). Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP. *Infect Immun*, *68*, 495–884.
- LaMonte, G., Philip, N., Reardon, J., Lacsina, J. R., Majoros, W., Chapman, L., Thornburg, C. D., Telen, M. J., Ohler, U., Nicchitta, C. V., Haystead, T., & Chi, J.-T. (2012). Translocation of Sickle Cell Erythrocyte MicroRNAs into *Plasmodium falciparum* Inhibits Parasite Translation and Contributes to Malaria Resistance. *Cell Host & Microbe*, *12*(2), 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.007>

- Lamour, K. H., & Hausbeck, M. K. (2000). Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology*, *90*, 396–400.
- Lamour, K. H., & Hausbeck, M. K. (2001). The dynamics of mefenoxam insensitivity in a recombining population of *Phytophthora capsici* characterized with amplified fragment length polymorphism markers. *Phytopathology*, *91*, 553–557.
- Lamour, K. H., & Hausbeck, M. K. (2003). Effect of crop rotation on the survival of *Phytophthora capsici* and sensitivity to mefenoxam. *Plant Disease*, *87*, 841–845.
- Lamour, K. H., Mudge, J., Gobena, D., Hurtado-Gonzales, O. P., Schmutz, J., Kuo, A., Miller, N. A., Rice, B. J., Raffaele, S., Cano, L. M., Bharti, A. K., Donahoo, R. S., Finley, S., Huitema, E., Hulvey, J., Platt, D., Salamov, A., Savidor, A., Sharma, R., ... Kingsmore, S. F. (2012). Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *25*(10), 1350–1360. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-12-0028-R>
- Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., & Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Lamour, K., & Kamoun, S. (2009). Oomycete genetics and genomics: Diversity, interactions, and research tools. *Blackwell Publishing, Hoboken, NJ, U.S.A.*
- Lande, R. (2009). Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. *J Evol Biol*, *22*, 1435–1446.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, *9*(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Larroque, M., Belmas, E., Martinez, T., Vergnes, S., Ladouce, N., Lafitte, C., Gaulin, E., & Dumas, B. (2013). Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity and resistance to the root pathogen *Phytophthora parasitica* in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *64*(12), 3615–3625. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert195>
- Larsen, P. (1980). Secondary plant products. *P. Stumpf. and E. Conn., Eds. Academic Press, New York. The Biochemistry of Plants*, *7*, 501–525.
- Latijnhouwers, M., de Wit, P. J., & Govers, F. (2003). Oomycetes and fungi: Similar weaponry to attack plants. *Trends Microbiology*, *11*, 462–469.
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, *11*(3), 204–220. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>
- Lee, B. K., Kim, B. S., Chang, S. W., & Hwang, B. K. (2001). Aggressiveness to pumpkin cultivars of isolates of *Phytophthora capsici* from pumpkin and pepper. *Plant Disease*, *85*, 497–500.
- Lee, J. H., Siddique, M. I., Kwon, J. K., & Kang, B. C. (2021). Comparative Genomic Analysis Reveals Genetic Variation and Adaptive Evolution in the Pathogenicity-Related Genes of *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.694136>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, *23*(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Levis, N. A., & Pfennig, D. W. (2016). Evaluating “Plasticity-First” Evolution in Nature: Key Criteria and Empirical Approaches. *Trends in Ecology & Evolution*, *31*(7), 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.03.012>
- Levy, S., & Siegal, M. L. (2008). Network hubs buffer environmental variation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biology*, *6*, e264.

- Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J., Cohn, M., Tung, J., Sun, H., Kumar, P., & Baker, B. (2012). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, *109*, 1790–1795.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, J., Kim, T., Nutiu, R., Ray, D., Hughes, T. R., & Zhang, Z. (2014). Identifying mRNA sequence elements for target recognition by human Argonaute proteins. *Genome Research*, *24*(5), 775–785. <https://doi.org/10.1101/gr.162230.113>
- Li, P., Feng, B., Wang, H., Tooley, P. W., & Zhang, X. (2011). Isolation of nine *Phytophthora capsici* pectin methylesterase genes which are differentially expressed in various plant species. *Basic Microbiology*, *51*, 61–70.
- Li, Y., Liu, X., Yin, Z., You, Y., Zou, Y., & et al. (2020). MicroRNA-like miR236, regulated by transcription factor MoMsn2, targets histone acetyltransferase MoHat1 to play a role in appressorium formation and virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* , *137*, 103349.
- Liang, H., Zhang, S., Fu, Z., Wang, Y., Wang, N., Liu, Y., Zhao, C., Wu, J., Hu, Y., Zhang, J., & et al. (2015). Effective detection and quantification of dietetically absorbed plant microRNAs in human plasma. *J Nutr Biochem.* , *26*(5), 505–512.
- Linde, C., Drenth, A., Kemp, G. H. J., Wing@eld, M. J., & von Broembsen, S. L. (1997). Population structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Phytopathology*, *87*, 822–827.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., & Sattler, M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, *426*(6965), 465–469. <https://doi.org/10.1038/nature02123>
- Liu, J., Cheng, X., Liu, D., Xu, W., Wise, R., & Shen, Q. (2014). The miR9863 family regulates distinct Mla alleles in barley to attenuate NLR receptor-triggered disease resistance and cell-death signaling. *PLOS Genet.* , *10*:e1004755.
- Liu, L., & Chen, X. (2018). Intercellular and systemic trafficking of RNAs in plants. *Nat. Plants*, *4*, 869–878.
- Liu, Q., Feng, Y., & Zhu, Z. (2009). Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Functional & Integrative Genomics*, *9*(3), 277–286. <https://doi.org/10.1007/s10142-009-0111-5>
- Lucas, S. J., Baştaş, K., & Budak, H. (2014). Exploring the interaction between small RNAs and R genes during *Brachypodium* response to *Fusarium culmorum* infection. *Gene*, *536*(2), 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.12.025>
- Luo, Y., Wang, P., Wang, X., Wang, Y., Mu, Z., Li, Q., Fu, Y., Xiao, J., Li, G., Ma, Y., & et al. (2017). Detection of dietetically absorbed maize-derived microRNAs in pigs. *Sci Rep.*, *7*(1), 645.
- Ma, J., Wang, C., Long, K., Zhang, H., Zhang, J., Jin, L., Tang, Q., Jiang, A., Wang, X., Tian, S., & et al. (2017). Exosomal microRNAs in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) breast milk: potential maternal regulators for the development of newborn cubs. *Sci Rep.* , *7*(1), 3507.
- Makeyev, E. v., & Bamford, D. H. (2002). Cellular RNA-Dependent RNA Polymerase Involved in Posttranscriptional Gene Silencing Has Two Distinct Activity Modes. *Molecular Cell*, *10*(6), 1417–1427. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00780-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00780-3)
- Malone, C. D., & Hannon, G. J. (2009). Small RNAs as guardians of the genome. *Cell*, *136*(4), 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.045>
- Malvick, D. K. , & Percich, J. A. (1997). Variation in pathogenicity and genotypes among single zoospore strains of *Aphanomyces eutiches*. *Phytopathology*, *88*, 52–57.
- Mary K. Hausbeck, & Kurt H. Lamour. (2004). *Phytophthora capsici* on Vegetable Crops: Research Progress and Management Challenges. *Plant Disease*, *82*(12), 1292–1303.
- Mason, P. A. (2016). On the role of host phenotypic plasticity in host shifting by parasites. *Ecology Letters*, *19*(2), 121–132. <https://doi.org/10.1111/ele.12555>

- Masood, M., Everett, C., Chan, S., & Snow, JW. (2016). Negligible uptake and transfer of diet-derived pollen microRNAs in adult honey bees. *RNA Biol.*, *13*(1), 109–118.
- Matzke, M., & Mosher, R. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.*, *15*, 394–408.
- Maynard Smith, J., & Szathmáry, E. (1995). The Major Transitions in Evolution. *W. H. Freeman*.
- McDonald, B. A., & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathology*, *40*, 349–379.
- McEwan, D., Weisman, A., & Hunter, C. (2012). Uptake of extracellular double-stranded RNA by SID-2. *Mol Cell*, *47*(5), 746–754.
- McVaugh, R. (1987). A Descriptive Account of the Vascular Plants of Western México. *Leguminosae*, 5(The University of Michigan Press. USA.).
- Mehta, A., Mann, M., Zhao, J. L., Marinov, G. K., Majumdar, D., Garcia-Flores, Y., Du, X., Erikci, E., Chowdhury, K., & Baltimore, D. (2015). The microRNA-212/132 cluster regulates B cell development by targeting Sox4. *The Journal of Cell Biology*, *210*(7), 2107OIA191. <https://doi.org/10.1083/jcb.2107OIA191>
- Meitz, J. C., Linde, C. C., Thompson, A., Langenhoven, S., & McLeod, A. (2010). *Phytophthora capsici* on vegetable hosts in South Africa: Distribution, host range and genetic diversity. *Australas. Plant. Pathology*, *39*, 431–439.
- Melnyk, C., Molnar, A., & Baulcombe, D. (2011). Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.*, *30*, 3553–3563.
- Mendel, G. J., Versuche über, P.-H., & Verhandlungen, des naturforschenden Vereines in B. I. (1865). *X*. 3–47.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., & et al. (2008). Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* Argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, *133*, 116–127.
- Miska, E., & Ferguson-Smith, A. (2016). Transgenerational inheritance: models and mechanisms of non-DNA sequence-based inheritance. *Science*, *354*, 59–63.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D412–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>
- Mittelbrunn, M., & Sanchez-Madrid, F. (2012). Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *13*, 328–335.
- Mlotshwa, S., Pruss, G., MacArthur, J., Endres, M., Davis, C., Hofseth, L., Pena, M., & Vance, V. (2015). A novel chemopreventive strategy based on therapeutic microRNAs produced in plants. *Cell Res.*, *25*(4), 521–524.
- Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C., & Höhn, B. (2006). Transgeneration memory of stress in plants. *Nature*, *442*, 1046–1049.
- Molnar, A., Melnyk, C. W., Bassett, A., Hardcastle, T. J., Dunn, R., & Baulcombe, D. C. (2010). Small Silencing RNAs in Plants Are Mobile and Direct Epigenetic Modification in Recipient Cells. *Science*, *328*(5980), 872–875. <https://doi.org/10.1126/science.1187959>
- Morgan, D., & Whitelaw, E. (2008). The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Mamm. Genome.*, *19*(6), 397–7.
- Morgan, W. and K. S. (2007). RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Microbiology*, *10*, 332–338.
- Moroney, J., Rundel, P., & Sork, V. (2013). Phenotypic plasticity and differentiation in fitness-related traits in invasive populations of the Mediterranean forb *Centaurea melitensis* (Asteraceae). *Am J Bot*, *100*, 2040.
- Nakai, K., & Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences*, *24*(1), 34–35. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01336-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01336-X)

- Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M. E., Delgado, S., Flores, R., & di Serio, F. (2012). Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *The Plant Journal*, *70*(6), 991–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04940.x>
- Navarro, J.-A., Daròs, J.-A., & Flores, R. (1999). Complexes Containing Both Polarity Strands of Avocado Sunblotch Viroid: Identification in Chloroplasts and Characterization. *Virology*, *253*(1), 77–85. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9497>
- Nawaz, K., Shahid, A. A., Subhani, M. N., Iftikhar, S., & Anwar, W. (2018). First report of leaf spot caused by *Phytophthora capsici* on chili pepper (*Capsicum frutescens* L.) in Pakistan. *Jornal Plant Pathology*, *100*, 127.
- Nicolas, F., Torres-Martinez, S., & Ruiz-Vazquez, R. (2003). Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO J*, *22*, 3983–3991.
- Nicotra, A. B., Atkin, O. K., Bonser, S. P., Davidson, A. M., Finnegan, E. J., & et al. (2010). Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends Plant Sci.*, *15*, 684–692.
- Norden-Krichmar, T. M., Allen, A. E., Gaasterland, T., & Hildebrand, M. (2011). Characterization of the Small RNA Transcriptome of the Diatom, *Thalassiosira pseudonana*. *PLoS ONE*, *6*(8), e22870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022870>
- Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J., & Schweizer, P. (2010). HIGS: Host-Induced Gene Silencing in the Obligate Biotrophic Fungal Pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell*, *22*(9), 3130–3141. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.077040>
- Nunes, C. C., & Dean, R. A. (2012). Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. *Molecular Plant Pathology*, *13*(5), 519–529. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00766.x>
- Nunes, C. C., Gowda, M., Sailsbery, J., Xue, M., Chen, F., Brown, D. E., Oh, Y., Mitchell, T. K., & Dean, R. A. (2011). Diverse and tissue-enriched small RNAs in the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genomics*, *12*(1), 288. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-288>
- Oh, S., Young, C., Lee, M., Oliva, R., Bozkurt, T., & et al. (2009). In planta expression screens of *Phytophthora infestans* RXLR effectors reveal diverse phenotypes, including activation of the *Solanum bulbocastanum* disease resistance protein Rpi-blb2. *Plant Cell*, *21*, 2928–2947.
- Ojeda-Rivera, J. O., Ulloa, M., Roberts, P. A., Kottapalli, P., Wang, C., Nájera-González, H.-R., Payton, P., Lopez-Arredondo, D., & Herrera-Estrella, L. (2022). Root-Knot Nematode Resistance in *Gossypium hirsutum* Determined by a Constitutive Defense-Response Transcriptional Program Avoiding a Fitness Penalty. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.858313>
- Oliva, R., Win, J., Raffaele, S., Boutemy, L., & Bozkurt, T. O. (2010). Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cellular Microbiology*, *12*, 705–715.
- Overdijk, E. J. R., Putker, V., Smits, J., Tang, H., Bouwmeester, K., Govers, F., & Ketelaar, T. (2021). *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR1 disturbs the growth of *Physcomitrium patens* without affecting Sec5 localization. *PLOS ONE*, *16*(4), e0249637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249637>
- OWENS, R. A. (2007). Potato spindle tuber viroid: the simplicity paradox resolved? *Molecular Plant Pathology*, *8*(5), 549–560. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00418.x>
- Pabón-Martínez, Y. V. (2011). Revisión de Tema MicroARNs: una visión molecular MicroRNA (miRNA): A molecular view. *Universidad Industrial de Santander*, 289–297.
- Pacheco, J. M. (2015). Efectores de oomycetes fitopatogénicos: en la primera línea de ataque Effectors phytopathogenic oomycetes: the first line of attack. In *Fitosanidad* (Vol. 19, Issue 3).
- Pál, C. (1998). Plasticity, memory and the adaptive landscape of the genotype. *Proc. Biol. Sci.*, *265*, 1319–1323.

- Parizotto, E., Dunoyer, P., Rahm, N., Himber, C., & Voinnet, O. (2004). In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes Dev.*, *18*, 2237–2242.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, *12*(17), 1484–1495. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01017-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01017-5)
- Parkin, I. A. P., Koh, C., Tang, H., Robinson, S. J., Kagale, S., Clarke, W. E., Town, C. D., Nixon, J., Krishnakumar, V., Bidwell, S. L., Denoeud, F., Belcram, H., Links, M. G., Just, J., Clarke, C., Bender, T., Huebert, T., Mason, A. S., Chris Pires, J., ... Sharpe, A. G. (2014). Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome Biology*, *15*(6). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-6-r77>
- Perez, M., & Lehner, B. (2019). Intergenerational and transgenerational epigenetic inheritance in animals. *Nat Cell Biol*, *21*, 143–151.
- Perrine-Walker, F. (2020). *Phytophthora palmivora*–cocoa interaction. In *Journal of Fungi* (Vol. 6, Issue 3, pp. 1–20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jof6030167>
- Pons-Hernández, J. L., Guerrero-Aguilar, B. Z., Martín González-Chavira, M., González-Pérez, E., Villalobos-Reyes, S., & Muñoz-Sánchez, C. I. (2020). Variabilidad fenotípica de aislados de *Phytophthora capsici* en Guanajuato. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, *11*(8), 1891–1901. <https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v11i8.2618>
- Qiao, Y., Xia, R., Zhai, J., Hou, Y., Feng, L., Zhai, Y., & Ma, W. (2021). Small RNAs in Plant Immunity and Virulence of Filamentous Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *13*, 1–24. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-121520>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Qutob, D., Chapman, B. P., & Gijzen, M. (2013). Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen. *Nature Communications*, *4*, 1349. <https://doi.org/10.1038/ncomms2354>
- Qutob, D., Tedman-Jones, J., Dong, S., Kufli, K., Pham, H., Wang, Y., Dou, D., Kale, S. D., Arredondo, F. D., Tyler, B. M., & Gijzen, M. (2009). Copy number variation and transcriptional polymorphisms of *Phytophthora sojae* RXLR effector genes Avr1a and Avr3a. *PLoS One*, *4*(4), e5066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005066>
- Raffaele, S., & Kamoun, S. (2012). Genome evolution in filamentous plant pathogens: Why bigger can be better. *Nat. Rev. Microbiology*, *10*, 417–430.
- Raffaele, S., Farrer, R. A., Cano, L. M., Studholme, D. J., MacLean, D., Thines, M., Jiang, R. H. Y., Zody, M. C., Kunjeti, S. G., Donofrio, N. M., Meyers, B. C., Nusbaum, C., & Kamoun, S. (2010). Genome evolution following host jumps in the Irish potato famine pathogen lineage. *Science (New York, N.Y.)*, *330*(6010), 1540–1543. <https://doi.org/10.1126/science.1193070>
- Rajewsky, N. (2006). microRNA target predictions in animals. *Nat Genet*, *38* Suppl, S8-13.
- Ramírez-Delgado, E., L.-R. J. J. (2015). *Evaluación del control biológico de Phytophthora capsici en Chile (Capsicum annuum L.) por Trichoderma spp.* Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Rancati, G., Pavelka, N., Fleharty, B., Noll, A., Trimble, R., Walton, K., Perera, A., Staehling-Hampton, K., Seidel, C., & Li, R. (2008). Aneuploidy underlies rapid adaptive evolution of yeast cells deprived of a conserved cytokinesis motor. *Cell*, *135*(5), 879.
- Rando, O. J., & Verstrepen, K. J. (2007). Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance. *Cell*, *128*(4), 655–668. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.023>
- Reinders-Wulff, B., Mirouze, M., Marí-Ordóñez, A., Dapp, M., Rozhon, W., Bucher, E., Theiler, G., & Paszkowski, J. (2009). Compromised stability of DNA methylation and transposon immobilization in mosaic *Arabidopsis* epigenomes. *Genes and Development*, *23*, 939–950.

- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, *16*(13), 1616–1626. <https://doi.org/10.1101/gad.1004402>
- Richards, C. L., Bossdorf, O., & Pigliucci, M. (2010). What role does heritable epigenetic variation play in phenotypic evolution? *BioScience*, *60*(3), 232–237. <https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.3.9>
- Ristaino, J. B. (1990). Intraspecific Variation Among Isolates of *Phytophthora capsici* from Pepper and Cucurbit Fields in North Carolina. *Phytopathology*, *80*(11), 1253. <https://doi.org/10.1094/phyto-80-1253>
- Ristaino, J. B., & S.A. Johnston. (1999). Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell. *Plant Disease*, *83*, 1080–1089.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnology*, *29*(1), 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt0111-24>
- Rojas Rojas, F. U., Sevillano Serrano, J., & Vega Arreguín, J. C. (2021, November 13). Análisis de la expresión de metilasas y desmetilasas de histonas relacionadas a la marca H3K4me3 en *Phytophthora capsici*. VI Simposio Nacional de Herramientas de Biotecnología Para Una Agricultura Sustentable.
- Rojas-Rojas, F. U., & Vega-Arreguín, J. C. (2021). Epigenetic insight into regulatory role of chromatin covalent modifications in lifecycle and virulence of *Phytophthora*. *Environmental Microbiology Reports*, *13*(4), 445–457. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12954>
- Rose, J. K., Ham, K. S., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (2002). Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell*, *14*, 1329–1345.
- Rubin, E., Lithwick, G., & Levy, A. (2001). Structure and evolution of the hAT transposon superfamily. *Genetics*, *158*, 949–957.
- Ruden, D., Garfinkel, M., Xiao, L., & Lu, X. (2005). Epigenetic regulation of trinucleotide repeat expansions and contractions and the “biased embryos” hypothesis for rapid morphological evolution. *Current Genomics*, *6*, 145–155.
- Runge, F., & Thines, M. (2011). Host matrix has major impact on the morphology of *Pseudoperonospora cubensis*. *Eur. J. Plant Pathol.*, *129*, 147–156.
- Rutherford, F. S., Ward, E. W., & Buzzel, R. I. (1985). Variation in virulence in successive single zoospore propagations of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Phytopathology*, *75*, 371–374.
- Sala, L., Chandrasekhar, S., & Vidigal, J. A. (2021). AGO unchained: Canonical and non-canonical roles of Argonaute proteins in mammals 2. A LONG EVOLUTIONARY ROAD FOR ARGONAUTE PROTEINS HHS Public Access. *Front Biosci*, *25*, 1–42.
- Salmon, A., Ainouche, M., & Wendel, JF. (2005). Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology*, *14*, 1163–1175.
- Salmon, A., Cloutault, J., Jenczewski, E., Chable, V., & Manzanares-Dauleux, MJ. (2008). Brassica oleracea displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Science*, *174*, 61–70.
- Sánchez-Gurrola, C., Gómez-Dorantes, N., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S. P., & Ávila-Quezada, G. (2019). Variabilidad morfológica y sensibilidad de *Phytophthora capsici* causando marchitez en chile pimiento morrón en Chihuahua, México. *Revista Mexicana Fitopatología*, *37*(1), 65–71.
- Satour, M. M., & Butler, E. E. (1967). A root and crown rot of tomato caused by *Phytophthora capsici* and *P. parasitica*. *Phytopathology*, *57*, 510–515.
- Schauer, S. E., Jacobsen, S. E., Meinke, D. W., & Ray, A. (2002). DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends in Plant Science*, *7*(11), 487–491. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02355-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02355-5)
- Schaum, C. E., & Collins, S. (2014). Plasticity predicts evolution in marine algae. *Proc.R. Soc. Lond. B* *281*, 20141486.

- Schlichting, C. D., & Wund, M. A. (2014). Phenotypic plasticity and epigenetic marking: an assessment of evidence for genetic accommodation. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 68(3), 656–672. <https://doi.org/10.1111/evo.12348>
- Schmalhausen, I. I. (1949). *Factors of Evolution: the Theory of Stabilizing Selection*. Blakiston.
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. In *Database* (Vol. 2020). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Schornack, S., van Damme, M., Bozkurt, T. O., Cano, L. M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., & Huitema, E. (2010). Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 17421–17426.
- Schwartz, V. U., Winter, S., Shelest, E., Marcet-Houben, M., Horn, F., Wehner, S., Linde, J., Valiante, V., Sammeth, M., Riege, K., Nowrousian, M., Kaerger, K., Jacobsen, I. D., Marz, M., Brakhage, A. A., Gabaldón, T., Böcker, S., & Voigt, K. (2014). Gene Expansion Shapes Genome Architecture in the Human Pathogen *Lichtheimia corymbifera*: An Evolutionary Genomics Analysis in the Ancient Terrestrial Mucorales (*Mucoromycotina*). *PLoS Genetics*, 10(8), e1004496. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004496>
- Schwarz-Sommer, Z., Davies, B., & Hudson, A. (2003). An everlasting pioneer: The story of *Antirrhinum* research. *Nat Rev Genet*, 4, 657–666.
- Sevillano, J., Fernando Uriel, R., & Julio César, V. (2022). *Increasing pathogenicity and metalaxyl resistance in Phytophthora*. Trabajo de investigación, datos enviados para publicación
- Shan, W., Cao, M., Leung, D., & Tyler, B. M. (2004). The Avr1b locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene Rps1b. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 17(4), 394–403. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.4.394>
- Shew, D., & Mendoza-Moran, A. (2016). Black Shank Pathogen Biology. *Sitio Web*. <https://Tobacco-Diseases.Info/Home-Page-Grid/Black-Shank-of-Tobacco/Black-Shank-Pathogen-Biology/>.
- Siddique, M. I., Lee, H. Y., Ro, N. Y., Han, K., Venkatesh, J., Solomon, A. M., Patil, A. S., Changkwian, A., Kwon, J. K., & Kang, B. C. (2019). Identifying candidate genes for *Phytophthora capsici* resistance in pepper (*Capsicum annuum*) via genotyping-by-sequencing-based QTL mapping and genome-wide association study. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46342-1>
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., & Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 107, 465–476.
- Simon, A. (2010). *Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Slotkin, R., & Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet*, 8, 272–285.
- Smolinska, U., Morra, M., Knudsen, G., & Brown, H. (1997). Toxicity of glucosinolate degradation products from *Brassica napus* seed meal toward *Aphanomyces euteiches* f. sp. pisi. *Phytopathology*, 87, 77–82.
- Solache-Huacuz, E., Rodríguez-Alvarado, G., Naranjo-Bravo, A. E., Celaya, M.-D., & Fernández-Pavía, S. P. (2010). Técnicas de aislamiento de *Phytophthora* contaminados con bacterias. *Revista de La DES Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 12(1), 61–64. t: <https://www.researchgate.net/publication/255950579>
- Soll, DR. (2002). Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica*, 81, 101–110.

- Song, J.-J., Smith, S. K., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2004). Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. *Science*, 305(5689), 1434–1437. <https://doi.org/10.1126/science.1102514>
- Spierings, D. C., McGoldrick, D., Hamilton-Easton, A. M., Neale, G., Murchison, E. P., Hannon, G. J., Green, D. R., & Withoff, S. (2011). Ordered progression of stage-specific miRNA profiles in the mouse B2 B-cell lineage. *Blood*, 117(20), 5340–5349. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-316034>
- Stam, R., Jupe, J., Howden, A. J. M., Morris, J. A., Boevink, P. C., Hedley, P. E., & Huitema, E. (2013). Identification and Characterisation CRN Effectors in *Phytophthora capsici* Shows Modularity and Functional Diversity. *PLoS ONE*, 8(3), e59517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059517>
- Stassen JHM, V. den A. G. (2011). How do oomycete effectors interfere with plant life? *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 407–414.
- Stavast, C. J., & Erkeland, S. J. (2019). The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. In *Cells* (Vol. 8, Issue 11). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells8111465>
- Stevenson, W. R., James, R. v., & Rand, R. E. (2000). Evaluation of selected fungicides to control Phytophthora blight and fruit rot of cucumber. *Fungic Nematicide Tests*, 55, 163.
- Stoks, R., Govaert, L., Pauwels, K., Jansen, B., & de Meester, L. (2016). Resurrecting complexity: the interplay of plasticity and rapid evolution in the multiple trait response to strong changes in predation pressure in the water flea *Daphnia magna*. *Ecol Lett.*, 19, 180.
- Studio Team. (2020). *RStudio Team RStudio: Integrated Development for R. RStudio* (v4.1.2). <http://www.rstudio.com/>.
- Subramanian, B., Gao, S., Lercher, M. J., Hu, S., & Chen, W. H. (2019). Evolview v3: A webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W270–W275. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz357>
- Sun, W. X., Jia, Y. J., O'Neill, L. R., Feng, B. Z., & Shang, X. G. (2008). Genetic diversity in *Phytophthora capsici* from Eastern China. *Plant Pathology*, 30, 414–424.
- Sunkar, R., Girke, T., Jain, P., & Zhu, J. (2005). Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell*, 17, 1397–1411.
- Suzuki, Y., & Nijhout, H. F. (2006). Evolution of a polyphenism by genetic accommodation. *Science*, 311, 650–652.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., & Mello, C. C. (1999). The rde-1 Gene, RNA Interference, and Transposon Silencing in *C. elegans*. *Cell*, 99(2), 123–132. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81644-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81644-X)
- Talavera, G., & Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 56(4), 564–577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- Tatusov, R. L., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Kiryutin, B., Koonin, E. v, Krylov, D. M., Mazumder, R., Mekhedov, S. L., Nikolskaya, A. N., Rao, B. S., Smirnov, S., Sverdlov, A. v, Vasudevan, S., Wolf, Y. I., Yin, J. J., & Natale, D. A. (2003). *The COG database: an updated version includes eukaryotes*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/4/41>
- Thines, M. (2014). Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes, a global overview. *European Journal of Plant Pathology*, 138, 431–447.
- Thines, M., & Kamoun, S. (2010). Oomycete–plant coevolution: recent advances and future prospects. *Curr. Opin. Plant Biology*, 13, 427–433.
- Tian, D., & Babadoost, M. (2004). Host range of *Phytophthora capsici* from pumpkin and pathogenicity of isolates. *Plant Disease*, 88, 485–489.
- Tompkins, C. M., & Tucker, C. M. (1937). *Phytophthora* rot of honeydew melon. *J. Agric. Res.*, 54, 933–944.

- Torto, T., Li, S., Styer, A., Huitema, E., Testa, A., Gow, N. A. R., van West, P., & Kamoun, S. (2003). EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from *Phytophthora*. *Genome Res.*, *13*, 1675–1685.
- Tschermak-Seysenegg, E. (1900). Ueber künstliche Kreuzung bei *Pisum sativum*. *Dtsch. Bot. Ges.*, *18*, 232–239.
- Turchinoyich, A., Toneyitsky, A., & Burwinkel, B. (2016). Extracellular miRNA: a collision of two paradigms. *Trends Biochem Sci.*, *41*(10), 883–892.
- Tyler, B. M. (2002). Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annu. Rev. Phytopathology*, *40*, 137–167.
- Tyler, B. M., Forster, H., & Coffey M.D. (1995). Inheritance of avirulence factors and restriction fragment length polymorphism markers in outcrosses of the oomycete *Phytophthora sojae*. *Mol Plant Microbe Interact*, *8*, 515–523.
- Tyler BM. (2007). *Phytophthora sojae*: Root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Mol Plant Pathol*, *8*(1), 1–8.
- Uchiyama, T., Saito, Y., Kuwabara, H., Fujino, K., Kishima, Y., Martin, C., & Sano, Y. (2008). Multiple regulatory mechanisms influence the activity of the transposon, Tam3, of *Antirrhinum*. *New Phytol*, *179*, 343–355.
- Ulloa, T. de J. J., & Vega, J. C. (2017). *Estudio de la plasticidad fenotípica en el oomiceto patógeno Phytophthora capsici y su importancia en la adaptación a diversos hospederos*. Tesis de Licenciatura, Datos no publicados
- Urgese, G., Paciello, G., Acquaviva, A., & Ficarra, E. (2016). IsomiR-SEA: An RNA-Seq analysis tool for miRNAs/isomiRs expression level profiling and miRNA-mRNA interaction sites evaluation. *BMC Bioinformatics*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0958-0>
- van Otterdijk, S. D., & Michels, K. B. (2016). Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: how good is the evidence? *FASEB J.*, *30*(7), 2457–2465.
- van West, P., Kamoun, S., van 't Klooster, J. W., & Govers, F. (1999). Internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Mol. Cell*, *3*, 339–348.
- van West, P., Morris, B. M., Reid, B., Appiah, A. A., Osborne, M. C., Campbell, T. A., Shepherd, S. J., & Gow, N. A. R. (2002). Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, *15*, 790–798.
- Vastenhouw, N. L., Brunschwig, K., Okihara, K. L., Muller, F., Tijsterman, M., & Plasterk, R. H. A. (2006). Gene expression: long-term gene silencing by RNAi. *Nature*, *442*, 882.
- Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.*, *13*, 350–358.
- Vaughn, M., & et al. (2007). Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology*, *5*, 1617–1629.
- Vega-Arreguín, J. C., Jalloh, A., Bos, J. I., & Moffett, P. (2014). Recognition of an Avr3a Homologue Plays a Major Role in Mediating Nonhost Resistance to *Phytophthora capsici* in *Nicotiana* Species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *27*(8), 770–780. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-14-0014-R>
- Veit, S., Worle, J. M., Nurnberger, T., Koch, W., & Seitz, H. U. (2001). A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco. *Plant Physiology*, *127*, 832–841.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S. I. S., & Moazed, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, *303*, 672–676.
- Verdel, A., & Moazed, D. (2005). RNAi-directed assembly of heterochromatin in fission yeast. *FEBS Lett.*, *579*, 5872–5878.
- Vetukuri, R. R., Åsman, A. K. M., Jahan, S. N., Avrova, A. O., Whisson, S. C., & Dixelius, C. (2013). Phenotypic diversification by gene silencing in *Phytophthora* plant pathogens. *Communicative and Integrative Biology*, *6*(6). <https://doi.org/10.4161/cib.25890>
- Vetukuri, R. R., Åsman, A. K. M., Tellgren-Roth, C., Jahan, S. N., Reimegård, J., Fogelqvist, J., Savenkov, E., Söderbom, F., Avrova, A. O., Whisson, S. C., & Dixelius, C. (2012). Evidence

- for small RNAs homologous to effector-encoding genes and transposable elements in the oomycete *Phytophthora infestans*. *PLoS One*, 7(12), e51399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051399>
- Vetukuri, R. R., Avrova, A. O., Grenville-Briggs, L. J., van West, P., Söderbom, F., Savenkov, E. I., Whisson, S. C., & Dixelius, C. (2011). Evidence for involvement of Dicer-like, Argonaute and histone deacetylase proteins in gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, 12(8), 772–785. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00710.x>
- Votava, E., Baral, J., & Bosland, P.W. (2005). Diversidad genética de variedades locales de Chile (*Capsicum annuum* var. *Annuum* L.) del norte de Nuevo México, Colorado y México. *Econ Bot*, 59, 8–17.
- Waddington, C. H. (1961). Genetic assimilation. *Adv. Genet.*, 10, 257–293.
- Wang, H., Zhang, X., Liu, J., Kiba, T., Woo, J., & et al. (2011). Deep sequencing of small RNAs specifically associated with *Arabidopsis* AGO1 and AGO4 uncovers new AGO functions. *Plant J*, 67, 292–304.
- Wang, L., Chen, H., Li, J., Shu, H., Zhang, X., Wang, Y., Tyler, B. M., & Dong, S. (2020). Effector gene silencing mediated by histone methylation underpins host adaptation in an oomycete plant pathogen. *Nucleic Acids Research*, 48(4), 1790–1799. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1160>
- Wang, M., Weiberg, A., Dellota, E., Yamane, D., & Jin, H. (2017). *Botrytis* small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biol.*, 14, 421–428.
- Wang, M., Weiberg, A., & Jin, H. (2015). Pathogen small RNAs: A new class of effectors for pathogen attacks. *Molecular Plant Pathology*, 16(3), 219–223. <https://doi.org/10.1111/mpp.12233>
- Wang, W., & Jiao, F. (2019). Effectors of *Phytophthora* pathogens are powerful weapons for manipulating host immunity. In *Planta* (Vol. 250, Issue 2, pp. 413–425). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03219-x>
- Wang, X., Hsueh, Y.-P., Li, W., Floyd, A., Skalsky, R., & et al. (2010). Sex-induced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi. *Genes Dev*, 24, 2566–2582.
- Wang, Y., Liang, Y., & Lu, Q. (2008). MicroRNA epigenetic alterations: predicting biomarkers and therapeutic targets in human diseases. *Clin. Genet.*, 74(4), 307–315.
- Waterhouse, G. M., & Brothers, M. P. (1981). The taxonomy of *Pseudoperonospora*. *Mycol.*, 148, 1–28.
- Weiberg, A., Bellinger, M., & Jin, H. (2015). Conversations between kingdoms: small RNAs. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.025>
- Weiberg, A., Wang, M., Bellinger, M., & Jin, H. (2014). Small RNAs: A New Paradigm in Plant-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 495–516. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045933>
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.-D., & Jin, H. (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6154), 118–123. <https://doi.org/10.1126/science.1239705>
- Wheeler, T. J., & Eddy, S. R. (2013). Nhmmer: DNA homology search with profile HMMs. *Bioinformatics*, 29(19), 2487–2489. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt403>
- Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., Armstrong, M. R., Grouffaud, S., vanWest, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I. K., Pritchard, L., & Birch, P. R. (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*, 450, 115–118.
- Whisson, S. C., Vetukuri, R. R., Avrova, A. O., & Dixelius, C. (2012). Can silencing of transposons contribute to variation in effector gene expression in *Phytophthora infestans*? *Mobile Genetic Elements*, 2(2), 110–114. <https://doi.org/10.4161/mge.20265>
- Whitelaw, N., & Whitelaw, E. (2006). How lifetimes shape epigenotype within and across generations. *Human Molecular Genetics*, 15, R131–R137.

- Wiant, J. S. (1940). A rot of winter queen watermelons caused by *Phytophthora capsici*. *J. Agric. Res.*, 60, 73–88.
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855–862. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4)
- Winston, W., Sutherlin, M., Wright, A., Feinberg, E., & Hunter, C. (2007). *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 10565–10570.
- Witwer, K., & Zhang, CY. (2017). Diet-derived microRNAs: unicorn or silver bullet? *Genes Nutr.*, 12, 15.
- Witwer, KW. (2015). Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. *Clin Chem.*, 61(1), 56–63.
- Wu, H. J., Ma, Y. K., Chen, T., Wang, M., & Wang, X. J. (2012). PsRobot: A web-based plant small RNA meta-analysis toolbox. *Nucleic Acids Research*, 40(W1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks554>
- Xu, J., Li, Y., Jia, J., Xiong, W., Zhong, C., Huang, G., Gou, X., Meng, Y., & Shan, W. (2022). Mutations in PpAGO3 Lead to Enhanced Virulence of *Phytophthora parasitica* by Activation of 25–26 nt sRNA-Associated Effector Genes. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.856106>
- Yang, J., Hotz, T., Broadnax, L., Yarmarkovich, M., Elbaz-Younes, I., & Hirschi, K. (2016). Anomalous uptake and circulatory characteristics of the plant-based small RNA MIR2911. *Sci Rep.*, 6, 26834.
- Yang, L. H., Wang, S. L., Tang, L. L., Liu, B., Ye, W. le, Wang, L. L., Wang, Z. Y., Zhou, M. T., & Chen, B. C. (2014). Universal stem-loop primer method for screening and quantification of microRNA. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115293>
- Yang, M., Duan, S., Mei, X., Huang, H., Chen, W., Liu, Y., Guo, C., Yang, T., Wei, W., Liu, X., He, X., Dong, Y., & Zhu, S. (2018). The *Phytophthora cactorum* genome provides insights into the adaptation to host defense compounds and fungicides. *Scientific Reports*, 8(1), 6534. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24939-2>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/134>
- Yin, J., Jackson, K. L., Candole, B. L., Csinos, A. S., Langston, D. B., & Ji, P. (2012). Aggressiveness and diversity of *Phytophthora capsici* isolates in Georgia. *Annals of Applied Biology*, 160, 191–200.
- Yu, A., Lepère, G., Jay, F., Wang, J., Bapaume, L., Wang, Y., Abraham, A.-L., Penterman, J., Fischer, R. L., Voinnet, O., & Navarro, L. (2013). Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in *Arabidopsis* antibacterial defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6), 2389–2394. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211757110>
- Zamanian, M., Fraser, L. M., Agbedanu, P. N., Harischandra, H., Moorhead, A. R., Day, T. A., Bartholomay, L. C., & Kimber, M. J. (2015). Release of Small RNA-containing Exosome-like Vesicles from the Human Filarial Parasite *Brugia malayi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0004069. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004069>
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., & Bartel, D. P. (2000). RNAi. *Cell*, 101(1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0)
- Zarzycka, H. (1996). Effect of various methods of maintenance of *Phytophthora infestans* on its pathogenicity to potato. *Plant Breed. Seed Sci.*, 40, 31–43.
- Zeh, D., Zeh, J., & Ishida, Y. (2009). Transposable elements and an epigenetic basis for punctuated equilibria. *BioEssays*, 31, 715–726.

- Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., & et al. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.* , 22(1), 107–126.
- Zhang, T., Jin, Y., Zhao, J., Gao, F., Zhou, B., & et al. (2016). Host-induced gene silencing of the target gene in fungal cells confers effective resistance to the cotton wilt disease pathogen *Verticillium dahliae*. *Mol. Plant* , 9, 939–942.
- Zhang, T., Zhao, Y., Zhao, J., Wang, S., Jin, Y., & et al. (2016). Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nat. Plants* , 2, 16153.
- Zhang, Y., Wiggins, B., Lawrence, C., Petrick, J., Ivashuta, S., & Heck, G. (2012). Analysis of plant-derived miRNAs in animal small RNA datasets. *BMC Genomics*, 13, 381.
- Zhou, H., Hirata, M., Osawa, R., Fujino, K., & Kishima, Y. (2017). Detainment of tam3 transposase at plasmamembrane by its BED-zinc finger domain. *Plant Physiology*, 173(2), 1492–1501. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00996>
- Zhou, J., Fu, Y., Xie, J., Li, B., & Jiang, D. (2012). Identification of microRNA-like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing. *Mol. Genet. Genomics*, 287, 275.
- Zhou, Q., Wang, Z., Zhang, J., Meng, H., & Huang, B. (2012). Genome-wide identification and profiling of microRNA-like RNAs from *Metarhizium anisopliae* during development. *Fungal Biol.* , 116, 1156.

Índice de ANEXOS

ANEXO 1.	Diagrama general de metodología.	180
ANEXO 2.	Protocolo de extracción de RNAs pequeños de <i>Phytophthora capsici</i> .	182
ANEXO 3.	Protocolo de extracción de DNA genómico de micelio de <i>P. capsici</i> .	183
ANEXO 4.	Protocolo de extracción de RNA total de micelio de <i>P. capsici</i> .	184
ANEXO 5.	Datos de medición de área infectada de hojas de chile, pepino, brócoli y frijol causada por <i>P. capsici</i> .	185
ANEXO 6.	Estadísticos de patogenicidad y virulencia de <i>P. capsici</i> D3 y aislados primarios en hojas de chile pepino, brócoli y frijol a las 24, 48 y 72 hdi.	186
ANEXO 7.	Fenotipo del desarrollo de infección primaria y secundaria causadas por <i>P. capsici</i> en hojas de chile a las 24, 48 y 72 hdi.	187
ANEXO 8.	Fenotipo del desarrollo de infección primaria y secundaria causadas por <i>P. capsici</i> en hojas de pepino a las 24, 48 y 72 hdi.	188
ANEXO 9.	Fenotipo del desarrollo de infección primaria y secundaria causadas por <i>P. capsici</i> en hojas de brócoli a las 24, 48 y 72 hdi.	189
ANEXO 10.	Fenotipo del desarrollo de infección primaria y secundaria causadas por <i>P. capsici</i> en hojas de frijol a las 24, 48 y 72 hdi.	190
ANEXO 11.	Plasticidad fenotípica representativa de micelio en aislados de <i>P. capsici</i>	191
ANEXO 12.	Prueba de hipótesis Chi-cuadrada (X^2) de plasticidad fenotípica colonial y esporangios en aislados de <i>P. capsici</i> .	192
ANEXO 13.	Plasticidad morfológica representativa de esporangios en aislados de <i>P. capsici</i> .	193
ANEXO 14.	Características de micro-estructuras fenotípicas representativas en D3, aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i> .	194
ANEXO 15.	Graficas descriptivas en el análisis de componentes principales en D3 y aislados primarios de <i>P. capsici</i> .	195
ANEXO 16.	Graficas descriptivas en el análisis de componentes principales en D3, aislados primarios y secundarios de <i>P. capsici</i> .	196
ANEXO 17.	Matriz de distancias de D3, aislados primarios y secundarios en <i>P. capsici</i>	197
ANEXO 18.	Características de muestras para análisis de expresión diferencial.	198
ANEXO 19.	Comparación de métodos para la identificación de sRNAs diferencialmente expresados asociados a regiones genómicas de <i>P. capsici</i> .	199
ANEXO 20.	miRNAs únicos y compartidos entre A-ch-ch y A-br-ch anotados en miRBase.	200
ANEXO 21.	Características de miRNAs identificados en A-ch-ch asociados al genoma de <i>P. capsici</i> anotados en miRBase.	201
ANEXO 22.	Características de miRNAs identificados en A-br-ch asociados al genoma de <i>P. capsici</i> anotados en miRBase.	202
ANEXO 23.	Características de miRNAs maduros <i>de novo</i> en A-ch-ch.	203
ANEXO 24.	Características de miRNAs maduros <i>de novo</i> en A-br-ch.	208
ANEXO 25.	Características de posibles genes target de miRNAs <i>de novo</i> asociados al genoma de <i>P. capsici</i> en A-ch-ch.	217
ANEXO 26.	Características de posibles genes target de miRNAs <i>de novo</i> asociados al	218

	genoma de <i>P. capsici</i> en A-br-ch.	
ANEXO 27.	Visualización en IGV del potencial sitio de unión regulatorio de A-ch-ch_102	224
ANEXO 28.	Características de miRNAs <i>de novo</i> identificados de sRNAs asociados a elementos transponibles en A-ch-ch.	225
ANEXO 29.	Características de miRNAs <i>de novo</i> identificados de sRNAs asociados a elementos transponibles en A-br-ch.	226
ANEXO 30.	Visualización en IGV del potencial sitio de unión regulatorio de A-ch-ch_65	227
ANEXO 31.	Características de miRNAs <i>de novo</i> obtenidos de sRNAs asociados al genoma de <i>C. annuum</i> y miRNA obtenido del genoma de <i>P. capsici</i> en A-ch-ch.	228
ANEXO 32.	Características de miRNAs <i>de novo</i> obtenidos de sRNAs asociados al genoma de <i>C. annuum</i> y miRNA obtenido del genoma de <i>P. capsici</i> en A-br-ch.	229
ANEXO 33.	Características de miRNAs anotados en PmiREN 2.0 identificados en A-ch-ch asociados al genoma de <i>Capsicum</i> (memoria epigenética inducida por el hospedero).	230
ANEXO 34.	Características de miRNAs <i>de novo</i> obtenidos de sRNAs asociados al genoma de <i>C. annuum</i> en A-ch-ch.	231
ANEXO 35.	Características de posibles genes target de miRNAs <i>de novo</i> asociados al genoma de <i>C. annuum</i> en A-ch-ch.	232
ANEXO 36.	Características de potenciales miRNAs anotados en PmiREN 2.0 identificados en A-br-ch asociados al genoma de <i>Brassica oleraceae</i> (herencia epigenética inducida por el hospedero).	233
ANEXO 37.	Alineamiento BLAST de miR8788 de <i>P. sojae</i> , <i>P. ramorum</i> y <i>P. infestans</i> contra el genoma de <i>P. capsici</i> .	236
ANEXO 38.	Identificadores utilizados para la reconstrucción filogenética de proteínas Dicer-like.	237
ANEXO 39.	Identificadores utilizados para la reconstrucción filogenética de proteínas exportina 5.	238
ANEXO 40.	Identificadores utilizados para la reconstrucción filogenética de proteínas argonautas.	239
ANEXO 41.	Identificadores utilizados para la reconstrucción filogenética de proteínas RNA polimerasa dependiente de RNA.	241
ANEXO 42.	Estructura secundaria de genes analizados mediante RT-qPCR.	242
ANEXO 43.	Características de genes evaluados por RT-qPCR.	244
ANEXO 44.	Características de oligos utilizados para RT-qPCR.	246
ANEXO 45.	Gel de extracción DNA genómico de <i>P. capsici</i> .	248
ANEXO 46.	Tamaño de amplificación esperado de oligos con PCR punto final.	249
ANEXO 47.	Gel de amplificación A-ch-ch_102.	250
ANEXO 48.	Gel de amplificación de A-ch-ch_65.	251
ANEXO 49.	Gel de extracción de RNA total de <i>P. capsici</i> .	252
ANEXO 50.	Estandarización y validación de amplificación de oligos para RT-qPCR.	253
ANEXO 51.	Curva melt de amplificación de genes analizados por RT-qPCR.	254
ANEXO 52.	Valores de Ct obtenidos de genes y miRNAs.	256

ANEXO 53.	Perfil de expresión de genes y miRNAs analizados por RT-qPCR de <i>P. capsici</i> .	263
ANEXO 54.	Componentes que contribuyen a la varianza en cinco aislados de <i>P. capsici</i> .	264
ANEXO 55.	Distancias en el perfil de expresión de genes y miRNAs analizados por RT-qPCR de <i>P. capsici</i> .	265

ANEXO 1. Diagrama general de metodología

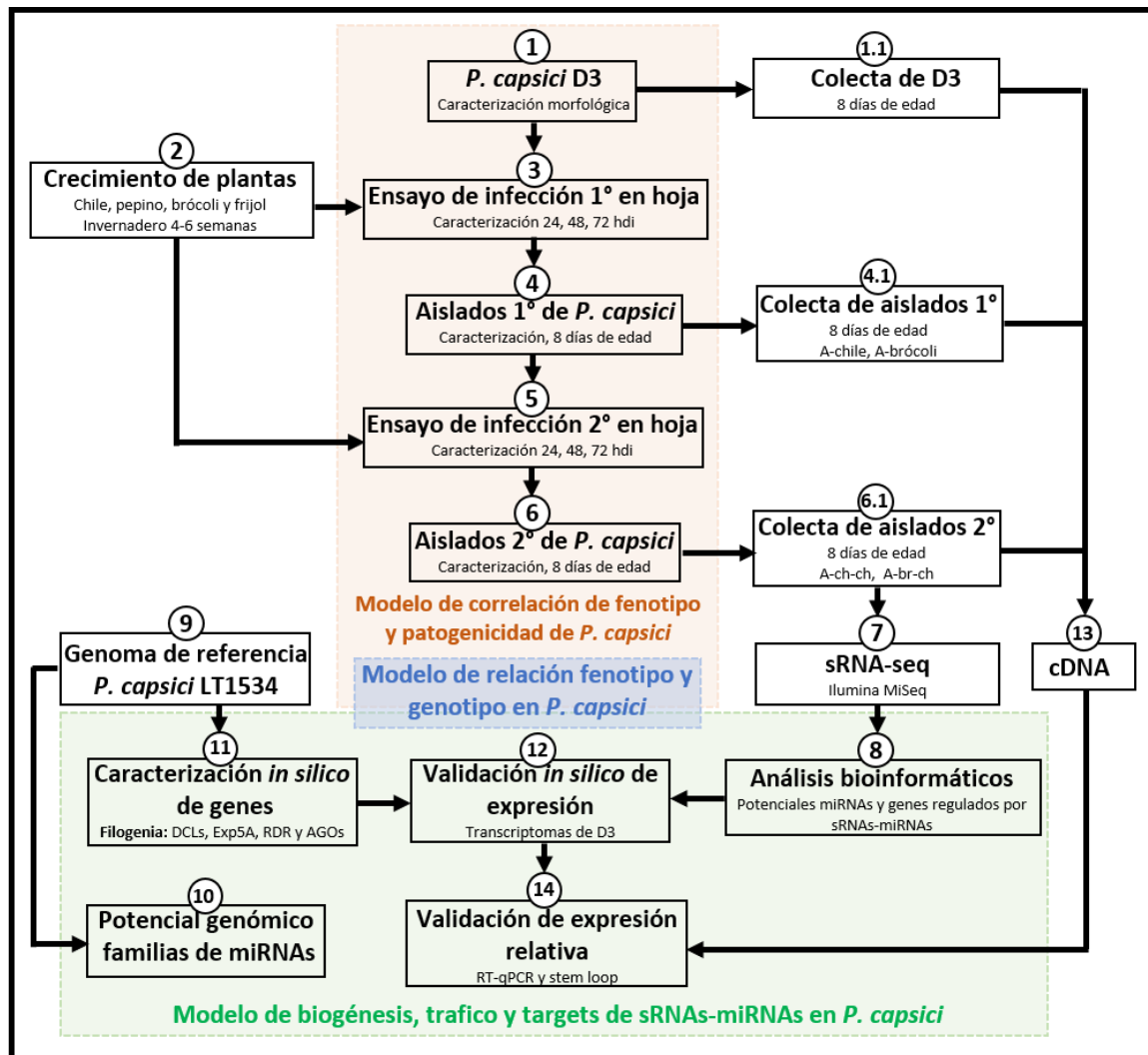


Diagrama general de la metodología utilizada en la investigación, a continuación, se describe de manera breve cada paso ejecutado:

1. *P. capsici* D3: En medio V8-Agar adicionado con antibióticos se creció y caracterizó la cinética de crecimiento, morfología macroscópica y microscópica de la cepa control D3 previamente caracterizada a nivel molecular de *Phytophthora capsici* y se colectó su tejido con nitrógeno líquido.

2. Crecimiento de plantas: En condiciones de invernadero a 28°C durante 4-6 semanas, fueron crecidas cuatro especies vegetales representativas de familias de solanáceas (chile, *Capsicum annuum*, var. *annuum* L.), cucurbitáceas (pepino, *Cucumis sativus*), brassicáceas (brócoli, *Brassica oleracea* var. *italica*) y fabáceas (frijol, *Phaseolus vulgaris*) para los ensayos de infección.

3. Ensayo de infección 1° en hoja: Con discos de 5 mm de diámetro se infectó la parte abaxial de hojas de las cuatro especies vegetales de chile, pepino, brócoli y frijol dispuestas en cámara de humedad a 28°C en oscuridad, monitoreando el desarrollo de la infección a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación (hdi) con fotografías y analizando las diferencias de patogenidad con análisis estadísticos ANOVA.

4. Aislados 1° de *P. capsici*: A las 72 horas después de la inoculación (hdi) del tejido infectado de las cuatro especies vegetales, fue recuperado el patógeno en placas Petri con medio V8-agar adicionado con antibióticos denominados como aislados primarios para caracterizar su morfología macroscópica, microscópica y cinética de crecimiento hasta los 8 días de edad y recolectar su biomasa para posteriores análisis.

5. Ensayo de infección 2° en hoja: A partir de cada aislado primario de *P. capsici*, se realizó una segunda generación de infección en las mismas cuatro especies vegetales de Chile, pepino, brócoli y frijol, obteniendo 16 condiciones diferentes de infecciones, las cuales fueron monitoreadas y analizadas con estadísticos de ANOVA a las 24, 48 y 72 hdi.

6. Aislados 2° de *P. capsici*: A las 72 hdi de las 16 condiciones de infecciones secundarias, se recuperó al patógeno en placas Petri con medio V8-Agar adicionado con antibióticos, obteniendo entonces los aislados secundarios para caracterizar su morfología macroscópica, microscópica y cinética de crecimiento hasta los 8 días de edad y coleccionar su tejido para posteriores análisis. Finalmente, se realizó un análisis de componentes principales, modelo de clusterización del fenotipo y patogenicidad de *P. capsici* a partir de los datos de caracterización de D3, ensayos de infección y aislamientos del patógeno.

7. sRNA-seq: Se obtuvieron los sRNAs de los aislados secundarios A-ch-ch y A-br-ch de *P. capsici* y se realizó sRNA-seq Illumina MiSeq para realizar sus posteriores análisis de secuencias cortas.

8. Análisis bioinformáticos: Fueron caracterizados los datos de sRNA-seq, identificando las poblaciones de sRNAs, potenciales miRNAs, probables genes target, tráfico de sRNAs de la especie vegetal al patógeno como mecanismos de reinos cruzados de RNAi en forma de memoria y herencia epigenética.

9. Genoma de referencia de *P. capsici* LT1534: A partir del genoma de referencia de *P. capsici* LT1534 del Joint Genome Institute (JGI) se realizaron análisis *in silico* sobre identificación del potencial regulatorio del mismo a partir de miRNAs reportados y caracterización de genes asociados a la biogénesis y procesamiento de RNAs no codificantes de genes, mostrados en los pasos 10 y 11, respectivamente.

10. Potencial genómico: Se identificaron familias de miRNAs reportadas en la base de datos miRBasev22 en el genoma de referencia LT1534 de *P. capsici* mediante alineamiento local BLAST.

11. Caracterización *in silico* de genes: Se identificaron y caracterizaron los dominios conservados de genes asociados a la biogénesis y procesamiento de RNAs no codificantes denominados DCLs, Exp5A, RDR y AGOs de *P. capsici* y reconstrucción de sus relaciones filogenéticas con homólogos de otras especies de organismos.

12. Validación *in silico* de expresión: A partir de genes de patogenicidad, modificadores de histonas y transposasa Tam3 identificados como potenciales elementos genéticos a ser regulados por sRNAs y miRNAs, así como de los genes DCLs, Exp5A, RDR y AGOs fue validada su expresión en transcriptomas disponibles de la cepa D3 de *P. capsici* mediante alineamiento local BLAST.

13. cDNA: Se extrajo el RNA total de cuatro condiciones experimentales de *P. capsici* (A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch) así como de la cepa control D3 sin tratamiento para obtener entonces su cDNA y ser utilizado en análisis de expresión relativa.

14. Validación de expresión relativa: Fueron diseñados y sintetizados oligos de 22 genes y 2 miRNAs caracterizados en el paso 11, para analizar su nivel de expresión a partir del cDNA mediante RT-qPCR y stem loop respectivamente. En seguida se generó un modelo gráfico correlativo de los datos de expresión de genes de biogénesis sRNAs-miRNAs, genes de patogenicidad, modificadores de histonas, transposición genómica en *P. capsici*, para finalmente conjuntar este modelo con el modelo de clusterización del fenotipo y patogenicidad creando un modelo integral de correlación mediante clusterización del fenotipo, patogenicidad y nivel de expresión génica-miRNAs del oomiceto.

ANEXO 2. Protocolo de extracción de RNAs pequeños de *Phytophthora capsici*

Se utilizó el kit Plant microRNA Purification kit (NORGEN BIOTEK CORP) para extraer RNAs pequeños a partir de micelio de *P. capsici* previamente colectado y ultracongelado usando el siguiente protocolo:

1. Con ayuda de nitrógeno líquido, mortero y pistilos estériles, triturar ≤ 150 mg de muestra de micelio y transferir el polvo a un tubo eppendorf de 1.5 mL conteniendo 600 μ L de Buffer de lysis C para homogenizar la reacción con vórtex durante 30 seg.
2. Transferir la mezcla del lisado a un "Filter column (clearin-oring)", centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm, 4°C. Transferir la parte cristalina del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL evitando tomar parte del precipitado, en seguida agregar 0.5 volúmenes de etanol al 96-100% y mezclar con vórtex durante 30 segundos.
3. Agregar el lisado del paso anterior a una "Large RNA Removal Column" ensamblada para centrifugar por 1 minuto a 14000 rpm, 4°C y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.
4. Agregar 300 μ L de etanol al 96-100% a la mezcla y por medio de inversión incorporar los componentes.
5. Agregar la mitad del lisado del paso anterior a una "microRNA Enrichment column" ensamblada, centrifugar por 1 minuto a 14000 rpm, 4°C, descartar el flujo y ensamblar la columna, repetir este paso hasta terminar de transferir el lisado por la columna.
6. Agregar 400 μ L de Wash Solution A la columna "microRNA Enrichment", centrifugar por 1 minuto a 14000 rpm, 4°C, asegurándose que la solución de lavado pase por completo a través de la columna, si es necesario puede volver a centrifugar por 1 minuto. Descartar el sobrenadante y reensamblar la columna.
7. Repetir el paso 6 por dos ocasiones más para lavar por segunda y tercera ocasión.
8. Centrifugar la columna "microRNA Enrichment" por 2 minutos a 14000 rpm, 4°C para secar por completo.
9. Pasar la columna "microRNA Enrichment" a un tubo eppendorf de 1.5 mL y agregar 15 μ L de Elution Solution A. Centrifugar a 200 rpm por 1 minuto, 4°C, seguido de centrifugación a 14000 rpm por 1 minuto, 4°C, hasta que el líquido pase por completo a través de la columna.
10. Repetir el paso 9, mantener la muestra a -20°C para uso en días posteriores o -80°C para almacenar por largos periodos.

ANEXO 3. Protocolo de extracción de DNA genómico de micelio de *P. capsici*

Para la extracción de DNA genómico de micelio fresco de *P. capsici* se utilizó el kit Plant/seed DNA Miniprep de ZYMO RESEARCH siguiendo las recomendaciones del fabricante descritas a continuación:

1. A partir de 4 placas de medio V8CA+ de *P. capsici* colectar ~150 mg de micelio aéreo y triturarlo con ayuda de mortero, pistilo y nitrógeno líquido. Posteriormente, transferir el tejido pulverizado a un tubo de lisis ZR BashingBead y agregar 750 μ L de Lysis solution en el tubo.
2. Pasar a un disruptor/vórtex y procesar la muestra a velocidad máxima por 10 minutos y centrifugar el tubo ZR BashingBead a 10000 x g por 1 minuto.
3. Transferir hasta 400 μ L del sobrenadante a una Zymo-Spin IV Spin flitrer (Tapa naranja) en un tubo de colecta y centrifugar a 7000 x g por 1 minuto.
4. Agregar 1200 μ L de Plant/seed DNA Binding Buffer al filtrado en el tubo de colecta y centrifugar a 10000 x g por 1 minuto. Descartar el flujo filtrado del tubo de colecta. Repetir el paso.
5. Agregar 200 μ L de DNA Pre-Wash Buffer a la columna Zymo-Spin IIC y centrifugar a 10000 x g por 1 minuto, descartar el filtrado.
6. Agregar 500 μ L de Plant/seed DNA Wash Buffer a la columna Zymo Spin IIC para centrifugar a 10000 x g por 1 minuto.
7. Transferir la columna Zymo-Spin IIC a un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio y agregar 50 μ L de DNA Elution Buffer directamente a la matriz de la columna, centrifugar a 10000 x g por 30 segundos para eluir el DNA.
8. Transferir el DNA eluido a una columna preparada Zymo-Spin IV HRC Spin flitrer (tapa verde- Preparación: centrifugar a 8000 x g por 3 minutos) con un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio para colectar, centrifugar a 8000 x g por 3 minutos.
9. Guardar el DNA genómico obtenido a -20°C para su uso en corto periodo de tiempo o -80°C para almacenar por largos periodos de tiempo.

ANEXO 4. Protocolo de extracción de RNA total de micelio de *P. capsici*

Se utilizó Quick-RNA Plant Miniprep kit (Zymo Research) para extraer el RNA total del tejido de micelio de *P. capsici* previamente colectado y ultracongelado siguiendo el protocolo del fabricante:

1. Transferir a un tubo ZR Bashing Bead Lysis 150 mg de micelio triturado y agregar 800 μ L de RNA Lysis Buffer. Asegurar el tubo ZR Bashing Bead Lysis a un soporte (Vórtex) para agitar a máxima velocidad por 30-60 segundos.
2. Centrifugar el tubo ZR Bashing Bead Lysis a 14000 x g por 1 minuto. Posteriormente, transferir 400 μ L del sobrenadante a una columna Zymo-Spin IICG y centrifugar a 14000 x g, transfiriendo la fase filtrada a un nuevo tubo eppendorf.
3. Agregar un volumen de etanol absoluto a la fase filtrada recuperada y mezclar mediante inversión. Transferir la mezcla a una columna Zymo-Spin IIC y centrifugar por 30 segundos a 14000 x g (En este paso las muestras son tratadas con DNase I, incubadas a 37°C por una hora).
4. Agregar 400 μ L de RNA Prep Buffer a la columna Zymo-Spin IIC y centrifugar por 30 segundos a 14000 x g, descartar el filtrado. Posteriormente, agregar 700 μ L de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugar por 30 segundos a 14000 x g, descartar el filtrado.
5. Nuevamente agregar 400 μ L de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugar a 14000 x g durante 2 minutos, asegurarse que se removi6 por completo el RNA Wash Buffer. Transferir con cuidado la columna a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL libre de RNAsas.
6. Agregar directamente 50 μ L de agua libre de RNAsas a la matriz de la columna y centrifugar por 30 segundos a 14000 x g.
7. De manera paralela, agregar 600 μ L de Prep Solution a un filtro Zymo-Spin III-HRC, centrifugar a 8000 x g por 3 minutos.
8. Transferir el RNA anteriormente eluido (paso 6) en agua libre de RNAsas al filtro Zymo-Spin III-HRC con un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL libre RNAsas y centrifugar a 16000 x g por 3 minutos para obtener el RNA total de la muestra. El RNA puede ser almacenado a -80°C por periodos relativamente largos.

ANEXO 5. Datos de medición del área infectada en hojas de chile, pepino, brócoli y frijol causada por *P. capsici*

Infección primaria (D3)				Infección secundaria (Aislado primario)											
Muestra	I-chile 24 hdi	I-chile 48 hdi	I-chile 72 hdi	I-ch-ch 24 hdi	I-ch-ch 48 hdi	I-ch-ch 72 hdi	I-pe-ch 24 hdi	I-pe-ch 48 hdi	I-pe-ch 72 hdi	I-br-ch 24 hdi	I-br-ch 48 hdi	I-br-ch 72 hdi	I-fr-ch 24 hdi	I-fr-ch 48 hdi	I-fr-ch 72 hdi
Área infectada (mm ²)	1.13	83.27	104.89	0.2	5.82	100.75	0.9	73.23	107.05	0.36	31.97	163.21	0.92	60.9	130
	0.32	53.67	106.55	0.2	28.48	122.68	1.78	76.36	158.82	0.77	37.43	86.67	0.72	69.44	146.29
	0.4	54.4	86.76	0.33	7.95	153.7	1.5	62.47	140.59	0.26	58.88	79.02	0.32	33.6	179.31
	0.16	51.25	92.8	0.37	30.51	110.73	0.43	59.26	118.34	0.6	28.65	150.28	0.46	37.04	141.92
	0.4	64.89	95.546	0.2	22.37	135.54	0.65	42.1	114.4	0.22	35.83	97.75	0.34	46.43	142.11
Promedio	0.482	61.496	97.3092	0.26	19.026	124.68	1.052	62.684	127.84	0.442	38.552	115.386	0.552	49.482	147.926
Muestra	I-pepino 24 hdi	I-pepino 48 hdi	I-pepino 72 hdi	I-ch-pe 24 hdi	I-ch-pe 48 hdi	I-ch-pe 72 hdi	I-pe-pe 24 hdi	I-pe-pe 48 hdi	I-pe-pe 72 hdi	I-br-pe 24 hdi	I-br-pe 48 hdi	I-br-pe 72 hdi	I-fr-pe 24 hdi	I-fr-pe 48 hdi	I-fr-pe 72 hdi
Área infectada (mm ²)	0.15	0.46	0.76	0.2	0.97	0.82	0.1	12.18	54.93	0.16	0.68	73.1	0.22	0.47	42.53
	0.2	0.78	2.9	0.12	0.85	7.05	0.15	1.92	65.15	0.11	0.78	74.99	0.33	3.69	11.01
	0.33	0.47	5.82	0.09	0.61	13.76	0.2	3.82	62	0.05	0.7	70.61	0.15	0.44	66.86
	0.2	0.33	0.65	0.11	0.38	10	0.33	4.52	42.03	0.08	0.64	48.88	0.08	6.14	48.6
	0.1	0.32	4.74	0.1	0.32	8.76	0.2	17.65	53.443	0.1	0.49	63.34	0.17	0.26	53.32
Promedio	0.196	0.472	2.974	0.124	0.626	8.078	0.196	8.018	55.5106	0.1	0.658	66.184	0.19	2.2	44.464
Muestra	I-brócoli 24 hdi	I-brócoli 48 hdi	I-brócoli 72 hdi	I-ch-br 24 hdi	I-ch-br 48 hdi	I-ch-br 72 hdi	I-pe-br 24 hdi	I-pe-br 48 hdi	I-pe-br 72 hdi	I-br-br 24 hdi	I-br-br 48 hdi	I-br-br 72 hdi	I-fr-br 24 hdi	I-fr-br 48 hdi	I-fr-br 72 hdi
Área infectada (mm ²)	0.43	0.3	0.556	0.33	0.43	2.59	0.88	1.77	3.43	0.2	1.01	3.49	0.48	1.82	60.73
	0.23	0.33	0.35	0.25	0.35	0.64	0.83	2.12	2.3	0.18	0.16	16.89	0.41	3.77	0.91
	0.1	0.34	0.53	0.4	0.52	0.52	0.59	6.79	0.49	0.26	0.25	1.37	0.56	1.55	1.17
	0.14	0.3	0.27	0.32	0.2	0.32	1.01	1.98	0.62	0.29	0.78	2.2	0.43	1.19	11.66
	0.4	0.32	0.574	0.4	0.56	3.44	0.93	1.63	2.31	0.8	0.8	2.52	0.43	0.74	8.9
Promedio	0.26	0.318	0.456	0.34	0.412	1.502	0.848	2.858	1.83	0.346	0.6	5.294	0.462	1.814	16.674
Muestra	I-frijol 24 hdi	I-frijol 48 hdi	I-frijol 72 hdi	I-ch-fr 24 hdi	I-ch-fr 48 hdi	I-ch-fr 72 hdi	I-pe-fr 24 hdi	I-pe-fr 48 hdi	I-pe-fr 72 hdi	I-br-fr 24 hdi	I-br-fr 48 hdi	I-br-fr 72 hdi	I-fr-fr 24 hdi	I-fr-fr 48 hdi	I-fr-fr 72 hdi
Área infectada (mm ²)	1.23	18.7	44.9	1.89	19.09	30.76	4.6	23.9	119.96	1.5	9.35	20.96	0.7	49.48	50.06
	1.87	4.59	13.47	1.66	9.47	37.72	3.53	65.06	34.87	1.96	6.53	87.04	1.32	4.02	96.15
	1.41	2.98	36.66	2.36	5.87	85.96	3.33	49.19	110.63	1.49	4.8	77.54	1.32	46.4	103.46
	1.78	11.42	25.26	1.5	50.94	26.92	5.84	34.93	93.36	1.75	7.08	24.32	2.53	10.01	133.41
	1.76	4.21	21.14	1.63	50.67	31.12	3.28	43.11	83.62	2.3	5.36	62.421	1.9	12.42	114.52
Promedio	1.61	8.38	28.286	1.808	27.208	42.496	4.116	43.238	88.488	1.8	6.624	54.4562	1.554	24.466	99.52

Medición del área infectada (mm²) ocasionada por *P. capsici* D3 y aislados primarios en hojas de chile, pepino, brócoli y frijol por dos generaciones a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación (hdi), correspondiente a la media de cinco experimentos independientes por triplicado en cada condición de infección.

ANEXO 6. Estadísticos de patogenicidad y virulencia de *P. capsici* D3 y aislados primarios en hojas de chile pepino, brócoli y frijol a las 24, 48 y 72 hdi.

Muestra	24 hdi	48 hdi	72 hdi
	mm ² ± SD	mm ² ± SD	mm ² ± SD
l-chile	0.482 ± 0.375	61.496 ± 13.250	97.3092 ± 8.330
l-ch-ch	0.26 ± 0.083	19.026 ± 11.505 ^a	124.68 ± 20.804
l-pe-ch	1.052 ± 0.570	62.684 ± 13.543^b	127.84 ± 21.362
l-br-ch	0.442 ± 0.235	38.552 ± 11.866	115.386 ± 38.609
l-fr-ch	0.552 ± 0.260	49.482 ± 15.370	147.926 ± 18.556^a
l-pepino	0.196 ± 0.085	0.472 ± 0.185	2.974 ± 3.319
l-ch-pe	0.124 ± 0.04	0.626 ± 0.284	8.078 ± 4.748
l-pe-pe	0.196 ± 0.085	8.018 ± 6.654	55.5106 ± 8.963^{a, c}
l-br-pe	0.1 ± 0.040	0.658 ± 0.106	66.184 ± 10.635^{a, c}
l-fr-pe	0.19 ± 0.093	2.2 ± 2.626	44.464 ± 20.736^{a, c}
l-brócoli	0.26 ± 0.150	0.318 ± 0.017	0.456 ± 0.137
l-ch-br	0.34 ± 0.06	0.412 ± 0.143	1.502 ± 1.418
l-pe-br	0.848 ± 0.158	2.858 ± 2.206	1.83 ± 1.252
l-br-br	0.346 ± 0.257	0.6 ± 0.373	5.294 ± 6.526
l-fr-br	0.462 ± 0.060	1.814 ± 1.160	16.674 ± 25.076^{a, c}
l-frijol	1.61 ± 0.275	8.38 ± 6.645	28.286 ± 12.508
l-ch-fr	1.808 ± 0.339	27.208 ± 22.076	42.496 ± 24.605
l-pe-fr	4.116 ± 1.103	43.238 ± 15.448	88.488 ± 33.177^{a, e}
l-br-fr	1.8 ± 0.340	6.624 ± 1.772	54.4562 ± 30.365
l-fr-fr	1.554 ± 0.691	24.466 ± 21.673	99.52 ± 31.010^{a, e, f}

a, diferencia significativa con respecto a la infección primaria (p<0.05)*

b, diferencia significativa con respecto a l-ch-ch (p<0.05)*

c, diferencia significativa con respecto a l-ch-pe (p<0.05)*

d, diferencia significativa con respecto a l-ch-br (p<0.05)*

e, diferencia significativa con respecto a l-ch-fr (p<0.05)*

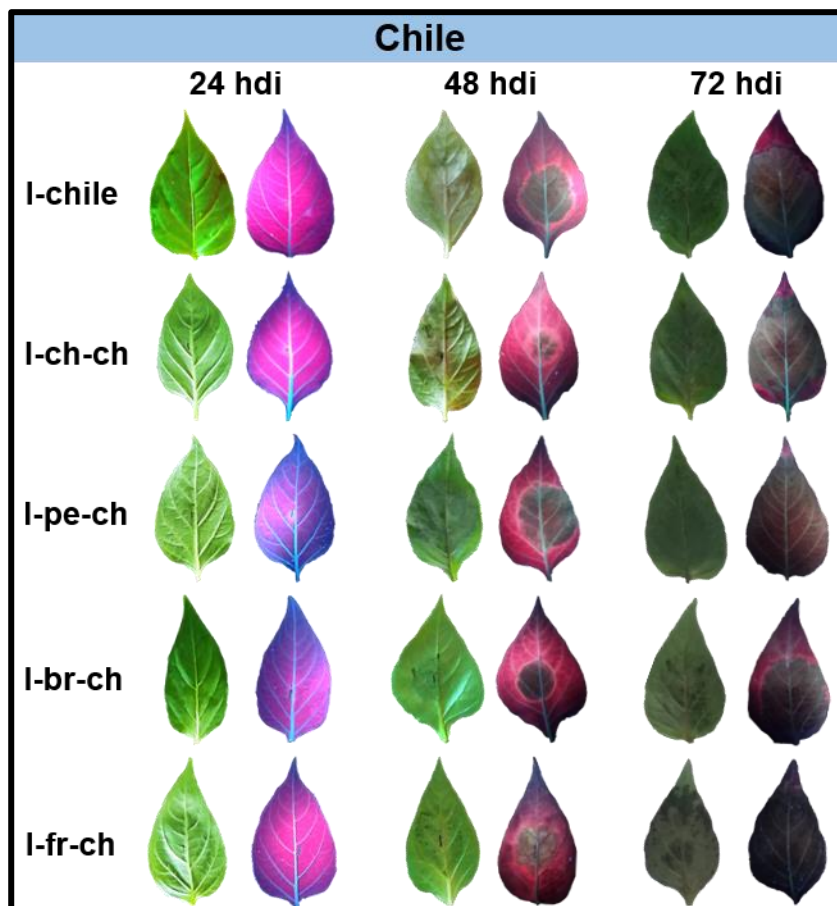
f, diferencia significativa con respecto a l-br-fr (p<0.05)*

*Comparado solo con la misma planta

Negrita indica patogenicidad similar o más alta que la infección primaria

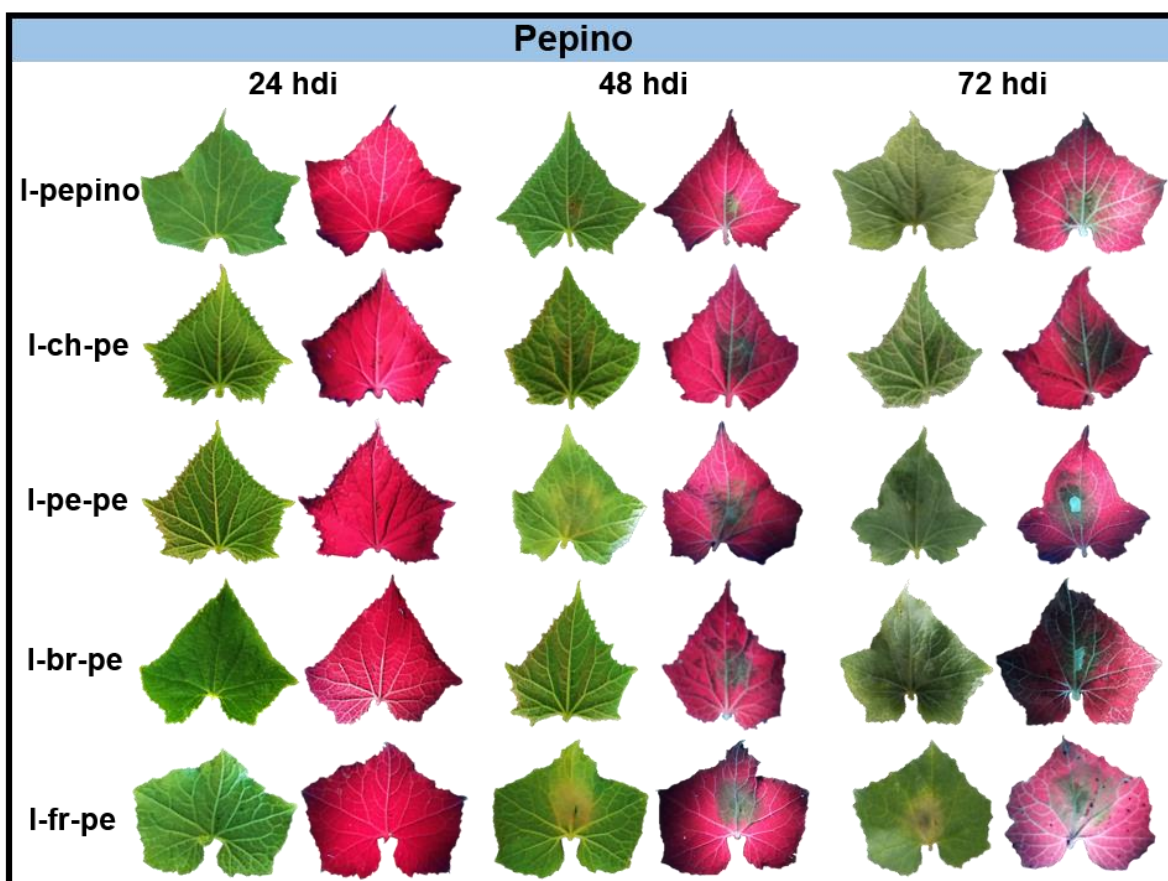
El tamaño de la lesión está expresado como media ± desviación estándar (SD) de dos experimentos independientes por duplicado y triplicado, respectivamente

ANEXO 7. Fenotipo del desarrollo de infección primaria y secundaria causadas por *P. capsici* en hojas de chile a las 24, 48 y 72 hdi



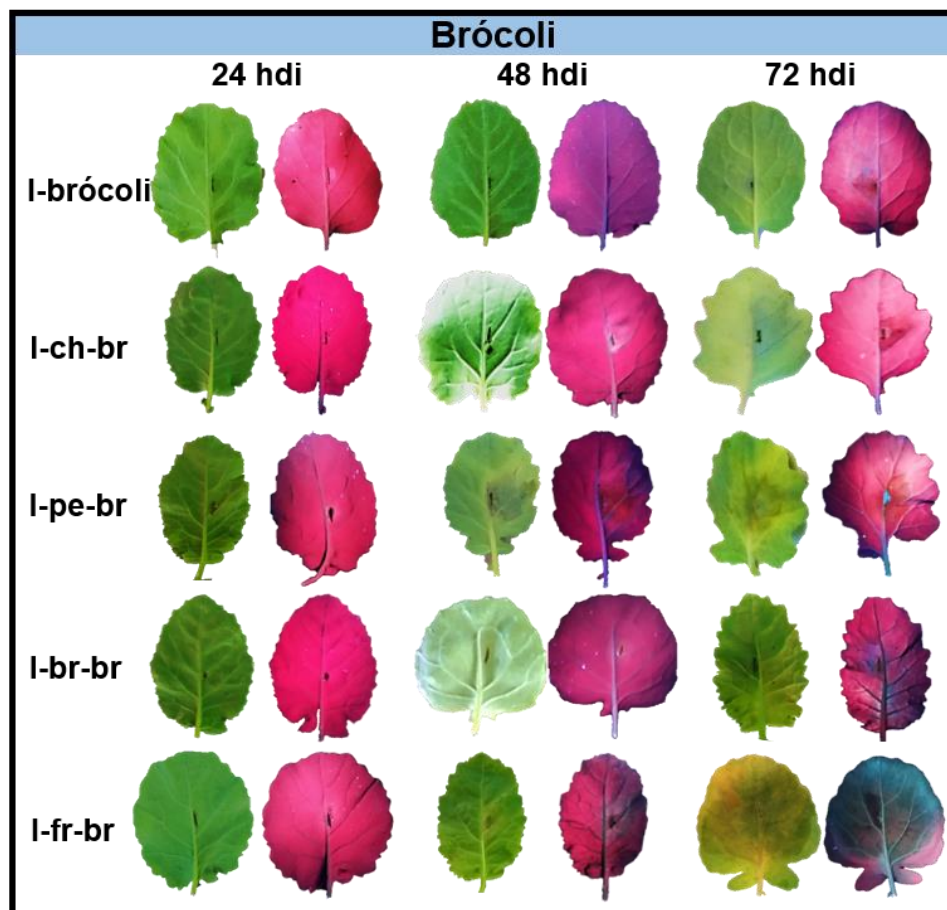
Fenotipo del desarrollo de infección causado por D3 y aislados primarios de *P. capsici* en hoja de chile a las 24, 48 y 72 hdi. La virulencia fue causada por micelio aéreo de D3 y aislados primarios de *P. capsici*. Hoja izquierda de cada periodo de infección fue visualizada bajo luz natural, las regiones oscuras muestran el área infectada, mientras que la hoja derecha fue obtenida a través de la presencia de luz UV de longitud de onda larga de 340nm para la observación de regiones necrosadas del tejido infectado, las regiones en rojo indican tejido sano debido a que la clorofila de las células emite auto-florescencia a la longitud de onda larga del espectro de UV, las regiones oscuras muestran el área infectada necrosada.

ANEXO 8. Fenotipo del desarrollo de infección primaria y secundaria causadas por *P. capsici* en hojas de pepino a las 24, 48 y 72 hdi



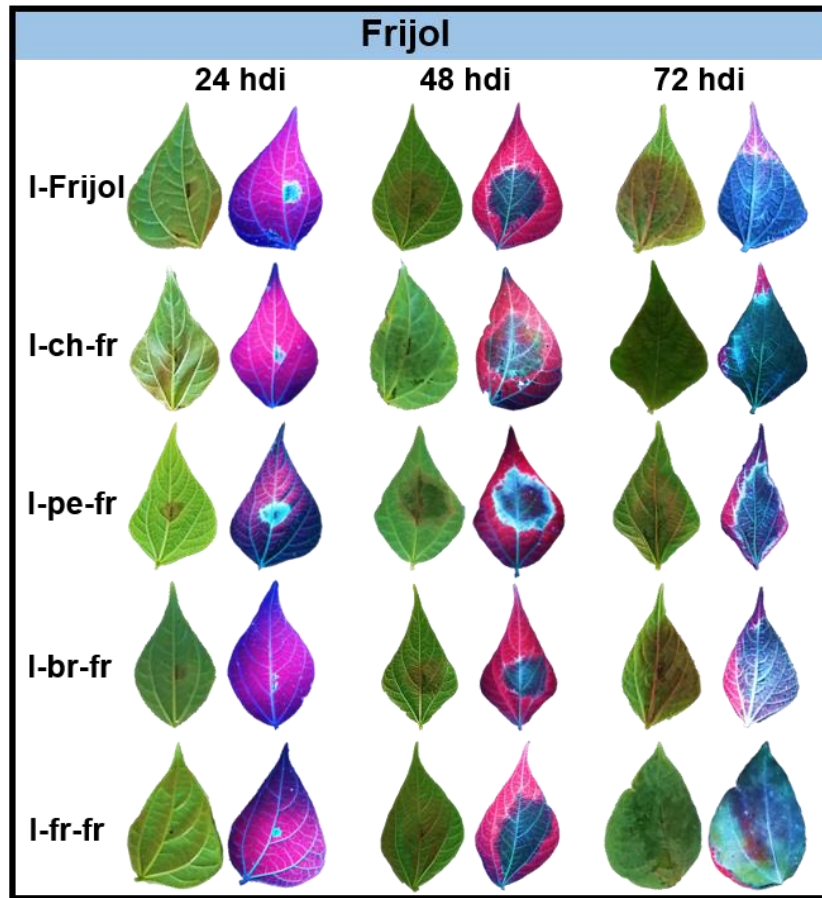
Fenotipo del desarrollo de infección causado por D3 y aislados primarios de *P. capsici* en hoja de pepino a las 24, 48 y 72 hdi. La virulencia fue causada por micelio aéreo de D3 y aislados primarios de *P. capsici*. Hoja izquierda de cada periodo de infección fue visualizada bajo luz natural en donde las regiones oscuras muestran el área infectada, mientras que la hoja derecha fue obtenida a través de la presencia de luz UV de longitud de onda larga de 340nm para la observación de regiones necrosadas del tejido infectado, las regiones en rojo indican tejido sano debido a que la clorofila de las células emite auto-florescencia a la longitud de onda larga del espectro de UV, las regiones oscuras muestran el área infectada necrosada.

ANEXO 9. Fenotipo del desarrollo de infección primaria y secundaria causadas por *P. capsici* en hojas de brócoli a las 24, 48 y 72 hdi.



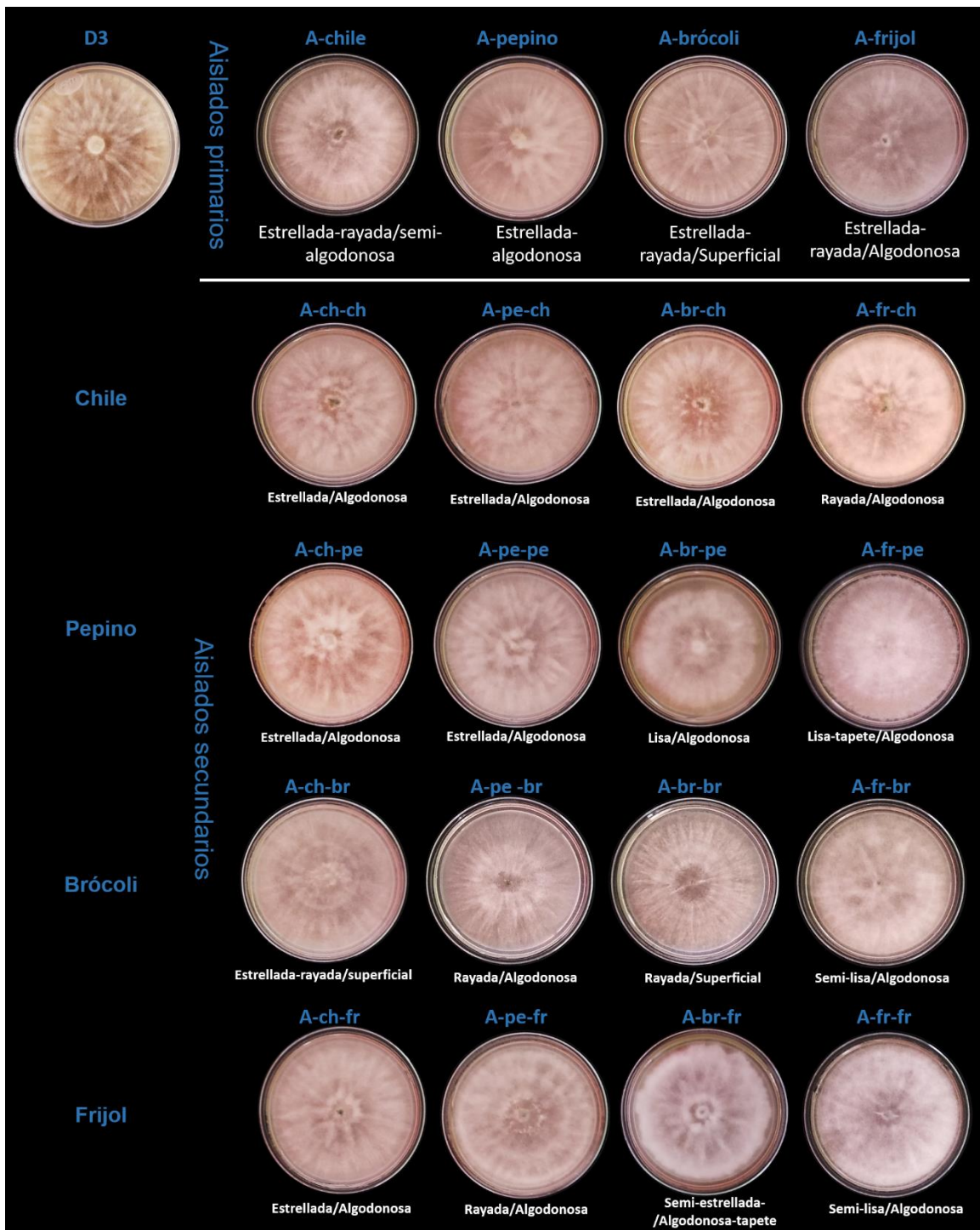
Fenotipo del desarrollo de infección causado por D3 y aislados primarios de *P. capsici* en hoja de brócoli a las 24, 48 y 72 hdi. La virulencia fue causada por micelio aéreo de D3 y aislados primarios de *P. capsici*. Hoja izquierda de cada periodo de infección fue visualizada bajo luz natural en donde las regiones oscuras muestran el área infectada, mientras que la hoja derecha fue obtenida a través de la presencia de luz UV de longitud de onda larga de 340nm para la observación de regiones necrosadas del tejido infectado, las regiones en rojo indican tejido sano debido a que la clorofila de las células emite auto-florescencia a la longitud de onda larga del espectro de UV, las regiones oscuras muestran el área infectada necrosada.

ANEXO 10. Fenotipo del desarrollo de infección primaria y secundaria causadas por *P. capsici* en hojas de frijol a las 24, 48 y 72 hdi.



Fenotipo del desarrollo de infección causado por D3 y aislados primarios de *P. capsici* en hoja de frijol a las 24, 48 y 72 hdi. La virulencia fue causada por micelio aéreo de D3 y aislados primarios de *P. capsici*. Hoja izquierda de cada periodo de infección fue visualizada bajo luz natural en donde las regiones oscuras muestran el área infectada, mientras que la hoja derecha fue obtenida a través de la presencia de luz UV de longitud de onda larga de 340nm para la observación de regiones necrosadas del tejido infectado, las regiones en rojo indican tejido sano debido a que la clorofila de las células emite auto-florescencia a la longitud de onda larga del espectro de UV, las regiones oscuras muestran el área infectada necrosada.

ANEXO 11. Plasticidad fenotípica representativa de micelio en aislados de *P. capsici*



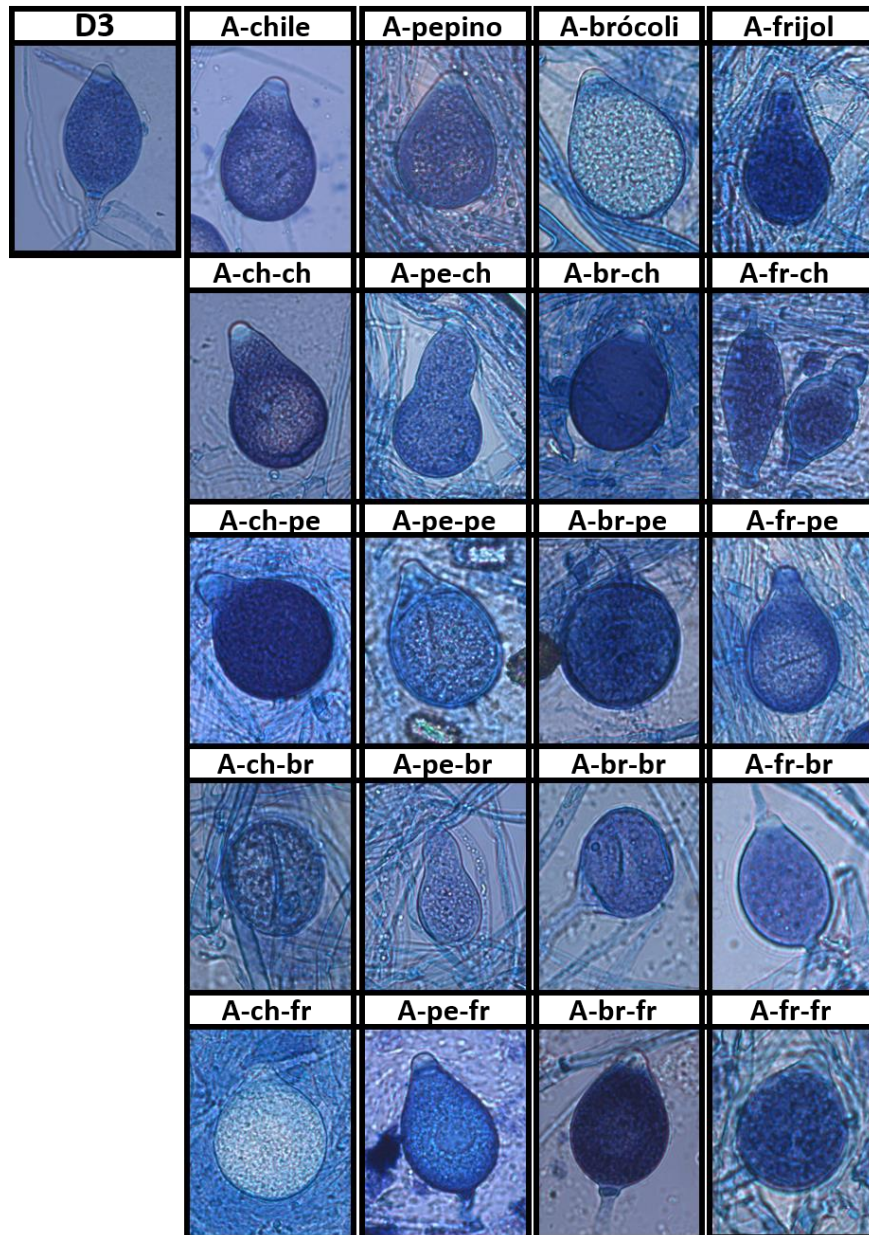
ANEXO 12. Prueba de hipótesis Chi-cuadrada (X²) de plasticidad fenotípica colonial y esporangios en aislados de *P. capsici*

p value											
**** <0.0001	*0.0128	*0.0203	**0.0015	**0.0032	*0.0059	**0.007	**0.0099	***0.0002	***0.0004	***0.0006	
NS: No significativo	*0.0167	**0.0014	**0.0027	**0.0037	**0.0063	**0.0085	***0.0001	***0.0003	***0.0005	***0.0008	

		Plasticidad fenotípica colonial																					
		D3	A-chile	A-pepino	A-brócoli	A-frijol	A-ch-ch	A-pe-ch	A-br-ch	A-fr-ch	A-ch-pe	A-pe-pe	A-br-pe	A-fr-pe	A-ch-br	A-pe-br	A-br-br	A-fr-br	A-ch-fr	A-pe-fr	A-br-fr	A-fr-fr	
Morfología de esporangios	D3	NS	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	D3	
	A-chile	**	NS	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	A-chile	
	A-pepino	****	NS	NS	**	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	A-pepino	
	A-brócoli	****	NS	NS	NS	NS	*	NS	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	A-brócoli	
	A-frijol	****	*	NS	NS	NS	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	A-frijol	
	A-ch-ch	****	**	****	**	**	****	****	****	****	****	NS	**	****	****	****	****	****	****	****	NS	A-ch-ch	
	A-pe-ch	****	**	**	*	NS	NS	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	NS	*	A-pe-ch	
	A-br-ch	****	*	NS	**	NS	****	NS	****	****	****	****	****	****	****	NS	****	****	****	**	**	A-br-ch	
	A-fr-ch	****	*	NS	*	NS	****	NS	NS	****	****	****	****	****	****	*	****	****	**	****	****	A-fr-ch	
	A-ch-pe	****	*	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	****	****	****	****	**	****	****	****	****	****	****	A-ch-pe	
	A-pe-pe	****	*	****	****	**	NS	NS	**	**	*	NS	****	****	****	NS	**	**	****	****	NS	A-pe-pe	
	A-br-pe	****	NS	*	NS	NS	NS	NS	*	*	NS	NS	****	****	**	****	****	**	****	****	****	A-br-pe	
	A-fr-pe	****	**	NS	*	NS	****	NS	NS	NS	NS	**	NS	****	****	*	****	****	*	*	****	A-fr-pe	
	A-ch-br	****	****	**	****	*	*	NS	*	*	*	*	NS	NS	****	****	****	**	****	****	****	A-ch-br	
	A-pe-br	****	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	****	****	**	A-pe-br	
	A-br-br	****	**	NS	*	NS	*	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	****	****	**	A-br-br	
	A-fr-br	****	****	**	**	NS	*	NS	NS	*	NS	****	*	NS	****	*	NS	****	****	****	****	A-fr-br	
	A-ch-fr	****	**	****	****	****	*	*	****	**	NS	NS	****	NS	NS	*	****	****	****	****	****	A-ch-fr	
	A-pe-fr	****	****	*	*	NS	****	NS	NS	*	NS	****	*	NS	****	*	NS	NS	****	****	NS	A-pe-fr	
	A-br-fr	****	*	**	**	*	NS	NS	****	**	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	**	NS	****	**	A-br-fr	
A-fr-fr	****	*	*	*	NS	****	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	*	NS	A-fr-fr		
		D3	A-chile	A-pepino	A-brócoli	A-frijol	A-ch-ch	A-pe-ch	A-br-ch	A-fr-ch	A-ch-pe	A-pe-pe	A-br-pe	A-fr-pe	A-ch-br	A-pe-br	A-br-br	A-fr-br	A-ch-fr	A-pe-fr	A-br-fr	A-fr-fr	

p value									
**** <0.0001	*0.0395	*0.0119	*0.0462	**0.003	**0.0057	***0.001	***0.006	***0.002	
NS: No significativo	*0.0167	**0.0217	**0.0011	**0.004	**0.0062	***0.003	***0.009		

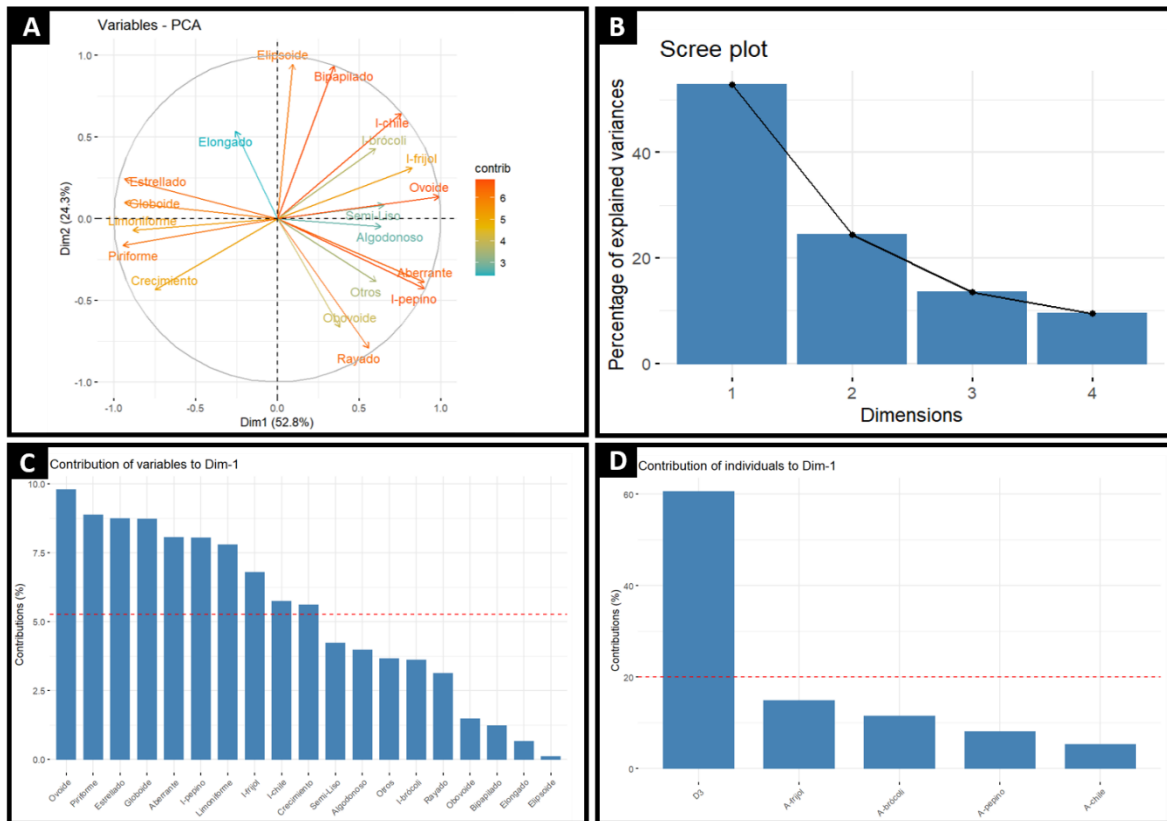
ANEXO 13. Plasticidad morfológica representativa de esporangios en aislados de *P. capsici*



ANEXO 14. Características de micro-estructuras fenotípicas representativas en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*

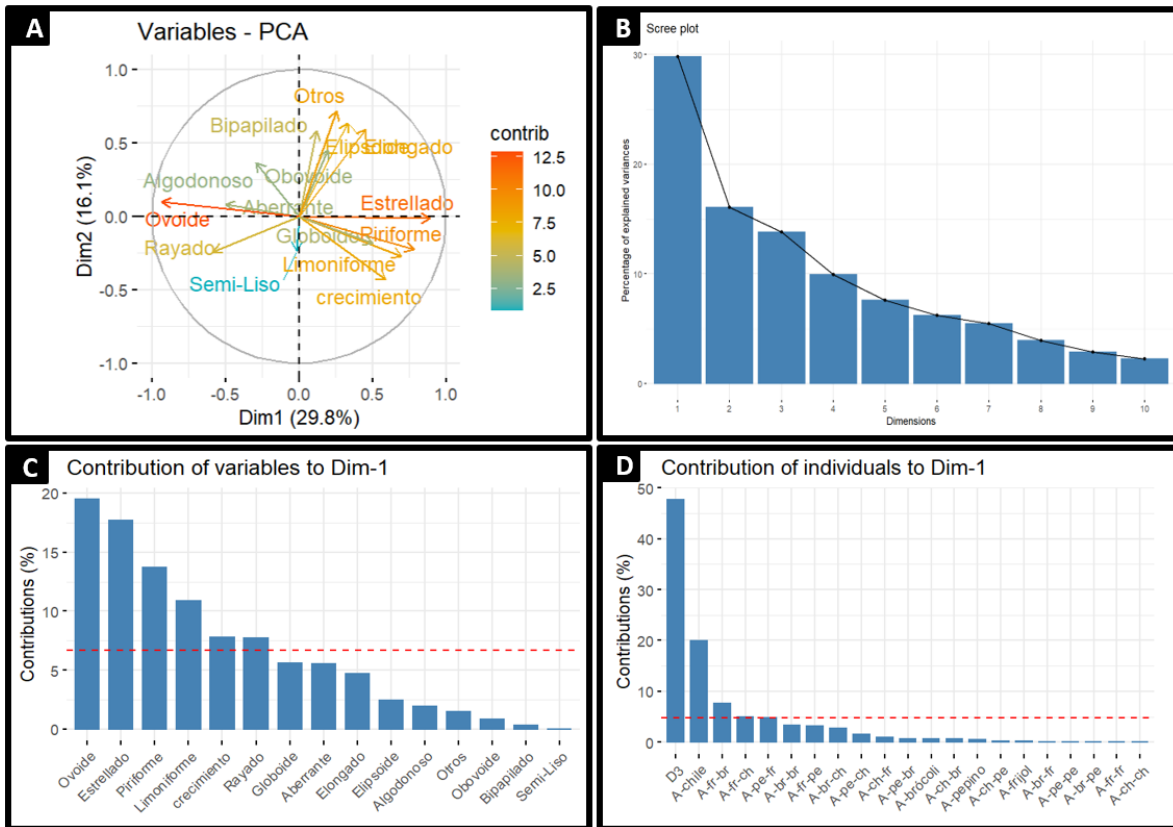
Muestra	Esporangio	Esporangiofóro	Tipo de papilación	Posición de papilación	Caducidad de esporangio	Longitud de pedicelo
D3	Ovoide, piriforme	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-chile	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-ch-ch	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta, lateral	Caduco	Corto
A-pe-ch	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-br-ch	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-fr-ch	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-pepino	Ovoide, piriforme, Globoide, cuello alargado	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-ch-pe	Ovoide, piriforme, Globoide, Eclipsode	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-pe-pe	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-br-pe	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-fr-pe	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-brócoli	Ovoide, piriforme, Globoide, cuello alargado, elipsoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-ch-br	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-pe-br	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-br-br	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado, bi-papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-fr-br	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-frijol	Ovoide, piriforme, Globoide, cuello alargado	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-ch-fr	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-pe-fr	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-br-fr	Ovoide, piriforme, Globoide	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto
A-fr-fr	Ovoide, piriforme, Globoide, eclipsode	Simple	Papilado	Opuesta	Caduco	Corto

ANEXO 15. Graficas descriptivas en el análisis de componentes principales en D3 y aislados primarios de *P. capsici*



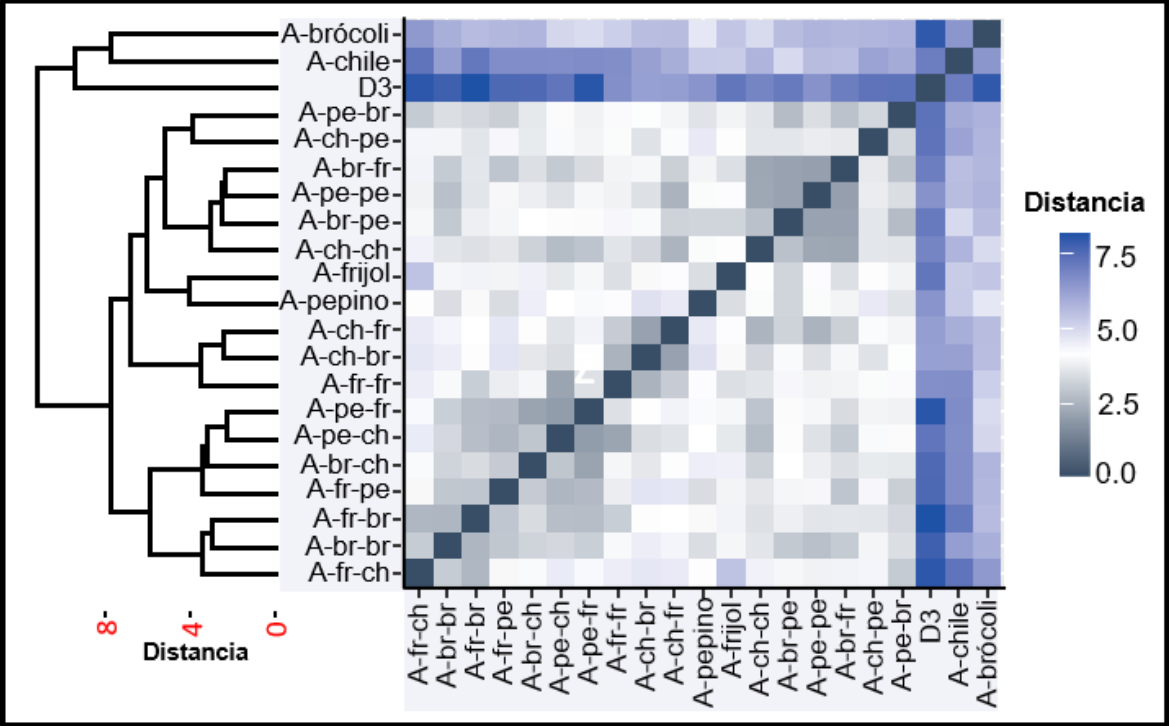
Contribución en varianza de las variables crecimiento, patogenicidad, morfología macroscópica y microscópica en D3 y aislados primarios de *P. capsici* en el análisis de componentes principales. **A:** Grafica de vectores de las variables observadas que contribuyen sobre los componentes principales. **B:** Screen plot, muestra el porcentaje de la varianza que explica cada componente principal. **C:** Grafica que indica el porcentaje en que contribuye cada variable observada sobre el componente principal 1. **D:** Grafica de barras que indica la contribución en la varianza de los individuos de *P. capsici* sobre el componente principal 1.

ANEXO 16. Graficas descriptivas en el análisis de componentes principales en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*



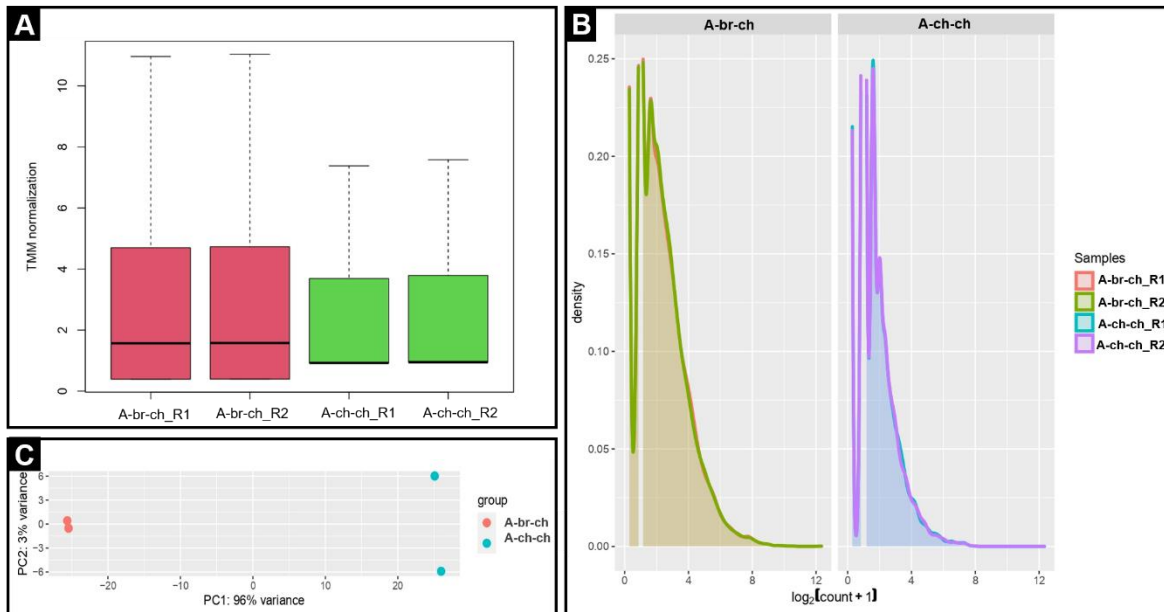
Contribución en varianza de las variables crecimiento, morfología macroscópica y microscópica en D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici* en el análisis de componentes principales. **A:** Grafica de vectores de las variables observadas que contribuyen sobre los componentes principales. **B:** Screen plot, muestra el porcentaje de la varianza que explica cada componente principal. **C:** Grafica que indica el porcentaje en que contribuye cada variable observada sobre el componente principal 1. **D:** Grafica de barras que indica la contribución en la varianza de los individuos de *P. capsici* sobre el componente principal 1.

ANEXO 17. Matriz de distancias de D3, aislados primarios y secundarios en *P. capsici*



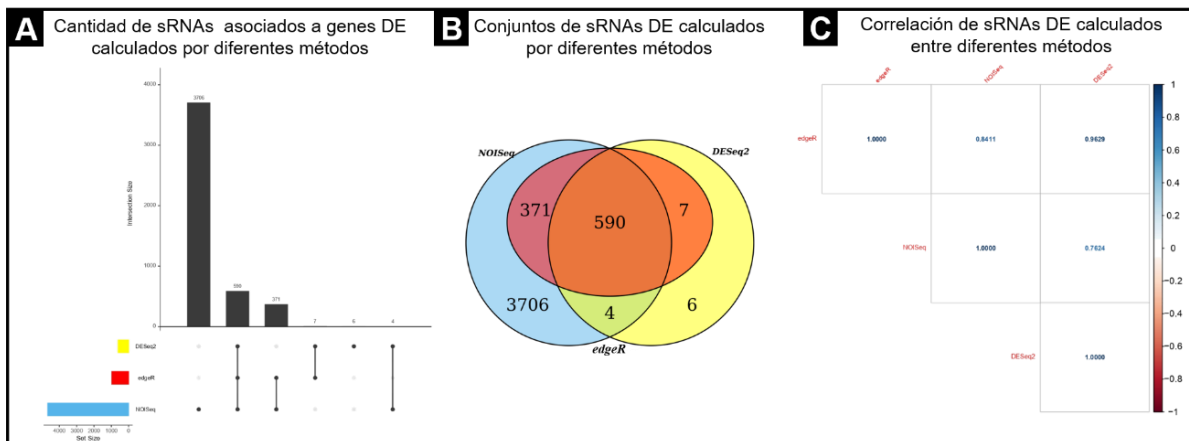
Matriz de distancias euclídeas de las variables crecimiento, morfología macroscópica y microscópica de D3, aislados primarios y secundarios de *P. capsici*. Se realiza la matriz de distancias para evaluar si es factible realizar clusterización de las variables en función de los tratamientos.

ANEXO 18: Características de muestras para análisis de expresión diferencial



A: Box plot de bibliotecas de sRNAs normalizados en A-ch-ch y A-br-ch. **B:** Grafica de densidades de A-ch-ch y A-br-ch. **C:** PCA de bibliotecas sRNAseq.

ANEXO 19. Comparación de métodos para la identificación de sRNAs diferencialmente expresados asociados a regiones genómicas de *P. capsici*



A: métodos NOISeq, edgeR y DESeq2. **B:** Conjuntos compartidos de sRNAs diferencialmente expresados identificados por tres métodos de análisis. **C:** Correlación de sRNAs diferencialmente expresados calculados por diferentes métodos de análisis.

ANEXO 20. miRNAs únicos y compartidos entre A-ch-ch y A-br-ch anotados en miRBase

<p>br-ch U ch-ch 210 miRNAs</p>	<p>ppc-let-7 ami-let-7a-5p mml-let-7c-5p bta-let-7a-5p dwi-let-7 isc-let-7 pha-let-7a ngi-let-7 eca-let-7a mmu-miR-98-5p cja-miR-98 age-miR-98 dpe-miR-10 ocu-miR-98-5p pbv-let-7c-5p oga-miR-98 oha-let-7a mo-let-7c-5p lgi-let-7 nle-miR-98 cfa-miR-98 mmm-let-7a ssc-let-7c cbn-let-7 der-miR-10 dgr-miR-10 dse-let-7 tch-miR-98-5p tgu-let-7a-5p ppa-let-7a dqu-miR-98-5p dre-let-7a dps-miR-10 dpe-let-7 cte-let-7 dma-let-7a pra-miR8788a-5p oni-let-7a eca-miR-98 cja-let-7a cgr-let-7a nvi-let-7 ocu-let-7a-5p aly-miR774b-5p ssa-let-7f-5p abu-let-7a pra-miR8788b-5p xtr-let-7c pny-let-7c nbr-let-7a nle-let-7c oar-let-7c ccr-let-7a cqu-miR-10-5p dse-miR-10 gmo-let-7a-5p ggo-let-7a ssa-let-7a-5p mmu-let-7c-5p tgu-let-7c-5p sha-let-7a cin-let-7d-5p mmu-miR-5124a ipu-let-7a dya-let-7 cpo-let-7a-5p ptr-miR-98 ppa-let-7c pxy-miR-10-5p pal-let-7a-5p ola-let-7c pca-let-7-5p ola-let-7a pbv-let-7a-5p aca-miR-98-5p tni-let-7a xla-let-7c-5p gmo-let-7c-5p hhi-let-7c hsa-miR-98-5p xtr-miR-98 dgr-let-7 bfl-let-7a-5p pol-let-7a-5p ggo-miR-98 dma-let-7c dme-miR-10-5p ssc-miR-98 sbo-let-7a mdo-let-7a-5p aca-let-7c-5p pal-let-7c-5p sfr-miR-10-5p oni-let-7c efu-let-7c cpo-let-7c-5p mze-let-7c gga-let-7j-5p aca-let-7a-5p dre-let-7c-5p dme-let-7-5p bta-let-7c oha-let-7a-5p pte-let-7-5p crm-let-7 cgr-miR-1260 cpo-miR-98-5p xtr-let-7a mmm-miR-98 pny-let-7a dma-miR-98 oar-let-7a mse-let-7a oan-miR-98 ame-miR-10-5p ptr-let-7a ola-let-7a-5p dan-let-7 cfa-let-7c xla-miR-98-5p pbv-miR-98-5p der-let-7 oan-let-7c-5p mo-let-7a-5p dno-miR-98-5p csa-let-7d tca-miR-10-5p mmu-miR-5106 fru-let-7a hpo-let-7-5p ipu-let-7c nlo-miR-10 bta-miR-98 chi-let-7c-5p pal-miR-98-5p ppy-let-7c oga-let-7a xla-let-7a-5p bma-let-7 api-miR-10 nle-let-7a mze-let-7a dvi-let-7 cel-let-7-5p ssc-let-7a gga-let-7l-5p chi-let-7a-5p pal-miR-486a-3-3p ocu-let-7c-5p ppy-let-7a eca-let-7c prd-let-7-5p bbe-let-7a-5p bmo-miR-10-5p dno-let-7c-5p dsi-miR-10 cbr-let-7 dqu-let-7-5p hsa-let-7a-5p ami-let-7c-5p mml-let-7a-5p cfa-let-7a cpi-let-7a-5p pma-let-7a ptr-let-7c hsa-let-7c-5p cgr-miR-98 oha-let-7c-5p cli-let-7a-5p aae-miR-10 sko-let-7 mo-miR-98-5p dwi-miR-10 cpi-miR-98-5p hme-let-7 dmo-miR-10 lmi-miR-10-5p dan-miR-10 cpi-let-7c-5p tca-let-7-5p ame-let-7-5p mmm-let-7c mmu-let-7a-5p mml-miR-98 dya-miR-10 tcf-let-7-5p cja-let-7c ppy-miR-98 bdo-let-7 nbr-let-7c dsi-let-7 hme-miR-10 ppa-miR-98 nvi-miR-10 asu-let-7-5p dps-let-7 gga-let-7c-5p pha-let-7c pha-miR-98 gga-let-7a-5p ssa-let-7c-5p chi-miR-98-5p bmo-let-7-5p abu-let-7c dmo-let-7 oha-miR-98-5p dno-let-7a-5p ggo-let-7c cli-let-7c-5p oga-let-7c</p>
<p>ch-ch 3 miRNAs</p>	<p>tcf-miR-10320 gga-miR-1723 cin-miR-92a-5p</p>
<p>br-ch 761 miRNAs</p>	<p>lva-miR-184-3p lva-miR-9-5p dpe-miR-1 api-miR-1 gmo-miR-133a-3p hme-miR-184 tni-miR-125b ola-miR-125c bdo-miR-125 cqu-miR-184 dps-miR-190-5p pca-miR-279b-3p chi-miR-125b-5p bfl-miR-184-3p mml-miR-9-5p isc-miR-375 oha-miR-100-5p sko-miR-184-3p isc-miR-184 tca-miR-263a-5p tur-miR-133-3p nlo-miR-34 tgu-miR-9-5p pca-bantam-3p ami-miR-9-5p tca-miR-279b-3p hme-bantam mse-bantam fru-miR-9 hme-miR-133 ame-miR-279d-3p nle-miR-125b cgr-miR-100-5p ppy-miR-133a mmu-miR-295-5p pca-miR-1175-5p dno-miR-100-5p age-miR-133a ppc-miR-235-3p xla-miR-92a-3p dan-miR-34 dan-miR-133 bmo-bantam-3p tcf-miR-96 der-miR-34 ccr-miR-9-3p pma-miR-92a cfa-miR-125b pca-miR-133-3p tca-miR-190-5p bdo-miR-263a cpo-miR-92b-3p ggo-miR-92 hme-miR-190 cte-miR-133 ptr-miR-92b mdo-miR-92b-3p tcf-miR-10-5p rno-miR-92a-3p hpo-miR-100-5p xtr-miR-100 aca-miR-9-5p pte-miR-10-5p ngi-miR-375 crm-miR-252 ssc-miR-92a aga-miR-100 dpu-miR-34 dvi-miR-133 bma-miR-100b mdo-miR-100-5p ccr-miR-125c der-miR-1 oni-miR-184a nbr-miR-100 nlo-miR-184 sko-miR-92c hpo-miR-9-5p pmi-miR-125-5p pbv-miR-9-5p dre-miR-125c-5p spu-miR-184 str-miR-34a-5p ola-miR-100 tni-miR-100 dps-miR-263a ppa-miR-10a mml-miR-92a-3p ptr-miR-133a bfl-miR-9-5p dps-miR-1 ppa-miR-92a gmo-miR-125b-5p prd-miR-34-5p dqu-miR-100-5p dre-miR-92a-3p nvi-miR-34 nbr-miR-125b ccr-miR-92a cqu-miR-100-5p dpe-miR-34 sko-miR-133 asu-miR-252-5p pra-miR8788a-3p pca-miR-184-3p isc-bantam dgr-miR-263a ipu-miR-184 mdo-miR-92a-3p ola-miR-9b-5p bta-miR-92a bbe-miR-100-5p pal-miR-133a-3p oga-miR-10a lla-miR-92 pma-miR-9a-5p pte-miR-9-5p bbe-miR-10a-5p oha-miR-125b-5p hco-miR-5950 mdo-miR-10a-5p ame-miR-9a-5p cpi-miR-9-5p mle-miR-100-5p chi-miR-9-5p tca-miR-9a-5p chi-miR-10a-5p xtr-miR-125b sha-miR-92a pal-miR-92a-3p mze-miR-184a dps-miR-34 dse-miR-9a bta-miR-125b ssa-miR-9a-5p pin-miR8788-3p tca-miR-125-5p hme-miR-34 cqu-miR-133 abu-miR-92b aca-miR-125b der-miR-125 ppy-miR-100 nbr-miR-184a mml-miR-92b-3p mse-miR-100 cpo-miR-100-5p hsa-miR-1910-5p dwi-miR-9a xtr-miR-9-5p ppc-miR-9 ocu-miR-125b-5p oar-miR-10a dpu-miR-133 ola-miR-125b dsi-miR-125 pma-miR-100a-5p dqu-miR-263a-5p dse-miR-263a tcf-miR-9a-5p dwi-miR-1 gga-miR-92-3p age-miR-125b der-miR-9a tch-miR-92a-3p oha-miR-92a-3p bmo-miR-1a-3p sbo-miR-125b lva-miR-252b-5p gmo-miR-100a-5p dre-miR-125b-5p sko-miR-125a dre-miR-184 dse-miR-133 hme-miR-279a mze-miR-92b pmi-miR-100-5p sko-miR-10 lca-miR-92 oga-miR-92a dpu-miR-263a dme-miR-263a-5p tca-miR-133-3p nbr-miR-133a nbr-miR-92a pte-miR-96-5p efu-miR-92b api-bantam eca-miR-10a pte-miR-100a-5p tur-miR-263b-5p odi-miR-92a dan-miR-9a cja-miR-9 mmm-miR-92a dpu-miR-252b dqu-miR-133-3p dmo-miR-1 age-miR-100 oni-miR-100 pte-miR-315-5p dvi-miR-263a-5p ami-miR-10a-5p nvi-miR-1 mml-miR-133a mo-miR-10a-5p tcf-miR-125 mse-miR-34 pal-miR-10a-5p dre-miR-100-5p ssa-miR-92b-3p tur-miR-993a-3p mmm-miR-100 ggo-miR-133a dwi-miR-34 pte-miR-92a-3p ame-miR-1-3p sha-miR-125a aae-miR-9a pbv-miR-92a-3p gga-miR-133a-3p cpi-miR-125b-5p gga-miR-125b-5p api-miR-100 tcf-miR-92a bma-miR-81 tur-miR-5735-3p ppa-miR-92b aga-miR-34 sko-miR-9-5p tni-miR-9 tcf-miR-34 lgi-miR-10 cgr-miR-10a-5p cli-miR-9-5p asu-miR-81a nvi-miR-133 aca-miR-100 cfa-miR-133c cpo-miR-125b-5p tgu-miR-125-5p spu-miR-125-5p ngi-miR-184 aga-miR-1 ccr-miR-133a-3p nlo-miR-133 lgi-miR-279 dsi-miR-9a eca-miR-92a dgr-miR-1 isc-miR-1 dpe-miR-184-3p isc-miR-96 ngi-miR-1 cbn-miR-251b pny-miR-125b cpo-miR-92a-3p pmi-miR-184-3p aae-miR-1175-5p sfr-miR-34-5p pbv-miR-125b-5p aga-miR-190 ptr-miR-125b pte-miR-34-5p dmo-miR-34 cpo-miR-9-5p mze-miR-92a dps-miR-9a pha-miR-125b pmi-miR-92b-3p efu-miR-125b abu-miR-92a dsi-miR-133 cte-miR-184a mne-miR-92 ppy-miR-92 dma-miR-100 bmo-miR-100 tur-miR-92-3p pte-miR-184-3p hco-miR-9 dgr-miR-34 mmu-miR-100-5p dme-miR-133-3p dwi-miR-125 ppy-miR-125b str-miR-252b-5p aae-miR-133 gmo-miR-9-5p ame-miR-133-3p age-miR-10a isc-miR-133 cgr-miR-92b-3p bma-miR-92 mmm-miR-92b dse-miR-125 dya-miR-263a mo-miR-100-5p dvi-miR-133-3p cte-miR-279 bta-miR-10a nlo-miR-125 aga-miR-9a fru-miR-125b cja-miR-100 mne-miR-133a dvi-miR-9a-5p pte-miR-375-3p lgi-miR-100 dpu-miR-279a spu-miR-10 pol-miR-9b-5p ame-miR-263a-5p ssc-miR-100 bmo-miR-184-3p lla-miR-125b dwi-miR-184-3p nvi-miR-100 tni-miR-92 ami-miR-92a-3p mmu-miR-9-5p dqu-miR-375-3p tca-miR-1-3p eca-miR-100 cfa-miR-10a dvi-miR-34-5p nvi-miR-9a pny-miR-92 oni-miR-9a-5p bdo-miR-190 oni-miR-92b cpi-miR-100-5p sla-miR-125b tgu-miR-100-5p gga-miR-10a-5p cpi-miR-92a-3p pte-miR-263b-5p efu-miR-92a</p>

ANEXO 21. Características de miRNAs identificados en A-ch-ch asociados al genoma de *P. capsici* anotados en miRBase

miRNA ID	miRNA locus accession	Organism	Genomic location	Gen target	Descripcion gen target	Referencia
mmu-miR-5124a	MI0018035	<i>Mus musculus</i>	chr13: 40865791-40865862 [+]	multitarget	Desarrollo de ratón	Spierings DC, <i>et al.</i> 2011
aly-miR774b-5p	MI0014650	<i>Arabidopsis lyrata</i>	GL348714.1: 3372279-3372385 [-]	No descrito	Relación evolutiva con <i>A. thaliana</i>	Fahlgren N, <i>et al.</i> 2010; Ma Z. <i>et al.</i> , 2010
pal-miR-486a-3-3p	MI0032589	<i>Pteropus alecto</i>	KB030862.1: 1990200-1990263 [+]	No descrito	Regulación génica postranscripcional	Cowled C. <i>et al.</i> , 2014
cgr-miR-1260	MI0020388	<i>Cricetulus griseus</i>	JH000033.1: 3309782-3309861 [+]	No descrito	Estado de desarrollo hamster	Hackl M. <i>et al.</i> , 2011
pra-miR8788b-5p	MI0027867	<i>Phytophthora ramorum</i>	PHYRAScaffold_67:213512-213649	multitarget	Permeasas de aminoácidos/auxinas, alfa/beta hidrolasa de papa (StABH1)	Fahlgren N. <i>et al.</i> , 2013; Hu <i>et al.</i> , 2022
oni-let-7c	MI0034606	<i>Oreochromis niloticus</i>	CM001453.1: 2453478-2453544 [-]	No descrito	Radiación adaptativa de los peces cíclidos africanos, desarrollo reproductivo	Brawand D. <i>et al.</i> , 2014; Eshel O. <i>et al.</i> , 2014
cin-miR-92a-5p	MI0007160	<i>Ciona intestinalis</i>	3p: 1864426-1864526 [+]	No descrito	Desarrollo de ciona intestinalis	Norden-Krichmar TM. <i>Et al.</i> , 2007; Fu X. <i>et al.</i> , 2008; Hendrix D. <i>et al.</i> , 2010
tcf-miR-10320	MI0033292	<i>Triops cancrioformis</i>	NA	No descrito	Desarrollo, conservación evolutiva de especies	Ikeda KT. <i>et al.</i> , 2015
dqu-miR-10-5p	MI0037474	<i>Dinoponera quadriceps</i>	NA	No descrito	Desarrollo, diferenciación celular, modificación de fenotipo	Patalano S. <i>et al.</i> , 2015
gga-miR-1723	MI0007460	<i>Gallus gallus</i>	chr2: 41506154-41506259 [-]	No descrito	Desarrollo embrionario	Glazov EA. <i>Et al.</i> , 2008

ANEXO 22. Características de miRNAs identificados en A-br-ch asociados al genoma de *P. capsici* anotados en miRBase

miRNA ID	miRNA locus accession	Organismo	Localización genómica	Gen target	Descripción gen target	Referencia
mmu-miR-5124a	MI0018035	<i>Mus musculus</i>	chr13: 40865791-40865862 [+]	multitarget	Desarrollo de ratón	Spierings DC, <i>et al.</i> , 2011
pra-miR8788b-5p	MI0027867	<i>Phytophthora ramorum</i>	PHYRA scaffold_67:21351-2-213649	multitarget	Permeasas de aminoácidos/auxinas, alfa/beta hidrolasa de papa (StABH1)	Fahlgren N. <i>et al.</i> , 2013; Hu <i>et al.</i> , 2022
aly-miR774b-5p	MI0014650	<i>Arabidopsis lyrata</i>	GL348714.1: 3372279-3372385 [-]	No descrito	Relación evolutiva con <i>A. thaliana</i>	Fahlgren N. <i>et al.</i> , 2010; Ma Z. <i>et al.</i> , 2010
der-miR-10	MI0009091	<i>Drosophila erecta</i>	scaffold_4770: 2882570-2882646 [-]	No descrito	Identificación/anotación de miRNAs en 12 especies de drosophila evolutivamente conservados	Clark AG. <i>et al.</i> , 2007
tur-miR-92-3p	MIMAT0023087	<i>Tetranychus urticae</i>	NA	No descrito	Secuenciación de genoma de araña, e identificación de firmas moleculares	Grbic M. <i>et al.</i> , 2011
pin-miR8788-3p	MI0027863	<i>Phytophthora infestans</i>	supercont1.18:1064102-1064237	multitarget	Permeasas de aminoácidos/auxinas, alfa/beta hidrolasa de papa (StABH1)	Fahlgren N. <i>et al.</i> , 2013; Hu <i>et al.</i> , 2022
ami-let-7a-5p	MIMAT0037999	<i>Alligator mississippiensis</i>	AKHW03004488.1: 7298627-7298712 [+]	No descrito	Identificación y evolución de miRNAs en diferentes especies de reptiles	Field DJ. <i>et al.</i> , 2014
dqu-bantam-3p	MI0037464	<i>Dinoponera quadriceps</i>	NA	No descrito	Desarrollo, diferenciación celular, modificación de fenotipo	Patalano S. <i>et al.</i> , 2015
pte-miR-71-3p	MI0038092	<i>Parasteotoda tepidariorum</i>	Scf5bK3_5995: 356520-356577 [+]	No descrito	Evolución del repertorio de miRNAs entre quelicerados	Leite DJ. <i>et al.</i> , 2016
pte-miR-279-3p	MI0038037	<i>Parasteotoda tepidariorum</i>	Scf5bK3_238.1: 754887-754947 [-] Scf5bK3_238.1: 780258-780318 [-]	No descrito	Evolución del repertorio de miRNAs entre quelicerados	Leite DJ. <i>et al.</i> , 2016

ANEXO 23. Características de miRNAs maduros *de novo* en A-ch-ch

ID miRNA novo	Familia MIRNA	score	Genoma	Strand	Nivel de expresión	miR maduro
A-ch-ch_000	A-ch-ch MIR37	-2.47	P.capsici.genoma	+	19	tcgagacgtcgaattgagtggggg
A-ch-ch_001	A-ch-ch MIR72	-3.88	P.capsici.genoma	+	20	tttgctgcagatgctcgcgagtcc
A-ch-ch_002	A-ch-ch MIR22	-0.24	P.capsici.genoma	+	8	tagcgaatgctgatgtgcttgg
A-ch-ch_003	A-ch-ch MIR21	1.95	P.capsici.genoma	+	19	tagcatgtcagtcgaggtagacggc
A-ch-ch_004	A-ch-ch MIR32	-3.67	P.capsici.genoma	+	11	tcaccttcggctgtccggacacc
A-ch-ch_005	A-ch-ch MIR30	-4.16	P.capsici.genoma	+	5	tcagatcggattccatctacggc
A-ch-ch_006	A-ch-ch MIR46	-1.84	P.capsici.genoma	+	8	tctgcaggtgaactagatgcc
A-ch-ch_007	A-ch-ch MIR28	-6.5	P.capsici.genoma	+	12	tattcgcagcttccgatcctggac
A-ch-ch_008	A-ch-ch MIR22	0.01	P.capsici.genoma	+	8	tagcgaatgctgatgtgcttgg
A-ch-ch_009	A-ch-ch MIR21	1.95	P.capsici.genoma	+	19	tagcatgtcagtcgaggtagacggc
A-ch-ch_010	A-ch-ch MIR52	-6.29	P.capsici.genoma	+	7	tgagatgaactgttcgaacttg
A-ch-ch_011	A-ch-ch MIR64	-1.15	P.capsici.genoma	+	5	ttgaggtcgttgtagcaagtca
A-ch-ch_012	A-ch-ch MIR1	15.47	P.capsici.genoma	+	10	aactgataataccgctgaccaag
A-ch-ch_013	A-ch-ch MIR64	-6.2	P.capsici.genoma	+	5	ttgaggtcgttgtagcaagtca
A-ch-ch_014	A-ch-ch MIR1	18.67	P.capsici.genoma	+	10	aactgataataccgctgaccaag
A-ch-ch_015	A-ch-ch MIR71	-5.39	P.capsici.genoma	+	7	ttcgtcctctgatggtgcacagga
A-ch-ch_016	A-ch-ch MIR66	0.1	P.capsici.genoma	+	14	ttcagagactggtgtgacttggc
A-ch-ch_017	A-ch-ch MIR28	-9.48	P.capsici.genoma	+	12	tattcgcagcttccgatcctggac
A-ch-ch_018	A-ch-ch MIR28	-7.49	P.capsici.genoma	+	12	tattcgcagcttccgatcctggac
A-ch-ch_019	A-ch-ch MIR65	-1.12	P.capsici.genoma	+	8	ttgcaaatgtcagtcggttaag
A-ch-ch_020	A-ch-ch MIR25	1.2	P.capsici.genoma	+	6	tatccgaaatcacaggttctcgag
A-ch-ch_021	A-ch-ch MIR73	-1.24	P.capsici.genoma	+	8	ttggtgttacgtgatctctgcc
A-ch-ch_022	A-ch-ch MIR32	-4.39	P.capsici.genoma	+	10	tcaccttcggctgtccggacacc
A-ch-ch_023	A-ch-ch MIR38	-2.06	P.capsici.genoma	+	8	tcgagtgactgtacaacgtaca
A-ch-ch_024	A-ch-ch MIR2	-3.52	P.capsici.genoma	+	10	aagaaattcgacgcgagggggcac
A-ch-ch_025	A-ch-ch MIR35	1.56	P.capsici.genoma	+	13	tcgaagatgaaactgacactctg
A-ch-ch_026	A-ch-ch MIR5	-2.81	P.capsici.genoma	+	10	acgcttgatataagaagaactccc
A-ch-ch_027	A-ch-ch MIR49	-2.15	P.capsici.genoma	+	21	tgagaactctgatcgggtatggc
A-ch-ch_028	A-ch-ch MIR22	-2.25	P.capsici.genoma	+	8	tagcgaatgctgatgtgcttgg

A-ch-ch_029	A-ch-ch MIR70	2	P.capsici.genoma	+	337	tttatctgctggctgtcttc
A-ch-ch_030	A-ch-ch MIR36	-3.32	P.capsici.genoma	+	6	tcgactggattgtcaagaacggcc
A-ch-ch_031	A-ch-ch MIR5	-3.55	P.capsici.genoma	+	10	acgcttgatataagaagaactccc
A-ch-ch_032	A-ch-ch MIR60	1.44	P.capsici.genoma	+	10	ttcgaagcaagtcgatgactttg
A-ch-ch_033	A-ch-ch MIR14	-4.31	P.capsici.genoma	+	5	tacaaactgcaaactcgtgcttgcc
A-ch-ch_034	A-ch-ch MIR73	-6.72	P.capsici.genoma	+	8	ttggtgttacgtgatctctgcc
A-ch-ch_035	A-ch-ch MIR61	-2.38	P.capsici.genoma	+	10	ttcggatcttaaggcctattaacc
A-ch-ch_036	A-ch-ch MIR22	-2.83	P.capsici.genoma	+	8	tagcgaatgctgatgtgcttg
A-ch-ch_037	A-ch-ch MIR5	-2.44	P.capsici.genoma	+	10	acgcttgatataagaagaactccc
A-ch-ch_038	A-ch-ch MIR52	-4.07	P.capsici.genoma	+	7	tgagatgaactgttcgaactg
A-ch-ch_039	A-ch-ch MIR16	-6.54	P.capsici.genoma	+	12	tacagagatgatcgtagagaacaac
A-ch-ch_040	A-ch-ch MIR11	-3.59	P.capsici.genoma	+	9	taaacaagaatcgcttacggatg
A-ch-ch_041	A-ch-ch MIR1	-0.15	P.capsici.genoma	+	10	aactgataatacccgctgaccaag
A-ch-ch_042	A-ch-ch MIR44	-4.15	P.capsici.genoma	+	6	tctatttcgcaaacgtgtacagc
A-ch-ch_043	A-ch-ch MIR15	-0.7	P.capsici.genoma	+	12	tacagaagatacattacgtcggc
A-ch-ch_044	A-ch-ch MIR32	1.2	P.capsici.genoma	+	10	tcactcttcggctgtgccggacacc
A-ch-ch_045	A-ch-ch MIR69	1.31	P.capsici.genoma	+	17	ttgtgtaccgctcgggtggacg
A-ch-ch_046	A-ch-ch MIR15	-0.6	P.capsici.genoma	+	12	tacagaagatacattacgtcggc
A-ch-ch_047	A-ch-ch MIR5	-3.07	P.capsici.genoma	+	10	acgcttgatataagaagaactccc
A-ch-ch_048	A-ch-ch MIR43	1.48	P.capsici.genoma	+	21	tcgttctgtctggcatagtaacc
A-ch-ch_049	A-ch-ch MIR34	-1.14	P.capsici.genoma	+	14	tccgggtgctgtctacct
A-ch-ch_050	A-ch-ch MIR34	-1.29	P.capsici.genoma	+	14	tccgggtgctgtctacct
A-ch-ch_051	A-ch-ch MIR53	1.21	P.capsici.genoma	+	18	tgccccaagggtgtcgaacgcgcc
A-ch-ch_052	A-ch-ch MIR53	1.05	P.capsici.genoma	+	18	tgccccaagggtgtcgaacgcgcc
A-ch-ch_053	A-ch-ch MIR41	-2.49	P.capsici.genoma	+	8	tcggcgcgattgagcagtatcggc
A-ch-ch_054	A-ch-ch MIR41	-2.49	P.capsici.genoma	+	8	tcggcgcgattgagcagtatcggc
A-ch-ch_055	A-ch-ch MIR31	-3.14	P.capsici.genoma	+	8	tcagtactgtcctcgaacacgcc
A-ch-ch_056	A-ch-ch MIR5	-2.81	P.capsici.genoma	+	10	acgcttgatataagaagaactccc
A-ch-ch_057	A-ch-ch MIR22	-7.5	P.capsici.genoma	+	8	tagcgaatgctgatgtgcttg
A-ch-ch_058	A-ch-ch MIR12	-0.75	P.capsici.genoma	+	11	taagcatctcatcgtcagctggc
A-ch-ch_059	A-ch-ch MIR42	-2.1	P.capsici.genoma	+	8	tcggggaaagtcgggtgtggac
A-ch-ch_060	A-ch-ch MIR67	-5.33	P.capsici.genoma	+	9	ttgatctcggcatgatcagcgcc
A-ch-ch_061	A-ch-ch MIR22	-5.49	P.capsici.genoma	+	8	tagcgaatgctgatgtgcttg
A-ch-ch_062	A-ch-ch MIR52	-7.19	P.capsici.genoma	+	7	tgagatgaactgttcgaactg

A-ch-ch_063	A-ch-ch MIR2	-2.61	P.capsici.genoma	+	10	aagaaattcgacgcgaggggac
A-ch-ch_064	A-ch-ch MIR26	-0.88	P.capsici.genoma	+	8	tatctagaagcggatcccagcgg
A-ch-ch_065	A-ch-ch MIR23	-4.26	P.capsici.genoma	+	9	tagcgagatttagtcgatggctggc
A-ch-ch_066	A-ch-ch MIR40	1.68	P.capsici.genoma	+	10	tcgctctcgatctcggaggagacgc
A-ch-ch_067	A-ch-ch MIR63	-7.06	P.capsici.genoma	+	7	ttgacttaggaccgagtgtagc
A-ch-ch_068	A-ch-ch MIR6	-5.83	P.capsici.genoma	+	13	agagatctgtagaccggttagcc
A-ch-ch_069	A-ch-ch MIR22	-4.48	P.capsici.genoma	+	8	tagcgaatgctgatgtgcttgg
A-ch-ch_070	A-ch-ch MIR24	-0.31	P.capsici.genoma	-	7	tatagtctagaccgtagttggcatg
A-ch-ch_071	A-ch-ch MIR15	-0.7	P.capsici.genoma	-	12	tacagaagatacattacgtcggc
A-ch-ch_072	A-ch-ch MIR17	0.03	P.capsici.genoma	-	11	tacccgagtggaagatcctgacg
A-ch-ch_073	A-ch-ch MIR54	-3.15	P.capsici.genoma	-	6	tgcgaaatctgcacgtgatcgggc
A-ch-ch_074	A-ch-ch MIR71	-5.39	P.capsici.genoma	-	7	ttcgtcctctgatggtgcacagga
A-ch-ch_075	A-ch-ch MIR48	1.63	P.capsici.genoma	-	9	tgacctagtgatcggctggtgggc
A-ch-ch_076	A-ch-ch MIR55	-3.14	P.capsici.genoma	-	9	tgcgatgattttgtcaacctcggc
A-ch-ch_077	A-ch-ch MIR15	-0.7	P.capsici.genoma	-	12	tacagaagatacattacgtcggc
A-ch-ch_078	A-ch-ch MIR39	1.51	P.capsici.genoma	-	10	tcgatctaagctctgcctagcacag
A-ch-ch_079	A-ch-ch MIR22	0.01	P.capsici.genoma	-	8	tagcgaatgctgatgtgcttgg
A-ch-ch_080	A-ch-ch MIR22	-3.35	P.capsici.genoma	-	8	tagcgaatgctgatgtgcttgg
A-ch-ch_081	A-ch-ch MIR28	-4.92	P.capsici.genoma	-	12	tattcgcagcttccgatcctggac
A-ch-ch_082	A-ch-ch MIR50	0.87	P.capsici.genoma	-	21	tgagaactctgatcgggatggcg
A-ch-ch_083	A-ch-ch MIR5	-2.71	P.capsici.genoma	-	10	acgctgatataaagaagaactccc
A-ch-ch_084	A-ch-ch MIR64	-9.32	P.capsici.genoma	-	5	ttgaggctgtgtgagcaagtca
A-ch-ch_085	A-ch-ch MIR22	-2.41	P.capsici.genoma	-	8	tagcgaatgctgatgtgcttgg
A-ch-ch_086	A-ch-ch MIR47	-7.42	P.capsici.genoma	-	8	tcttgactcccagtagaccagc
A-ch-ch_087	A-ch-ch MIR53	1.72	P.capsici.genoma	-	18	tgcccaagggtgtcgaacgcgcc
A-ch-ch_088	A-ch-ch MIR21	1.06	P.capsici.genoma	-	19	tagcatgtcagtcgaggtagacggc
A-ch-ch_089	A-ch-ch MIR5	-2.81	P.capsici.genoma	-	10	acgctgatataaagaagaactccc
A-ch-ch_090	A-ch-ch MIR60	1.59	P.capsici.genoma	-	10	ttcgcaagcaagtcgatgactttg
A-ch-ch_091	A-ch-ch MIR1	-6.15	P.capsici.genoma	-	10	aactgataataccgctgaccaag
A-ch-ch_092	A-ch-ch MIR60	1.44	P.capsici.genoma	-	10	ttcgcaagcaagtcgatgactttg
A-ch-ch_093	A-ch-ch MIR60	1.44	P.capsici.genoma	-	10	ttcgcaagcaagtcgatgactttg
A-ch-ch_094	A-ch-ch MIR58	-5.51	P.capsici.genoma	-	106	tgttttggccaaccgattgtagcc
A-ch-ch_095	A-ch-ch MIR58	-3.8	P.capsici.genoma	-	106	tgttttggccaaccgattgtagcc
A-ch-ch_096	A-ch-ch MIR58	-5.51	P.capsici.genoma	-	106	tgttttggccaaccgattgtagcc

A-ch-ch_097	A-ch-ch MIR58	-5.51	P.capsici.genoma	-	106	tgtttggccaaccggattgtagcc
A-ch-ch_098	A-ch-ch MIR58	-3.8	P.capsici.genoma	-	106	tgtttggccaaccggattgtagcc
A-ch-ch_099	A-ch-ch MIR58	-3.8	P.capsici.genoma	-	106	tgtttggccaaccggattgtagcc
A-ch-ch_100	A-ch-ch MIR18	-3.61	P.capsici.genoma	-	5	tactgaaggaccatgcaacgcac
A-ch-ch_101	A-ch-ch MIR22	-2.25	P.capsici.genoma	-	8	tagcgaatgctgatgtgcttg
A-ch-ch_102	A-ch-ch MIR70	2.65	P.capsici.genoma	-	330	tttatctgctggctgtcttc
A-ch-ch_103	A-ch-ch MIR28	-0.81	P.capsici.genoma	-	12	tattcgcagtctccgatcctggac
A-ch-ch_104	A-ch-ch MIR10	-3.79	P.capsici.genoma	-	6	ctggccaagaggctggagaacctg
A-ch-ch_105	A-ch-ch MIR55	-4.87	P.capsici.genoma	-	9	tgcgatgatattgtcaacctcggc
A-ch-ch_106	A-ch-ch MIR5	-2.71	P.capsici.genoma	-	10	acgctgatataaagaagaactccc
A-ch-ch_107	A-ch-ch MIR7	-3.42	P.capsici.genoma	-	8	agtgagtcgctgagcttgtagc
A-ch-ch_108	A-ch-ch MIR59	9.91	P.capsici.genoma	-	25	ttacatagtagtactggagagcc
A-ch-ch_109	A-ch-ch MIR59	9.91	P.capsici.genoma	-	25	ttacatagtagtactggagagcc
A-ch-ch_110	A-ch-ch MIR59	7.88	P.capsici.genoma	-	25	ttacatagtagtactggagagcc
A-ch-ch_111	A-ch-ch MIR33	-2.37	P.capsici.genoma	-	23	tccgatgattacagtagctaaaagac
A-ch-ch_112	A-ch-ch MIR52	-6.29	P.capsici.genoma	-	7	tgagatgaactgttcgaacttg
A-ch-ch_113	A-ch-ch MIR3	0.9	P.capsici.genoma	-	29	aatgaagtgctgtcgatgtgaacc
A-ch-ch_114	A-ch-ch MIR15	-0.7	P.capsici.genoma	-	12	tacagaagatacattacgtcggc
A-ch-ch_115	A-ch-ch MIR15	-0.7	P.capsici.genoma	-	12	tacagaagatacattacgtcggc
A-ch-ch_116	A-ch-ch MIR63	-7.06	P.capsici.genoma	-	7	ttgacttagaccgagtgtagc
A-ch-ch_117	A-ch-ch MIR10	-4.88	P.capsici.genoma	-	6	ctggccaagaggctggagaacctg
A-ch-ch_118	A-ch-ch MIR15	-0.7	P.capsici.genoma	-	12	tacagaagatacattacgtcggc
A-ch-ch_119	A-ch-ch MIR15	-0.7	P.capsici.genoma	-	12	tacagaagatacattacgtcggc
A-ch-ch_120	A-ch-ch MIR20	-6.09	P.capsici.genoma	-	5	tagacgactaacgatagctggac
A-ch-ch_121	A-ch-ch MIR60	8.05	P.capsici.genoma	-	7	ttcgaagcaagtcgatgactttg
A-ch-ch_122	A-ch-ch MIR57	-2.98	P.capsici.genoma	-	29	ttgtcttaaggggtggcgacatgc
A-ch-ch_123	A-ch-ch MIR35	1.56	P.capsici.genoma	-	13	tcgaagatgaaactgacactctg
A-ch-ch_124	A-ch-ch MIR44	-4.15	P.capsici.genoma	-	6	tctatttcgcaaacgtgtacagc
A-ch-ch_125	A-ch-ch MIR35	1.56	P.capsici.genoma	-	13	tcgaagatgaaactgacactctg
A-ch-ch_126	A-ch-ch MIR68	-4.88	P.capsici.genoma	-	9	ttggccttgatctcgtgtacagc
A-ch-ch_127	A-ch-ch MIR68	-7.53	P.capsici.genoma	-	9	ttggccttgatctcgtgtacagc
A-ch-ch_128	A-ch-ch MIR22	-0.24	P.capsici.genoma	-	8	tagcgaatgctgatgtgcttg
A-ch-ch_129	A-ch-ch MIR60	1.44	P.capsici.genoma	-	10	ttcgaagcaagtcgatgactttg
A-ch-ch_130	A-ch-ch MIR5	-4.08	P.capsici.genoma	-	10	acgctgatataaagaagaactccc

A-ch-ch_131	A-ch-ch MIR51	-5.07	P.capsici.genoma	-	7	tgagagaccggtcatgatcacgc
A-ch-ch_132	A-ch-ch MIR27	-3.57	P.capsici.genoma	-	14	tatgtcaggtgaacgatgccgt
A-ch-ch_133	A-ch-ch MIR56	-6.42	P.capsici.genoma	-	9	tggcaaaagcaagtcggtagcgatctg
A-ch-ch_134	A-ch-ch MIR22	0.01	P.capsici.genoma	-	8	tagcgaatgctgatgtgcttg
A-ch-ch_135	A-ch-ch MIR37	0.71	P.capsici.genoma	-	16	tcgagacgtcgaattgagtggggg
A-ch-ch_136	A-ch-ch MIR52	-4.51	P.capsici.genoma	-	7	tgagatgaactgttcgaactg
A-ch-ch_137	A-ch-ch MIR4	-3.75	P.capsici.genoma	-	344	acgagtcataactgtgcaacatcc
A-ch-ch_138	A-ch-ch MIR29	-2.04	P.capsici.genoma	-	6	tcacggagatgtcaattgctgagc
A-ch-ch_139	A-ch-ch MIR8	-3.14	P.capsici.genoma	-	13	cccacgaagtatgctcttggaagc
A-ch-ch_140	A-ch-ch MIR13	13.13	P.capsici.genoma	-	12	taattaccgtaagagctgttca
A-ch-ch_141	A-ch-ch MIR9	-3.79	P.capsici.genoma	-	13	cccgtgctgctgacggaggcc
A-ch-ch_142	A-ch-ch MIR15	-0.71	P.capsici.genoma	-	12	tacagaagatacattacgtcggc
A-ch-ch_143	A-ch-ch MIR73	-1.51	P.capsici.genoma	-	8	ttagtggttacgtgatctctcgcc
A-ch-ch_144	A-ch-ch MIR15	-0.7	P.capsici.genoma	-	12	tacagaagatacattacgtcggc
A-ch-ch_145	A-ch-ch MIR22	-2.03	P.capsici.genoma	-	8	tagcgaatgctgatgtgcttg
A-ch-ch_146	A-ch-ch MIR62	0.05	P.capsici.genoma	-	27	ttcgccacaaggcacaactgacct
A-ch-ch_147	A-ch-ch MIR62	-0.29	P.capsici.genoma	-	27	ttcgccacaaggcacaactgacct
A-ch-ch_148	A-ch-ch MIR62	-0.47	P.capsici.genoma	-	27	ttcgccacaaggcacaactgacct
A-ch-ch_149	A-ch-ch MIR62	-1.16	P.capsici.genoma	-	27	ttcgccacaaggcacaactgacct
A-ch-ch_150	A-ch-ch MIR62	-0.47	P.capsici.genoma	-	27	ttcgccacaaggcacaactgacct
A-ch-ch_151	A-ch-ch MIR19	-4.45	P.capsici.genoma	-	8	tactgcagactagtaggcttcc
A-ch-ch_152	A-ch-ch MIR45	-2.15	P.capsici.genoma	-	8	tctcaagcgaatttgcgggtg
A-ch-ch_153	A-ch-ch MIR60	1.95	P.capsici.genoma	-	9	ttcgaagcaagtcgatgactttg
A-ch-ch_154	A-ch-ch MIR73	9.05	P.capsici.genoma	-	8	ttagtggttacgtgatctctcgcc

ANEXO 24: Características de miRNAs maduros *de novo* en A-br-ch

ID miRNA novo	Familia MIRNA	score	Genoma	strand	Nivel de Expresión	miR maduro
br-ch_000	A-br-ch MIR91	-2.23	P.capsici.genoma	+	16	tcattatttggcgcctgacc
br-ch_001	A-br-ch MIR12	-1.45	P.capsici.genoma	+	17	agatggctgtcttgccgc
br-ch_002	A-br-ch MIR23	-5.94	P.capsici.genoma	+	11	gaggctgaagagtagtctggg
br-ch_003	A-br-ch MIR161	-1.09	P.capsici.genoma	+	22	tgccgagatgctagtagcaacgg
br-ch_004	A-br-ch MIR27	-3.93	P.capsici.genoma	+	5	taacagtaggcggccaagca
br-ch_005	A-br-ch MIR105	-3.03	P.capsici.genoma	+	15	tccggacgttcaggtgtacctgct
br-ch_006	A-br-ch MIR86	-0.72	P.capsici.genoma	+	18	tcagatcggattccatctacggc
br-ch_007	A-br-ch MIR165	-2.23	P.capsici.genoma	+	72	tgctgacatggaacacgaccgag
br-ch_008	A-br-ch MIR92	-1.4	P.capsici.genoma	+	11	tccaaaagacgagatcggccaatg
br-ch_009	A-br-ch MIR205	7.94	P.capsici.genoma	+	13	ttggcggcatgggcaaagatcacc
br-ch_010	A-br-ch MIR145	-5.16	P.capsici.genoma	+	5	tcttgctttccgactggaacg
br-ch_011	A-br-ch MIR210	-4.03	P.capsici.genoma	+	7	tttccatgtactccagctcgact
br-ch_012	A-br-ch MIR30	-6.21	P.capsici.genoma	+	5	taacgagtcaagcaggccaagaa
br-ch_013	A-br-ch MIR42	-1.93	P.capsici.genoma	+	15	taccgatcacatcaaggagctccg
br-ch_014	A-br-ch MIR215	-1.1	P.capsici.genoma	+	20	ttttcatggtcgtggcat
br-ch_015	A-br-ch MIR34	-0.52	P.capsici.genoma	+	15	taagattattattgtgacaggagcc
br-ch_016	A-br-ch MIR152	-3.2	P.capsici.genoma	+	6	tgagttacctcgaactgacagcc
br-ch_017	A-br-ch MIR164	-4.15	P.capsici.genoma	+	8	tgcggttggtgtacggtgtacatg
br-ch_018	A-br-ch MIR144	-2.25	P.capsici.genoma	+	5	tctgcctattgcccggacgt
br-ch_019	A-br-ch MIR83	-2.42	P.capsici.genoma	+	16	tcactgagaaagtgtcgtggacacg
br-ch_020	A-br-ch MIR175	38.59	P.capsici.genoma	+	52	tgtcgcccgttggttactgtacg
br-ch_021	A-br-ch MIR109	-8.15	P.capsici.genoma	+	12	tccgtactgtcctctgtccccga
br-ch_022	A-br-ch MIR16	1.25	P.capsici.genoma	+	17	cattaatgtgtacctggcatg
br-ch_023	A-br-ch MIR51	-6.8	P.capsici.genoma	+	6	tacggatatacatagtgtctgatg
br-ch_024	A-br-ch MIR31	1.34	P.capsici.genoma	+	11	taacggagagtacgggggactg
br-ch_025	A-br-ch MIR173	-3.06	P.capsici.genoma	+	7	tgtactggcgaccaatcaagc
br-ch_026	A-br-ch MIR101	-6.61	P.capsici.genoma	+	6	tccgagtccttgagcgtctgcctg
br-ch_027	A-br-ch MIR58	-3.51	P.capsici.genoma	+	23	tagaatctgtgtacttgaaccacg

br-ch_028	A-br-ch MIR68	-6.45	P.capsici.genoma	+	10	tagtgaagacaaatgatgccaggcc
br-ch_029	A-br-ch MIR47	-2.75	P.capsici.genoma	+	9	tacgacctccaaaggctggcatg
br-ch_030	A-br-ch MIR34	-0.52	P.capsici.genoma	+	15	taagattattattgtgacaggagcc
br-ch_031	A-br-ch MIR60	-2.47	P.capsici.genoma	+	53	tagactttagggaggttgcc
br-ch_032	A-br-ch MIR113	-2.02	P.capsici.genoma	+	12	tcgaaacggtgtctgatttttgc
br-ch_033	A-br-ch MIR135	-3.26	P.capsici.genoma	+	18	tcggcatcgagtggaacaggtacag
br-ch_034	A-br-ch MIR81	0.96	P.capsici.genoma	+	64	tcaccagagtgctgtagagc
br-ch_035	A-br-ch MIR24	0.03	P.capsici.genoma	+	35	ggttcaaaccggtaggagc
br-ch_036	A-br-ch MIR18	-0.84	P.capsici.genoma	+	5	cgaaggcgtcttcgcgacc
br-ch_037	A-br-ch MIR169	-5.58	P.capsici.genoma	+	6	tgctcgtggcgtggcgg
br-ch_038	A-br-ch MIR140	10.16	P.capsici.genoma	+	10	tctcaaggctgcatgattgagcc
br-ch_039	A-br-ch MIR64	-6.16	P.capsici.genoma	+	19	taggacctccaacataacataga
br-ch_040	A-br-ch MIR203	-1.41	P.capsici.genoma	+	8	ttggcacatttcgatcgacgacg
br-ch_041	A-br-ch MIR11	-3.67	P.capsici.genoma	+	15	agaagttggattaagcagta
br-ch_042	A-br-ch MIR48	-9.94	P.capsici.genoma	+	5	tacgagaaaggctgtgagagacg
br-ch_043	A-br-ch MIR154	8.76	P.capsici.genoma	+	11	tgatgagaatggcgagatagac
br-ch_044	A-br-ch MIR125	-0.6	P.capsici.genoma	+	14	tcgagatctttgcgctcctggct
br-ch_045	A-br-ch MIR29	-1.95	P.capsici.genoma	+	9	taacgagctgtgtcagcaatactg
br-ch_046	A-br-ch MIR190	-0.72	P.capsici.genoma	+	100	ttcgagcttccgatcctggactg
br-ch_047	A-br-ch MIR101	-8.44	P.capsici.genoma	+	6	tccgagtccttgagcgtctgctg
br-ch_048	A-br-ch MIR151	-0.64	P.capsici.genoma	+	7	tgagtcctctaagctcgtgggat
br-ch_049	A-br-ch MIR44	0.12	P.capsici.genoma	+	11	taccgtaggacaaattgtgagc
br-ch_050	A-br-ch MIR204	-1.5	P.capsici.genoma	+	16	ttggcgcacactgttgttg
br-ch_051	A-br-ch MIR170	18.58	P.capsici.genoma	+	20	tggactcagaatacaattcact
br-ch_052	A-br-ch MIR38	-6.98	P.capsici.genoma	+	10	taagttggccttctattgag
br-ch_053	A-br-ch MIR8	-1.46	P.capsici.genoma	+	10	acacggaaatlttgagtagaactca
br-ch_054	A-br-ch MIR199	-3.19	P.capsici.genoma	+	27	ttgcaaccgcaactgggctgaca
br-ch_055	A-br-ch MIR111	-1.63	P.capsici.genoma	+	8	tcctcggctgccttgaacgac
br-ch_056	A-br-ch MIR163	-2.8	P.capsici.genoma	+	13	tcggcagctcaatgtctcgc
br-ch_057	A-br-ch MIR84	-2.2	P.capsici.genoma	+	12	tcagaaacctcggcagatttccg
br-ch_058	A-br-ch MIR122	-9.02	P.capsici.genoma	+	8	tcgagaatctggatcgacaatggtg
br-ch_059	A-br-ch MIR12	-0.78	P.capsici.genoma	+	17	agatggctgtcttggcgc
br-ch_060	A-br-ch MIR28	8.02	P.capsici.genoma	+	18	taacatcggctcactttgcacgca

br-ch_061	A-br-ch MIR101	-7.32	P.capsici.genoma	+	6	tccgagtccttgagcgtctgcctg
br-ch_062	A-br-ch MIR192	-5.62	P.capsici.genoma	+	18	ttcggtatcgtcgcagcatcgcc
br-ch_063	A-br-ch MIR166	6.51	P.capsici.genoma	+	9	tgcgtgataaagcggagttgaaag
br-ch_064	A-br-ch MIR166	2.03	P.capsici.genoma	+	9	tgcgtgataaagcggagttgaaag
br-ch_065	A-br-ch MIR184	-2.24	P.capsici.genoma	+	18	ttcatgaacgtgacgacctgg
br-ch_066	A-br-ch MIR159	10.7	P.capsici.genoma	+	7	tgcatcgtcggccgacc
br-ch_067	A-br-ch MIR188	-0.57	P.capsici.genoma	+	29	ttcgagcggctcctgaaccgatggac
br-ch_068	A-br-ch MIR117	-0.36	P.capsici.genoma	+	7	tcgaccctcgcgtccctctaacgcc
br-ch_069	A-br-ch MIR98	-1.56	P.capsici.genoma	+	9	tcccttggctcggctgtgccagcc
br-ch_070	A-br-ch MIR101	-7.32	P.capsici.genoma	+	6	tccgagtccttgagcgtctgcctg
br-ch_071	A-br-ch MIR101	-4.16	P.capsici.genoma	+	6	tccgagtccttgagcgtctgcctg
br-ch_072	A-br-ch MIR97	0.64	P.capsici.genoma	+	10	tccccagatgataaagacaaaactg
br-ch_073	A-br-ch MIR73	-7.29	P.capsici.genoma	+	5	tatcgccgagttgctctccaatg
br-ch_074	A-br-ch MIR78	-0.98	P.capsici.genoma	+	100	tatgtctctgttggccccgagg
br-ch_075	A-br-ch MIR185	-9.47	P.capsici.genoma	+	11	ttccactggatcactggcagcctg
br-ch_076	A-br-ch MIR193	-3.32	P.capsici.genoma	+	9	ttcgtgaccgatgagcgtcgagg
br-ch_077	A-br-ch MIR101	-7.32	P.capsici.genoma	+	6	tccgagtccttgagcgtctgcctg
br-ch_078	A-br-ch MIR101	-4.16	P.capsici.genoma	+	6	tccgagtccttgagcgtctgcctg
br-ch_079	A-br-ch MIR118	-7.47	P.capsici.genoma	+	10	tcgacgaactgaaccgtcggcc
br-ch_080	A-br-ch MIR186	-4.56	P.capsici.genoma	+	13	ttccgatcctggactgtcttatgga
br-ch_081	A-br-ch MIR138	10.29	P.capsici.genoma	+	19	tcgggctccttcttgcgaagctg
br-ch_082	A-br-ch MIR157	-4.68	P.capsici.genoma	+	8	tgccatatacgtcgcgatacacgt
br-ch_083	A-br-ch MIR179	57.27	P.capsici.genoma	+	65	ttacgagatccgcctgcctg
br-ch_084	A-br-ch MIR214	-5.31	P.capsici.genoma	+	9	ttttatcgccatggatcc
br-ch_085	A-br-ch MIR198	11.75	P.capsici.genoma	+	9	ttgccgtagatggaatccgatctg
br-ch_086	A-br-ch MIR67	-2.73	P.capsici.genoma	+	6	tagtcgagttaacctgaaagtacag
br-ch_087	A-br-ch MIR69	-9.39	P.capsici.genoma	+	8	tagttatctccacgagcttg
br-ch_088	A-br-ch MIR8	-7.25	P.capsici.genoma	+	10	acacggaaatttgagtagaactca
br-ch_089	A-br-ch MIR15	-2.28	P.capsici.genoma	+	133	catcagtcgacgtagcagc
br-ch_090	A-br-ch MIR42	0.41	P.capsici.genoma	+	15	taccgatcacatcaaggagctccg
br-ch_091	A-br-ch MIR121	-7.88	P.capsici.genoma	+	9	tcgagaaggatgtggagtgattaga
br-ch_092	A-br-ch MIR77	-1.64	P.capsici.genoma	+	11	tatgtaagactgtagcctggccaac
br-ch_093	A-br-ch MIR99	-2.79	P.capsici.genoma	+	16	tccctttcgagattcgtggctg

br-ch_094	A-br-ch MIR150	-4	P.capsici.genoma	+	10	tgagcggactagttgaagaga
br-ch_095	A-br-ch MIR80	27.43	P.capsici.genoma	+	15	tcaacgactatctgagtcgagc
br-ch_096	A-br-ch MIR188	-1.09	P.capsici.genoma	+	23	ttcgagcggctctgaaccgatggac
br-ch_097	A-br-ch MIR108	-4.98	P.capsici.genoma	+	6	tccggatgtacacatggtctacag
br-ch_098	A-br-ch MIR207	-0.45	P.capsici.genoma	+	9	ttgggatcttgatcttgggat
br-ch_099	A-br-ch MIR153	-2.95	P.capsici.genoma	+	45	tgataataccgtcgaccaag
br-ch_100	A-br-ch MIR82	32.53	P.capsici.genoma	+	15	tcacgcggctgagcatctcg
br-ch_101	A-br-ch MIR89	1.2	P.capsici.genoma	+	30	tcatcttccggctgcccggacacc
br-ch_102	A-br-ch MIR6	-0.53	P.capsici.genoma	+	21	aatggcgtcactgtattcgg
br-ch_103	A-br-ch MIR55	-3.74	P.capsici.genoma	+	5	tactgtcgggtccggggc
br-ch_104	A-br-ch MIR196	11.17	P.capsici.genoma	+	8	ttgactatgaagagacgtacgcgcc
br-ch_105	A-br-ch MIR157	-4.24	P.capsici.genoma	+	8	tgccatatacgtcgcgatacacgt
br-ch_106	A-br-ch MIR65	-4.21	P.capsici.genoma	+	6	taggagaaatcagaattctg
br-ch_107	A-br-ch MIR37	-2.42	P.capsici.genoma	+	7	taagtctcgagcgactcccgtcg
br-ch_108	A-br-ch MIR32	-5.35	P.capsici.genoma	+	65	taacgtagagacctgaagtaccgc
br-ch_109	A-br-ch MIR202	-1.84	P.capsici.genoma	+	20	ttggacttgtgattagccccacc
br-ch_110	A-br-ch MIR202	-0.27	P.capsici.genoma	+	20	ttggacttgtgattagccccacc
br-ch_111	A-br-ch MIR168	-4.35	P.capsici.genoma	+	12	tgctcgcctgtgcctctgtggcatg
br-ch_112	A-br-ch MIR171	0.1	P.capsici.genoma	+	16	tggagagagaagcgtagacctggcc
br-ch_113	A-br-ch MIR156	-1.84	P.capsici.genoma	+	24	tgacatgtagtaaccgtagcc
br-ch_114	A-br-ch MIR79	-2.13	P.capsici.genoma	+	12	tattgttactgttagagagcc
br-ch_115	A-br-ch MIR7	0.07	P.capsici.genoma	+	20	acaaatcgaacaaagatgctg
br-ch_116	A-br-ch MIR54	-0.72	P.capsici.genoma	+	15	tactgtcctcgagaacacgccc
br-ch_117	A-br-ch MIR11	17.18	P.capsici.genoma	+	21	agaagttgattaagcagta
br-ch_118	A-br-ch MIR133	77.96	P.capsici.genoma	+	71	tcggacgctcgcgagcttcgag
br-ch_119	A-br-ch MIR8	-7.25	P.capsici.genoma	+	10	acacggaaatttgagtagaactca
br-ch_120	A-br-ch MIR175	-3.8	P.capsici.genoma	+	52	tgtcggcgttggtcactgtacg
br-ch_121	A-br-ch MIR148	1.37	P.capsici.genoma	+	12	tgacgcactgactcggggc
br-ch_122	A-br-ch MIR142	-2.45	P.capsici.genoma	+	24	tctctacgttacgtatctccgcc
br-ch_123	A-br-ch MIR197	-6.35	P.capsici.genoma	+	7	ttgagattgactttgaccacag
br-ch_124	A-br-ch MIR197	-6.02	P.capsici.genoma	+	7	ttgagattgactttgaccacag
br-ch_125	A-br-ch MIR127	-2.42	P.capsici.genoma	+	20	tcgagcgtctcggagtcgaactg
br-ch_126	A-br-ch MIR101	-7.32	P.capsici.genoma	+	6	tccgagtcggtgagcgtctgcctg

br-ch_127	A-br-ch MIR101	-8.44	P.capsici.genoma	+	6	tccgagtccttgagcgtctgcctg
br-ch_128	A-br-ch MIR41	-1.92	P.capsici.genoma	+	8	tacccgaacctgaacgaacgagacg
br-ch_129	A-br-ch MIR41	-1.92	P.capsici.genoma	+	8	tacccgaacctgaacgaacgagacg
br-ch_130	A-br-ch MIR107	-1.49	P.capsici.genoma	+	8	tccggatcttcggcctcagccccg
br-ch_131	A-br-ch MIR126	-2.65	P.capsici.genoma	+	10	tcgagatgaaccgacactgtactg
br-ch_132	A-br-ch MIR112	-8.1	P.capsici.genoma	+	12	tccttgatacagtcaacttagagc
br-ch_133	A-br-ch MIR103	-4.65	P.capsici.genoma	+	6	tccggaaccgatggacctcagcc
br-ch_134	A-br-ch MIR37	-0.1	P.capsici.genoma	+	8	taagtctcgagcgactcccgtcgg
br-ch_135	A-br-ch MIR160	-3.85	P.capsici.genoma	+	5	tgcgcaagcatgcgtactggcatg
br-ch_136	A-br-ch MIR8	-5.45	P.capsici.genoma	+	10	acacggaaatcttgagtagaactca
br-ch_137	A-br-ch MIR62	31.18	P.capsici.genoma	+	58	tagcgaatgtcgatgtgcttgg
br-ch_138	A-br-ch MIR122	-7.21	P.capsici.genoma	+	8	tcgagaatctggatcgacaatggtg
br-ch_139	A-br-ch MIR175	40.81	P.capsici.genoma	+	52	tgtcgcccgttggtcactgtacg
br-ch_140	A-br-ch MIR120	0.36	P.capsici.genoma	+	20	tcgagaagactggacttgggggag
br-ch_141	A-br-ch MIR53	-3.65	P.capsici.genoma	+	12	tacggtttcgttgaagagggc
br-ch_142	A-br-ch MIR125	-0.6	P.capsici.genoma	+	14	tcgagatctttgcctcctggct
br-ch_143	A-br-ch MIR14	-4.27	P.capsici.genoma	+	5	cagatgacaatagacggatg
br-ch_144	A-br-ch MIR9	-2.12	P.capsici.genoma	+	51	accccgattggtatgaggcttccc
br-ch_145	A-br-ch MIR101	-5.89	P.capsici.genoma	+	6	tccgagtccttgagcgtctgcctg
br-ch_146	A-br-ch MIR90	-5.05	P.capsici.genoma	+	21	tcatgatgcgacgacgaagacacg
br-ch_147	A-br-ch MIR33	6.93	P.capsici.genoma	+	7	taagacggccaagctcaacgaga
br-ch_148	A-br-ch MIR39	15.24	P.capsici.genoma	+	7	taccaagacttggttggggtagct
br-ch_149	A-br-ch MIR72	-5.58	P.capsici.genoma	+	9	tatatggactgaacaggcaccag
br-ch_150	A-br-ch MIR187	-0.83	P.capsici.genoma	-	22	ttcgagaattctgtgaaactga
br-ch_151	A-br-ch MIR212	-6.98	P.capsici.genoma	-	15	tttgagaaggatctgcaactggga
br-ch_152	A-br-ch MIR26	-6.7	P.capsici.genoma	-	11	taacaaatctggatgaaagact
br-ch_153	A-br-ch MIR122	-3.58	P.capsici.genoma	-	8	tcgagaatctggatcgacaatggtg
br-ch_154	A-br-ch MIR2	-4.48	P.capsici.genoma	-	390	aacagagctttggttggcc
br-ch_155	A-br-ch MIR149	-2.02	P.capsici.genoma	-	21	tgactgtaggcactcaccgtggc
br-ch_156	A-br-ch MIR95	-9.54	P.capsici.genoma	-	9	tccagaagaaggtatctcgtgac
br-ch_157	A-br-ch MIR36	-2.72	P.capsici.genoma	-	20	taaggaccggggccaggacgttag
br-ch_158	A-br-ch MIR181	-3.09	P.capsici.genoma	-	16	ttatgcattgaaattgggat
br-ch_159	A-br-ch MIR46	2.19	P.capsici.genoma	-	25	tacctcgactgacatgctacc

br-ch_160	A-br-ch MIR85	-1.79	P.capsici.genoma	-	31	tcagaacgcctggctcgacgagct
br-ch_161	A-br-ch MIR183	1.58	P.capsici.genoma	-	17	ttcagatcgagggcggagttcc
br-ch_162	A-br-ch MIR114	-0.2	P.capsici.genoma	-	18	tcgaactcgacacagccgttgcggc
br-ch_163	A-br-ch MIR43	0.41	P.capsici.genoma	-	27	taccggagttggaagatcctgac
br-ch_164	A-br-ch MIR128	-1.02	P.capsici.genoma	-	7	tcgatcaatctcgtcatcgttcgc
br-ch_165	A-br-ch MIR147	-2.2	P.capsici.genoma	-	13	tgaacgagaagtcggacgcttcc
br-ch_166	A-br-ch MIR115	-0.24	P.capsici.genoma	-	7	tcgaatcgacggacgattgacggc
br-ch_167	A-br-ch MIR213	-8.22	P.capsici.genoma	-	13	tttggctggagacggatgaaagt
br-ch_168	A-br-ch MIR155	0.89	P.capsici.genoma	-	21	tgattggctgagacggatga
br-ch_169	A-br-ch MIR124	-2.2	P.capsici.genoma	-	5	tcgagatcgactacgacatggagc
br-ch_170	A-br-ch MIR126	-5.67	P.capsici.genoma	-	10	tcgagatgaaccgacactgtactg
br-ch_171	A-br-ch MIR122	-8.14	P.capsici.genoma	-	8	tcgagaatctggatcgacaatggtg
br-ch_172	A-br-ch MIR94	-0.11	P.capsici.genoma	-	8	tccactcgagacttgattaac
br-ch_173	A-br-ch MIR75	-9.2	P.capsici.genoma	-	6	tatgatccactgtagtcgt
br-ch_174	A-br-ch MIR63	-4.13	P.capsici.genoma	-	31	tagctccaccagttctgaaactg
br-ch_175	A-br-ch MIR101	-7.03	P.capsici.genoma	-	6	tccgagtccttgagcgtctgcctg
br-ch_176	A-br-ch MIR3	-3.75	P.capsici.genoma	-	17	aacgaaattccagattgcaaggac
br-ch_177	A-br-ch MIR52	-1.28	P.capsici.genoma	-	7	tacggcatatgacacttgggcac
br-ch_178	A-br-ch MIR211	-4.56	P.capsici.genoma	-	17	tttgacaagtcggaactgcacccgc
br-ch_179	A-br-ch MIR98	-4.6	P.capsici.genoma	-	9	tcccttggctggctgtgccagcc
br-ch_180	A-br-ch MIR19	-7.14	P.capsici.genoma	-	5	cggatgaaactggctggg
br-ch_181	A-br-ch MIR122	-2.46	P.capsici.genoma	-	8	tcgagaatctggatcgacaatggtg
br-ch_182	A-br-ch MIR25	-8.84	P.capsici.genoma	-	6	taaacgacgagtgagacactggaaa
br-ch_183	A-br-ch MIR195	17.78	P.capsici.genoma	-	26	ttcttgttcgacttggctctctg
br-ch_184	A-br-ch MIR116	-6.81	P.capsici.genoma	-	5	tcgacacaaattgtcagcacgg
br-ch_185	A-br-ch MIR195	-0.92	P.capsici.genoma	-	26	ttcttgttcgacttggctctctg
br-ch_186	A-br-ch MIR21	-1.54	P.capsici.genoma	-	496	ctaccaagcgtaccaacgc
br-ch_187	A-br-ch MIR8	-7.25	P.capsici.genoma	-	10	acacggaaattttgagtagaactca
br-ch_188	A-br-ch MIR153	1.48	P.capsici.genoma	-	45	tgataatacccgctcgaccaag
br-ch_189	A-br-ch MIR122	-3.98	P.capsici.genoma	-	8	tcgagaatctggatcgacaatggtg
br-ch_190	A-br-ch MIR182	-0.81	P.capsici.genoma	-	25	ttcagacgttctgttgcgacagcc
br-ch_191	A-br-ch MIR182	-0.81	P.capsici.genoma	-	25	ttcagacgttctgttgcgacagcc
br-ch_192	A-br-ch MIR4	12.36	P.capsici.genoma	-	5	aagacttgatcatgtgggagc

br-ch_193	A-br-ch MIR50	-2.84	P.capsici.genoma	-	12	tacgcgttgcggcggttctga
br-ch_194	A-br-ch MIR35	-2.82	P.capsici.genoma	-	24	taaggaacgtcgggaatacagga
br-ch_195	A-br-ch MIR187	-0.03	P.capsici.genoma	-	22	ttcgagaattctgtgaaactga
br-ch_196	A-br-ch MIR153	-1.45	P.capsici.genoma	-	45	tgataatacccgctcgaaccaag
br-ch_197	A-br-ch MIR143	5.32	P.capsici.genoma	-	8	tctgcactccgaagtctcttggc
br-ch_198	A-br-ch MIR217	1.19	P.capsici.genoma	-	28	ttttaagcgtctcttctgtgcc
br-ch_199	A-br-ch MIR191	1.78	P.capsici.genoma	-	10	ttgcccggagagatcacgtagga
br-ch_200	A-br-ch MIR87	-1.19	P.capsici.genoma	-	5	tcagcaacgcgtgctcatcg
br-ch_201	A-br-ch MIR87	-1.19	P.capsici.genoma	-	5	tcagcaacgcgtgctcatcg
br-ch_202	A-br-ch MIR122	-3.48	P.capsici.genoma	-	8	tcgagaatctggatcgacaatggtg
br-ch_203	A-br-ch MIR1	0.67	P.capsici.genoma	-	10	aaaaggcgtcagggcgagc
br-ch_204	A-br-ch MIR194	18.71	P.capsici.genoma	-	25	ttctcaggacagtactgatcatc
br-ch_205	A-br-ch MIR176	-9.47	P.capsici.genoma	-	13	tgtcttggccgcactttag
br-ch_206	A-br-ch MIR61	25.51	P.capsici.genoma	-	28	tagccaatggcatgttagtgacc
br-ch_207	A-br-ch MIR88	-4	P.capsici.genoma	-	5	tcagtctggagcagggccgatccc
br-ch_208	A-br-ch MIR76	-7.19	P.capsici.genoma	-	8	tatggagctacgatggcgagccgg
br-ch_209	A-br-ch MIR150	-3.08	P.capsici.genoma	-	10	tgagcgaggactagtttgaagaga
br-ch_210	A-br-ch MIR130	-5.2	P.capsici.genoma	-	5	tcgcacgtcatgtaggaaccgcca
br-ch_211	A-br-ch MIR131	-8.93	P.capsici.genoma	-	5	tcggaacttaagactgccgcc
br-ch_212	A-br-ch MIR188	-3.05	P.capsici.genoma	-	29	ttcgagcgtcctgaaccgatggac
br-ch_213	A-br-ch MIR107	-1.49	P.capsici.genoma	-	8	tccgatcttcggcctcagccc
br-ch_214	A-br-ch MIR208	2	P.capsici.genoma	-	1814	tttatctgttggtgtct
br-ch_215	A-br-ch MIR78	-0.98	P.capsici.genoma	-	100	tatgtctctgttggccccgaggg
br-ch_216	A-br-ch MIR201	-4.45	P.capsici.genoma	-	13	ttggaacgagaagtgcggtgaa
br-ch_217	A-br-ch MIR40	-2.05	P.capsici.genoma	-	14	taccagaatttccggacgcggtg
br-ch_218	A-br-ch MIR12	1.24	P.capsici.genoma	-	17	agatggctgtcttggcgc
br-ch_219	A-br-ch MIR96	-7.55	P.capsici.genoma	-	28	tccaggcacaacgcgaacacgccc
br-ch_220	A-br-ch MIR195	14.99	P.capsici.genoma	-	26	ttctgttcgacttggctctctg
br-ch_221	A-br-ch MIR200	-7.35	P.capsici.genoma	-	5	ttgctacattgttgagttaccac
br-ch_222	A-br-ch MIR198	7.64	P.capsici.genoma	-	9	ttgccgtagatggaatccgatctg
br-ch_223	A-br-ch MIR134	1.8	P.capsici.genoma	-	12	tcggagaattcggttggccc
br-ch_224	A-br-ch MIR206	-3.82	P.capsici.genoma	-	5	ttggctacaatccgaccggacat
br-ch_225	A-br-ch MIR22	-0.17	P.capsici.genoma	-	15	ctttcattcggatttttccg

br-ch_226	A-br-ch MIR178	-1.86	P.capsici.genoma	-	13	tgtggtcgatggagtagcc
br-ch_227	A-br-ch MIR56	-2.4	P.capsici.genoma	-	6	tacttgatcagctcttggggtgt
br-ch_228	A-br-ch MIR14	-2.74	P.capsici.genoma	-	5	cagatgacaatagacggatg
br-ch_229	A-br-ch MIR177	0.77	P.capsici.genoma	-	15	tgtgacgttcacagtacttcggcc
br-ch_230	A-br-ch MIR167	-9.22	P.capsici.genoma	-	6	tgcgtgtgtcagtgcttgaccc
br-ch_231	A-br-ch MIR180	-4.23	P.capsici.genoma	-	6	ttacgcatcttatcggaaggtaga
br-ch_232	A-br-ch MIR81	72.47	P.capsici.genoma	-	64	tcaccagagtgctgtagagc
br-ch_233	A-br-ch MIR18	-1.47	P.capsici.genoma	-	5	cgaaggcgtcttcgcgacc
br-ch_234	A-br-ch MIR195	16.18	P.capsici.genoma	-	26	ttcttgttcgacttggtctctg
br-ch_235	A-br-ch MIR132	1.7	P.capsici.genoma	-	97	tcggaaccgttgggctcataactg
br-ch_236	A-br-ch MIR8	-7.61	P.capsici.genoma	-	10	acacggaaattttagtagaactca
br-ch_237	A-br-ch MIR146	-1.8	P.capsici.genoma	-	13	tcttgccaggaaactgtagatgg
br-ch_238	A-br-ch MIR104	1.2	P.capsici.genoma	-	23	tccggacgccaagtgtgtgagtgcc
br-ch_239	A-br-ch MIR189	-2.57	P.capsici.genoma	-	8	ttcgagtactgtactgacgccg
br-ch_240	A-br-ch MIR71	1.32	P.capsici.genoma	-	12	tatatgaattctgtcgaactga
br-ch_241	A-br-ch MIR2	-4.48	P.capsici.genoma	-	390	aacagagcttggttgcc
br-ch_242	A-br-ch MIR74	-5.3	P.capsici.genoma	-	15	tatcttgactgccggcatagcta
br-ch_243	A-br-ch MIR137	-2.17	P.capsici.genoma	-	15	tcggccctcgtagtctttggc
br-ch_244	A-br-ch MIR110	-2.55	P.capsici.genoma	-	12	tccgtggcatgaactatcagacca
br-ch_245	A-br-ch MIR139	0.94	P.capsici.genoma	-	7	tctacaagggatccgacagggcag
br-ch_246	A-br-ch MIR42	1.09	P.capsici.genoma	-	15	taccgatcacatcaaggagctccg
br-ch_247	A-br-ch MIR158	-1.84	P.capsici.genoma	-	6	tgccatgccgaccagacgttc
br-ch_248	A-br-ch MIR195	13.08	P.capsici.genoma	-	26	ttcttgttcgacttggtctctg
br-ch_249	A-br-ch MIR57	-3.04	P.capsici.genoma	-	11	tacttggccttgatcatgacc
br-ch_250	A-br-ch MIR66	-1.02	P.capsici.genoma	-	8	tagtaccggtgctcagaaggatctg
br-ch_251	A-br-ch MIR129	-3.49	P.capsici.genoma	-	6	tcgattgcaagacggaggcacgaga
br-ch_252	A-br-ch MIR209	-9.54	P.capsici.genoma	-	5	tttcatctgtgtccatgttgatg
br-ch_253	A-br-ch MIR182	-1.05	P.capsici.genoma	-	25	ttcagacgttctgttccgacagcc
br-ch_254	A-br-ch MIR10	-3.75	P.capsici.genoma	-	231	acgagtcataactgtgcaacatcc
br-ch_255	A-br-ch MIR216	-4.3	P.capsici.genoma	-	28	tttttagtacttggtaaacctgg
br-ch_256	A-br-ch MIR20	-1.74	P.capsici.genoma	-	15	cgctgctgctgctgtccgtg
br-ch_257	A-br-ch MIR181	-8.96	P.capsici.genoma	-	16	ttatgatttgaattgggat
br-ch_258	A-br-ch MIR187	-0.18	P.capsici.genoma	-	22	ttcagaattctgtggaactga

br-ch_259	A-br-ch MIR123	-2.26	P.capsici.genoma	-	13	tcgagacggcctcatgaacgcac
br-ch_260	A-br-ch MIR101	-8.43	P.capsici.genoma	-	6	tccgagtccttgagcgtctgcctg
br-ch_261	A-br-ch MIR119	-1.85	P.capsici.genoma	-	14	tcgagaactggcctctatgaacgc
br-ch_262	A-br-ch MIR100	-0.2	P.capsici.genoma	-	23	tccgaacatttagaacttctgt
br-ch_263	A-br-ch MIR62	31.18	P.capsici.genoma	-	58	tagcgaatgtcgaatgtcttg
br-ch_264	A-br-ch MIR17	-1.54	P.capsici.genoma	-	28	cccacgaagtatgctctggcac
br-ch_265	A-br-ch MIR162	1.22	P.capsici.genoma	-	16	tgcggaatctgaacctgaactgg
br-ch_266	A-br-ch MIR141	-2.06	P.capsici.genoma	-	7	tctcccagttgatcaccgggtcatg
br-ch_267	A-br-ch MIR93	-0.12	P.capsici.genoma	-	21	tccaaggctgggaagtattggcc
br-ch_268	A-br-ch MIR9	-1.98	P.capsici.genoma	-	51	accccgattggatgaggcttccc
br-ch_269	A-br-ch MIR140	10.66	P.capsici.genoma	-	10	tctcaaggctgcgattgagcc
br-ch_270	A-br-ch MIR102	-4.86	P.capsici.genoma	-	7	tccgagtcgttgcatccact
br-ch_271	A-br-ch MIR59	-2.65	P.capsici.genoma	-	8	tagactgcgagcgcctgtaccgga
br-ch_272	A-br-ch MIR160	-3.01	P.capsici.genoma	-	5	tgcgcaagcatgcgtactggcatg
br-ch_273	A-br-ch MIR45	-8.62	P.capsici.genoma	-	16	taccgtcgcgtgtgtctgtagacc
br-ch_274	A-br-ch MIR5	-3.2	P.capsici.genoma	-	9	aaggaagttgattacgctgtggcac
br-ch_275	A-br-ch MIR49	-2.85	P.capsici.genoma	-	8	tacgagaatggaatcggttcagtg
br-ch_276	A-br-ch MIR136	0.8	P.capsici.genoma	-	61	tcggccacaaggcacaactgacct
br-ch_277	A-br-ch MIR136	81.76	P.capsici.genoma	-	61	tcggccacaaggcacaactgacct
br-ch_278	A-br-ch MIR136	77.48	P.capsici.genoma	-	61	tcggccacaaggcacaactgacct
br-ch_279	A-br-ch MIR136	78.51	P.capsici.genoma	-	61	tcggccacaaggcacaactgacct
br-ch_280	A-br-ch MIR136	73.32	P.capsici.genoma	-	61	tcggccacaaggcacaactgacct
br-ch_281	A-br-ch MIR136	78.4	P.capsici.genoma	-	61	tcggccacaaggcacaactgacct
br-ch_282	A-br-ch MIR136	86.54	P.capsici.genoma	-	61	tcggccacaaggcacaactgacct
br-ch_283	A-br-ch MIR70	-5.97	P.capsici.genoma	-	10	tagttccggatcaattgtgtaga
br-ch_284	A-br-ch MIR13	-0.13	P.capsici.genoma	-	10	cacaagtccttgaacgccacc
br-ch_285	A-br-ch MIR174	34.87	P.capsici.genoma	-	30	tgtccgtgctccatgtctgtatc
br-ch_286	A-br-ch MIR106	-2.26	P.capsici.genoma	-	12	tccggatcaggctgggactaaga
br-ch_287	A-br-ch MIR172	-4.4	P.capsici.genoma	-	106	tggcatcaagtgtcggatcgggc

ANEXO 25. Características de posibles genes target de miRNAs *de novo* asociados al genoma de *P. capsici* en A-ch-ch

ID_miRNA_novo	Familia miRNA	expression(number of mature reads)	ID Target	Descripción	KOG/GO/IPR ID	ID transcripto	Locus gen target	Programa de predicción target
A-ch-ch_019	A-ch-ch MIR65	8	CBOT117-L11	Zinc finger, TAZ-type, regulation of transcription, DNA-dependent, histone acetyltransferase activity	GO:0004402	553156	PHYCAscaffold_51:274655-277983	PSROBOT
A-ch-ch_024	A-ch-ch MIR2	10	CBOT81-N23	Proteína tirosina kinasa, nuclear	GO:0004713	564434	PHYCAscaffold_14:969846-973229	TAPIR_HYBRID
A-ch-ch_032	A-ch-ch MIR60	10	CBOT65-N15	Aldehido deshidrogenasa, producción y conversión de energía	KOG2450	503542	PHYCAscaffold_4:273370-274981	PSROBOT
A-ch-ch_048	A-ch-ch MIR43	21	CBOT177-A15	Polynucleotidyl transferase, Ribonuclease H fold, núcleo	GO:0003676	565796	PHYCAscaffold_19:306374-310085	PSROBOT
A-ch-ch_049	A-ch-ch MIR34	14	CBOT133-F09	WD40 repeat protein, función general	KOG2109	510921	PHYCAscaffold_71:80009-83106	TAPIR_HYBRID
A-ch-ch_049	A-ch-ch MIR34	14	CBOT117-J05	Toll-Interleukin receptor, transducción de señales	GO:0004888	540375	PHYCAscaffold_4:1286220-1290793	TAPIR_HYBRID
A-ch-ch_049	A-ch-ch MIR34	14	CBOT137-C09	Quitinasa, transporte de carbohidratos, metabolismo	KOG2806	503818	PHYCAscaffold_4:1441055-1442515	TAPIR_HYBRID
A-ch-ch_050	A-ch-ch MIR34	14	CBOT137-C09	Quitinasa, transporte de carbohidratos, metabolismo	KOG2806	503818	PHYCAscaffold_4:1441055-1442515	TAPIR_HYBRID
A-ch-ch_050	A-ch-ch MIR34	14	CBOT133-F09	WD40 repeat protein, función general	KOG2109	510921	PHYCAscaffold_71:80009-83106	TAPIR_HYBRID
A-ch-ch_050	A-ch-ch MIR34	14	CBOT117-J05	Toll-Interleukin receptor, transducción de señales	GO:0004888	540375	PHYCAscaffold_4:1286220-1290793	TAPIR_HYBRID
A-ch-ch_063	A-ch-ch MIR2	10	CBOT81-N23	Proteína tirosina kinasa, nuclear	GO:0004713	564434	PHYCAscaffold_14:969846-973229	TAPIR_HYBRID
A-ch-ch_090	A-ch-ch MIR60	10	CBOT65-N15	Aldehido deshidrogenasa, producción y conversión de energía	KOG2450	503542	PHYCAscaffold_4:273370-274981	PSROBOT
A-ch-ch_092	A-ch-ch MIR60	10	CBOT65-N15	Aldehido deshidrogenasa, producción y conversión de energía	KOG2450	503542	PHYCAscaffold_4:273370-274981	PSROBOT
A-ch-ch_093	A-ch-ch MIR60	10	CBOT65-N15	Aldehido deshidrogenasa, producción y conversión de energía	KOG2450	503542	PHYCAscaffold_4:273370-274981	PSROBOT
A-ch-ch_121	A-ch-ch MIR60	7	CBOT65-N15	Aldehido deshidrogenasa, producción y conversión de energía	KOG2450	503542	PHYCAscaffold_4:273370-274981	PSROBOT
A-ch-ch_129	A-ch-ch MIR60	10	CBOT65-N15	Aldehido deshidrogenasa, producción y conversión de energía	KOG2450	503542	PHYCAscaffold_4:273370-274981	PSROBOT
A-ch-ch_141	A-ch-ch MIR9	13	CBOT45-E10	Nucleolar GTPase/ATPase p130, estructura nuclear	KOG2992	503228	PHYCAscaffold_3:575600-577164	PSROBOT
A-ch-ch_141	A-ch-ch MIR9	13	CBOT109-P17	N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol deacetylase-related	IPR003737	540992	PHYCAscaffold_5:1345315-1348510	TAPIR_FASTA', 'TAPIR_HYBRID', 'PSROBOT

A-ch-ch_153	A-ch-ch MIR60	9	CBOT65- N15	Aldehido deshidrogenasa, producción y conversión de energía	KOG2450	503542	PHYCAscaffold_4:273370 -274981	PSROBOT
-------------	------------------	---	----------------	---	---------	--------	-----------------------------------	---------

ANEXO 26. Características de posibles genes target de miRNAs *de novo* asociados al genoma de *P. capsici* en A-br-ch

ID_miRNA_n ovo	Familia miRNA	expression(num ber of mature reads)	ID Target	Descripción	KOG/GO ID	ID trancripto	Locus gen target	Porgrama de predicción target
A-br-ch_001	A-br-ch MIR12	17	CBOT93-N13	Zinc finger, FYVE/PHD-type	GO:0008270	526395	PHYCAscaffold_9:6543 32-656595	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_001	A-br-ch MIR12	17	CBOU73-G22	Proteinase inhibitor I14/I15, hirudin/antistatin	GO:0004857	548547	PHYCAscaffold_29:247 967-249331	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_001	A-br-ch MIR12	17	CBOU29-D06	Chaperonin Cpn60/TCP-1	GO:0005524	539737	PHYCAscaffold_3:1582 176-1586162	PSROBOT
A-br-ch_001	A-br-ch MIR12	17	CBOT177-A17	Vacuolar H ⁺ -ATPase V1 sector, subunit A, producción y conversión de energía	KOG1352	506531	PHYCAscaffold_20:355 497-357710	PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID
A-br-ch_001	A-br-ch MIR12	17	CBOT89-C17	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/enoyl- CoA hydratase, metabolismo y transporte de lípidos	KOG1683	506742	PHYCAscaffold_21:842 715-845066	PSROBOT
A-br-ch_011	A-br-ch MIR210	7	CBOT105-E11	Desconocida	NA	508317	PHYCAscaffold_34:966 33-99085	TAPIR_FASTA', 'PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID'
A-br-ch_011	A-br-ch MIR210	7	CBOT21-O13	L-phenylalanine biosynthesis	GO:0009094	549571	PHYCAscaffold_33:135 806-138085	PSROBOT
A-br-ch_014	A-br-ch MIR215	20	CBOU161-O23	Methionyl-tRNA synthetase, class Ia, citoplasma	GO:0006431	577402	PHYCAscaffold_112:44 711-47001	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_014	A-br-ch MIR215	20	CBOT61-O13	eIF-2alpha kinase GCN2, traducción, biogenesis y estructura ribosomal	KOG1035	503813	PHYCAscaffold_4:1410 813-1413927	PSROBOT
A-br-ch_014	A-br-ch MIR215	20	CBOT121-J17	Poly(A)-specific exoribonuclease PARN, replicación, recombinación y reparación DNA	KOG1990	511445	PHYCAscaffold_85:623 41-64849	PSROBOT
A-br-ch_014	A-br-ch MIR215	20	CBOT41-M17	protein kinase activity	GO:0004672	546645	PHYCAscaffold_22:112 014-114590	PSROBOT
A-br-ch_026	A-br-ch MIR101	6	CBOT69-C07	C-type lectin, mecanismo de transducción de señales	KOG4297	511217	PHYCAscaffold_79:834 69-86200	PSROBOT
A-br-ch_036	A-br-ch MIR18	5	CBOU109-D12	6-phosphogluconate dehydrogenase, C- terminal-like	GO:0004455	548506	PHYCAscaffold_29:196 786-198489	PSROBOT
A-br-ch_036	A-br-ch MIR18	5	CBOT17-N11	RNA recognition motif, RNP-1	GO:0003676	525239	PHYCAscaffold_2:1497 886-1500312	PSROBOT
A-br-ch_036	A-br-ch MIR18	5	CBOT181-H14	Aspartate/ornithine carbamoyltransferase, citoesqueleto	KOG3595	531377	PHYCAscaffold_129:10 137-23657	PSROBOT
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOT29-J13	Ubiquitin-protein ligase activity, intracelular	GO:0004842	541327	PHYCAscaffold_6:8922 63-894677	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOT49-P20	Myosin class II heavy chain, complejo	KOG0161	562179	PHYCAscaffold_8:1128 464-1132269	PSROBOT

				asociado a microtubulos				
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOT173-K13	RNA-processing protein, HAT helix, control del ciclo celular	KOG1915	510806	PHYCAscaffold_67:138 105-140233	PSROBOT'
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOT41-F18	Regulador de la transcripción dependiente de DNA, DNA-binding centromere protein B (CENP-B)	KOG3105	534022	PHYCAscaffold_19:807 305-809638	TAPIR_FASTA'
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOT153-C21	ATP-citrate lyase/succinyl-CoA ligase, producción y conversión de energía	KOG1254	504894	PHYCAscaffold_10:415 086-419544	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOT53-L14	Desconocida	NA	546113	PHYCAscaffold_20:252 934-256605	TAPIR_FASTA', 'PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID'
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOT177-P17	Nucleolar GTPase/ATPase p130, estructura nucleolar-dedos de zinc	KOG2992	527667	PHYCAscaffold_21:642 758-646229	TAPIR_FASTA', 'PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID'
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOT41-L12	Phospholipase D1, metabolismo y transporte de lípidos	KOG1329	503602	PHYCAscaffold_4:4152 40-417604	TAPIR_FASTA', 'PSROBOT
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOU29-D06	Chaperonin complex component, TCP-1 beta subunit (CCT2), modificación postraduccional, chaperonas	KOG0363	503447	PHYCAscaffold_3:1582 176-1584587	PSROBOT
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOU85-B01	Cyclin, C-terminal, núcleo	GO:0005634	566228	PHYCAscaffold_20:568 640-570768	TAPIR_FASTA', 'PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID'
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOU29-C06	Función desconocida	KOG2936	531778	PHYCAscaffold_2:9860 33-987409	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOU17-J05	Zinc finger, RING-type	GO:0008270	511299	PHYCAscaffold_80:927 94-94245	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_037	A-br-ch MIR169	6	CBOT77-A16	Nucleolar GTPase/ATPase p130, estructura nuclear	KOG2992	509590	PHYCAscaffold_47:521 445-523748	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_047	A-br-ch MIR101	6	CBOT69-C07	C-type lectin, mecanismo de transducción de señales	KOG4297	511217	PHYCAscaffold_79:834 69-86200	PSROBOT
A-br-ch_050	A-br-ch MIR204	16	CBOU17-H07	Glutaredoxin-related protein, modificación post-traduccional, chaperonas	KOG0911	553581	PHYCAscaffold_54:130 311-131690	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_050	A-br-ch MIR204	16	CBOT125-N24	SANT, DNA-binding	GO:0003677	511655	PHYCAscaffold_94:806 71-82752	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_050	A-br-ch MIR204	16	CBOU97-C09	Myosin class II heavy chain, citoesqueleto	KOG0161	553527	PHYCAscaffold_53:335 392-338322	TAPIR_FASTA', 'PSROBOT
A-br-ch_059	A-br-ch MIR12	17	CBOT97-I24	SAC3/GANP/THP3, reñacionada con la elongación de la transcripción	IPR045107	506869	PHYCAscaffold_22:832 441-834922	TAPIR_FASTA', 'TAPIR_HYBRID
A-br-ch_059	A-br-ch MIR12	17	CBOU73-G22	Proteinase inhibitor 114/115, hirudin/antistatin	GO:0004857	548547	PHYCAscaffold_29:247 967-249331	TAPIR_HYBRID

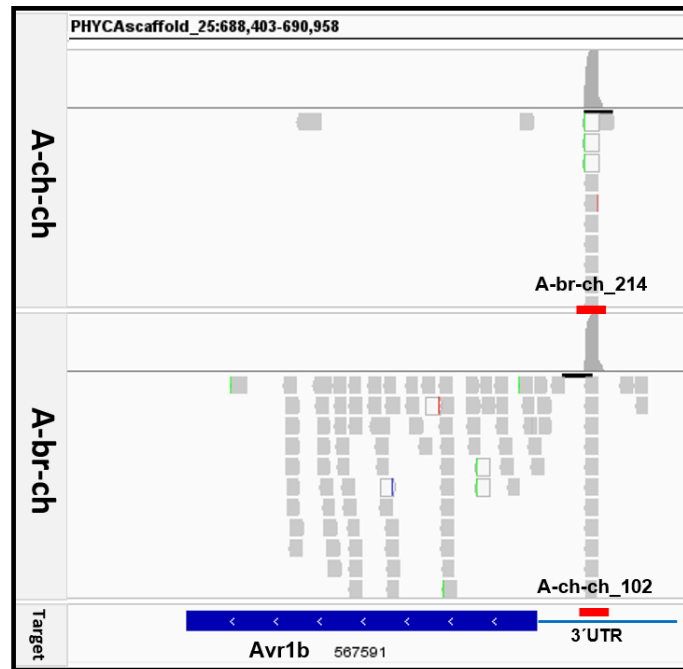
A-br-ch_059	A-br-ch MIR12	17	CBOU29-D06	Chaperonin complex component, TCP-1 beta subunit (CCT2), modificación postraduccion, chaperonas	KOG0363	503447	PHYCAscaffold_3:1582 176-1584587	PSROBOT
A-br-ch_059	A-br-ch MIR12	17	CBOT89-C17	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase, metabolismo y transporte de lipidos	KOG1683	506742	PHYCAscaffold_21:842 715-845066	PSROBOT
A-br-ch_059	A-br-ch MIR12	17	CBOT93-N13	Zinc finger, FYVE/PHD-type	GO:0008270	526395	PHYCAscaffold_9:6543 32-656595	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_059	A-br-ch MIR12	17	CBOT177-A17	Vacuolar H+-ATPase V1 sector, subunit A, producción y conversión de energía	KOG1352	506531	PHYCAscaffold_20:355 497-357710	PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID
A-br-ch_061	A-br-ch MIR101	6	CBOT69-C07	C-type lectin, mecanismo de transducción de señales	KOG4297	511217	PHYCAscaffold_79:834 69-86200	PSROBOT
A-br-ch_065	A-br-ch MIR184	18	CBOT157-A20	Desmetilasa: phosphatidylserine-specific receptor PtdSerR, contains JmjC domain	KOG2130	509113	PHYCAscaffold_42:10 7391-109735	PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID'
A-br-ch_070	A-br-ch MIR101	6	CBOT69-C07	C-type lectin, mecanismo de transducción de señales	KOG4297	511217	PHYCAscaffold_79:834 69-86200	PSROBOT
A-br-ch_071	A-br-ch MIR101	6	CBOT69-C07	C-type lectin, mecanismo de transducción de señales	KOG4297	511217	PHYCAscaffold_79:834 69-86200	PSROBOT
A-br-ch_077	A-br-ch MIR101	6	CBOT69-C07	C-type lectin, mecanismo de transducción de señales	KOG4297	511217	PHYCAscaffold_79:834 69-86200	PSROBOT
A-br-ch_078	A-br-ch MIR101	6	CBOT69-C07	C-type lectin, mecanismo de transducción de señales	KOG4297	511217	PHYCAscaffold_79:834 69-86200	PSROBOT
A-br-ch_083	A-br-ch MIR179	65	CBOT133-K21	Trafico intracelular, secrecion y transporte vesicular, vacuolar protein sorting-associated protein	KOG1809	506196	PHYCAscaffold_18:340 871-343393	PSROBOT
A-br-ch_084	A-br-ch MIR214	9	CBOU89-D23	Desconocida	NA	NA	PHYCAscaffold_2:8945 9-91221	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_089	A-br-ch MIR15	133	CBOT129-P09	Ferric reductase, NADH/NADPH oxidase and related proteins, transporte de iones inorganicos	KOG0039	508158	PHYCAscaffold_33:805 35-82859	
A-br-ch_089	A-br-ch MIR15	133	CBOT125-D23	Zinc finger, FYVE/PHD-type	KOG1729	505843	PHYCAscaffold_16:104 164-106187	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_089	A-br-ch MIR15	133	CBOT61-K07	Molecular chaperones HSP105/HSP110/SS E1, HSP70 superfamily,	KOG0103	502791	PHYCAscaffold_1:1581 055-1583369	TAPIR_FASTA', 'PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID'

				modificación postraduccional				
A-br-ch_089	A-br-ch MIR15	133	CBOT69-I10	PDZ/DHR/GLGF, proteína de unión	GO:0005515	511557	PHYCAscaffold_89:664 57-68923	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_089	A-br-ch MIR15	133	CBOT177-E08	Desconocida	NA	502873	PHYCAscaffold_1:2013 095-2016437	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_089	A-br-ch MIR15	133	CBOT61-K22	Karyopherin (importin) beta 3, trafico, transporte intracelular de vesiculas	KOG2171	503021	PHYCAscaffold_2:1048 829-1053328	PSROBOT
A-br-ch_089	A-br-ch MIR15	133	CBOU105-D05	Protein of unknown function DUF81, proteina integral de membrana	GO:0016021	576684	PHYCAscaffold_94:106 718-109186	PSROBOT
A-br-ch_089	A-br-ch MIR15	133	CBOU133-M20	Aldehyde dehydrogenase, producción y conversión de energía	KOG2456	504663	PHYCAscaffold_9:2907 46-292373	TAPIR_FASTA', 'PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID'
A-br-ch_100	A-br-ch MIR82	15	CBOT173-M15	Vitamin K-dependent carboxylation/gamma-carboxyglutamic region, función desconocida	KOG3695	511124	PHYCAscaffold_76:109 206-112119	PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID'
A-br-ch_100	A-br-ch MIR82	15	CBOT113-L07	Metalloendopeptidase family - saccharolysin & thimet oligopeptidase, modificación postraduccional, chaperonas	KOG2089	572181	PHYCAscaffold_46:510 326-512840	TAPIR_FASTA', 'PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID'
A-br-ch_102	A-br-ch MIR6	21	CBOT29-L15	tRNA ligase activity	GO:0004812	531369	PHYCAscaffold_121:53 896-56025	PSROBOT
A-br-ch_103	A-br-ch MIR55	5	CBOT93-D18	Transcription regulator XNP/ATRX, DEAD-box superfamily	KOG1015	503422	PHYCAscaffold_3:1517 743-1520502	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_103	A-br-ch MIR55	5	CBOU173-P08	Metallophosphoesterase, hidrolasa	GO:0016787	508931	PHYCAscaffold_40:100 995-102250	PSROBOT
A-br-ch_115	A-br-ch MIR7	20	CBOT61-C20	Poly(A) polymerase and related nucleotidyltransferases, procesamiento y modificación de RNA	KOG2245	529676	PHYCAscaffold_47:427 037-430515	PSROBOT
A-br-ch_125	A-br-ch MIR127	20	CBOT173-L23	Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta and related serine/threonine protein kinases, mecanismo de transducción de señales	KOG0585	511131	PHYCAscaffold_76:137 358-139113	PSROBOT
A-br-ch_126	A-br-ch MIR101	6	CBOT69-C07	C-type lectin, mecanismo de transducción de señales	KOG4297	511217	PHYCAscaffold_79:834 69-86200	PSROBOT
A-br-ch_127	A-br-ch MIR101	6	CBOT69-C07	C-type lectin, mecanismo de	KOG4297	511217	PHYCAscaffold_79:834 69-86200	PSROBOT

				transducción de señales				
A-br-ch_145	A-br-ch MIR101	6	CBOT69-C07	C-type lectin, mecanismo de transducción de señales	KOG4297	511217	PHYCAscaffold_79:834 69-86200	PSROBOT
A-br-ch_154	A-br-ch MIR2	390	CBOT61-O13	E2F-associated phosphoprotein	IPR019370	525696	PHYCAscaffold_4:1410 811-1415152	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_158	A-br-ch MIR181	16	CBOT121-L17	Desconocida	NA	569748	PHYCAscaffold_34:780 63-81565	PSROBOT
A-br-ch_168	A-br-ch MIR155	21	CBOU77-P24	Nucleosome remodeling factor, subunit CAF1/NURF55/MSI1	KOG0264	504626	PHYCAscaffold_9:1096 79-111351	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_173	A-br-ch MIR75	6	CBOT69-K22	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, modificación postraduccion, chaperonas	KOG1887	559163	PHYCAscaffold_3:1544 48-157794	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_175	A-br-ch MIR101	6	CBOT69-C07	C-type lectin, mecanismo de transducción de señales	KOG4297	511217	PHYCAscaffold_79:834 69-86200	PSROBOT
A-br-ch_180	A-br-ch MIR19	5	CBOT141-D17	DNA replication licensing factor, MCM2 component, replicación, recombinación y reparación DNA	KOG0477	527907	PHYCAscaffold_24:177 073-181434	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_186	A-br-ch MIR21	496	CBOT137-E23	Vesicle transport protein, Got1/SFT2-like	IPR007305	556019	PHYCAscaffold_81:161 446-162618	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_192	A-br-ch MIR4	5	CBOT137-N22	Desconocida	NA	504606	PHYCAscaffold_8:1166 692-1168582	PSROBOT
A-br-ch_192	A-br-ch MIR4	5	CBOU33-G13	Desconocida	NA	511923	PHYCAscaffold_105:42 063-43717	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_193	A-br-ch MIR50	12	CBOT73-O17	Desconocida	NA	505109	PHYCAscaffold_11:300 538-303474	PSROBOT
A-br-ch_203	A-br-ch MIR1	10	CBOU125-N02	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit (PKA), mecanismo de transducción de señales	KOG0616	504237	PHYCAscaffold_6:1326 862-1328185	PSROBOT
A-br-ch_203	A-br-ch MIR1	10	CBOT25-E13	Karyopherin (importin) beta 3, trafico, transporte intracelular de vesiculas	KOG2171	532200	PHYCAscaffold_4:6197 49-623145	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_214	A-br-ch MIR208	1814	CBOT85-O23	Mitotic checkpoint protein MAD1, control del ciclo celular y division celular	KOG4593	506073	PHYCAscaffold_17:542 892-545859	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_218	A-br-ch MIR12	17	CBOU29-D06	Chaperonin Cpn60/TCP-1	GO:0005524	539737	PHYCAscaffold_3:1582 176-1586162	PSROBOT
A-br-ch_218	A-br-ch MIR12	17	CBOT89-C17	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase, transporte y metabolismo de lipidos	KOG1683	506742	PHYCAscaffold_21:842 715-845066	PSROBOT

A-br-ch_218	A-br-ch MIR12	17	CBOT177-A17	Vacuolar H ⁺ -ATPase V1 sector, subunit A, producción y conversión de energía	KOG1352	506531	PHYCAscaffold_20:355 497-357710	PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID
A-br-ch_218	A-br-ch MIR12	17	CBOT93-N13	Zinc finger, FYVE/PHD-type	GO:0008270	526395	PHYCAscaffold_9:6543 32-656595	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_218	A-br-ch MIR12	17	CBOU73-G22	Proteinase inhibitor 114/115, hirudin/antistatin	GO:0004857	548547	PHYCAscaffold_29:247 967-249331	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_223	A-br-ch MIR134	12	CBOT153-J13	Desconocida	NA	563460	PHYCAscaffold_12:445 335-447367	PSROBOT
A-br-ch_226	A-br-ch MIR178	13	CBOT149-C24	Cullins, control del ciclo celular, division celular, cromosomas	KOG2166	506178	PHYCAscaffold_18:260 763-263286	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_226	A-br-ch MIR178	13	CBOT37-C06	leiotropic drug resistance proteins (PDR1-15), ABC superfamily, biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios	KOG0065	504947	PHYCAscaffold_10:666 199-670501	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_226	A-br-ch MIR178	13	CBOT45-E23	Sodium/calcium exchanger membrane region, intercambio membranal de iones	GO:0016021	569303	PHYCAscaffold_32:218 409-220443	PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID'
A-br-ch_233	A-br-ch MIR18	5	CBOT17-N11	RNA recognition motif, RNP-1	GO:0003676	525239	PHYCAscaffold_2:1497 886-1500312	PSROBOT
A-br-ch_233	A-br-ch MIR18	5	CBOU109-D12	6-phosphogluconate dehydrogenase, C- terminal-like	GO:0004455	548506	PHYCAscaffold_29:196 786-198489	PSROBOT
A-br-ch_233	A-br-ch MIR18	5	CBOT181-H14	Aspartate/ornithine carbamoyltransferase, citoesqueleto	KOG3595	531377	PHYCAscaffold_129:10 137-23657	PSROBOT
A-br-ch_241	A-br-ch MIR2	390	CBOT61-O13	E2F-associated phosphoprotein	IPR019370	525696	PHYCAscaffold_4:1410 811-1415152	TAPIR_HYBRID
A-br-ch_256	A-br-ch MIR20	15	CBOT17-G18	DNA topoisomerase type I activity	GO:0003917	538489	PHYCAscaffold_1:1829 607-1832211	TAPIR_FASTA', 'PSROBOT', 'TAPIR_HYBRID'
A-br-ch_257	A-br-ch MIR181	16	CBOT121-L17	Desconocida	NA	569748	PHYCAscaffold_34:780 63-81565	PSROBOT
A-br-ch_260	A-br-ch MIR101	6	CBOT69-C07	C-type lectin, mecanismo de transducción de señales	KOG4297	511217	PHYCAscaffold_79:834 69-86200	PSROBOT
A-br-ch_271	A-br-ch MIR59	8	CBOT57-O09	Lipid exporter ABCA1 and related proteins, ABC superfamily, metabolismo y transporte de lípidos	KOG0059	571405	PHYCAscaffold_42:154 988-159649	PSROBOT
A-br-ch_284	A-br-ch MIR13	10	CBOT33-G08	Lipid exporter ABCA1 and related proteins, ABC superfamily, metabolismo y transporte de lípidos	KOG0059	532343	PHYCAscaffold_5:1321 95-137648	PSROBOT
A-br-ch_284	A-br-ch MIR13	10	CBOT25-C02	O-linked N- acetylglucosamine transferase OGT, transporte y metabolismo de carbohidratos	KOG4626	574577	HYCAscaffold_64:1167 80-120127	PSROBOT

ANEXO 27. Visualización en IGV del potencial sitio de unión regulatorio de A-ch-ch_102 sobre el gen Avr1b (567591) de *P. capsici* y nivel de expresión en A-ch-ch y A-br-ch.



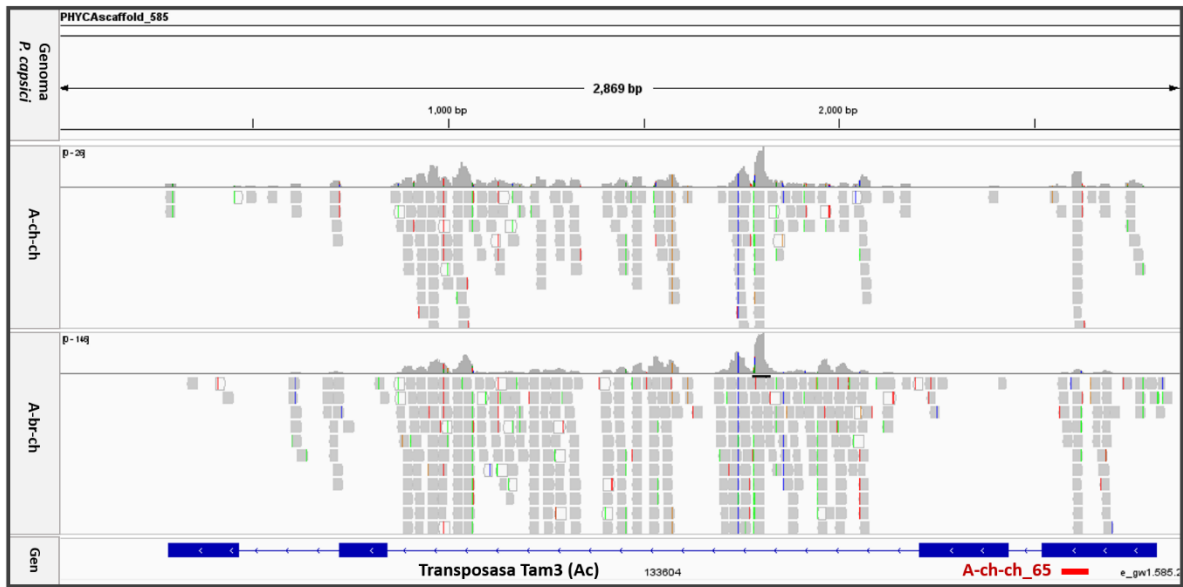
ANEXO 28. Características de miRNAs *de novo* identificados de sRNAs asociados a elementos transponibles en A-ch-ch

miR_ID_novo	score	chr	strand	expression(number of mature reads)	mature miR	mature_loci
ch-ch_TEs_000	1.31	P.capsici.genoma	+	10	ttcgcaagcaagtcgatgacttg	19270123-19270146
ch-ch_TEs_001	-6.33	P.capsici.genoma	-	9	tcgtgccgagcatgaacaagaacc	12489843-12489866
ch-ch_TEs_002	4.31	P.capsici.genoma	-	7	ttcgcaagcaagtcgatgacttg	41056287-41056310
ch-ch_TEs_003	-4.06	P.capsici.genoma	-	7	ttcgcaagcaagtcgatgacttg	58821409-58821432

ANEXO 29. Características de miRNAs *de novo* identificados de sRNAs asociados a elementos transponibles en A-br-ch

miR_ID_novo	score	chr	strand	expression(number of mature reads)	mature miR	mature_loci
br-ch_TEs_000	-3.85	P.capsici.genoma	+	7	aactgagttctgttgggcc	7191583-7191601
br-ch_TEs_001	-4.76	P.capsici.genoma	+	7	aactgagttctgttgggcc	10395745-10395763
br-ch_TEs_002	-2.46	P.capsici.genoma	+	11	tacacctgtagcactttgtag	12016751-12016772
br-ch_TEs_003	-3.37	P.capsici.genoma	+	18	ttctgttcagctcggcac	12489845-12489864
br-ch_TEs_004	-4.11	P.capsici.genoma	+	10	tcatgagattgacttggtcctg	14065144-14065166
br-ch_TEs_005	1.08	P.capsici.genoma	+	20	ttcgcaagcaagtcgatgacttg	19143295-19143318
br-ch_TEs_006	-4.8	P.capsici.genoma	+	7	aactgagttctgttgggcc	25900610-25900628
br-ch_TEs_007	-2.24	P.capsici.genoma	+	7	tatggactttgttgggcc	25903749-25903768
br-ch_TEs_008	-4.44	P.capsici.genoma	+	7	aactgagttctgttgggcc	27491758-27491776
br-ch_TEs_009	0.79	P.capsici.genoma	+	20	ttcgcaagcaagtcgatgacttg	27495376-27495399
br-ch_TEs_010	-0.31	P.capsici.genoma	+	10	tcatgagattgacttggtcctg	28676168-28676190
br-ch_TEs_011	1.4	P.capsici.genoma	+	20	ttcgcaagcaagtcgatgacttg	31101429-31101452
br-ch_TEs_012	-2.17	P.capsici.genoma	+	80	taaactggactgtcgttcgaga	61061326-61061349
br-ch_TEs_013	-2.17	P.capsici.genoma	+	80	taaactggactgtcgttcgaga	61067991-61068014
br-ch_TEs_014	-1.22	P.capsici.genoma	+	18	ttctgttcagctcggcac	63374916-63374935
br-ch_TEs_015	-5.49	P.capsici.genoma	-	7	tggtaccgaatgtcaatgtgcttg	6539685-6539708
br-ch_TEs_016	-2.39	P.capsici.genoma	-	25	ttgcaaccgcaactgggctgaca	10702915-10702938
br-ch_TEs_017	0.84	P.capsici.genoma	-	20	ttcgcaagcaagtcgatgacttg	14189410-14189433
br-ch_TEs_018	-5.84	P.capsici.genoma	-	7	tggtaccgaatgtcaatgtgcttg	18745859-18745882
br-ch_TEs_019	-2.84	P.capsici.genoma	-	10	tcatgagattgacttggtcctg	25061694-25061716
br-ch_TEs_020	1.44	P.capsici.genoma	-	20	ttcgcaagcaagtcgatgacttg	27776132-27776155
br-ch_TEs_021	-0.91	P.capsici.genoma	-	9	tcatgagattgacttggtcctg	27816201-27816223
br-ch_TEs_022	-2.25	P.capsici.genoma	-	7	ttggaccgtcaaggtcgtggcc	35748689-35748711
br-ch_TEs_023	-9.6	P.capsici.genoma	-	6	tactgcaagaagcctggccatg	36455298-36455319
br-ch_TEs_024	-5.84	P.capsici.genoma	-	7	tggtaccgaatgtcaatgtgcttg	36533618-36533641
br-ch_TEs_025	0.72	P.capsici.genoma	-	22	tcctgggccttgtgatcgtcatg	42697012-42697036
br-ch_TEs_026	-4.45	P.capsici.genoma	-	7	aactgagttctgttgggcc	51260228-51260246
br-ch_TEs_027	-0.12	P.capsici.genoma	-	8	tgcaaggcagcaggcgtagagc	58145857-58145879
br-ch_TEs_028	-2.17	P.capsici.genoma	-	80	taaactggactgtcgttcgaga	60609350-60609373
br-ch_TEs_029	0.97	P.capsici.genoma	-	20	ttcgcaagcaagtcgatgacttg	63522666-63522689
br-ch_TEs_030	-7.58	P.capsici.genoma	-	9	ttggaagtgagattgaaatggt	63636589-63636611
br-ch_TEs_031	-3.45	P.capsici.genoma	-	10	ttggctcataacctgaagaaggta	63709858-63709882

ANEXO 30. Visualización en IGV del potencial sitio de unión regulatorio de A-ch-ch_65 sobre el gen Transposasa Tam3(familia Ac) de *P. capsici* y nivel de expresión en A-ch-ch y A-br-ch.



ANEXO 31. Características de miRNAs *de novo* obtenidos de sRNAs asociados al genoma de *Capsicum annuum var. annuum* y miRNA obtenido del genoma de *P. capsici* en A-ch-ch

miR_ID_novo	score	chr	strand	expression(number of mature reads)	mature miR	mature_loci
chch_chile-Pcap_000	-6.34	P.capsici.genoma	+	6	ttgctgcagatgctgc	1032541-1032558
chch_chile-Pcap_001	-6.34	P.capsici.genoma	-	6	ttgctgcagatgctgc	17699265-17699282
chch_chile-Pcap_002	-6.34	P.capsici.genoma	-	6	ttgctgcagatgctgc	17700495-17700512
chch_chile-Pcap_003	-6.34	P.capsici.genoma	-	6	ttgctgcagatgctgc	17701725-17701742

ANEXO 32. Características de miRNAs *de novo* obtenidos de sRNAs asociados al genoma de *Capsicum annuum* var. *annuum* y miRNA obtenido del genoma de *P. capsici* en A-br-ch

miR_ID_novo	score	chr	strand	expression(number of mature reads)	mature miR	mature_loci
br-ch_chile-Pcap_000	0.85	P.capsici.genoma	+	17	tgtgagggttggcatg	62904075-62904092
br-ch_chile-Pcap_001	-5.85	P.capsici.genoma	-	11	cagtagtagtgcagtagta	19025649-19025668
br-ch_chile-Pcap_002	0.26	P.capsici.genoma	-	11	cagtagtagtgcagtagta	19025649-19025668

ANEXO 33. Características de miRNAs anotados en PmiREN 2.0 identificados en A-ch-ch asociados al genoma de *Capsicum* (memoria epigenética inducida por el hospedero)

miRNA ID	miRNA locus accession	Organism	Genomic location	Gen target	Descripcion gen target
Ppe-MIRN28 82b	PmiREN0179 35	Prunus persica	Ppe- Pp08 2116772 2116981 -	Prupe.2G17070 0.1	Proteína hipotética
				Prupe.6G021700 .1	Proteína hipotética
Vvi-MIRN33 54	PmiREN0206 70	Vitis vinifera	Vvi- chr4 2902835 2902923 -	VIT_200s2434g0 0005	disease resistance rpp13-like protein 2-like
				VIT_205s0102g0 0975	probable disease resistance protein rdl6 rf9-like

ANEXO 34. Características de miRNAs *de novo* obtenidos de sRNAs asociados al genoma de *Capsicum annuum* var. *annuum* en A-ch-ch

miR_ID_novo	score	chr	strand	expression(number of mature reads)	mature miR	mature_loci
ch-ch_gchile_000	-3.49	Annuum.v.2.1.20160825.CDS	-	14	tagccgtaggggaacctg	5218867-5218884
ch-ch_gchile_001	-1.02	Annuum.v.2.1.20160825.CDS	-	147	tagcgacgttgcttttgat	28273266-28273285
ch-ch_gchile_002	-1.02	Annuum.v.2.1.20160825.CDS	-	147	tagcgacgttgcttttgat	37564713-37564732
ch-ch_gchile_003	-1.02	Annuum.v.2.1.20160825.CDS	-	147	tagcgacgttgcttttgat	37566627-37566646
ch-ch_gchile_004	-1.02	Annuum.v.2.1.20160825.CDS	-	147	tagcgacgttgcttttgat	38629566-38629585
ch-ch_gchile_005	-1.02	Annuum.v.2.1.20160825.CDS	-	147	tagcgacgttgcttttgat	38631171-38631190

ANEXO 35. Características de posibles genes target de miRNAs *de novo* asociados al genoma de *Capsicum annuum* var. *annuum* en A-ch-ch

miRNA	Expresión	ID Target	Descripción	KOG/GO ID	ID transcritpo	Locus gen target	Programa de predicción target
ch-ch_gchile_000	14	CBOT65-G14	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	KOG0292	508267	PHYCAscaffold_33:43 1351-435265	TAPIR_FASTA
ch-ch_gchile_000	14	CBOT85-C22	Proteína hipotética	NA	504424	PHYCAscaffold_7:125 4329-1255913	TAPIR_HYBRID

ANEXO 36. Características de potenciales miRNAs anotados en PmiREN 2.0 identificados en A-br-ch asociados al genoma de *Brassica oleraceae* (herencia epigenética inducida por el hospedero)

miRNA ID	miRNA locus accession	Organism	Genomic location	Gen target	Descripcion gen target
Ghi-miRN1400	PmiREN008730	<i>Gossypium hirsutum</i>	NC_030082.1 Ghi-116726244 116726430	Gohir.D04G055700.1	No disponible
Tae-miR5054b	PmiREN026066	<i>Triticum aestivum</i>	Tae-chr5D 347348036 347348263 +	Multitarget	Traes_1AL_90BF0232D.1, Traes_4DL_11BA77209.1, Traes_6AS_7D9BD122A.2 Traes_1BS_09CBCE13A.1 Traes_2AL_210FE485C.1, Traes_2AL_B58C1991D.1, Traes_2AL_F56A10D11.1, Traes_2BL_309B78688.1, Traes_2BL_46E59998A1.1 Traes_2BL_476B6147F.1, Traes_3B_12357F8A8.1, Traes_3B_E653839AD1.1, Traes_4DS_D196094A6.1, Traes_5BL_775E720CC.4, Traes_5BL_CE73B6BFF.1 Traes_5BS_017F8702A.1, Traes_6AS_2CE67423B.1, Traes_6DS_78211FFA0.1, Traes_7DL_7C8896E04.2, TraesCS3B02G236900.1, TraesCS1A02G341400.1, TraesCS1B02G354100.1, TraesCS1B02G354100.2, TraesCS1B02G354100.3, TraesCS2B02G157900.1, TraesCS2D02G136600.1, TraesCS2D02G136600.2, TraesCS3D02G516900.1, TraesCS5B02G412700.1, TraesCS5D02G380100.1, TraesCS5D02G417700.1
Tae-miR5054a	PmiREN026065	<i>Triticum aestivum</i>	Tae-chr4D 116287241 116287468 -	Multitarget	Traes_4BL_FD31350CB.1, Traes_6AS_7D9BD122A.2 Traes_4DL_B3182F456.1, Traes_6DS_78211FFA0.1, Traes_2DL_527E6E688.1, Traes_3B_8FB469D8A.1, Traes_3B_C1D8E152A.1, Traes_4DL_AB1FA3DCF.1 Traes_4DS_40CA33DB1.1 Traes_5BL_245A319AD.1, Traes_5BL_69A0036EA.1, Traes_5BL_CE73B6BFF.1 Traes_5BL_FE9A859E4.1, Traes_5DL_500C66579.1, Traes_5DL_640A0E637.1, Traes_7DS_D4832745D.1, TraesCS3B02G236900.1, TraesCS1A02G341400.1, TraesCS1B02G354100.1,

						TraesCS1B02G354100.2, TraesCS1B02G354100.3, TraesCS2B02G157900.1, TraesCS2D02G136600.1, TraesCS2D02G136600.2, TraesCS3D02G516900.1, TraesCS5B02G412700.1, TraesCS5D02G380100.1, TraesCS5D02G417700.1
Aof-miR5054	PmiREN000994	<i>Asparagus officinalis</i>	NC_033798.1	Aof-124137254 124137372	No identificado	NA
Atr-miRN70	PmiREN000383	<i>Amborella trichopoda</i>	AmTr_v1.0_scaffold00013	Atr-6986813 6986813 6986982 +	No identificado	NA
Mtr-miRN1926	PmiREN011849	<i>Medicago truncatula</i>	Mtr-chr2	18229410 18229661 +	Multitarget	Medtr2g041480.1, Medtr8g039590.1
Osa-miR5809a	PmiREN014424	<i>Oryza sativa</i>	Osa-Chr3	7799785 7800025 +	Multitarget	LOC_Os03g05290.1, LOC_Os03g06230.1, LOC_Os03g08810.1, LOC_Os03g10050.1, LOC_Os03g14180.1, LOC_Os03g15110.1, LOC_Os03g20010.1, LOC_Os03g31510.1, LOC_Os03g52680.1, LOC_Os03g53710.1, LOC_Os03g55030.1, LOC_Os04g34600.1, LOC_Os04g39350.1, LOC_Os04g40100.1, LOC_Os04g47780.1, LOC_Os04g53540.3, LOC_Os04g54630.1, LOC_Os04g55040.1, LOC_Os04g56240.1, LOC_Os05g03740.1, LOC_Os05g03750.1, LOC_Os05g03760.1, LOC_Os05g07040.1, LOC_Os05g15520.1, LOC_Os05g26194.1, LOC_Os05g33280.1, LOC_Os05g33940.1, LOC_Os05g34830.1, LOC_Os05g35290.1, LOC_Os05g43060.1, LOC_Os05g45030.1, LOC_Os06g10160.1, LOC_Os06g14420.1, LOC_Os06g15620.1, LOC_Os06g15760.1, LOC_Os06g35410.1, LOC_Os06g38294.1, LOC_Os06g46740.1, LOC_Os06g47890.2, LOC_Os06g49660.1, LOC_Os07g01600.1, LOC_Os07g06590.1, LOC_Os07g09010.1, LOC_Os07g15020.1, LOC_Os07g37030.1, LOC_Os07g40450.1, LOC_Os07g44410.1,

LOC_Os07g49150.1,
LOC_Os08g02630.1,
LOC_Os08g03520.1,
LOC_Os08g04430.1,
LOC_Os08g13920.1,
LOC_Os08g16930.1,
LOC_Os08g20570.1,
LOC_Os08g27720.1,
LOC_Os08g34720.1,
LOC_Os08g35590.1,
LOC_Os09g17580.1,
LOC_Os09g34140.2,
LOC_Os10g27050.1,
LOC_Os10g40030.1,
LOC_Os11g06720.1,
LOC_Os11g33120.1,
LOC_Os11g39640.1,
LOC_Os11g42550.1,
LOC_Os12g12934.1,
LOC_Os12g41090.1,
LOC_Os12g41390.1,
LOC_Os12g43720.1,
LOC_Os07g46630.1,
LOC_Os02g10480.6,
LOC_Os03g25850.1,
LOC_Os04g22940.1,
LOC_Os08g40190.1,
LOC_Os10g32980.1,
LOC_Os01g24880.1,
LOC_Os01g67960.1,
LOC_Os02g07670.1,
LOC_Os02g39750.1,
LOC_Os04g03890.1,
LOC_Os04g09570.1,
LOC_Os04g35890.1,
LOC_Os04g43710.1,
LOC_Os04g46950.1,
LOC_Os05g06780.1,
LOC_Os05g25220.1,
LOC_Os06g22340.1,
LOC_Os07g39970.1,
LOC_Os07g49080.1,
LOC_Os08g05610.1,
LOC_Os09g30390.1,
LOC_Os10g23310.1,
LOC_Os10g23820.1,
LOC_Os10g36960.1,
LOC_Os10g37110.1,
LOC_Os11g05820.1,
LOC_Os11g09030.1,
LOC_Os11g09050.1

ANEXO 38. Identificadores utilizados para la reconstrucción filogenética de proteínas Dicer-like

ID Proteína	ID base de datos	Organismo
PcaDCL-α	511433	<i>Phytophthora capsici</i> LT1534
PcaDCL-β	18102	<i>Phytophthora capsici</i> LT1534
PinDCL-1	XP_002903577	<i>Phytophthora infestans</i> T30-4
PinDCL-2	KAF4042611.1	<i>Phytophthora infestans</i> T30-4
PsoDCL-1	318891	<i>Phytophthora sojae</i>
PsoDCL-2	331314	<i>Phytophthora sojae</i>
AtDCL-1	NP_171612.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtDCL-2	NP_001189798	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtDCL-3	AEE77844	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtDCL-4	P84634.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Drosha-hs	NP_037367.3	<i>Homo sapiens</i>
Dicer-hs	Q9UPY3.3	<i>Homo sapiens</i>
Drosha-dm	NP_477436.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
Dicer-dm	NP_524453.1	<i>Drosophila melanogaster</i>

ANEXO 39. Identificadores utilizados para la reconstrucción filogenética de proteínas exportina 5

ID Proteína	ID base de datos	Organismo
PcapExp5	KAG1707859.1	<i>Phytophthora capsici</i>
PcinExp5	20862	<i>Phytophthora cinammomi</i>
PcacExp5	KAF1782335.1	<i>Phytophthora cactorum</i>
PfraExp5	KAE9300335.1	<i>Phytophthora fraguarie</i>
PinfExp5	KAF4043683.1	<i>Phytophthora infestans</i>
PkerExp5	RLN06207.1	<i>Phytophthora kernoviae</i>
PmegExp5	OWZ21752.1	<i>Phytophthora megakarya</i>
PnicExp5	KUF78654.1	<i>Phytophthora nicotianae</i>
PpalExp5	POM75346.1	<i>Phytophthora palmivora</i> var. <i>p.</i>
PparExp5	ETL99906.1	<i>Phytophthora parasitica</i>
PrubExp5	KAE9290114.1	<i>Phytophthora rubi</i>
PsojExp5-1	EGZ04521.1	<i>Phytophthora sojae</i>
PsojExp5-2	EGZ07563.1	<i>Phytophthora sojae</i>

ANEXO 40. Identificadores utilizados para la reconstrucción filogenética de proteínas argonautas

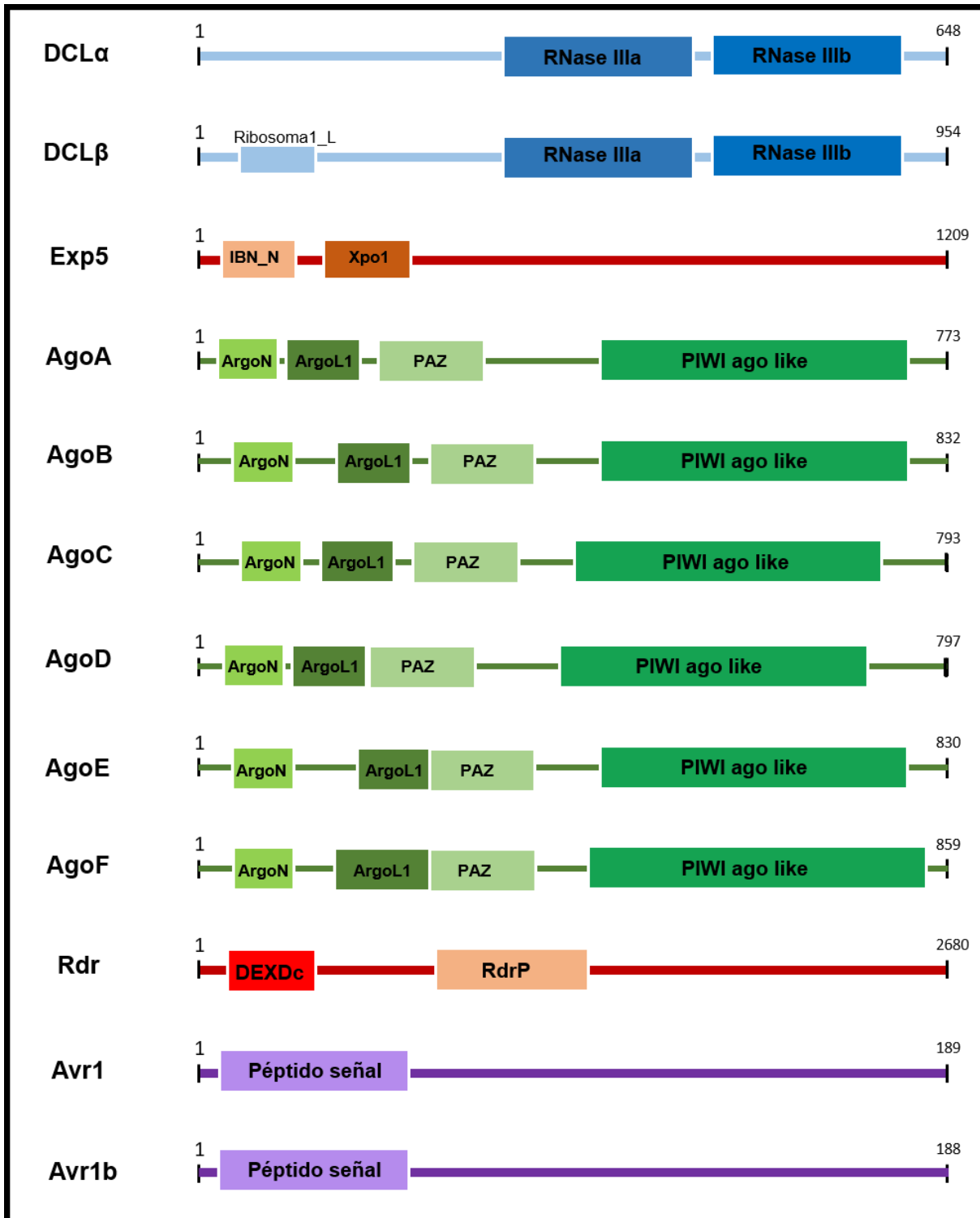
ID Proteína	ID base de datos	Organismo	ID Proteína	ID base de datos	Organismo
PcapAGO-A	558569	<i>Phytophthora capsici</i>	PfraAGO-D	KAE9323106.1	<i>Phytophthora fragariae</i>
PcapAGO-B	64465	<i>Phytophthora capsici</i>	PinfAGO-A	KAF4029815.1	<i>Phytophthora infestans</i>
PcapAGO-C	534306	<i>Phytophthora capsici</i>	PinfAGO-B	KAF4029816.1	<i>Phytophthora infestans</i>
PcapAGO-D	54500	<i>Phytophthora capsici</i>	PinfAGO-C	KAF4039717.1	<i>Phytophthora infestans</i>
PcapAGO-E	545808	<i>Phytophthora capsici</i>	PinfAGO-D	KAF4046262.1	<i>Phytophthora infestans</i>
PcapAGO-F	106132	<i>Phytophthora capsici</i>	PinfAGO-E	KAF4046263.1	<i>Phytophthora infestans</i>
PinfAGO-1	XP_002906080.1	<i>Phytophthora infestans T30-4</i>	PkerAGO-A	RLN14280.1	<i>Phytophthora kernoviae</i>
PinfAGO-2	XP_002906081.1	<i>Phytophthora infestans T30-4</i>	PkerAGO-B	RLN14281.1	<i>Phytophthora kernoviae</i>
PinfAGO-3	XP_002908068.1	<i>Phytophthora infestans T30-4</i>	PkerAGO-C	RLN26787.1	<i>Phytophthora kernoviae</i>
PinfAGO-4	XP_002908108.1	<i>Phytophthora infestans T30-4</i>	PkerAGO-C	RLN44601.1	<i>Phytophthora kernoviae</i>
PinfAGO-5	XP_002908109.1	<i>Phytophthora infestans T30-4</i>	PmegAGO-A	OWZ02375.1	<i>Phytophthora megakarya</i>
PsojAGO-1	AZS32315.1	<i>Phytophthora sojae</i>	PmegAGO-F	OWZ16857.1	<i>Phytophthora megakarya</i>
PsojAGO-2	AZS32317.1	<i>Phytophthora sojae</i>	PmegAGO-1	OWZ20388.1	<i>Phytophthora megakarya</i>
PsojAGO-3	KAG6614512.1	<i>Phytophthora sojae</i>	PmegAGO-2	OWZ10341.1	<i>Phytophthora megakarya</i>
PsojAGO-4	XP_009525986.1	<i>Phytophthora sojae</i>	PmegAGO-3	OWZ02930.1	<i>Phytophthora megakarya</i>
PsojAGO-5	KAG3165337.1	<i>Phytophthora sojae</i>	PmegAGO-4	OWZ16223.1	<i>Phytophthora megakarya</i>
PsojAGO-6	XP_009525989.1	<i>Phytophthora sojae</i>	PmegAGO-5	OWZ10186.1	<i>Phytophthora megakarya</i>
PcacAGO-A	KAF1772096.1	<i>Phytophthora cactorum</i>	PmegAGO-6	OWZ23573.1	<i>Phytophthora megakarya</i>
PcacAGO-B	KAF1776570.1	<i>Phytophthora cactorum</i>	PnicAGO-A	KUF79332.1	<i>Phytophthora nicotianae</i>
PcacAGO-C	KAF1777221.1	<i>Phytophthora cactorum</i>	PnicAGO-B	KUF81505.1	<i>Phytophthora nicotianae</i>
PcacAGO-D	KAF1778058.1	<i>Phytophthora cactorum</i>	PnicAGO-C	KUF81506.1	<i>Phytophthora nicotianae</i>
PcacAGO-E	KAF1783873.1	<i>Phytophthora cactorum</i>	PnicAGO-D	KUF81529.1	<i>Phytophthora nicotianae</i>

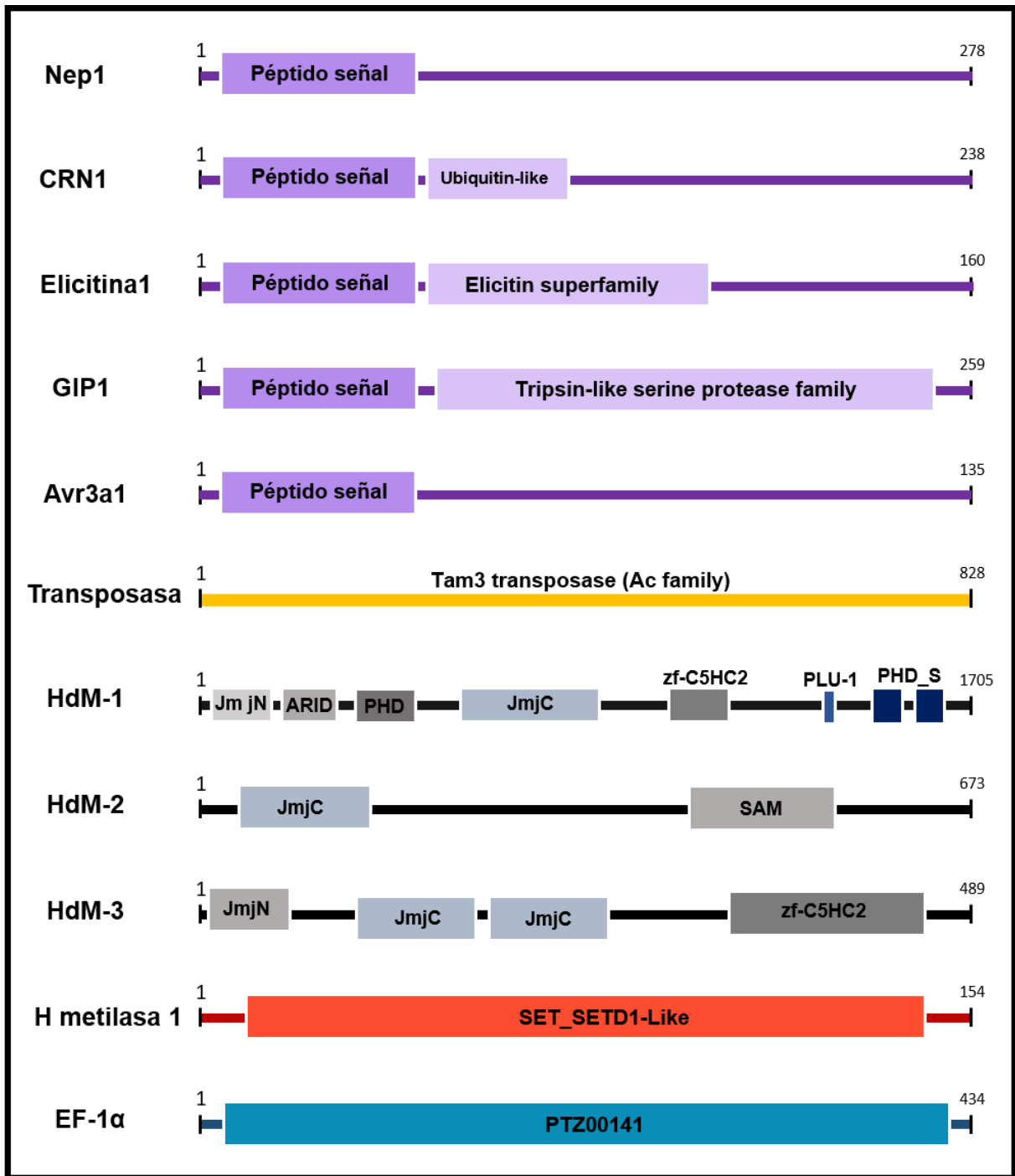
PcapAGO-A-1	KAG1701140.1	<i>Phytophthora capsici</i>	PnicAGO-E	KUG01884.1	<i>Phytophthora nicotianae</i>
PcapAGO-B-1	KAG1687203.1	<i>Phytophthora capsici</i>	PpalAGO-3	POM73309.1	<i>Phytophthora palmivora</i> var. <i>p.</i>
PcapAGO-C-1	KAG1689094.1	<i>Phytophthora capsici</i>	PpalAGO-1	POM66368.1	<i>Phytophthora palmivora</i> var. <i>p.</i>
PcapAGO-D-1	KAG1691464.1	<i>Phytophthora capsici</i>	PparAGO-A	ETL92480.1	<i>Phytophthora parasitica</i>
PcapAGO-E-1	KAG1701080.1	<i>Phytophthora capsici</i>	PparAGO-B	ETL92481.1	<i>Phytophthora parasitica</i>
PcapAGO-F-1	KAG1701140.1	<i>Phytophthora capsici</i>	PparAGO-C	ETL92503.1	<i>Phytophthora parasitica</i>
PcapAGO-G-1	KAG1701146.1	<i>Phytophthora capsici</i>	PparAGO-D	ETL92537.1	<i>Phytophthora parasitica</i>
PcapAGO-H-1	KAG1713552.1	<i>Phytophthora capsici</i>	PparAGO-E	ETM00734.1	<i>Phytophthora parasitica</i>
PcinAGO-A	32891	<i>Phytophthora cinammomi</i>	PrubAGO-A	KAE9330056.1	<i>Phytophthora rubi</i>
PcinAGO-B	114840	<i>Phytophthora cinammomi</i>	PrubAGO-C	KAE9354824.1	<i>Phytophthora rubi</i>
PcinAGO-C	232455	<i>Phytophthora cinammomi</i>	PrubAGO-1	KAE9031987.1	<i>Phytophthora rubi</i>
PcinAGO-D	251257	<i>Phytophthora cinammomi</i>	PrubAGO-2	KAE9044236.1	<i>Phytophthora rubi</i>
PcinAGO-E	251258	<i>Phytophthora cinammomi</i>	PrubAGO-3	KAE9044024.1	<i>Phytophthora rubi</i>
PcinAGO-F	295332	<i>Phytophthora cinammomi</i>	PrubAGO-12	KAE9354836.1	<i>Phytophthora rubi</i>
PcinAGO-G	326310	<i>Phytophthora cinammomi</i>	PsojAGO-A	EGZ07883.1	<i>Phytophthora sojae</i>
PfraAGO-A	KAE9295971.1	<i>Phytophthora fragariae</i>	PsojAGO-B	EGZ16927.1	<i>Phytophthora sojae</i>
PfraAGO-B	KAE9300693.1	<i>Phytophthora fragariae</i>	PsojAGO-C	EGZ16928.1	<i>Phytophthora sojae</i>
PfraAGO-C	KAE9303991.1	<i>Phytophthora fragariae</i>	PsojAGO-D	EGZ16931.1	<i>Phytophthora sojae</i>

ANEXO 41. Identificadores utilizados para la reconstrucción filogenética de proteínas RNA polimerasa dependiente de RNA

ID Proteína	ID base de datos	Organismo
PcapRdr	KAG1704547.1	<i>Phytophthora capsici</i>
PcacRdr	KAF1773732.1	<i>Phytophthora cactorum</i>
PcinRdr	92923	<i>Phytophthora cinammomi</i>
PfraRdr	KAE9319764.1	<i>Phytophthora fragariae</i>
PinfRdr	KAF4034320.1	<i>Phytophthora infestans</i>
PmegRdr	OWZ15303.1	<i>Phytophthora megakarya</i>
PnicRdr	KUF98780.1	<i>Phytophthora nicotianae</i>
PparRdr	ETL98829.1	<i>Phytophthora parasitica</i>
PrubRdr	KAE9346693.1	<i>Phytophthora rubi</i>
PsojRdr	EGZ19842.1	<i>Phytophthora sojae</i>

ANEXO 42. Estructura secundaria de genes analizados mediante RT-qPCR





ANEXO 43. Características de genes evaluados por RT-qPCR

Gen	ID Phyca11	ID KOG/IPR**	Descripción KOG/IR***	Tamaño (aminoácidos)	No. exones	Locus (Phyca11)	Hebra	Localización subcelular	ID GO*
DCL-α	511433	KOG0701	Procesamiento y modificación de ARN	684	1	PHYCAscaffold_85:46098-48577	+	Núcleo	GO:0005634
DCL-β	18102	IPR002677	Unión a ARN, ribonucleasa III	954	6	PHYCAscaffold_33:251889-255536	-	Mitocondria	GO: 0005739
Exp5	529988	KOG2020	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	1209	1	PHYCAscaffold_52:377206-380861	+	Núcleo	GO:0005634
AgoA	558569	IPR12337	Unión a ácido nucleico, Polinucleotidil transferasa, Ribonucleasa H	773	1	PHYCAscaffold_2:159343-161780	-	Citoplasma	GO:0005737
AgoB	64465	IPR12337	Unión a ácido nucleico, Polinucleotidil transferasa, Ribonucleasa H	832	1	PHYCAscaffold_19:453325-455820	+	Citoplasma	GO:0005737
AgoC	534306	IPR12337	Unión a ácido nucleico, Polinucleotidil transferasa, Ribonucleasa H	793	5	PHYCAscaffold_22:528439-531907	-	Citoplasma	GO:0005737
AgoD	54500	IPR12337	Unión a ácido nucleico, Polinucleotidil transferasa, Ribonucleasa H	797	1	PHYCAscaffold_22:528597-530987	-	Citoplasma	GO:0005737
AgoE	545808	IPR12337	Unión a ácido nucleico, Polinucleotidil transferasa, Ribonucleasa H	830	1	PHYCAscaffold_19:306374-310085	+	Citoplasma	GO:0005737
AgoF	106132	IPR12337	Unión a ácido nucleico, Polinucleotidil transferasa, Ribonucleasa H	859	1	PHYCAscaffold_12:883921-886497	+	Citoplasma	GO:0005737
Rdr	107928	KOG0988	Procesamiento y modificación de ARN	2680	1	PHYCAscaffold_14:483193-484770	+	Núcleo	GO:0005634
Avr1	129759	XXXX	Efector	189	1	PHYCAscaffold_87:112304-112870	+	Mitocondria	GO: 0005739
Avr1b	567591	XXXX	Efector	188	1	PHYCAscaffold_25:689103-689666	-	Citoplasma	GO:0005737
Nep1	109174	XXXX	Efector	278	1	PHYCAscaffold_16:1013548-1014381	+	Extracelular	GO:0005576
CRN1	573801	XXXX	Efector	238	1	PHYCAscaffold_55:398188-398914	-	Citoplasma	GO:0005737
Elicitina	11949	KOG1216	Mecanismos de defensa	160	1	PHYCAscaffold_87:148138-148617	-	Extracelular	GO:0005576
GIP1	126183	KOG3627	Peptidasa	259	1	PHYCAscaffold_61:135922-136698	-	Extracelular	GO:0005576
Avr3a1	114012	XXXX	Efector	135	1	PHYCAscaffold_25:524589-524993	-	Citoplasma	GO:0005737
Transposasa Tam3	133604	KOG1121	Replicación, recombinación y reparación	828	4	PHYCAscaffold_585:286-2814	-	Extracelular	GO:0005576
HdM-1	6021	KOG1246	Unión a ADN con dominio jumonji/RBP2/SMCY/ JmjC	1705	2	PHYCAscaffold_9:454619-459895	-	Núcleo	GO:0005634

HdM-2	509113	KOG2130	Estructura y dinámica de cromatina, contiene el dominio JmjC	673	3	PHYCAscaffold_42:107391-109735	-	Núcleo	GO:0005634
HdM-3	572401	KOG1246	Unión a ADN con dominio jumonji/RBP2/SMCY/ JmjC	489	5	PHYCAscaffold_48:130307-132054	+	Núcleo	GO:0005634
Hmetilasa-1	118496	KOG1080	Histona H3 (Lys4) complejo de metiltransferasa, subunidad SET1 y metiltransferasas relacionadas	154	1	PHYCAscaffold_36:322242-322703	-	Núcleo	GO:0005634
EF-1α	111787	IPR004539	Factor de elongación de traducción EF1A	434	2	PHYCAscaffold_70:109184-110808	+	Citoplasma	GO: 0005737

*ID de bases de datos de Gene Ontology GO.

**ID de bases de datos de KOG y InterPRO.

*** Descripción del gen en base a los criterios de las bases de datos de KOG e InterPRO

Locus: De acuerdo a la base de datos del genoma de *P. capsici* LT1534 v11 del JGI

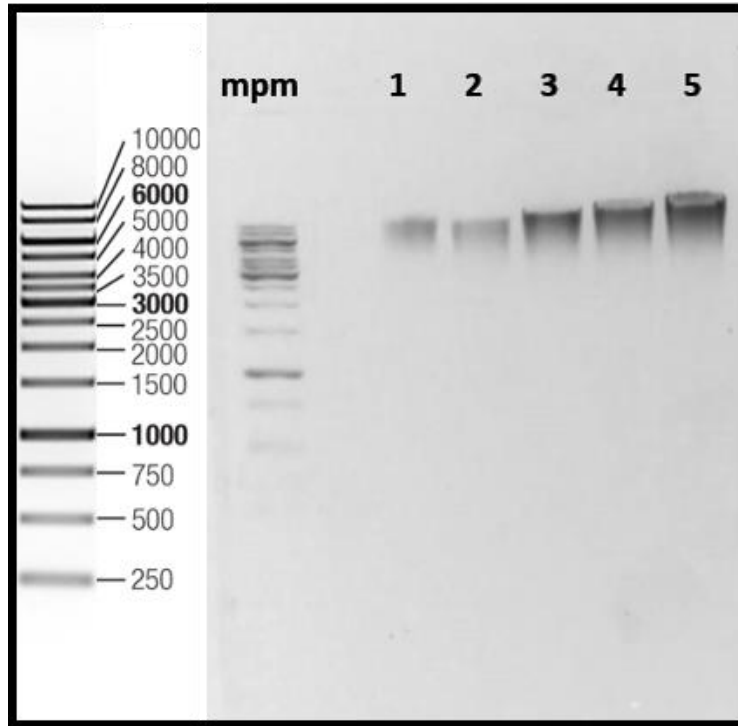
Localización subcelular: Identificada a partir del software Predict protein LocTree3v4.0

ANEXO 44. Características de oligos utilizados para RT-qPCR

Gen	Nombre del oligo	Secuencia	Sitio de amplificación	Tamaño de amplicón esperado	Tamaño oligo (nt)	% GC	Tm teórica	Tm (°C) Experimental
DCL-α	PcapDCL1 F	GAAGCCGCTACTTGAACCCT	RNAseII-Nter	145 pb	20	55	57.3	54
	PcapDCL1 R	GACCGTGCGATCAGAAATGC			20	55	56.8	
Exp5_2	PcaExp5_2-F	GCAGTCTTTACACGAGCGTT	Región intermedia	180 pb	20	50	55.5	59
	PcaExp5_2-R	GGGTTTTGCATTGCATTTCGG			20	50	55.7	
DCL-β	PcapDCL2.1-F	CCGAGTGGGCTACGCTATTG	Región variable entre dominios	211 pb	20	60	57.9	59
	PcapDCL2.1-R	GCCATCTTCCGTCAGTCGTG			20	60	58.2	
AGO-A	PcapAGO-A F	GAGCGAGGGACAGTTTCACA	Domino PIWI	212 pb	20	55	57.2	59
	PcapAGO-A R	GGTGGCAGATACCCGTTTCA			20	55	57.4	
AGO-B	PcapAGO-B F	TTGCGGAAGATCGAGGTTGT	Domino PAZ	180 pb	20	50	56.7	68
	PcapAGO-B R	CACCAACGGTAGATGTGGGT			20	55	57.1	
AGO-C	PcapAGO-C F	GAGGTGGTGAAGGTTACGGG	N-terminal	161 pb	20	60	57.6	x
	PcapAGO-C R	CGAGAGCCTCGATGTTGTGA			20	55	56.9	
AGO-D	PcapAGO-D F	CTTCGGAGGCTTTGCGAATG	N-terminal	133 pb	20	55	56.8	54
	PcapAGO-D R	TACAGCGCAGACATCCCATC			20	55	57.1	
AGO-E	PcapAGO-E F	CGTGTATTACGCGCACTTGG	Dominio PIWI	265 pb	20	55	56.6	68
	PcapAGO-E R	GCTTCACTGGTCGGGTAACA			20	55	57.2	
AGO-F	PcapAGO-F F	TGATGATCGATGGCAGACCG	Dominio PIWI	195 pb	20	55	57.1	68
	PcapAGO-F R	CCAACACCGTGTCAGACGTA			20	55	57	
Rdr	PcapRdr-F	GCGTTTTGGTGGTGTCTGAA	dominio Rdr	158 pb	20	50	56.1	59
	PcapRdr-R	GAGCACACTTTGGCGTGTA			20	50	55.9	
Elicitina	PcapEli11949-F	CGGACCAGGCTACCATTGAC	Región variable C-Ter	125 pb	20	60	57.9	59
	PcapEli11949-R	GGCACGGAGGTTGATCTTGT			20	55	57.6	
GIP-1	GIP1-F	GAAGGTTATCTCCACTCTCGC	Región péptido señal	210 pb	21	52.4	54.8	59
	GIP1-R	CAGGCCGCACTAGTAAGTAC			20	55	55	
Avr1	PcapAvr1-F	CGACGAGAGGGGAGGATTTTC	Región variable C-Ter	170 pb	20	60	57.1	59
	PcapAvr1-R	AGTATTTGGGGCCTTACC			20	55	57.4	
Avr1b	PcAvr1b-F	GTGGATTCTCCAATGCTGCG	N-terminal	183 pb	20	55	56.6	59

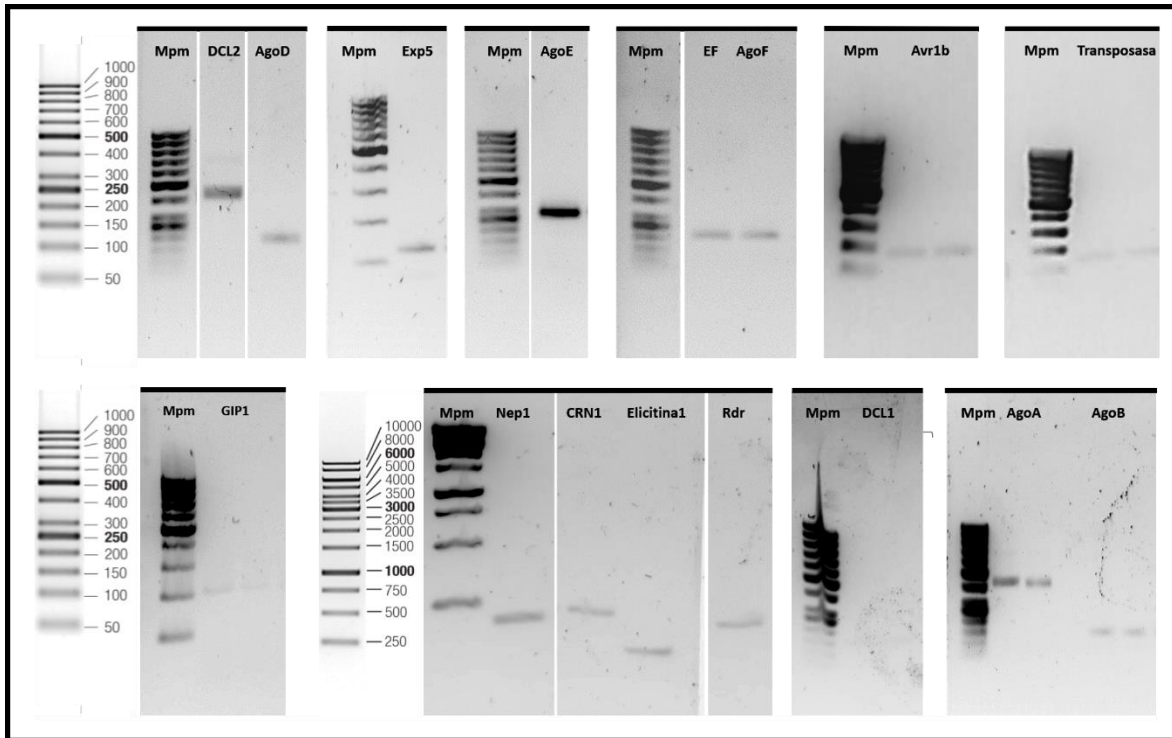
	PcAvr1b-R	GTCCCAGTTTGGCTAGAACG			20	55	55.7	
Avr3a1	PcapAvr3a-F	CATCATGGCAGACCCAAGCA	Región conservada	151 pb	20	55	58	59
	PcapAvr3a-R	ATAATCCAGGTGGATCGCGT			20	50	56.2	
Nep1	PcapNep1-F	GCCCAAAGTGTCTTGGTGC	Región variable N-Ter	205 pb	20	55	57.3	59
	PcapNep1-R	TACATCCGTCGGTGCCTTTT			20	50	56.7	
CRN1	PcapCRN1-F	AGACAGATCGCATCACGAGG	Región variable C-Ter	202 pb	20	55	56.7	59
	PcapCRN1-R	CGACTCTTCCCTATTCCGGG			20	60	56.9	
Transposasa	PcTransp-F	CAATTTTGAAGCCGTTGAAGC	N-terminal	154 pb	21	42.9	53.4	59
	PcTransp-R	TCCAGATACTGGGTCATAGCG			21	52.4	55.9	
HdM-1	PcHdM-1 6021-F	AGAGGAACTACTGGAGCGGT	JmjC	231 pb	20	55	57.5	59
	PcHdM-1 6021-R	CAAGGGATG/ACCGTACCAAGT			20	55	57.4	
HdM-2	PcHdM-1 509113-F	ACGTGGTGATGTCTAGCGTG	Dom. SAM	229 pb	20	55	57.1	59
	PcHdM-1 509113-R	ATGCGAGTATGGGCAGTAGC			20	55	57.2	
HdM-3	PcJmjC2-572401-F	ACATCATCTGACGTTCCCG	JmjC C-Ter	181 pb	20	55	57	59
	PcJmjC2-572401-R	CCGAAGTGAAACACGAAGCG			20	55	56.8	
Hmetilasa-1	PcSETD1-118496-F	CCGAGTGGACGAGAAAACGA	SETD1_like	114 pb	20	55	57	59
	PcSETD1-118496-R	CCTCCTCGACAGCCACAAT			20	55	57.4	
ch-ch miR65	RTmiR65-R	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATC GAGGAAGAAGACGGAAGAATGT GCGTCTCGCCTTCTTTCACCGAC CG	miR65	90 pb	69	X	X	42
	qPCRmiR65-F	TAGCGAGATTTAGTCGATGGC			21	47.6	54.3	59
Loop102-R-RT	RT-miR-102-R	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATC GAGGAAGAAGACGGAAGAATGT GCGTCTCGCCTTCTTTCGAAGAC AG	miR102	90 pb	69	x	x	42
	qPCR-miR-102-F	GCTTTATCTGCTGGCTGTC			19	52.6	53.7	59
Universal	qPCR-univ-R	CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT	X	X	21	47.6	54.2	59
EF-1a	PcEF-1a-F	CTAAGGGCACCCAGGACTTC	PTZ00141	193 pb	20	60	57	59
	PcEF-1a-F	TCACCCGACTTCACGAACTT			20	50	56.3	

ANEXO 45. Gel de extracción DNA genómico de *P. capsici*



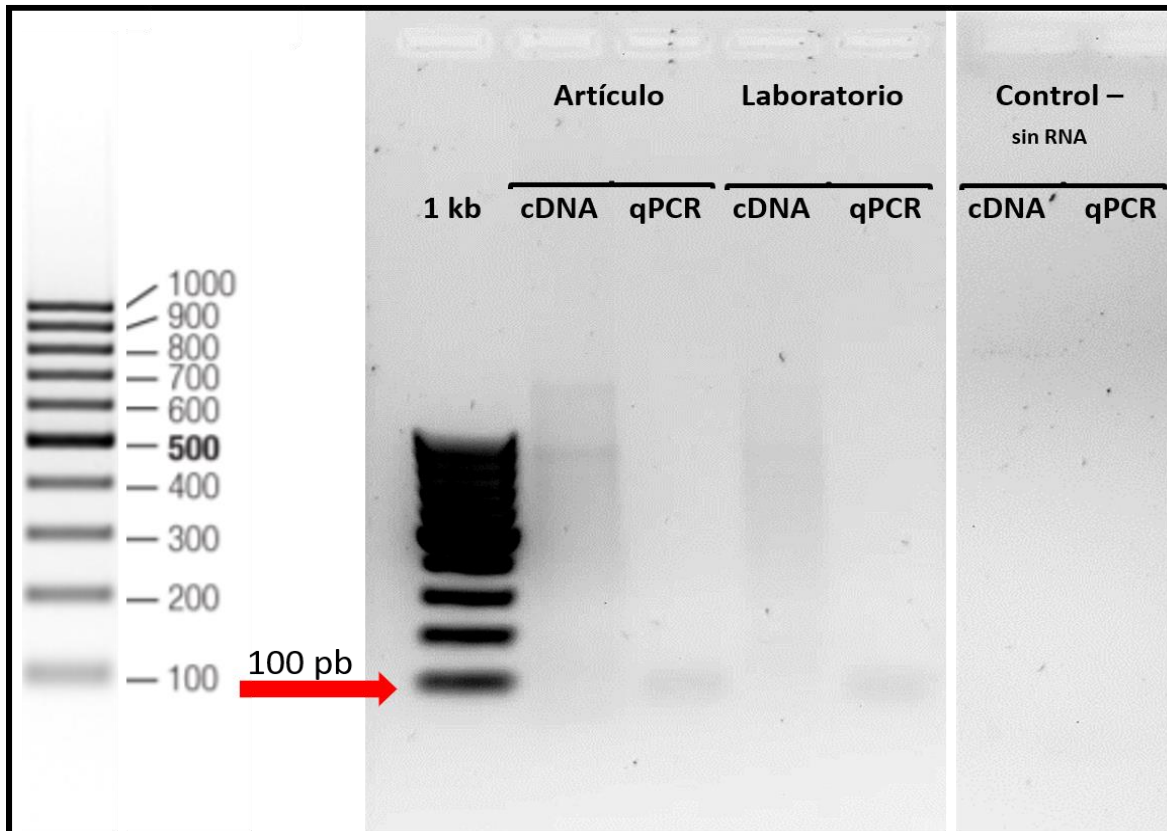
Gel de agarosa al 1%, mpm: marcador de peso molecular , carril 1-5: muestra DNA genómico de micelio de *P. capsici* D3

ANEXO 46. Tamaño de amplificación esperado de oligos con PCR punto final



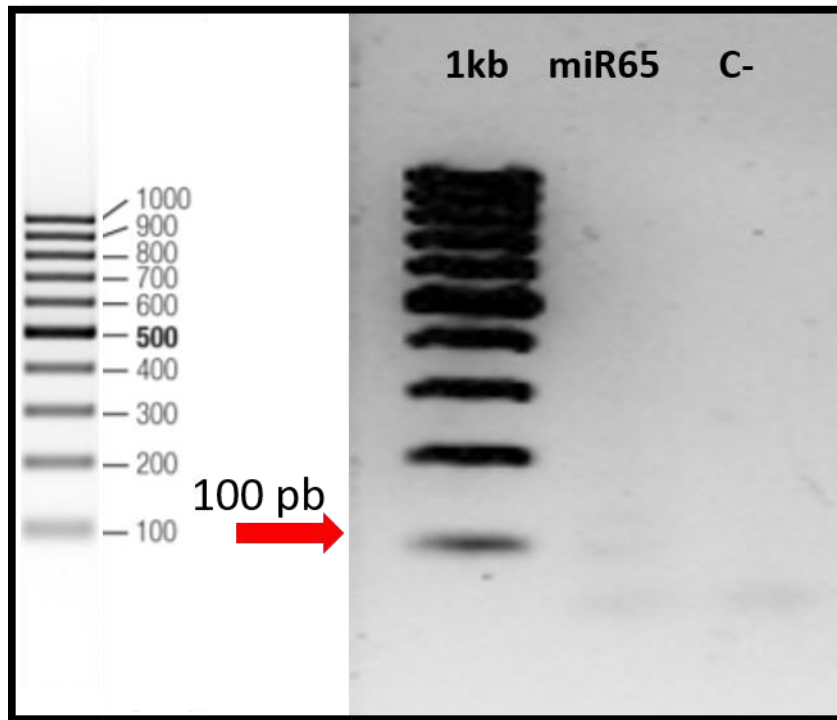
Electroforesis PCR punto final de genes DCL1, DCL2, exportina 5A (Exp5), RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR), AgoA, AgoB, AgoD, AgoE, AgoF, Avr1b, GIP1, Nep1, CRN1, elicatina1, Transposasa Tam3 y factor de elongación 1 α (EF) en gel de agarosa al 1.5%, Mpm: marcador de peso molecular.

ANEXO 47. Gel de amplificación A-ch-ch_102



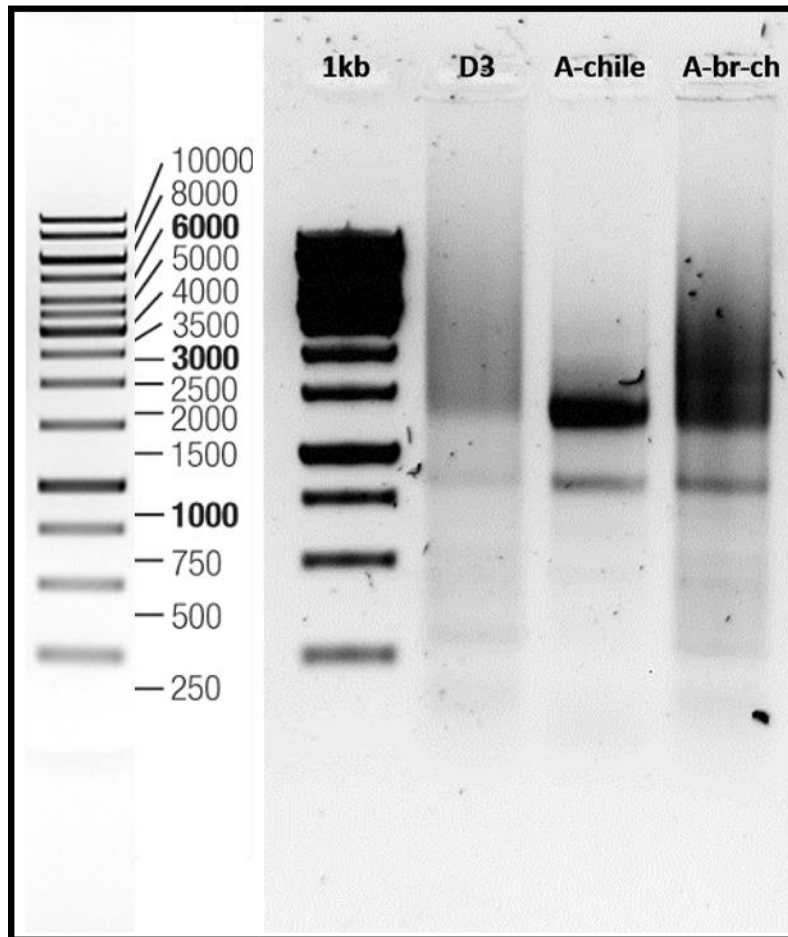
Electroforesis en gel de agarosa al 2% qPCR de A-ch-ch_102 con cDNA de D3. Se probaron dos metodologías para realizar qPCR del miRNA a partir del artículo de (L. H. Yang et al., 2014) y metodología desarrollada en el laboratorio, carril cDNA: muestra de cDNA sin retrotranscriptasa, carril qPCR: reacción de qPCR del miRNA, Control -: sin templado de cDNA y sin retrotranscriptasa. 1Kb: marcador de peso molecular.

ANEXO 48. Gel de amplificación de A-ch-ch_65



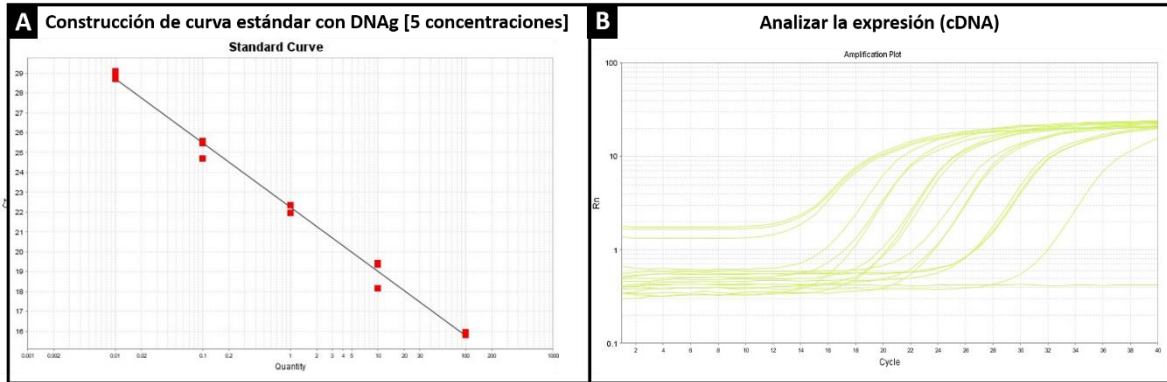
Electroforesis en gel de agarosa al 2% qPCR de A-ch-ch_65 con cDNA de D3. 1Kb: marcador de peso molecular. miR65: qPCR de A-ch-ch_65, C-: control negativo sin retrotranscriptasa.

ANEXO 49. Gel de extracción de RNA total de *P. capsici*



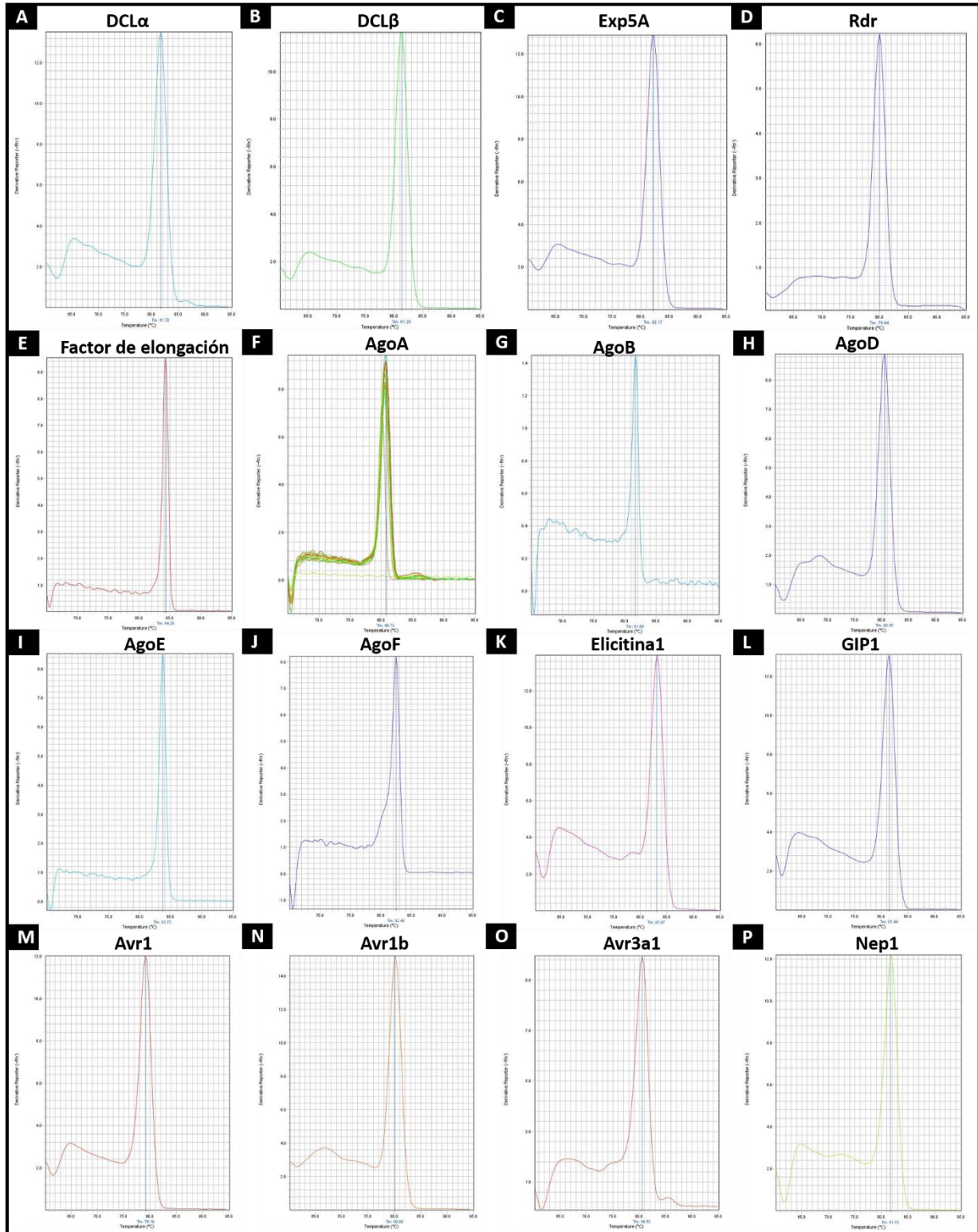
Electroforesis en gel de agarosa al 1%, extracción RNA total de D3, A-chile y A-br-ch de *P. capsici*, 1kb: marcador de peso molecular.

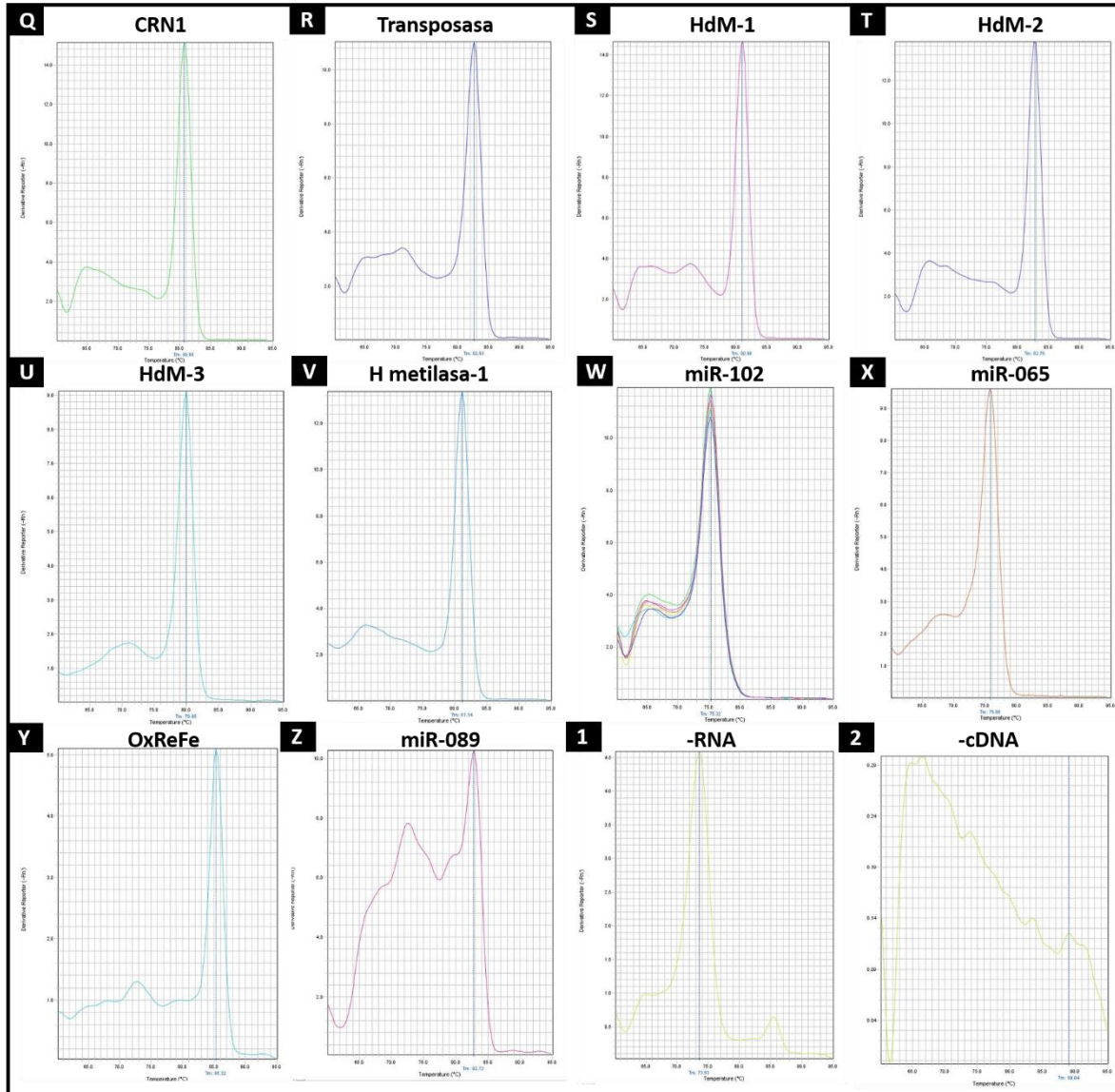
ANEXO 50. Estandarización y validación de amplificación de oligos para RT-qPCR



A: Curva estándar con DNA genómico de *P. capsici* a 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 ng/ μ L, $R^2=0.98$ de gen endógeno. **B:** Curva de amplificación de gen endógeno con cDNA.

ANEXO 51. Curva melt de amplificación de genes analizados por RT-qPCR





Curva melt de amplificación de genes analizados por RT-qPCR. **A:** DCL α , **B:** DCL β , **C:** Exportina 5A (EXp5A), **D:** RNA polimerasa dependiente de RNA (Rdr), **E:** Factor de elongación 1 α (EF-1 α), **F:** Argonata A (AgoA), **G:** Argonata B (AgoB), **H:** Argonata D (AgoD), **I:** Argonata E (AgoE), **J:** Argonata F (AgoF), **K:** Elicitina1, **L:** GIP1, **M:** Avr1, **N:** Avr1b, **O:** Avr3a1, **P:** Nep1, **Q:** CRN1, **R:** Transposasa Tam3, **S:** Histona desmetilasa 1 (HdM-1), **T:** Histona desmetilasa 2 (HdM-2), **U:** Histona desmetilasa 3 (HdM-3), **V:** Histona metilasa 1 (H metilasa-1), **W:** miR102, **X:** miR065, **Y:** Enzima oxide reductasa de fierro (OxReFe), **Z:** miR-089, **1:** -RNA (Control negativo de RT-PCR sin agregar RNA), **2:** -cDNA (Control negativo de qPCR sin RNA).

ANEXO 52. Valores de Ct obtenidos de genes y miRNAs

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (DCL α)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct
C7P8 RB-1	16.24	16.58	16.64	16.49	C7P8 RB-1	25.24	24.88	24.96	25.03	8.54	-0.13	1.09
C7P8 RB-2	16.31	16.22	16.46	16.33	C7P8 RB-2	24.81	25.17	25.41	25.13	8.80	0.13	0.91
Chile RB-1	13.95	14.06	14.31	14.11	Chile RB-1	23.84	23.93	23.68	23.82	9.71	1.04	0.49
Chile RB-2	14.30	13.90	14.06	14.09	Chile RB-2	23.40	23.60	23.30	23.43	9.35	0.68	0.63
Brócoli RB-1	17.54	17.03	17.13	17.23	Brócoli RB-1	26.86	26.90	26.92	26.89	9.66	0.99	0.50
Brócoli RB-2	16.99	16.87	17.26	17.04	Brócoli RB-2	26.93	26.93	26.88	26.91	9.87	1.20	0.43
ch-ch RB-1	16.28	16.07	16.18	16.18	ch-ch RB-1	27.14	27.03	27.22	27.13	10.95	2.28	0.21
ch-ch RB-2	16.02	16.28	16.03	16.11	ch-ch RB-2	27.19	27.47	27.16	27.27	11.16	2.49	0.18
br-ch RB-1	15.16	15.16	15.02	15.11	br-ch RB-1	24.70	24.76	24.94	24.80	9.69	1.02	0.49
br-ch RB-2	14.96	14.87	15.32	15.05	br-ch RB-2	24.63	24.66	24.84	24.71	9.66	0.99	0.50

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (DCL β)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct
C7P8 RB-1	17.89	17.91	17.95	17.92	C7P8 RB-1	25.68	25.71	25.72	25.70	7.79	-0.11	1.08
C7P8 RB-2	16.24	16.58	16.64	16.49	C7P8 RB-2	24.37	24.51	24.60	24.49	8.01	0.11	0.93
Chile RB-1	17.62	17.45	17.9	17.66	Chile RB-1	28.65	28.72	28.61	28.66	11.00	3.11	0.12
Chile RB-2	16.84	16.64	16.79	16.76	Chile RB-2	26.46	26.30	26.17	26.31	9.55	1.66	0.32
Brócoli RB-1	17.10	16.94	16.91	16.98	Brócoli RB-1	27.23	27.21	27.14	27.19	10.21	2.31	0.20
Brócoli RB-2	17.00	17.13	16.95	17.03	Brócoli RB-2	27.25	27.61	27.02	27.29	10.27	2.37	0.19
ch-ch RB-1	16.28	16.07	16.18	16.18	ch-ch RB-1	28.93	29.13	28.96	29.01	12.83	4.93	0.03
ch-ch RB-2	16.02	16.28	16.03	16.11	ch-ch RB-2	28.14	28.60	28.13	28.29	12.18	4.28	0.05
br-ch RB-1	16.76	16.64	16.61	16.67	br-ch RB-1	26.53	26.48	26.35	26.45	9.78	1.89	0.27
br-ch RB-2	15.38	15.53	15.23	15.38	br-ch RB-2	25.54	25.53	25.55	25.54	10.16	2.26	0.21

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (Exp5)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct
C7P8 RB-1	14.92	14.95	14.87	14.91	C7P8 RB-1	24.98	24.97	25.03	24.99	10.08	0.09	0.94
C7P8 RB-2	14.89	14.95	14.90	14.91	C7P8 RB-2	24.75	24.96	24.71	24.81	9.89	-0.09	1.07
Chile RB-1	17.80	17.85	17.98	17.88	Chile RB-1	29.11	29.47	29.20	29.26	11.38	1.40	0.38
Chile RB-2	17.85	17.63	17.93	17.80	Chile RB-2	28.90	29.21	29.10	29.07	11.27	1.28	0.41
Brócoli RB-1	16.22	16.43	16.85	16.50	Brócoli RB-1	27.49	27.28	27.12	27.30	10.80	0.81	0.57
Brócoli RB-2	17.24	16.04	16.91	16.73	Brócoli RB-2	27.25	27.34	27.07	27.22	10.49	0.50	0.71
ch-ch RB-1	15.55	15.92	15.42	15.63	ch-ch RB-1	26.74	26.89	26.57	26.73	11.10	1.12	0.46
ch-ch RB-2	15.65	15.35	15.45	15.48	ch-ch RB-2	26.98	26.42	26.94	26.78	11.30	1.31	0.40
br-ch RB-1	14.30	14.19	14.27	14.25	br-ch RB-1	24.61	24.92	24.51	24.68	10.43	0.44	0.74
br-ch RB-2	14.38	14.34	14.31	14.34	br-ch RB-2	24.85	24.88	24.90	24.88	10.53	0.55	0.68

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (AgoA)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct

C7P8 RB-1	16.48	16.54	16.26	16.43	C7P8 RB-1	21.27	21.35	21.35	21.32	4.90	-0.22	1.16
C7P8 RB-2	15.37	15.32	15.25	15.31	C7P8 RB-2	20.67	20.65	20.61	20.64	5.33	0.22	0.86
Chile RB-1	14.25	14.27	14.20	14.24	Chile RB-1	18.62	18.50	18.31	18.48	4.24	-0.88	1.84
Chile RB-2	19.06	18.97	19.04	19.02	Chile RB-2	22.85	22.97	22.88	22.90	3.88	-1.24	2.36
Brócoli RB-1	16.22	16.43	16.04	16.23	Brócoli RB-1	22.63	22.96	22.65	22.75	6.52	1.40	0.38
Brócoli RB-2	17.24	16.85	16.91	17.00	Brócoli RB-2	22.80	22.48	22.59	22.62	5.62	0.51	0.70
ch-ch RB-1	16.79	16.71	16.49	16.66	ch-ch RB-1	21.88	21.69	21.83	21.80	5.14	0.02	0.98
ch-ch RB-2	16.91	16.94	17.21	17.02	ch-ch RB-2	23.01	22.99	22.94	22.98	5.96	0.85	0.56
br-ch RB-1	15.34	15.21	15.28	15.28	br-ch RB-1	20.19	19.92	19.72	19.94	4.67	-0.45	1.36
br-ch RB-2	15.29	15.18	15.06	15.18	br-ch RB-2	20.03	20.11	20.03	20.06	4.88	-0.23	1.18

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (AgoB)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^Δ -ΔΔCt
C7P8 RB-1	16.24	16.58	16.64	16.49	C7P8 RB-1	34.84	36.50	35.79	35.71	19.22	-0.11	1.08
C7P8 RB-2	16.31	16.22	16.46	16.33	C7P8 RB-2	35.95	35.22	36.15	35.77	19.44	0.11	0.93
Chile RB-1	13.95	14.06	14.31	14.11	Chile RB-1	35.35	35.69	35.58	35.54	21.43	2.10	0.23
Chile RB-2	14.30	13.90	14.06	14.09	Chile RB-2	35.66	35.54	35.78	35.66	21.57	2.24	0.21
Brócoli RB-1	17.54	17.03	17.13	17.23	Brócoli RB-1	NE	NE	NE	NE	NR	NE	0.00
Brócoli RB-2	16.99	16.87	17.26	17.04	Brócoli RB-2	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.00
ch-ch RB-1	16.28	16.07	16.18	16.18	ch-ch RB-1	33.65	33.41	33.06	33.37	17.20	-2.14	4.40
ch-ch RB-2	16.02	16.28	16.03	16.11	ch-ch RB-2	32.95	33.16	33.53	33.21	17.10	-2.23	4.69
br-ch RB-1	15.38	15.53	15.23	15.38	br-ch RB-1	29.83	29.28	29.84	29.65	14.27	-5.06	33.44
br-ch RB-2	14.96	14.87	15.32	15.05	br-ch RB-2	29.35	29.67	29.32	29.45	14.40	-4.94	30.63

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (AgoD)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^Δ -ΔΔCt
C7P8 RB-1	16.24	16.58	16.64	16.49	C7P8 RB-1	24.80	24.86	24.81	24.82	8.34	-0.11	1.08
C7P8 RB-2	16.31	16.22	16.46	16.33	C7P8 RB-2	24.85	24.91	24.90	24.89	8.56	0.11	0.93
Chile RB-1	13.95	14.06	14.31	14.11	Chile RB-1	26.87	26.97	26.92	26.92	12.81	4.37	0.05
Chile RB-2	14.30	13.90	14.06	14.09	Chile RB-2	26.65	26.72	26.89	26.75	12.67	4.22	0.05
Brócoli RB-1	17.26	17.03	17.13	17.14	Brócoli RB-1	23.80	23.75	23.87	23.81	6.67	-1.78	3.43
Brócoli RB-2	16.99	16.87	17.54	17.13	Brócoli RB-2	23.75	23.74	23.69	23.73	6.59	-1.85	3.61
ch-ch RB-1	16.28	16.07	16.18	16.18	ch-ch RB-1	28.19	27.83	27.76	27.93	11.75	3.30	0.10
ch-ch RB-2	16.02	16.28	16.03	16.11	ch-ch RB-2	27.93	28.20	27.94	28.02	11.91	3.47	0.09
br-ch RB-1	15.16	15.16	15.02	15.11	br-ch RB-1	26.26	26.03	26.03	26.11	10.99	2.55	0.17
br-ch RB-2	14.96	14.87	15.32	15.05	br-ch RB-2	25.82	25.94	25.67	25.81	10.76	2.31	0.20

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (AgoE)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^Δ -ΔΔCt
C7P8 RB-1	16.24	16.58	16.64	16.49	C7P8 RB-1	27.91	27.80	27.72	27.81	11.32	0.13	0.91
C7P8 RB-2	16.31	16.22	16.46	16.33	C7P8 RB-2	27.61	27.42	27.13	27.39	11.06	-0.13	1.10
Chile RB-1	13.95	14.06	14.31	14.11	Chile RB-1	30.52	30.35	30.70	30.52	16.42	5.23	0.03
Chile RB-2	14.30	13.90	14.06	14.09	Chile RB-2	30.70	30.31	31.33	30.78	16.69	5.50	0.02

Brócoli RB-1	17.54	17.03	17.13	17.23	Brócoli RB-1	35.25	34.96	35.27	35.16	17.93	6.74	0.01
Brócoli RB-2	16.99	16.87	17.26	17.04	Brócoli RB-2	35.74	35.93	35.98	35.88	18.84	7.65	0.00
ch-ch RB-1	16.28	16.07	16.18	16.18	ch-ch RB-1	30.97	30.75	30.76	30.83	14.65	3.46	0.09
ch-ch RB-2	16.02	16.28	16.03	16.11	ch-ch RB-2	30.85	30.88	30.76	30.83	14.72	3.53	0.09
br-ch RB-1	15.38	15.53	15.23	15.38	br-ch RB-1	27.02	27.17	26.91	27.03	11.65	0.46	0.73
br-ch RB-2	14.96	14.87	15.32	15.05	br-ch RB-2	26.84	26.79	26.76	26.80	11.75	0.56	0.68

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (AgoF)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^Δ -ΔΔCt
C7P8 RB-1	16.24	16.58	16.64	16.49	C7P8 RB-1	26.29	26.70	26.64	26.54	10.06	0.10	0.94
C7P8 RB-2	16.31	16.22	16.46	16.33	C7P8 RB-2	26.50	25.86	26.22	26.19	9.86	-0.10	1.07
Chile RB-1	13.95	14.06	14.31	14.11	Chile RB-1	26.31	26.33	26.79	26.48	12.37	2.41	0.19
Chile RB-2	14.30	13.90	14.06	14.09	Chile RB-2	26.04	26.21	26.40	26.22	12.13	2.17	0.22
Brócoli RB-1	17.54	17.03	17.13	17.23	Brócoli RB-1	28.40	28.43	28.24	28.36	11.12	1.16	0.45
Brócoli RB-2	16.99	16.87	17.26	17.04	Brócoli RB-2	28.24	28.27	28.81	28.44	11.40	1.44	0.37
ch-ch RB-1	16.28	16.07	16.18	16.18	ch-ch RB-1	28.64	28.95	28.75	28.78	12.60	2.64	0.16
ch-ch RB-2	16.02	16.28	16.03	16.11	ch-ch RB-2	28.63	29.14	28.80	28.86	12.75	2.79	0.14
br-ch RB-1	15.38	15.53	15.23	15.38	br-ch RB-1	27.06	27.19	27.20	27.15	11.77	1.81	0.29
br-ch RB-2	14.96	14.87	15.32	15.05	br-ch RB-2	27.27	26.84	26.88	27.00	11.95	1.99	0.25

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (Rdr)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^Δ -ΔΔCt
C7P8 RB-1	14.92	14.95	14.87	14.91	C7P8 RB-1	28.55	28.08	28.01	28.21	13.30	0.07	0.95
C7P8 RB-2	14.89	14.95	14.90	14.91	C7P8 RB-2	28.28	28.00	27.96	28.08	13.17	-0.07	1.05
Chile RB-1	17.80	17.85	17.98	17.88	Chile RB-1	31.89	31.18	30.38	31.15	13.27	0.04	0.97
Chile RB-2	17.85	17.63	17.93	17.80	Chile RB-2	31.40	31.66	30.95	31.34	13.53	0.30	0.81
Brócoli RB-1	16.22	16.43	16.85	16.50	Brócoli RB-1	27.98	27.92	28.02	27.97	11.47	-1.76	3.39
Brócoli RB-2	17.24	16.04	16.91	16.73	Brócoli RB-2	27.85	27.72	28.35	27.97	11.24	-1.99	3.97
ch-ch RB-1	15.55	15.92	15.42	15.63	ch-ch RB-1	28.87	28.60	28.82	28.76	13.13	-0.10	1.07
ch-ch RB-2	15.65	15.35	15.45	15.48	ch-ch RB-2	28.93	29.24	28.66	28.94	13.46	0.23	0.85
br-ch RB-1	14.30	14.19	14.27	14.25	br-ch RB-1	27.46	27.96	27.13	27.52	13.26	0.03	0.98
br-ch RB-2	14.38	14.34	14.31	14.34	br-ch RB-2	27.67	27.47	27.08	27.41	13.06	-0.17	1.13

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (Elicitina1)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^Δ -ΔΔCt
C7P8 RB-1	17.94	17.87	17.74	17.85	C7P8 RB-1	22.94	22.92	22.87	22.91	5.06	0.06	0.96
C7P8 RB-2	17.89	17.91	17.95	17.92	C7P8 RB-2	22.88	22.94	22.74	22.85	4.94	-0.06	1.04
Chile RB-1	16.84	16.64	16.79	16.76	Chile RB-1	24.74	24.79	24.63	24.72	7.96	2.97	0.13
Chile RB-2	16.69	16.87	16.76	16.77	Chile RB-2	24.66	24.60	24.63	24.63	7.86	2.86	0.14
Brócoli RB-1	16.22	16.43	16.04	16.23	Brócoli RB-1	23.83	23.55	23.50	23.63	7.40	2.40	0.19
Brócoli RB-2	17.24	16.85	16.91	17.00	Brócoli RB-2	24.32	23.93	23.97	24.07	7.07	2.08	0.24
ch-ch RB-1	17.97	17.72	17.90	17.86	ch-ch RB-1	24.98	25.03	24.76	24.92	7.06	2.06	0.24
ch-ch RB-2	17.97	17.91	17.72	17.87	ch-ch RB-2	25.06	24.95	24.90	24.97	7.10	2.11	0.23

br-ch RB-1	16.76	16.64	16.61	16.67	br-ch RB-1	21.71	21.54	21.49	21.58	4.91	-0.09	1.06
br-ch RB-2	16.79	16.62	16.64	16.68	br-ch RB-2	21.68	21.73	21.98	21.80	5.11	0.11	0.92

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (GIP1)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^Δ -ΔΔCt
C7P8 RB-1	15.00	15.12	15.22	15.11	C7P8 RB-1	27.50	27.14	27.13	27.26	12.14	0.02	0.99
C7P8 RB-2	15.02	15.09	15.03	15.05	C7P8 RB-2	27.20	27.10	27.15	27.15	12.10	-0.02	1.01
Chile RB-1	17.40	17.45	17.63	17.49	Chile RB-1	29.91	29.92	29.62	29.82	12.32	0.20	0.87
Chile RB-2	17.87	17.90	17.62	17.80	Chile RB-2	29.91	29.62	29.59	29.71	11.91	-0.21	1.16
Brócoli RB-1	16.22	16.43	16.85	16.50	Brócoli RB-1	25.60	25.36	25.45	25.47	8.97	-3.15	8.90
Brócoli RB-2	17.24	16.04	16.91	16.73	Brócoli RB-2	25.65	25.37	25.50	25.51	8.78	-3.35	10.17
ch-ch RB-1	15.77	15.66	15.80	15.74	ch-ch RB-1	27.73	27.60	27.70	27.68	11.93	-0.19	1.14
ch-ch RB-2	15.38	15.34	15.71	15.48	ch-ch RB-2	27.46	27.42	27.30	27.39	11.92	-0.21	1.15
br-ch RB-1	14.55	14.64	14.55	14.58	br-ch RB-1	28.50	28.57	28.47	28.51	13.93	1.81	0.29
br-ch RB-2	14.90	14.91	14.78	14.86	br-ch RB-2	28.10	28.22	28.37	28.23	13.37	1.24	0.42

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (Avr1)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^Δ -ΔΔCt
C7P8 RB-1	17.94	17.87	17.74	17.85	C7P8 RB-1	24.83	25.00	25.02	24.95	7.10	0.03	0.98
C7P8 RB-2	17.89	17.91	17.95	17.92	C7P8 RB-2	24.98	24.95	24.96	24.96	7.05	-0.03	1.02
Chile RB-1	16.84	16.64	16.79	16.76	Chile RB-1	27.17	27.12	27.32	27.20	10.45	3.37	0.10
Chile RB-2	16.69	16.87	16.76	16.77	Chile RB-2	26.92	26.73	26.78	26.81	10.04	2.96	0.13
Brócoli RB-1	16.22	16.43	16.04	16.23	Brócoli RB-1	26.94	26.81	26.57	26.77	10.54	3.47	0.09
Brócoli RB-2	17.24	16.85	16.91	17.00	Brócoli RB-2	26.96	27.12	26.90	26.99	9.99	2.92	0.13
ch-ch RB-1	16.28	16.07	16.18	16.18	ch-ch RB-1	27.22	27.01	27.30	27.18	11.00	3.93	0.07
ch-ch RB-2	16.02	16.28	16.03	16.11	ch-ch RB-2	26.76	26.76	26.84	26.79	10.68	3.60	0.08
br-ch RB-1	16.76	16.64	16.61	16.67	br-ch RB-1	25.50	25.43	25.54	25.49	8.82	1.75	0.30
br-ch RB-2	16.79	16.62	16.64	16.68	br-ch RB-2	25.63	25.61	25.41	25.55	8.87	1.79	0.29

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (Avr1b)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^Δ -ΔΔCt
C7P8 RB-1	16.76	16.49	16.34	16.53	C7P8 RB-1	25.71	25.68	25.85	25.75	9.22	0.10	0.93
C7P8 RB-2	17.18	16.66	16.59	16.81	C7P8 RB-2	25.73	25.92	25.84	25.83	9.02	-0.10	1.07
Chile RB-1	17.73	17.69	17.14	17.52	Chile RB-1	24.98	25.32	25.15	25.15	7.63	-1.49	2.81
Chile RB-2	17.00	17.13	17.66	17.26	Chile RB-2	25.14	24.94	24.98	25.02	7.76	-1.36	2.57
Brócoli RB-1	16.22	16.43	16.85	16.50	Brócoli RB-1	24.78	24.34	24.43	24.52	8.02	-1.10	2.15
Brócoli RB-2	17.24	16.04	16.91	16.73	Brócoli RB-2	24.62	24.49	24.93	24.68	7.95	-1.17	2.25
ch-ch RB-1	16.28	16.11	16.26	16.22	ch-ch RB-1	23.72	23.72	23.52	23.65	7.44	-1.68	3.21
ch-ch RB-2	16.39	16.31	16.25	16.32	ch-ch RB-2	23.95	23.54	23.72	23.74	7.42	-1.70	3.25
br-ch RB-1	17.81	17.83	17.76	17.80	br-ch RB-1	23.98	24.27	24.01	24.09	6.29	-2.83	7.12
br-ch RB-2	17.90	17.79	17.83	17.84	br-ch RB-2	24.21	24.41	24.27	24.30	6.46	-2.66	6.33

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (Avr3a1)							
---	--	--	--	--	-------------------------	--	--	--	--	--	--	--

Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{Δ-ΔCt}
C7P8 RB-1	14.92	14.95	14.87	14.91	C7P8 RB-1	28.64	28.12	28.28	28.35	13.43	0.04	0.97
C7P8 RB-2	14.89	14.95	14.90	14.91	C7P8 RB-2	28.22	28.25	28.31	28.26	13.35	-0.04	1.03
Chile RB-1	17.80	17.85	17.98	17.88	Chile RB-1	30.21	30.67	30.60	30.49	12.62	-0.77	1.71
Chile RB-2	14.40	14.48	14.19	14.36	Chile RB-2	27.01	27.01	27.10	27.04	12.68	-0.71	1.63
Brócoli RB-1	16.22	16.43	16.85	16.50	Brócoli RB-1	26.84	26.58	26.50	26.64	10.14	-3.25	9.51
Brócoli RB-2	17.24	16.04	16.91	16.73	Brócoli RB-2	26.55	27.04	26.56	26.72	9.99	-3.40	10.58
ch-ch RB-1	15.55	15.92	15.42	15.63	ch-ch RB-1	27.79	27.66	27.72	27.72	12.09	-1.30	2.46
ch-ch RB-2	15.65	15.35	15.45	15.48	ch-ch RB-2	27.50	27.44	27.54	27.49	12.01	-1.38	2.60
br-ch RB-1	14.30	14.19	14.27	14.25	br-ch RB-1	30.96	31.61	31.16	31.24	16.99	3.60	0.08
br-ch RB-2	14.38	14.34	14.31	14.34	br-ch RB-2	30.88	30.81	30.92	30.87	16.53	3.14	0.11

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (Nep1)					ΔCt	ΔΔCt	2 ^{Δ-ΔCt}
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{Δ-ΔCt}
C7P8 RB-1	17.94	17.87	17.74	17.85	C7P8 RB-1	26.05	26.21	26.02	26.09	8.24	-0.20	1.15
C7P8 RB-2	16.31	16.22	16.46	16.33	C7P8 RB-2	24.90	25.01	24.99	24.97	8.64	0.20	0.87
Chile RB-1	16.84	16.64	16.79	16.76	Chile RB-1	28.37	28.33	28.14	28.28	11.52	3.08	0.12
Chile RB-2	16.69	16.87	16.76	16.77	Chile RB-2	27.91	28.12	28.92	28.32	11.54	3.10	0.12
Brócoli RB-1	16.22	16.43	16.04	16.23	Brócoli RB-1	26.28	25.72	25.78	25.93	9.70	1.26	0.42
Brócoli RB-2	17.24	16.85	16.91	17.00	Brócoli RB-2	26.51	26.29	26.27	26.36	9.36	0.92	0.53
ch-ch RB-1	17.97	17.72	17.90	17.86	ch-ch RB-1	30.07	30.02	30.06	30.05	12.19	3.75	0.07
ch-ch RB-2	17.97	17.91	17.72	17.87	ch-ch RB-2	29.80	30.16	29.12	29.69	11.83	3.39	0.10
br-ch RB-1	16.76	16.64	16.61	16.67	br-ch RB-1	26.11	25.92	25.96	26.00	9.33	0.89	0.54
br-ch RB-2	16.79	16.62	16.64	16.68	br-ch RB-2	25.99	25.70	25.70	25.80	9.11	0.67	0.63

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (CRN1)					ΔCt	ΔΔCt	2 ^{Δ-ΔCt}
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{Δ-ΔCt}
C7P8 RB-1	17.89	17.91	17.95	17.92	C7P8 RB-1	23.64	23.63	23.58	23.62	5.70	0.04	0.97
C7P8 RB-2	17.94	17.87	17.74	17.85	C7P8 RB-2	23.60	23.50	23.33	23.48	5.63	-0.04	1.03
Chile RB-1	16.84	16.64	16.79	16.76	Chile RB-1	26.02	26.93	26.11	26.35	9.60	3.93	0.07
Chile RB-2	16.69	16.87	16.76	16.77	Chile RB-2	25.83	25.83	25.86	25.84	9.07	3.40	0.09
Brócoli RB-1	16.22	16.43	16.04	16.23	Brócoli RB-1	24.00	23.63	24.17	23.93	7.70	2.04	0.24
Brócoli RB-2	17.24	16.85	16.91	17.00	Brócoli RB-2	25.45	25.52	25.36	25.44	8.44	2.78	0.15
ch-ch RB-1	17.97	17.72	17.90	17.86	ch-ch RB-1	26.95	26.72	27.01	26.89	9.03	3.37	0.10
ch-ch RB-2	17.97	17.91	17.72	17.87	ch-ch RB-2	27.06	26.98	27.04	27.03	9.16	3.50	0.09
br-ch RB-1	16.76	16.64	16.61	16.67	br-ch RB-1	24.06	24.14	24.52	24.24	7.57	1.91	0.27
br-ch RB-2	16.79	16.62	16.64	16.68	br-ch RB-2	23.99	24.18	24.20	24.12	7.44	1.78	0.29

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (Transposasa)					ΔCt	ΔΔCt	2 ^{Δ-ΔCt}
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{Δ-ΔCt}
C7P8 RB-1	16.31	16.20	16.20	16.24	C7P8 RB-1	26.76	26.69	26.53	26.66	10.42	-0.04	1.03
C7P8 RB-2	16.46	16.26	16.24	16.32	C7P8 RB-2	26.58	27.30	26.58	26.82	10.50	0.04	0.97
Chile RB-1	16.54	16.28	16.57	16.46	Chile RB-1	25.93	26.74	26.77	26.48	10.02	-0.45	1.36

Chile RB-2	16.29	16.43	16.25	16.32	Chile RB-2	26.07	26.58	25.93	26.19	9.86	-0.60	1.51
Brócoli RB-1	16.81	16.84	16.95	16.87	Brócoli RB-1	18.93	18.88	18.90	18.90	2.04	-8.43	343.96
Brócoli RB-2	16.62	16.65	16.92	16.73	Brócoli RB-2	18.68	18.95	18.84	18.82	2.09	-8.37	330.71
ch-ch RB-1	15.99	15.92	16.03	16.01	ch-ch RB-1	26.29	26.05	25.75	26.03	10.02	-0.45	1.36
ch-ch RB-2	16.04	15.92	16.09	15.98	ch-ch RB-2	25.79	25.45	25.32	25.52	9.54	-0.92	1.90
br-ch RB-1	14.23	14.30	14.18	14.24	br-ch RB-1	17.63	17.58	17.44	17.55	3.31	-7.15	141.97
br-ch RB-2	14.39	14.43	14.34	14.39	br-ch RB-2	17.66	17.51	17.58	17.58	3.20	-7.27	153.93

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (HdM-1)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{ΔΔCt}
C7P8 RB-1	16.24	16.18	16.33	16.25	C7P8 RB-1	23.77	23.49	23.54	23.60	7.35	-0.05	1.03
C7P8 RB-2	16.37	16.25	16.36	16.33	C7P8 RB-2	23.82	23.82	23.67	23.77	7.44	0.05	0.97
Chile RB-1	14.27	14.15	14.16	14.19	Chile RB-1	18.71	18.55	18.61	18.62	4.43	-2.97	7.82
Chile RB-2	17.54	17.42	17.38	17.45	Chile RB-2	21.77	21.58	21.62	21.66	4.21	-3.19	9.11
Brócoli RB-1	16.81	16.84	16.95	16.87	Brócoli RB-1	24.68	24.52	24.57	24.59	7.72	0.33	0.80
Brócoli RB-2	16.62	16.65	16.92	16.73	Brócoli RB-2	24.31	23.95	24.63	24.30	7.57	0.17	0.89
ch-ch RB-1	14.34	14.28	14.23	14.28	ch-ch RB-1	18.54	18.49	18.64	18.56	4.27	-3.12	8.71
ch-ch RB-2	16.28	16.11	16.26	16.22	ch-ch RB-2	20.80	20.79	20.84	20.81	4.59	-2.80	6.98
br-ch RB-1	17.62	17.94	17.68	17.75	br-ch RB-1	21.68	21.68	21.58	21.65	3.90	-3.50	11.29
br-ch RB-2	14.39	14.43	14.34	14.39	br-ch RB-2	18.59	18.71	18.55	18.62	4.23	-3.17	8.98

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (HdM-2)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{ΔΔCt}
C7P8 RB-1	16.24	16.18	16.33	16.25	C7P8 RB-1	27.44	27.27	27.76	27.49	11.24	-0.09	1.07
C7P8 RB-2	16.37	16.25	16.36	16.33	C7P8 RB-2	27.91	27.85	27.49	27.75	11.42	0.09	0.94
Chile RB-1	17.62	17.45	17.90	17.66	Chile RB-1	27.94	28.12	27.97	28.01	10.35	-0.98	1.97
Chile RB-2	17.54	17.42	17.38	17.45	Chile RB-2	28.25	27.77	28.33	28.12	10.67	-0.66	1.58
Brócoli RB-1	17.10	16.94	16.91	16.98	Brócoli RB-1	23.90	23.43	23.47	23.60	6.62	-4.72	26.26
Brócoli RB-2	17.00	17.13	16.95	17.03	Brócoli RB-2	23.94	23.50	24.12	23.85	6.83	-4.51	22.71
ch-ch RB-1	16.10	15.95	16.18	16.08	ch-ch RB-1	26.29	26.05	25.75	26.03	9.95	-1.38	2.60
ch-ch RB-2	15.89	15.82	16.02	15.91	ch-ch RB-2	25.84	25.76	25.73	25.78	9.87	-1.47	2.76
br-ch RB-1	17.62	17.94	17.68	17.75	br-ch RB-1	27.73	27.51	27.05	27.43	9.68	-1.65	3.13
br-ch RB-2	17.69	17.87	17.81	17.79	br-ch RB-2	27.57	27.59	27.04	27.40	9.61	-1.72	3.30

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (HdM-3)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{ΔΔCt}
C7P8 RB-1	15.94	15.92	15.93	15.93	C7P8 RB-1	27.85	28.06	27.65	27.85	11.92	0.03	0.98
C7P8 RB-2	15.82	15.88	15.76	15.82	C7P8 RB-2	27.57	27.60	27.91	27.69	11.87	-0.03	1.02
Chile RB-1	14.27	14.15	14.16	14.19	Chile RB-1	25.04	25.02	25.20	25.09	10.89	-1.01	2.01
Chile RB-2	14.34	14.28	14.23	14.28	Chile RB-2	25.78	25.27	25.16	25.40	11.12	-0.78	1.72
Brócoli RB-1	16.81	16.84	16.95	16.87	Brócoli RB-1	26.89	26.84	26.59	26.77	9.91	-1.99	3.98
Brócoli RB-2	16.62	16.65	16.92	16.73	Brócoli RB-2	26.75	26.97	26.88	26.87	10.14	-1.76	3.39
ch-ch RB-1	15.68	15.63	15.81	15.71	ch-ch RB-1	25.32	25.31	25.11	25.25	9.54	-2.36	5.13

ch-ch RB-2	15.74	15.69	15.82	15.75	ch-ch RB-2	25.41	25.18	25.01	25.20	9.45	-2.45	5.46
br-ch RB-1	14.23	14.30	14.18	14.24	br-ch RB-1	24.82	24.76	24.84	24.81	10.57	-1.33	2.51
br-ch RB-2	14.39	14.43	14.34	14.39	br-ch RB-2	25.08	24.96	25.08	25.04	10.65	-1.25	2.37

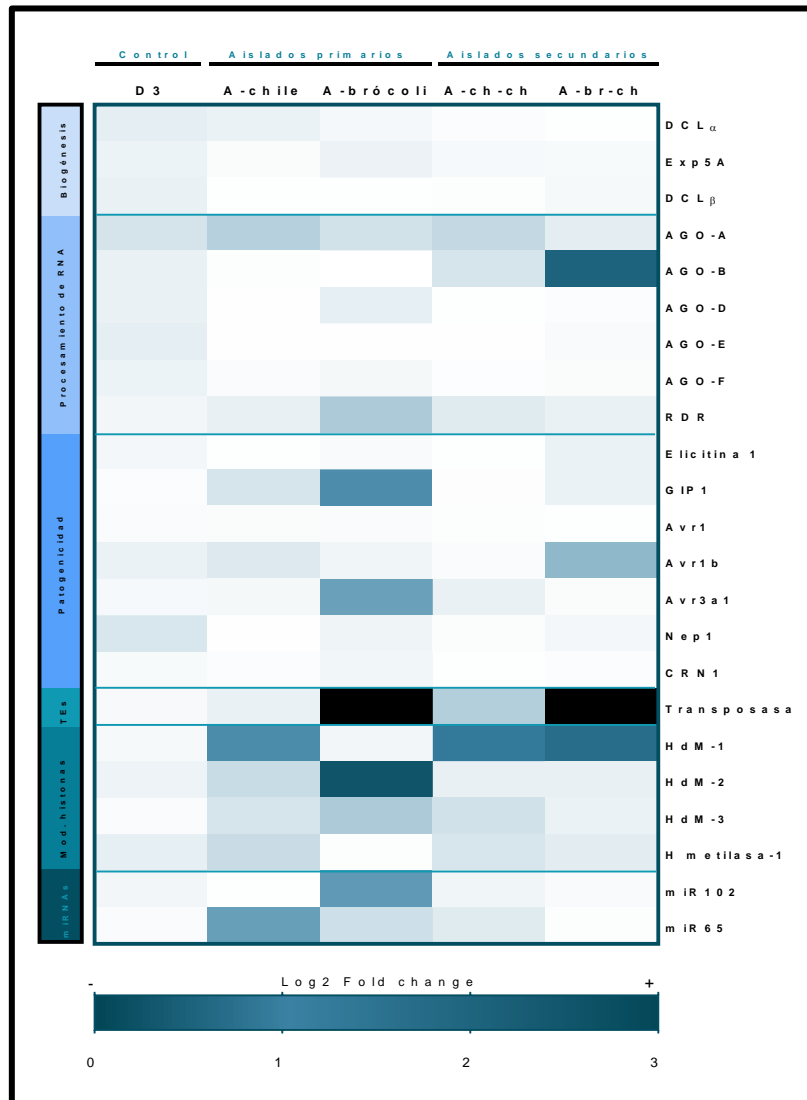
Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (H metilasa-1)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{ΔΔCt}
C7P8 RB-1	16.24	16.18	16.33	16.25	C7P8 RB-1	23.41	23.71	23.44	23.52	7.27	-0.13	1.09
C7P8 RB-2	15.82	15.88	15.76	15.82	C7P8 RB-2	23.54	23.23	23.26	23.34	7.52	0.13	0.92
Chile RB-1	17.62	17.45	17.90	17.66	Chile RB-1	23.66	23.20	24.24	23.70	6.04	-1.35	2.56
Chile RB-2	17.54	17.42	17.38	17.45	Chile RB-2	23.96	24.00	23.21	23.72	6.28	-1.12	2.17
Brócoli RB-1	16.81	16.84	16.95	16.87	Brócoli RB-1	24.56	24.47	24.76	24.77	7.90	0.51	0.70
Brócoli RB-2	16.62	16.65	16.92	16.73	Brócoli RB-2	24.77	24.62	24.92	24.60	7.87	0.47	0.72
ch-ch RB-1	16.10	15.95	16.18	16.08	ch-ch RB-1	22.75	22.86	22.82	22.81	6.73	-0.66	1.58
ch-ch RB-2	15.89	15.82	16.02	15.91	ch-ch RB-2	22.92	22.93	22.92	22.92	7.01	-0.38	1.30
br-ch RB-1	17.62	17.94	17.68	17.75	br-ch RB-1	25.37	25.76	25.33	25.49	7.74	0.34	0.79
br-ch RB-2	17.69	17.87	17.81	17.79	br-ch RB-2	25.27	25.01	25.33	25.20	7.41	0.02	0.99

Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (miR102)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{ΔΔCt}
C7P8 RB-1	19.43	19.54	19.68	19.55	C7P8 RB-1	22.87	22.72	22.82	22.80	3.25	0.06	0.96
C7P8 RB-2	19.56	19.92	19.91	19.80	C7P8 RB-2	22.83	22.96	22.97	22.92	3.12	-0.06	1.05
Chile RB-1	20.16	19.86	19.90	19.97	Chile RB-1	25.86	25.62	25.51	25.66	5.69	2.50	0.18
Chile RB-2	20.00	20.11	20.33	20.15	Chile RB-2	25.76	25.96	26.04	25.92	5.77	2.59	0.17
Brócoli RB-1	22.50	22.37	22.45	22.44	Brócoli RB-1	21.39	21.19	21.29	21.29	-1.15	-4.34	20.23
Brócoli RB-2	22.20	22.39	22.58	22.39	Brócoli RB-2	21.27	21.35	21.35	21.32	-1.07	-4.26	19.09
ch-ch RB-1	18.95	19.46	19.45	19.29	ch-ch RB-1	23.78	23.97	23.56	23.77	4.48	1.30	0.41
ch-ch RB-2	19.61	19.66	19.83	19.70	ch-ch RB-2	23.74	23.73	24.11	23.86	4.16	0.97	0.51
br-ch RB-1	17.93	17.88	17.94	17.92	br-ch RB-1	22.71	22.87	22.59	22.72	4.81	1.62	0.33
br-ch RB-2	17.68	17.67	17.89	17.75	br-ch RB-2	22.64	22.77	22.96	22.79	5.04	1.86	0.28

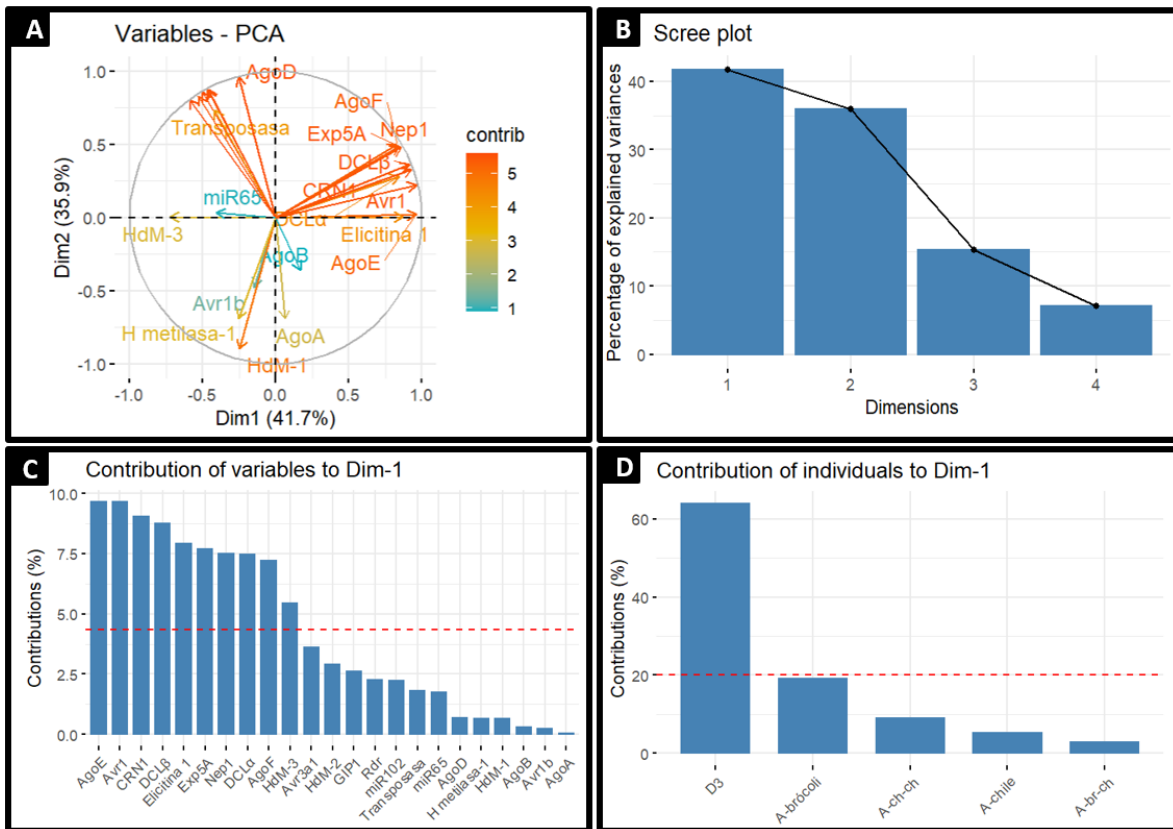
Gen Housekeeping (Factor de elongación)					Gen de interés (miR65)							
Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	Muestra	Ct1	Ct2	Ct3	P-Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{ΔΔCt}
C7P8 RB-1	20.85	20.93	21.18	20.99	C7P8 RB-1	34.28	34.21	34.26	34.25	13.26	-0.03	1.02
C7P8 RB-2	20.72	20.41	20.53	20.55	C7P8 RB-2	33.97	33.91	33.73	33.87	13.32	0.03	0.98
Chile RB-1	22.85	22.78	22.64	22.76	Chile RB-1	34.15	33.70	33.86	33.90	11.15	-2.14	4.42
Chile RB-2	22.60	22.64	22.82	22.69	Chile RB-2	34.62	34.37	33.73	34.24	11.55	-1.74	3.33
Brócoli RB-1	22.11	22.08	21.99	22.06	Brócoli RB-1	34.24	33.95	34.42	34.20	12.14	-1.15	2.21
Brócoli RB-2	21.74	22.15	22.38	22.09	Brócoli RB-2	34.05	33.83	34.18	34.02	11.93	-1.36	2.57
ch-ch RB-1	20.13	19.94	19.83	19.97	ch-ch RB-1	33.78	33.96	34.19	33.98	14.01	0.72	0.61
ch-ch RB-2	19.93	20.14	20.26	20.11	ch-ch RB-2	34.69	34.20	35.39	34.76	14.65	1.36	0.39
br-ch RB-1	19.74	19.46	19.56	19.59	br-ch RB-1	33.12	35.04	33.53	33.90	14.31	1.02	0.49
br-ch RB-2	19.68	19.72	20.05	19.82	br-ch RB-2	34.25	33.38	34.92	34.18	14.37	1.08	0.47

P-Ct: Promedio de Ct

ANEXO 53. Perfil de expresión de genes y miRNAs analizados por RT-qPCR de *P. capsici*



ANEXO 54. Componentes que contribuyen a la varianza en cinco aislados de *P. capsici*



Contribución en varianza de las variables DCL α , DCL β , Exportina 5A (Exp5A), RNA polimerasa dependiente de RNA (Rdr), Argonata A (AgoA), Argonata B (AgoB), Argonata D (AgoD), Argonata E (AgoE), Argonata F (AgoF), Elicitina1, GIP1, Avr1, Avr1b, Avr3a1, Nep1, CRN1, Transposasa Tam3, Histona desmetilasa 1 (HdM-1), Histona desmetilasa 2 (HdM-2), Histona desmetilasa 3 (HdM-3), Histona metilasa 1 (H metilasa-1), miR102 y miR065 en D3, A-chile, A-brócoli, A-ch-ch y A-br-ch de *P. capsici* en el análisis de componentes principales. **A:** Grafica de vectores de las variables observadas que contribuyen sobre los componentes principales. **B:** Screen plot, muestra el porcentaje de la varianza que explica cada componente principal. **C:** Grafica que indica el porcentaje en que contribuye cada variable observada sobre el componente principal 1. **D:** Grafica de barras que indica la contribución en la varianza de los individuos (tratamientos) de *P. capsici* sobre el componente principal 1.

ANEXO 55. Distancias en el perfil de expresión de genes y miRNAs analizados por RT-qPCR de *P. capsici*

