






Identificación y expresión del efector central fúngico *Pep1* en *Thecaphora frezii*

Identification and expression of the fungal central effector *Pep1* in *Thecaphora frezii*

Néstor Walter Soria¹ , Pablo Yang¹ , María Soledad Díaz² , Ana Cristina Figueroa² , Valeria Roxana Alasino^{2,3} , Dante Miguel Beltramo^{1,2,3}.

1 Universidad Católica de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Cátedra de Biotecnología, Unidad Asociada al CONICET: Área de Cs. Agrarias, Ingeniería, Cs. Biológicas.

2 Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba – CEPROCOR

3 CONICET

Correspondencia: Néstor Walter Soria, e-mail: nestorwsoria@gmail.com

Resumen

Thecaphora frezii es un hongo fitopatógeno perteneciente a la clase Ustilaginomicetes, que produce la enfermedad del carbón de maní. En su ciclo biológico presenta tres estructuras, las teliosporas (es la estructura de resistencia) y las basidiosporas e hifas. El micelio (hifas) es la estructura infectiva, que penetra en el ginóforo de la planta e inicia la infección. Para dicha acción, sería necesaria la expresión de la proteína *Pep1* ya que la misma fue identificada en otros *Ustilaginomicetes* como el *Ustilago maydis* y el *Ustilago hordei*, que infectan al maíz y a la cebada, respectivamente, y su expresión es fundamental para dicha acción.

Pudimos amplificar el ADN copia de *Pep1* de *Thecaphora frezii* cuya secuencia traducida codificaría para una proteína de 180 aminoácidos. Se observaron grandes homologías con ortólogas de otras especies y la presencia de cuatro cisteínas conservadas. Paralelamente, medimos los niveles de expresión de este transcripto, encontrándose muy elevado en las hifas, coincidiendo con el estadio infectivo del hongo.

Futuros estudios funcionales de inactivación génica del gen *pep1* deberán realizarse para comprobar fenotípicamente el efecto que este gen provoca en cultivos de maní.

Palabras claves: *Thecaphora frezii*; *Pep1*; maní; infección

Abstract

Thecaphora frezii is a phytopathogenic fungus belonging to the Ustilaginomycetes class, which causes the peanut smut disease. In its biological cycle it has three structures, teliospores (is the resistance structure), basidiospores and hyphae. The mycelium (hyphae) is the infective structure, which penetrates the plant's gynophore and initiates the infection. For this action, the expression of the *Pep1* protein would be necessary since it was identified in other *Ustilaginomycetes* such as *Ustilago maydis* and *Ustilago hordei*, which infect corn and barley, respectively, and its expression is essential for this action.

We were able to amplify the Pep1 DNAC of *Thecaphora frezii* whose translated sequence would code for a 180 amino acid protein. Great homologies with orthologous of other species and the presence of four conserved cysteines were observed. In parallel, we measured the expression levels of this transcript, being higher in the hyphae, coinciding with the infective stage of the fungus.

Future functional studies of gene inactivation of the *pep1* gene should be carried out to phenotypically verify the effect that this gene causes in peanut crops.

KeyWords: *Thecaphora frezii*; *Pep1*; peanut; infection.

Introducción

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es uno de los cultivos leguminosos más importante del mundo, nativo de Sudamérica, distribuido en Brasil, Paraguay, Bolivia, Argentina y Uruguay¹. De los 49.171 millones de toneladas estimadas mundialmente para la cosecha 2021, se observa que China, India, Nigeria, EEUU y Argentina se constituyen en los cinco principales productores, con el 37%, 12%, 9%, 6% y 3% de la producción mundial respectivamente². Durante el ciclo de cultivo, el maní es atacado frecuentemente por enfermedades de origen fúngico especialmente algunas que se desarrollan en el suelo durante la etapa de formación del fruto, durante la cosecha y en las fases de secado y almacenamiento del grano^{3,4}. Uno de los causantes es el hongo *Thecaphora frezii* (*T. frezii*)⁵.

El carbón del maní, enfermedad causada por *T. frezii*, un hongo biotrofo, produce numerosas pérdidas anuales, teniendo mayor incidencia en la zona sur de la provincia de Córdoba. El mismo, fue detectado por primera vez en la campaña 1994/95, mientras que su prevalencia, incidencia y severidad se ha ido incrementando en los últimos 10 años, expandiéndose, además, a otras provincias⁶.

Ustilago maydis (*U. maydis*) se considera un modelo fúngico importante que ha sido ampliamente utilizado en estudios biológicos y genéticos⁷ y se ha considerado como un hongo de gran importancia para el estudio del desarrollo dimórfico y de interacción planta-patógeno. La relación entre *T. frezii* y *U. maydis*, es que este último hongo también pertenece a la clase de *Ustilagomicetes* y genera carbón en las plantas de maíz.

Se acepta que la mayoría de los genes de avirulencia fúngica codifican factores de virulencia que se llaman efectores. La mayoría de los efectores fúngicos se secretan, siendo proteínas ricas en cisteína, y ha sido demostrado un papel en la virulencia de algunos de ellos⁸. *U. maydis* expresa un efector llamado *Pep1* (Protein essential during penetration 1)⁹. El gen *pep1* está específicamente expresado durante el desarrollo del patógeno *U. maydis*⁹. En este hongo, variantes mutantes deletionadas del gen *pep1* formaban

estructuras de penetración normales pero la infección se detenía inmediatamente después de la penetración epidérmica. Además, se encontró que *Pep1* se localiza en el apoplasto de la planta donde se acumula particularmente en sitios de pasajes de célula a célula de hifas biotróficas de *U. maydis*⁹. *Pep1* no solo es esencial para la virulencia de *U. maydis* sino también para el hongo relacionado con el carbón de cebada, *Ustilago hordei* (*U. hordei*), que indica una función conservada de *Pep1* en otros biotrofos fúngicos además de *U. maydis*⁹.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue comenzar a identificar y caracterizar a la proteína *Pep1*, cuya actividad sería fundamental para la infección por parte de *T. frezii* sobre las plantas de maní.

Material y métodos

Aislamiento y cultivo de *Thecaphora frezii*

Las teliosporas *T. frezii* fueron obtenidas de cajas de maní que presentaban síntomas de enfermedad (hipertrofia) y descontaminadas superficialmente con etanol. Las teliosporas se desinfectaron con hipoclorito de sodio 5% durante 5 min y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril durante 10 minutos. Las hifas fueron obtenidas por germinación de las teliosporas en medio PDA (Potato Dextrose Agar). Las basidiosporas se obtuvieron a partir de las hifas crecidas en medio sólido, las cuales se sembraron en agar agua (1,5 % agar-agar). Se corroboró la formación de dichas estructuras mediante microscopía óptica.

Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total de los tres estadios de *T. frezii* (se combinaron tres cultivos independientes para cada etapa) se extrajo usando TRIzol (Invitrogen, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADNc se eliminó mediante digestión en columna con ADNasa (Qiagen) al

doble de la concentración recomendada por el fabricante. Se controló la posible degradación y contaminación del ARN en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) y se confirmó la pureza del ARN usando el espectrofotómetro NanoPhotometer (IMPLEN, CA, EE. UU.). La concentración de ARN se midió con el kit de ensayo de ARN Qubit y el fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies, CA, EE. UU.).

La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó con 1 µL de Oligo-(dT)20 (50 µM) (Invitrogen), 1 µg de ARN total y 400 U de SuperScript III RT (transcriptasa inversa, Invitrogen) en un volumen de reacción de 20 µL incubado a 55°C durante 1 h.

Amplificación y secuenciamiento del ADNc de pep1

La amplificación rápida de los extremos del ADNc 5' y 3' (5'-RACE y 3'-RACE) se realizó utilizando el kit comercial GeneRacer (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron: 5'-RACE-GSP1 5' AYRCAVGTGTGSGGNAG 3'; 5'-RACE-GSP2 5' TTGTTKCKVDRTTCGTA 3'; 5'-RACE-GSP3 5' CYTGRDVBKYGCAGT 3'; 3'-RACE-GSP1 5' TACGAYHBMGMMMAACAA 3'; 3'-RACE-GSP2 5' CTNCCSCARACBTGYRT 3'. Después de la electroforesis de los productos de PCR, se cortaron dos bandas correspondientes al tamaño esperado de aproximadamente 280 pb (5'-RACE) y 260 pb (3'-RACE) del gel de agarosa y se purificaron usando el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN, Hilden, Alemania). A continuación, los productos de PCR se secuenciaron en un secuenciador de ADN automatizado ABI 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.).

Análisis de la secuencia del ADNc de pep1

La secuencia del ADNc de pep1 de *T. frezii* se comparó con las de otros hongos depositados en GenBank utilizando las herramientas "BLAST-N" o "BLAST-X" disponibles en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). La secuencia de aminoácidos de Pep1 de *T. frezii* se dedujo del ADNc correspondiente utilizando la herramienta de traducción del sitio web ExpASY Proteomics (<https://web.expasy.org/translate/>). La presencia de péptido señal fue detectada usando el predictor SignalP-5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). La predicción de efector fúngico en secreciones se realizó a través del programa EffectorP, que ha sido diseñado para distinguir proteínas secretadas

de efectores secretados en hongos patógenos de plantas (<http://effectorp.csiro.au/>).

Comparación de secuencias y relación filogenética

Las secuencias de aminoácidos completas se alinearon utilizando el programa Clustal W (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Las secuencias de *Pep1* utilizadas para la comparación fueron de las siguientes especies (número de acceso de GenBank entre paréntesis): *Anthracoystis flocculosa* (*A. flocculosa*) PF-1 (XP_007878051.1), *U. maydis* 521 (XP_011387901.1), *U. hordei* (XP_041411115.1) y *Kalmanozyma brasiliensis* (*K. brasiliensis*) (XP_016292919.1). Para deducir la secuencia de *Pep1* de *Thecaphora thlaspeos* (*T. thlaspeos*) fue necesario utilizar los programas tBLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) y <http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/submission.php> (UWYS01000010.1). El análisis filogenético fue realizado utilizando las condiciones por defecto del software disponible en http://www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi.

Cuantificación de los transcritos de pep1 de acuerdo al estadio de T. frezii

Se realizó la cuantificación de la expresión génica de *pep1* en los tres estadios de *T. frezii* a través del sistema de detección de PCR en tiempo real StepOne Plus Real-Time PCR system® (ThermoFisher, Massachusetts, EE. UU.). Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa accesible en la página de GenScript® (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool>) (Tabla 1).

El ADNc se preparó a partir de las mismas muestras de ARNs utilizadas para el análisis de 5'-RACE y 3'-RACE.

La expresión génica relativa se realizó usando el transcritto de actina como gen de referencia para la normalización de la expresión. La especificidad de los amplicones se verificó mediante el análisis de las curvas de fusión y mediante el secuenciamiento de los fragmentos obtenidos. El cambio de expresión en el gen *pep1*, en relación con la expresión de actina se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ ¹⁰. La media y DS (\pm), fueron entonces calculadas para cada una de las diferentes muestras. Los datos fueron analizados con el test de Student para establecer las diferencias significativas.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos usadas en la Real Time PCR

Nombre	Secuencia (5'→3')	Tamaño esperado del amplicón (pb)
<i>pep1</i> -F	CATCCTCTCTCCTCACGTACC	141
<i>pep1</i> -R	GCCTTCGTCTGGTTGTGAA	
<i>actina</i> -F	CTACGTTGCCCTCGACTTTG	107
<i>actina</i> -R	CGTTTCCGACAGTGATGACC	

proteína deducida pudiera actuar como efector, la analizamos mediante el programa EffectorP, asignando una probabilidad del 0,667; 0,802; 0,555 y 0,682 de presentar esa función para *T. frezii*; *U. maydis*; *U. hordei* y para *T. thlaspeos*, respectivamente.

Resultados

Características de la secuencia de *pep1*

A partir del ADNc de *T. frezii* se logró amplificar un fragmento de 543 pb correspondientes a la totalidad del transcripto del gen *pep1*. La secuencia fue registrada en GenBank bajo el código MZ337396 y codificaría para una proteína de 180 aminoácidos, compatible con los tamaños observados en otras proteínas ortólogas.

Paralelamente se analizó en la secuencia proteica predicha la posible presencia de un péptido señal a través del predictor SignalP-5.0, el cual arrojó una probabilidad del 0,9062 de presencia del mismo. Además, para evaluar la posibilidad de que la

Alineamientos de secuencias *Pep1* y relación filogenética

Para estos análisis, se alinearon las secuencias de proteínas ortólogas de *Pep1* de hongos filogenéticamente próximos a *T. frezii*. Para ello se compararon las secuencias de *Pep1* de *U. maydis* 521, *U. hordei*, *K. brasiliensis*, *T. thlaspeos* y *A. flocculosa* PF1 (Figura 1A y Tabla 2). Se consideró que las proteínas eran homólogas si compartían un 25% o más de identidad con una longitud de alineación mayor a 80 aminoácidos¹¹. En la Figura 1B observamos la estructura de la proteína *Pep1* de *T. frezii*, con su péptido señal y sus 4 cisteínas conservadas.

A

<i>T. frezii</i>	MVPRFVWPLRLLALPLVLILLTYHPTV--SSIPSRHPSTPALVRR---- <td>55</td>	55
<i>T. thlaspeos</i>	---MRLSTVLFLETSVLLSLSTT---SS--AFGAVMLNSKHLDRR----DGPSQPALAIT	48
<i>A. flocculosa</i> PF1	--MPSKLPETLL---LPVLLALLT--PRR-IYVRAQPTQPHLTSRRDGTADGPPGIPTAIT	53
<i>U. maydis</i> 521	--MMTLVQTTLLSLALVLLGSTV--FVHADAAGAVPL-----PNFKVDQPPLAST	47
<i>U. hordei</i>	--MKLTLNTAFLLTLASLLVLS----IDSV-DADVPL-----PDYTAHDYPLAAT	43
<i>K. brasiliensis</i>	--MKTLLTASFVSLASLLFTS----LTQVSAGAVPV-----PDYTVHPLPLAST	44
	: * * * * *	
<i>T. frezii</i>	MFWFNNOQKAI ^C YDLTARVKSVTGYTD ^C DFQDDYDSANNSYFLPQT ^C VLIAPLSEALFNI	115
<i>T. thlaspeos</i>	LFWFNNI ELAICHDMRDRVESISEI IHCNAQDDYDKI NNTYALPQTCTPLI PRSERLHSQ	108
<i>A. flocculosa</i> PF1	LFWFNMLEVGI ^C YDMRRVVSDDPSFDCNAQGDYDRDNNTYALPQTCTALI PKSEALLYR	113
<i>U. maydis</i> 521	FYWFSSVEVGV ^C YNPQARVGSIKGALHCTHQENYDRDNNSYTLPQTCTVALKPLGKAFSSN	107
<i>U. hordei</i>	FYWFSSVEVGV ^C YSPKARVGSIKGALHCTHQENYDIENNTWTLPQTCTVALKPLGEPSSNA	103
<i>K. brasiliensis</i>	FYWFSSVEVGV ^C YSPTARVASIPGALHCTHQEKYDIDNNSWTLPQTCTVALKPLGGPLSSA	104
	::*... : : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *	
<i>T. frezii</i>	LSEAC ^C RKVG-TLGE ^C MDVKGNTPTPTITPGNPGGGMPGTPNYAQSGNP---GLGLGPG--	169
<i>T. thlaspeos</i>	VKMAC ^C KEAAGTFGILV---RPSA-----NDGVVDSNQSPOQP-----	142
<i>A. flocculosa</i> PF1	ITQAC ^C QQTNGKFDTLT---APPG-----TDMNPGPAAASGAGAA---GTSASAA--	156
<i>U. maydis</i> 521	VRDSC ^C TNAGIFNVIVPASSNAL-----GSQAYDAVQAKGGTGGT-----	148
<i>U. hordei</i>	VRDSC ^C TNAGSFNLIKPASSNAD-----GSQAYNAISNKGADGAASDPGSQ	149
<i>K. brasiliensis</i>	VRDSC ^C TNAGTFNVITPAGSNAE-----GGQAYDAIQKGGPGGGGAGAGGD	150
	: : * : : : : : :	
<i>T. frezii</i>	-----YNPVQVSSGM-----	180
<i>T. thlaspeos</i>	-----	142
<i>A. flocculosa</i> PF1	-----AASKQ-----	161
<i>U. maydis</i> 521	-TDDDT ^C SAPDSNDQEKKGGGLGGIGSMFGM	178
<i>U. hordei</i>	TG-----SDDDEGDKKRDGGMLGGLGKMGVGL	175
<i>K. brasiliensis</i>	GASTDDS ^C NDAEDSGKKRDGGMLGGIGSMFGM	181

B

MVPRFVWPLRLLALPLVLILLTYHPTVSSIPSRHPSTPALVRRKAPDQPPLAITMFWFNNOQKAI
CYDLTARVKSVTGYTD**C**DFQDDYDSANNSYFLPQT**C**VLIAPLSEALFNI**L**SEA**C**RKVGTLGEMD
 VKGNTPTPTITPGNPGGGMPGTPNYAQSGNPGLGGLPGYNPVGVPSSGM

Figura 1. A: Alineamiento de secuencias de *Pep1* de *T. frezii*, *T. thlaspeos*, *A. flocculosa* PF1, *U. maydis* 521, *U. hordei* y *K. brasiliensis*. En rectángulos se señalan las cuatro cisteínas conservadas. *, identidad de secuencia en todo el conjunto de la alineación; :, una sola discrepancia en el conjunto de la alineación; :, dos discrepancias en la alineación. Las secuencias subrayadas corresponden a los péptidos señales. **B:** Secuencia completa de la proteína *Pep1* de *T. frezii* señalando al péptido señal (subrayado) y a las 4 cisteínas conservadas (en negritas y sombreadas).

Tabla 2. Porcentaje de identidad y homología a nivel proteico de las distintas *Pep1* de hongos fitopatogénicos (excepto *A. flocculosa*) respecto *Thecaphora frezii*

Hongo	n° de aminoácidos deducidos	Identidad (%)	Homología (%)
<i>Thecaphora frezii</i>	180	100	100
<i>Anthracoystis flocculosa</i> PF1	161	47	63
<i>Thecaphora thlaspeos</i>	142	44	62
<i>Ustilago maydis</i> 521	178	44	65
<i>Ustilago hordei</i>	175	34	48
<i>Kalmanozyma brasiliensis</i>	181	42	61

Una posible relación evolutiva entre los hongos alineados anteriormente pudo observarse a través de la construcción de un árbol filogenético basados en las secuencias proteicas de *Pep1* (Figura 2).

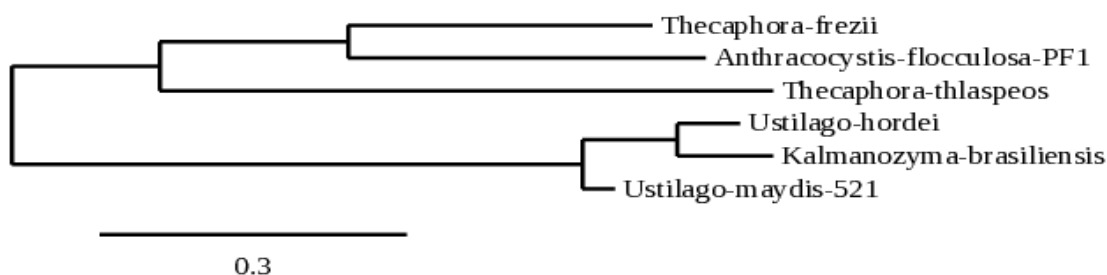


Figura 2. Árbol filogenético de *Pep1* construido en base a *T. frezii*, *U. maydis* 521, *U. hordei*, *K. brasiliensis*, *T. thlaspeos* y *A. flocculosa* PF1.

Análisis de la expresión de *pep1*

Los niveles de expresión del ARNm de *pep1* fueron cuantificados mediante PCR en Tiempo Real en los tres estadios del *T. frezii*, es decir, teliosporas, basidiosporas e hifas. Coincidentemente con lo esperado, los niveles del transcripto de *pep1* fueron más elevados en las hifas y basidiosporas, respecto a lo que sucede en teliosporas (Figura 3). Se calcularon las medias, desviaciones standart y el valor de p mediante el test de Student. La diferencia de expresión no fue significativa cuando se compararon los niveles presentes en las basidiosporas vs. hifas ($p > 0,05$), mientras que la diferencia fue significativa entre basidiosporas vs. teliosporas e hifas vs. teliosporas ($p < 0,001$).

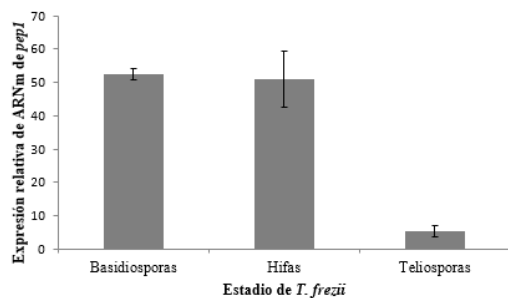


Figura 3. Niveles de expresión del ARNm de *pep1* en los tres estadios de *T. frezii*. La media y DS (\pm), fueron calculadas para cada una de las diferentes muestras.

Discusión y Conclusiones

Uno de los microorganismos que infecta a los cultivos del maní es el hongo *T. frezii*. Esta afección, llamada carbón del maní, produce enormes pérdidas en estos cultivares.

Para que muchos hongos sean fitopatogénicos es necesario la expresión de efectores que desencadenan el proceso infeccioso¹², siendo uno de ellos la *Pep1* (Protein essential during penetration 1)⁹.

Uno de los hongos que presenta varias características comunes con *T. frezii* es el hongo *U. maydis*, que además de ser usado como modelo de estudio de muchas características de hongos fitopatogénicos, causa la enfermedad del carbón del maíz, expresa el gen *pep1*⁹ y pertenece a la misma clase de hongos que *T. frezii*¹³.

En este trabajo nos propusimos caracterizar al menos de manera parcial a la proteína *Pep1* de *T. frezii*.

A partir de la obtención del ADNc de *pep1*, procedimos a la secuenciación del mismo y a la deducción de la secuencia aminoacídica correspondiente. Los análisis de esta secuencia mostraron la posible presencia de un péptido señal, el cual se encuentra presente en todos los efectores⁸. Además, realizando un análisis de homología con ortólogos de *Pep1* de hongos próximos filogenéticamente con *T. frezii*, pudimos

encontrar ciertas regiones conservadas, particularmente la presencia de cuatro cisteínas que ya se ha demostrado que son esenciales para la función *Pep1*¹⁴. Esta estructura proteica también se encuentra presente en hongos que afectan a plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, entre otros, *Sporisorium reilianum*; *Sporisorium scitamineum*; *Ustilago avenae*; *Ustilago nuda* y *Melanopsichium pennsylvanicum*¹⁴.

Otro aspecto importante que encontramos es que la presencia del transcripto de *pep1* está altamente expresado en estructuras del hongo como son las basidiosporas e hifas, estando estas últimas estructuras asociadas al estadio infectivo del hongo¹⁵.

Los aportes descritos en el presente trabajo, pueden ser el puntapié inicial para comenzar a identificar factores que están involucrados en el proceso infeccioso de *T. frezii* que lleva a la enfermedad del carbón del maní y a las consecuentes pérdidas económicas.

Bibliografía

1. Krapovickas A, Gregory WC. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* [Internet]. 2007 Jan 1; 16:1. Available from: <http://revistas.unne.edu.ar/index.php/bon/article/view/158>
2. United States Department of Agriculture. Peanut Explorer [Internet]. web site. 2021 [cited 2021 Jul 8]. Available from: <https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=2221000>
3. Pitt JJ, Dyer SK, McCammon S. Systemic invasion of developing peanut plants by *Aspergillus flavus*. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 1991 Jul;13(1):16–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.1991.tb00558.x>
4. Fernandez EM, Rosolem CA, Maringoni AC, Oliveira DMT. Fungus incidence on peanut grains as affected by drying method and Ca nutrition. *F Crop Res* [Internet]. 1997 May;52(1–2):9–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378429096034612>
5. Marinelli A, March GJ, Oddino C. Aspectos biológicos y epidemiológicos del carbón del maní (*Arachis hypogaea* L.) causado por *Thecaphora frezii* Carranza & Lindquist. *AgriScientia* [Internet]. 2008;25(1):1–5. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77950144062&partnerID=tZOtx3y1>
6. Cazzola, N; Gateu, M.; March, G.; Marinelli, A.; García, J. J.; Rago, A. y Oddino C. Intensidad y pérdidas ocasionadas por carbón del maní según regiones de producción. *XXVII Jorn Nac Maní*. 2012;34–5.
7. Bölker M. *Ustilago maydis* – a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* [Internet]. 2001 Jun 1;147(6):1395–401. Available from: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-147-6-1395>
8. Stergiopoulos I, de Wit PJGM. Fungal Effector Proteins. *Annu Rev Phytopathol* [Internet]. 2009 Sep;47(1):233–63. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.112408.132637>
9. Doehlemann G, van der Linde K, Aßmann D, Schwambach D, Hof A, Mohanty A, et al. *Pep1*, a Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis*, Is Required for Successful Invasion of Plant Cells. Howlett BJ, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2009 Feb 6;5(2): e1000290. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000290>
10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec;25(4):402–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>
11. Sander C, Schneider R. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins Struct Funct Genet* [Internet]. 1991 Jan;9(1):56–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/prot.340090107>
12. Selin C, de Kievit TR, Belmonte MF, Fernando WGD. Elucidating the Role of Effectors in Plant-Fungal Interactions: Progress and Challenges. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Apr 27; 7:600. Available from: www.frontiersin.org
13. Boekhout T, Fonseca Á, Sampaio JP, Bandoni RJ, Fell JW, Kwon-Chung KJ. Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Basidiomycetous Yeasts. In: *The Yeasts* [Internet]. Elsevier; 2011. p. 1339–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444521491001002>

14. Hemetsberger C, Mueller AN, Matei A, Herrberger C, Hensel G, Kumlehn J, et al. The fungal core effector Pep1 is conserved across smuts of dicots and monocots. *New Phytol* [Internet]. 2015 May 27;206(3):1116–26. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.13304>
15. Sinha M, Shree A, Singh K, Kumar K, Singh SK, Kumar V, et al. Modulation of fungal virulence through CRZ1 regulated F-BAR-dependent actin remodeling and endocytosis in chickpea infecting phytopathogen *Ascochyta rabiei*. Stukenbrock EH, editor. *PLOS Genet* [Internet]. 2021 May 17;17(5): e1009137. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009137>

