



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

*LA DIVERSIDAD INTRAESPECÍFICA DE POTENCIALES
PÉPTIDOS EFECTORES MiSSPs COMO FACTOR
RELACIONADO CON EL DESARROLLO DE LA SIMBIOSIS EN
*Laccaria trichodermophora**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:**

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ELENA FLORES CALLEJAS



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. RODOLFO ENRIQUE ÁNGELES ARGÁIZ**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, MAYO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos institucionales

Agradezco mucho a los profesores titulares del taller “Diversidad y aspectos ecológicos de macromicetos saprobios, ectomicorrícicos y líquenes” 2020-2022, por su constante apoyo y contribuciones al desarrollo de mi proyecto. Gracias a ellos incrementó mi gusto e interés por el mundo de los hongos, y puedo decir que logré culminar un trabajo interesante y muy bien fundamentado.

Agradezco a mi tutor, el Dr. Rodolfo Ángeles Argáiz, quién me ha apoyado a lo largo de todo este proceso. Me ha instruido con paciencia y dedicación, además de que me ha brindado herramientas y contactos que me serán de gran utilidad en lo que resta de mi vida profesional. Muchas gracias Rodo, espero hayas disfrutado tanto de este trabajo como yo lo he hecho.

También quisiera agradecer a la Dra. Diana Hernández Oaxaca, quién fue parte fundamental para mis primeros avances y aprendizaje en aspectos relacionados con la programación. No dejaré de agradecerte toda la ayuda que me brindaste cuando más la necesitaba.

Agradecimientos personales

Agradezco mucho a mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermano Arturo. Ellos han sido mi mayor soporte durante la carrera y mi vida en general. Me han dado estabilidad y ánimos en cada paso, y espero que sigamos dándonos cariño, apoyo y amor incondicional en lo que resta de nuestros caminos.

También quisiera agradecer a mis amigos de la carrera y de la universidad. Han sido una red de apoyo invaluable para mí. Algunos empezamos al mismo tiempo, otros nos encontramos y nos hemos estado dando el hombro durante el camino, pero terminamos y terminamos juntos. Especialmente gracias a Shey, a Cyn, a Fer, a Aldo y a Lia por hacer de mi carrera y, de mi tiempo a su lado, una experiencia única que atesoraré lo que resta de mi vida. Gracias a Lupa, a Carlos y a Marianita, porque han estado conmigo desde que tengo 17 años y no podría pedir mejores amigos; siempre han estado y estoy segura de que siempre estarán, así como yo estaré para ellos. Gracias a Santiago, porque ha sido una de las personas que más me ha sostenido en estos últimos meses, que siempre tiene las palabras correctas para hacerme sentirme tan importante y capaz como sé que soy, y que es un lugar seguro para mí.

Este éxito es compartido, con todos ustedes, los amo mucho.

Resumen	4
1. Introducción	6
2. Marco teórico	8
2.1 Importancia de las asociaciones micorrícicas	8
2.2 Ecología y fisiología de la simbiosis ectomicorrícica	9
2.3 Genética y desarrollo de la simbiosis ectomicorrícica	11
2.3.1 Péptidos efectores en el desarrollo de la simbiosis	12
2.3.2 <i>Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins</i> (MiSSP).....	12
2.3.3 Predicción de péptidos efectores.....	14
3. Antecedentes y modelo de estudio	15
3.1 <i>Laccaria</i> Berkeley & Broome 1883.....	15
3.2 <i>Laccaria trichodermophora</i> Mueller 1984	16
3.3 Variación intraespecífica en <i>Laccaria</i>	17
3.3.1 Variación intraespecífica en <i>Laccaria trichodermophora</i>	17
3.4 Péptidos efectores en la simbiosis con <i>Laccaria trichodermophora</i>	18
4. Justificación	18
5. Preguntas de investigación	19
6. Objetivos	19
7. Hipótesis.....	20
8. Métodos.....	20
8.1 Diseño metodológico	20
8.2 Ensamblajes genómicos y archivos de aminoácidos analizados.....	21
8.2.1 Evaluación de calidad de los ensamblajes genómicos	23
8.2.2 Búsqueda de MiSSP mediante BLAST	24
8.2.3 Predicción y anotación de potenciales MiSSP.....	25
8.2.4 Evaluación de la eficiencia de los protocolos analíticos	28
8.2.5 Evaluación del efecto de los protocolos de predicción de genes	29
9. Resultados.....	29
9.1 Calidad de los ensamblajes genómicos de <i>Laccaria</i>	29
9.2 Las MiSSP de <i>Laccaria bicolor</i> S238N en genomas de <i>Laccaria</i>	30
9.3 Predicción de péptidos efectores del género <i>Laccaria</i>	32
9.3.1 Predicción de péptidos efectores en <i>Laccaria trichodermophora</i>	38
9.4 Evaluación de la eficiencia de los protocolos utilizados.....	39
9.5 Evaluación del efecto de los protocolos de predicción de genes	40
10. Discusión	43
11. Conclusiones	48
12. Referencias.....	48
13. Apéndices	61

Resumen

La simbiosis ectomicorrícica es muy relevante en los ecosistemas forestales y puede ser aprovechada para la reforestación y/o restauración de los mismos. El establecimiento y desarrollo de la simbiosis están mediados por la actividad funcional de genes que codifican para moléculas involucradas en la interacción, como las MiSSP (proteínas secretadas pequeñas inducidas por micorrizas, por sus iniciales en inglés *Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins*). Las MiSSP son péptidos efectores específicamente inducidos durante la simbiosis y participan en la formación de la interfaz simbiótica apoplástica. Para *Laccaria*, un género de hongos ectomicorrícicos, las MiSSP corresponden a la mayor parte de los productos génicos transcritos durante el establecimiento de la simbiosis. En el presente estudio se predijeron y cuantificaron las MiSSP potenciales de cuatro cepas de *Laccaria trichodermophora*, una especie de importancia ecológica y sociocultural en México. Se emplearon dos protocolos (protocolos 1 y 2) de predicción bioinformática basados en características estructurales y de localización sub-celular de los péptidos de interés. La eficiencia de dichos protocolos fue evaluada con el genoma de *Laccaria bicolor*, especie para la que se tienen MiSSP caracterizadas experimentalmente. Ambos protocolos tuvieron una eficiencia similar en su capacidad predictiva de las MiSSP reportadas para *L. bicolor*. Sin embargo, el protocolo 1 fue más eficiente para predecir péptidos apoplásticos, mientras que el protocolo 2 lo fue para péptidos nucleares. La cantidad de MiSSP predichas para *L. trichodermophora* fue menor a la reportada previamente con datos bioinformáticos. Esto se debe a que en este trabajo incluimos más criterios estructurales (ausencia de dominios transmembranales) y de localización sub-celular (en retículo endoplasmático, núcleo y apoplasto) para la predicción de péptidos efectores, por lo que estas predicciones son potencialmente más precisas. Los dos protocolos utilizados permitieron identificar MiSSP de diferentes características y localizaciones sub-celulares, por lo cual es recomendable utilizar ambos para la detección de estos péptidos. La variabilidad intraespecífica encontrada para estos péptidos puede estar relacionada con el desarrollo de la simbiosis de este hongo ectomicorrícico, particularmente en aspectos de la colonización y la forma de interactuar con sus hospederos.

Abstract

Ectomycorrhizal symbiosis is very relevant in forest ecosystems and can be used for their reforestation and/or restoration. The establishment and development of symbiosis are mediated by the functional activity of genes that code for molecules involved in the interaction, such as MiSSPs (*Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins*). MiSSPs are effector peptides specifically induced during symbiosis that participate in the formation of the apoplastic symbiotic interface. For *Laccaria*, a genus of ectomycorrhizal fungi, MiSSPs correspond to most of the gene products transcribed during the establishment of symbiosis. In the present study, the potential MiSSPs of four strains of *Laccaria trichodermophora*, a species of ecological and sociocultural importance in Mexico, were predicted and quantified. Two bioinformatics prediction protocols (protocols 1 and 2) based on structural characteristics and subcellular localization of the peptides of interest were used. The efficiency of these protocols was evaluated with the genome of *Laccaria bicolor*, a species for which MiSSPs have been experimentally characterized. Both protocols had similar efficiency in their predictive ability of the reported MiSSPs for *L. bicolor*. However, protocol 1 was more efficient for predicting apoplastic peptides, whereas protocol 2 was more efficient for nuclear peptides. The number of MiSSPs predicted for *L. trichodermophora* was lower than the previously reported with bioinformatics data. This is because in this work we include more structural (absence of transmembrane domains) and sub-cellular localization criteria (in endoplasmic reticulum, nucleus and apoplast) for the prediction of effector peptides, so these predictions are potentially more accurate. The two protocols used allowed the identification of MiSSPs with different characteristics and sub-cellular locations, so it is advisable to use both for the detection of these peptides. The intraspecific variability found for these peptides may be related to the development of the symbiosis of this ectomycorrhizal fungus, particularly in aspects of colonization and the way they interact with their hosts.

1. Introducción

La simbiosis ectomicorrízica (ECM) es una de las asociaciones mutualistas más prominente y ecológicamente importantes en los ecosistemas forestales, especialmente en los bosques templados y boreales (Nehls 2008; Mello y Ballestrini 2018). Se trata de asociaciones formadas entre las raíces cortas y absorbentes de las plantas terrestres y algunos hongos del suelo, que resultan en la formación de un órgano híbrido llamado ectomicorriza (Felten *et al.* 2009; Kottke y Oberwinkler 1987). En estas raíces modificadas las hifas de los hongos rodean su superficie (Gea *et al.* 1994), creciendo entre las células epidérmicas y corticales de la planta sin penetrarlas (Tschaplinski *et al.* 2014; Balestrini y Kottke 2016). Se estima que esta interacción ocurre en cerca del 2% de las especies de plantas terrestres (Brundett y Tedersoo 2018). En este tipo de asociación se ven involucradas especies de plantas de las familias Betulaceae, Fagaceae, Pinaceae, Salicaceae, Myrtaceae, Nothofagaceae y Dipterocarpaceae, entre otras (Sánchez-Ramírez *et al.* 2017), así como algunos hongos pertenecientes a las cuatro divisiones: Basidiomycota, Ascomycota y Mucoromycota (Brundett y Tedersoo 2018).

El establecimiento y desarrollo de la ECM están mediados por un sistema complejo de comunicación química entre las plantas y los hongos, así como por la actividad funcional de varias redes de genes, lo que ha sido demostrado para sistemas modelo, como la asociación entre *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton y árboles del género *Populus* spp. (Larsen *et al.* 2016; Martin *et al.* 2016), *Hebeloma cylindrosporum* y *Pinus* spp. (Marmeisse *et al.* 2004; Doré *et al.* 2015), *Tuber melanosporum* y *Corylus* spp. (Ceccaroli *et al.* 2010; Montanini *et al.* 2010) y *Pisolithus* spp. y *Eucalyptus* spp. (Duplessis *et al.* 2005). De entre los genes expresados durante la ECM, del 7 al 38% corresponden a genes específicos de cada linaje; es decir, restringidos a especies particulares de hongos que forman micorrizas (Kohler *et al.* 2015). Por esta razón, uno de los objetivos en el estudio de esta interacción es la identificación de genes comunes a todas las especies de hongos en la ECM, también llamados “genes simbióticos” (Kuo *et al.* 2014).

La secuenciación y análisis de genomas completos de hongos ectomicorrízicos son importantes para estudios bioquímicos, genéticos y transcriptómicos que permitan dilucidar los mecanismos del establecimiento, mantenimiento y funcionamiento de esta asociación (Kuo *et al.* 2014; Daguerre *et al.* 2017). Mediante secuenciación y análisis

de genomas completos se descubrió que los hongos simbióticos de plantas secretan numerosas proteínas efectoras cuya función específica no ha sido descrita (Plett y Martin 2011; Grigoriev *et al.* 2014; Stotz *et al.* 2014), pero que sin duda están involucradas en el establecimiento, mantenimiento y funcionamiento de la simbiosis. La caracterización del secretoma de los hongos ectomicorrícicos es un requisito previo para la identificación y caracterización de estas proteínas extracelulares (Doré *et al.* 2015), así como de los “genes simbióticos” que las codifican.

Las proteínas extracelulares en su conjunto constituyen al secretoma fúngico (Girard *et al.* 2013). Éste, se compone de numerosas categorías de proteínas, entre las que se incluyen las denominadas *Small Effector-like Secreted Proteins* (SSP) (Alfaro *et al.* 2014). Las SSP han mostrado ser fundamentales para el establecimiento de la ECM (Martin *et al.* 2008; Martin y Kamoun 2011; van Ooij 2011; Plett y Martin 2011, 2015; Plett *et al.* 2011, 2014, 2015; Raudaskoski y Kothe 2015), pues posibilitan el diálogo molecular entre los hongos ectomicorrícicos y sus plantas hospederas (Kloppholz *et al.* 2011; Giraldo y Valent 2013; Rovenich *et al.* 2014; Lo Presti *et al.* 2015). Varios de los genes codificantes de SSP son inducidos específicamente durante la interacción simbiótica, por lo que sus productos proteicos son denominados *Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins* (MiSSP) (Martin *et al.* 2008; Pellegrin *et al.* 2015). La síntesis de MiSSP está regulada por la identidad de la planta hospedera y por señales ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes y el tipo de sustrato (Plett *et al.* 2014; Doré *et al.* 2015). Además, estas proteínas promueven la formación de una nueva interfaz apoplástica entre la planta y su simbionte fúngico, de modo que promueven el establecimiento y desarrollo de la interacción (Veneault-Fourrey y Martin 2011). Aunque las SSP más numerosas conocidas pertenecen a hongos patógenos (Stahl y Bishop 2000; Fouché *et al.* 2018), también se han detectado SSP en hongos ectomicorrícicos (Martin *et al.* 2008).

Laccaria bicolor es un hongo ectomicorrízico capaz de colonizar plantas tanto de linajes de angiospermas como de gimnospermas (Wallenda y Kottke 1998) y ha sido empleado como modelo para estudiar la respuesta transcripcional de los hongos ectomicorrícicos frente a diferentes tipos de hospederos (Plett *et al.* 2015). A raíz de esto se ha comprobado que para este hongo la identidad de la cepa determina las diferencias tanto en crecimiento micelial *in vitro* como en el desempeño de las plantas inoculadas (Hazard *et al.* 2017a, b).

Laccaria trichodermophora Mueller 1984, es un hongo silvestre comestible de importancia ecológica y sociocultural en México, donde se asocia con pinos jóvenes en las montañas del Eje Neovolcánico Transversal (Montoya *et al.* 2004). Se le considera una especie especialista porque dentro de su rango de distribución tiene como principales hospederos a representantes jóvenes del género *Pinus* (Mueller y Strack 1992). En nuestro grupo de investigación se demostró experimentalmente que las diferentes cepas de *L. trichodermophora* presentan una capacidad distinta de colonización de las raíces hospederas (Flores-Almaraz 2020). Asimismo, los datos genómicos de *L. trichodermophora* indican que existe variación intraespecífica en su contenido genómico de péptidos efectores (Ángeles-Argáiz 2022).

La presente tesis se enfoca en predecir y cuantificar las MiSSP de *L. trichodermophora*. Asimismo, aporta información para estudiar la relación entre el contenido genómico de MiSSP y la variabilidad intraespecífica de la especie en términos del desarrollo de su simbiosis; particularmente en cuanto a su capacidad de colonización y preferencia por el hospedero.

2. Marco teórico

2.1 Importancia de las asociaciones micorrícicas

En los ecosistemas forestales las raíces de los árboles se encuentran en contacto con comunidades microbianas del suelo, con cuyos integrantes pueden establecer relaciones mutualistas, comensales o patógenas. Estas comunidades intervienen en el intercambio y reciclaje de nutrientes en el suelo (particularmente C, N y P), por lo que tienen impacto en su fertilidad (Chaparro *et al.* 2012; Lakshmanan *et al.* 2014) y en el almacenamiento de carbono (Schimel y Schaeffer 2012). Los hongos son elementos clave de estas comunidades y muestran un amplio rango de interacciones con las plantas. Pueden ser degradadores de madera, descomponedores saprobios del suelo, fitopatógenos y mutualistas (Bonfante y Genre 2010; Veneault-Fourrey y Martin 2011).

Entre las asociaciones mutualistas se encuentran las micorrizas, formadas entre hongos habitantes del suelo y las raíces de las plantas terrestres. Se estima que entre el 90 y el 95% de las familias de plantas terrestres (86% de las especies vegetales) presentan micorrizas de forma habitual (Smith y Read 2008; Brundett y Tedersoo 2018). Las asociaciones micorrícicas pueden clasificarse agrupando su diversidad en cuatro categorías: micorrizas arbusculares, ectomicorrizas, micorrizas ericoides y

micorrizas orquidioides (Martin *et al.* 2016; Brundett y Tedersoo 2018). Estas categorías se basan en criterios de diferenciación morfológica de los tejidos de la raíz y en los linajes evolutivos de las plantas hospedadas. Algunas plantas pueden ser colonizadas por más de un tipo de micorriza y diferentes especies de hongos pueden verse involucradas en estas asociaciones (Teste *et al.* 2019). Además, pueden establecer conexiones con otras plantas a través de los hongos asociados a sus raíces (Simard 2018). Estas conexiones forman redes micorrícicas que permiten a sus interactuantes compartir nutrientes y señales químicas, ya sea intra- o inter-específicamente (Simard *et al.* 2012).

La asociación simbiótica con hongos micorrícicos contribuye a la estabilidad y diversidad de los ecosistemas forestales (Simard *et al.* 1997). Además, es indispensable para la nutrición de la mayoría de los árboles y modula la competencia entre ellos, sobre todo considerando que los niveles de nutrientes inorgánicos biodisponibles en los suelos forestales suelen ser bajos para sustentar el crecimiento de las plantas (Martin *et al.* 2016).

2.2 Ecología y fisiología de la simbiosis ectomicorrícica

Los hongos ectomicorrícicos son organismos mutualistas que se encuentran ubicuamente en los suelos forestales y que son capaces de colonizar los tejidos de la raíz para acceder a los nutrientes transportados por la misma (Tschaplinski *et al.* 2014). La colonización por este grupo de hongos genera cambios morfológicos pronunciados tanto en la arquitectura de la raíz como en la célula fúngica, dando como resultado la formación de un órgano híbrido llamado ectomicorriza (Fig. 1) (Kottke y Oberwinkler 1987; Felten *et al.* 2009). Estas puntas de raíz son modificadas por las hifas de los hongos, que rodean su superficie formando una cubierta o manto de tejido fúngico. A partir del manto las hifas ingresan al apoplasto, que es el espacio extracelular periférico a la membrana plasmática de las células de las raíces. Es ahí donde las hifas forman un entramado complejo entre las células de la planta y del hongo, denominado red de Hartig (Fig. 1) (Gea *et al.* 1994). Las hifas que comprenden esta red crecen entre las células epidérmicas y corticales de la planta sin penetrar al interior de estas (Tschaplinski *et al.* 2014; Balestrini y Kottke 2016). Además, forman un sistema de hifas que crecen del manto hacia el exterior, explorando el suelo, llamado micelio extraradical (Fig. 1) (Smith y Read 2008; Mello y Balestrini 2018).

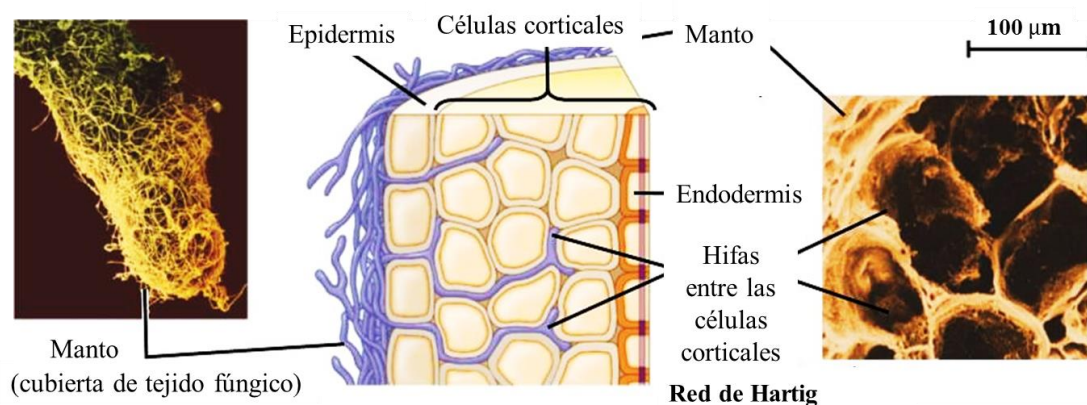


Figura 1. Representación gráfica e imágenes de microscopía electrónica de barrido de una ectomicorriza. Se observan las hifas que conforman al manto, al micelio extraradical y a la red de Hartig (modificado de Atrebe 2013).

Ambos participantes de la interacción se benefician mediante el intercambio de nutrientes que se da a través de la superficie de la interfaz planta-hongo al interior de la red de Hartig (Hobbie *et al.* 2005; Tschaplinski *et al.* 2014). El árbol suministra al hongo ectomicorrícico hasta el 30% de los carbohidratos derivados de la fotosíntesis a cambio de hasta el 70% de sus requerimientos de N y P (Nehls 2008; Smith y Read 2008; Martin y Nehls 2009; Mello y Ballestrini 2018). Así, en esta asociación se da un intercambio constante de nutrientes y señales químicas, lo cual optimiza el crecimiento de ambos interactuantes y la salud de los árboles al mejorar su nutrición mineral, fortalecer sus defensas (Wallander *et al.* 2001; Franklin *et al.* 2014), facilitar la captación de agua y de otros nutrientes de baja disponibilidad (Plassard y Dell 2010), así como incrementar su tolerancia a la desecación (Lehto y Zwiazek 2011) y a altas concentraciones de metales pesados (Luo *et al.* 2014).

Aunque la gran mayoría de los hongos ectomicorrícicos forman estructuras simbióticas similares e intercambian los mismos nutrientes con sus hospederos, su diversidad fenotípica es amplia. Por ejemplo, hay mucha variación en cuanto a la morfología, anatomía, fisiología, rango de especies hospederas, beneficio nutricional, especialización ecológica y características de crecimiento (Brundett 2002; Peterson y Massicotte 2004; Smith y Read 2008; Clemmensen *et al.* 2015; van Der Heijden *et al.* 2015). Esta variabilidad fenotípica se explica en parte por la evolución independiente y en numerosas ocasiones de las ectomicorrizas, tanto en plantas (más de 18 veces en angiospermas; Koele *et al.* 2012) como en hongos (78–82 veces; Tedersoo y Smith

2017) y, está íntimamente ligada con la forma en que cada especie de hongo ectomicorrícico establece y mantiene sus interacciones simbióticas (Hibbett *et al.* 2000; Martin *et al.* 2016; Tedersoo y Smith 2017; Miyauchi *et al.* 2020).

2.3 Genética y desarrollo de la simbiosis ectomicorrícica

Típicamente, la formación de la ECM involucra cuatro pasos fundamentales: i) el reconocimiento del simbionte mediante el intercambio pre-simbiótico de señales difusibles y volátiles; ii) la adhesión inicial del simbionte a las células vegetales y la evasión de las defensas de la planta, iii) la agregación o crecimiento hacia el interior de las células vegetales o entre ellas y, finalmente, iv) un intercambio de nutrientes entre los dos organismos (Plett *et al.* 2015; Plett y Martin 2018). Cada uno de estos pasos involucra numerosas vías de señalización en las que la pérdida o alteración de cualquiera de las señales involucradas, puede impedir o bloquear la simbiosis (Plett y Martin 2018). Este complejo sistema de comunicación química entre la planta y el hongo está mediado por la actividad funcional de varias redes de genes (Marmeisse *et al.* 2004; Duplessis *et al.* 2005; Ceccaroli *et al.* 2010; Montanini *et al.* 2010; Doré *et al.* 2015; Larsen *et al.* 2016; Martin *et al.* 2016), lo que ha sido demostrado para asociaciones que son usadas como modelos de estudio (p. ej. *Laccaria bicolor* y árboles del género *Populus* spp., *Hebeloma cylindrosporum* y *Pinus* spp., *Tuber melanosporum* y *Corylus* spp., *Pisolithus* spp. y *Eucalyptus* spp.).

Aunque los genes pertenecientes a las categorías funcionales que controlan el procesamiento de información, el metabolismo, las reacciones de óxido-reducción (REDOX) y el almacenamiento y transporte de nutrientes están regulados positivamente en todas las interacciones ectomicorrícicas estudiadas hasta ahora (Kohler *et al.* 2015), cada especie de hongo ectomicorrícico expresa un conjunto distinto de genes asociados a simbiosis, involucrados en dichos procesos (Martin *et al.* 2016). Una gran proporción de estos genes están presentes como ortólogos en los genomas de hongos de pudrición café y blanca. Es decir, algunos genes de hongos de vida libre cumplen funciones simbióticas en los hongos ectomicorrícicos, lo que sugiere que pueden asociarse con vías metabólicas esenciales (Martin *et al.* 2016).

2.3.1 Péptidos efectores en el desarrollo de la simbiosis

El secretoma fúngico se compone de numerosas categorías de proteínas que incluyen lipasas, proteasas, *Carbohydrate-Active enZymes* (enzimas CAZ), SSP y proteínas de función desconocida (Alfaro *et al.* 2014). Las enzimas CAZymes, proteasas y lipasas son enzimas que participan en la degradación de moléculas complejas (p. ej. lignocelulosa y proteínas) y participan en la adquisición de nutrientes a partir de biomasa viva o muerta (Baldrian *et al.* 2011; Eastwood *et al.* 2011; Zhao *et al.* 2014). Otras proteínas secretadas, como las lectinas, carecen de actividad catalítica y su función es dar especificidad por el sustrato (Giollant *et al.* 1993; Peumans y van Damme 1995) desempeñando un papel importante en las interacciones entre el hongo y su planta hospedera (Hentschel *et al.* 2000; Rep 2005; Boller y Felix 2009; Downie 2010). Algunas proteínas tienen función de adhesión a superficies, como en el caso de las hidrofobinas (Talbot *et al.* 1996; Tucker y Talbot 2001; Linder *et al.* 2005; Aimaniananda *et al.* 2009); otras, como las proteínas de unión a quitina, protegen al hongo de las defensas de las plantas y pueden constituir objetivos para la detección temprana de patógenos (van den Burg *et al.* 2006; Kamoun 2006; Ellis *et al.* 2009; Stergiopoulos y de Wit 2009; Kale 2012; Stotz *et al.* 2014). La mayoría de las proteínas secretadas al espacio extracelular siguen una ruta predeterminada que implica su paso por el retículo endoplasmático (RE), desde donde son conducidas al complejo de Golgi, específicamente a la región cis-Golgi y a la red trans-Golgi, en donde son maduras y internalizadas en vesículas de secreción que se fusionan con la membrana plasmática (ver **Apéndice A**) (Viotti 2016; Owji *et al.* 2018). El destino, la ruta de transporte y la eficiencia de secreción de estas proteínas depende de la presencia de péptidos cortos en sus extremos N-terminal, denominados péptidos señal (SP) (Owji *et al.* 2018).

2.3.2 *Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins* (MiSSP)

Las SSP son proteínas importantes en la comunicación molecular entre los hongos ectomicorrícicos y sus plantas hospederas (Kloppholz *et al.* 2011; Giraldo y Valent 2013; Rovenich *et al.* 2014; Lo Presti *et al.* 2015). Gradualmente fueron asociadas con el término efector, que las define como “moléculas secretadas por plagas o microorganismos que alteran los procesos o estructuras de las células del hospedero y que, en general, promueven el estilo de vida de los microorganismos” (Win *et al.* 2012). Varios de los genes codificadores de SSP son inducidos específicamente durante la

interacción y juegan un papel importante en el establecimiento de esta, por lo que sus productos proteicos son denominados MiSSP (por sus iniciales en inglés *Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins*) (Martin *et al.* 2008; Pellegrin *et al.* 2015). Las MiSSP son proteínas efectoras pequeñas (de menos de 300 aminoácidos) con un péptido señal, que pueden translocarse en compartimentos específicos de las células hospederas (Plett *et al.* 2011) o residir en la interfaz simbiótica (Pellegrin *et al.* 2019). Estas proteínas corresponden a los productos proteicos codificados por el 8–28% de los genes que son expresados preferencialmente durante la simbiosis (Kloppholz *et al.* 2011; Giraldo y Valent 2013; Rovenich *et al.* 2014; Lo Presti *et al.* 2015; Martin *et al.* 2016). La síntesis de MiSSP en el hongo está regulada por la identidad de la planta hospedera (Plett *et al.* 2014; Doré *et al.* 2015) y, aunque sus funciones aún se están determinando, se presume que las MiSSP regulan la expresión de algunas de las proteínas del hospedero y/o que actúan sobre vías de señalización de la hormona del crecimiento, reestructurando así la raíz y las células del hospedero (tanto anatómica como transcripcionalmente), lo que contribuye a construir una nueva interfaz simbiótica apoplástica (Veneault-Fourrey y Martin 2011).

La secuenciación del genoma completo del hongo ectomicorrícico *Laccaria bicolor* facilitó la identificación de moléculas involucradas en la interacción ectomicorrícica (Martin y Selosse 2008; Kuo *et al.* 2014). En el genoma de este hongo se identificaron genes que codifican para más de 2,900 proteínas secretadas, de las cuales el 10% corresponden a SSP (Martin *et al.* 2008). Además, su perfil de transcripción mostró que más de 50 genes codifican para MiSSP (Martin *et al.* 2008). De entre las MiSSP para las que codifican algunos genes de *L. bicolor* sólo tres han sido descritas como efectores en la interacción ectomicorrícica y caracterizadas funcionalmente: MiSSP7 (Plett *et al.* 2011, 2014), MISSP7.6 (Kang *et al.* 2020) y MiSSP8 (Pellegrin *et al.* 2019). La MiSSP7 interactúa con la vía de señalización mediada por ácido jasmónico, de manera que bloquea las respuestas de defensa de la planta y permite la penetración del hongo al espacio intercelular de las células corticales (Plett *et al.* 2014). La MiSSP7.6 es secretada en la interfaz simbiótica, donde se une a los reguladores de Trihelix en los núcleos de las células vegetales y regula la expresión de los genes de respuesta inmune del hospedero (Kang *et al.* 2020). Finalmente, la MiSSP8 está relacionada con los primeros pasos de la colonización y regula la agregación de hifas, influyendo así en la formación del manto y la red de Hartig

(Pellegrin *et al.* 2019); sin embargo, a diferencia de las MiSSP 7 y 7.6, está en discusión si puede ser considerada una proteína efectora debido a que no altera directamente procesos ni estructuras de las células vegetales (Win *et al.* 2012).

2.3.3 Predicción de péptidos efectores

Los criterios fundamentales para ajustarse a la definición de proteínas efectoras secretadas incluyen: (a) un péptido señal N-terminal; (b) la ausencia de dominios transmembranales; (c) ausencia de sitios de anclaje de glicosil fosfatidil inositol (GPI); (d) ausencia de señales de localización prevista para dirigir la proteína a las mitocondrias u otros organelos intracelulares y (e) un tamaño pequeño (menor a 300 aminoácidos) (Jones y Dangl 2006; Stergiopoulos y de Wit 2009; Djamei *et al.* 2011; Lo Presti *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2018). Adicionalmente, las MiSSP pueden ser secretadas al interior de la célula vegetal o al apoplasto (Veneault-Fourrey y Martin 2011).

Existen herramientas computacionales que combinan algoritmos para la predicción de estas características con base en la secuencia de aminoácidos de las proteínas y que, por lo tanto, podrían ser útiles para la predicción de las proteínas efectoras secretadas (Min 2010). Sin embargo, hay características adicionales que deberían considerarse para hacer predicciones más precisas. Las proteínas que tienen péptidos señal no se secretan sistemáticamente, ya que algunas de ellas pueden estar ancladas en el RE debido a la señal hidrófoba en el extremo C terminal o a la presencia de uno o más dominios transmembranales (TM). De manera similar, las proteínas con anclas de GPI permanecen insertadas en la membrana, ya que tienen glicolípidos adheridos al extremo C-terminal (Petersen *et al.* 2011). Por lo tanto, para un mejor análisis del secretoma y, en particular de las proteínas efectoras secretadas, es necesario incluir en los algoritmos el reconocimiento de señales de anclaje a membrana, anclajes de GPI, péptidos de tránsito de plástidos, péptidos señal y dominios TM (Sonah *et al.* 2016). Para aplicar diferentes criterios específicos a dichas proteínas, se debe utilizar varias herramientas computacionales de manera sistemática. El uso secuencial de diferentes herramientas para obtener el resultado deseado se conoce como *pipeline* o protocolo analítico y la literatura ofrece una amplia gama de ellos para la identificación de proteínas efectoras secretadas (Min 2010; Sonah *et al.* 2016).

Existen protocolos específicos para hongos, así como estudios de validación de estas herramientas que recomiendan su uso en ciertas combinaciones. Por ejemplo, para la predicción de péptidos señal, Min (2010) señala que utilizar la herramienta predictora de localización sub-celular de proteínas WolfPsort (Horton *et al.* 2007; <https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) en conjunto con TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) para predecir la topología de las proteínas, o bien de SignalP (v4.0 Petersen *et al.* 2011) que predice la presencia de péptidos señal, junto con TMHMM, lleva a resultados de mayor precisión. Constantemente se actualizan los algoritmos y programas para la predicción de SSP, por lo que incluir los métodos y versiones más actuales permite obtener resultados más robustos (p. ej. OutCyte; Zhao *et al.* 2019).

3. Antecedentes y modelo de estudio

3.1 *Laccaria* Berkeley & Broome 1883

Laccaria Berkeley & Broome 1883 (Agaricales, Hydnangiaceae) es un género de hongos con un rango de distribución amplio que forma asociaciones ectomicorrícicas con numerosas especies de árboles alrededor del mundo, muchos de ellos de importancia económica (Kropp y Mueller 1999). Se han inferido 116 especies en 30 países con un criterio filogenético (Wilson *et al.* 2017). En México los reportes de diversidad incluyen alrededor de 17 especies (Ramos *et al.* 2017).

El género *Laccaria* es considerado generalista debido a su amplia distribución y cantidad de hospederos (Mueller y Strack 1992; Brun *et al.* 1994; Osmundson *et al.* 2005; Finlay 2008; Wilson *et al.* 2017). Sin embargo, está integrado por especies generalistas (*L. bicolor*, *L. laccata* y *L. amethystina*), restringidas a las angiospermas (*L. ochropurpurea* y *L. calospora*), y restringidas a las gimnospermas (*L. vinaceobrunea* y *L. trichodermophora*) (Wilson *et al.* 2017).

Algunas especies de *Laccaria* (p. ej. *L. bicolor*, *L. laccata* y *L. proxima*) han sido utilizadas como especies modelo en el estudio de la simbiosis ectomicorrícica (Trappe 1977; Pera y Parladé 2005; Quoreshi *et al.* 2008; Khasa *et al.* 2009; Wadud *et al.* 2008, 2014), y para inocular diferentes géneros de árboles (i.e. *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Betula*, *Quercus*, entre otros) con fines de reforestación (Gibson y Deacon 1988; Mortier *et al.* 1988; Dixon y Johnson 1992; Onwuchekwa *et al.* 2014; Parladé y Álvarez 1993; Sudhakara y Natarajan 1997; Zadworny *et al.* 2004). Aunque la mayoría de las

especies del género se consideran buenas candidatas para la micorrización (Molina *et al.* 1992; Kropp y Mueller 1999; Perea-Estrada *et al.* 2009; Wilson *et al.* 2017), no hay evidencia suficiente para establecer patrones generales, incluso para un linaje particular.

3.2 *Laccaria trichodermophora* Mueller 1984

Laccaria trichodermophora Mueller 1984 es un hongo silvestre comestible que fructifica durante toda la temporada de lluvias (Montoya *et al.* 2004; Carrasco-Hernández *et al.* 2010), y cuya característica morfológica principal es el arreglo perpendicular de las hifas de la cutícula, conocida como tricodermo (Mueller 1984; Osmundson 2003) (Fig. 2).



Figura 2. Esporomas de *Laccaria trichodermophora* en La Malinche, Tlaxcala. Fotografía: Ramírez-Terrazo y Ángeles-Argáiz (Ángeles-Argáiz 2022).

Se distribuye en el sureste de Estados Unidos y México y ha sido introducida a Centro- y Sudamérica (Mueller y Strack 1992; Kropp y Mueller 1999). En México se ha reportado en la Faja Volcánica Transmexicana, en un rango altitudinal de los 3,000 a los 4,000 msnm, principalmente asociada a individuos de las especies *Pinus montezumae* y *P. hartwegii* (Pérez-Silva *et al.* 2011; Montoya *et al.* 2014; Galindo-Flores *et al.* 2015; Pacheco-Cobos *et al.* 2015; GBIF Secretariat 2017a, b; Ramos 2018; Quintero-Corrales *et al.* 2020), con las cuales se ha comprobado su asociación *in vitro*

(Galindo-Flores *et al.* 2015; López-Gutiérrez *et al.* 2018; Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019; Flores-Almaraz 2020). También se le ha encontrado fuera de su área de distribución natural asociada con *Quercus* tropicales en Costa Rica y Colombia cerca de plantaciones de pino (Mueller y Strack 1992) y, excepcionalmente, en bosques de *Fagus* en México (Ramos *et al.* 2017). Aunado a su valor sociocultural por ser un hongo comestible, su preferencia por pinos jóvenes como hospederos, sus adaptaciones fisiológicas a suelos pobres en nutrientes y su abundante producción de esporomas lo hacen una especie valiosa a nivel ecológico y un bioinoculante potencial en programas de reforestación de pinos (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020).

3.3 Variación intraespecífica en *Laccaria*

Como es lo esperado, dentro del género *Laccaria* se ha reportado variación genética interespecífica e intraespecífica. Por ejemplo, al comparar los genomas de *L. bicolor* y *L. amethystina* (Kholer *et al.* 2015), y estudiar distintas cepas de *L. bicolor* (Plett *et al.* 2012). Además, se ha comprobado que la identidad de la cepa de *L. bicolor* es determinante en aspectos como su crecimiento micelial *in vitro* y el desempeño de las plantas inoculadas con este hongo (Di Battista *et al.* 1996); e incluso se reportó variación en la composición de sus genes codificantes de hidrofobinas (Plett *et al.* 2012). Esto corresponde con el conocimiento clásico referente a la importancia de la identidad de la cepa en el fenotipo de prácticamente cualquier especie microbiana, exceptuando al de las clonas dentro de la especie (Hazard *et al.* 2017a, b).

Además de lo reportado para *Laccaria*, la variación genética intraespecífica detectada en otros géneros de hongos ectomicorrícicos, como *Amanita*, *Hebeloma* y *Pisolithus*, impacta en su capacidad para obtener N de fuentes orgánicas (Sawyer *et al.* 2003; Guidot *et al.* 2005) o para colonizar e interactuar con sus hospederos (Plett *et al.* 2015; Hazard *et al.* 2017a; Hortal *et al.* 2017). Por lo tanto, es necesario profundizar en la investigación de las diferencias intraespecíficas, en particular a nivel de los genes involucrados en la ECM (Plett *et al.* 2020), ya sea en términos de su variación alélica o de su presencia en el genoma fúngico.

3.3.1 Variabilidad intraespecífica en *Laccaria trichodermophora*

Los ensayos experimentales con diferentes cepas de *L. trichodermophora* han demostrado que existen diferencias intraespecíficas en cuanto a su capacidad de

colonización de raíces (Flores-Almaraz 2020). De las cuatro cepas estudiadas, sólo *L. trichodermorphora* CA15-F10 desarrolló ectomicorrizas maduras y abundantes. Dichas diferencias podrían deberse a las condiciones lumínicas (Trocha *et al.* 2016), el tiempo de desarrollo de la interacción, el mantenimiento y subcultivo de los hongos ectomicorrícicos *in vitro* (Thomson *et al.* 1993; Di Battista *et al.* 1996), el tipo de inóculo utilizado, la cantidad de biomasa producida por los hongos ectomicorrícicos (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020) y el origen geográfico de los simbiontes (Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019). Sin embargo, también podrían estar influenciadas por el contenido de genes relevantes para el establecimiento y mantenimiento de la interacción (Hedh *et al.* 2009; Ángeles-Argáiz 2022).

3.4 Péptidos efectores en la simbiosis con *Laccaria trichodermorphora*

La secuenciación del genoma completo de *L. bicolor* facilitó la identificación de proteínas efectoras (Martin y Selosse 2008; Kuo *et al.* 2014). Los datos genómicos más recientes señalan que dentro del género *Laccaria* se codifican alrededor de 367 SSP (Ángeles-Argáiz 2022). Por su parte, los datos genómicos de *L. trichodermorphora* indican que existe diversidad intraespecífica en el contenido de péptidos efectores (Ángeles-Argáiz 2022). Los genomas de las cuatro cepas de *L. trichodermorphora* analizadas hasta ahora codifican entre 595 y 1,730 proteínas secretadas (SP), de las cuáles entre 130 y 252 fueron predichas como péptidos efectores y, de éstos, entre 58 y 121 no se localizan en el apoplasto. Estos últimos podrían ser secretados al interior de la célula vegetal (Ángeles-Argáiz 2022) y tratarse de MiSSP potenciales. La mayoría de los péptidos efectores no apoplásticos corresponden a genes exclusivos entre cada una de las cuatro cepas estudiadas. La cepa CA15-F10 contiene el mayor número de péptidos efectores no apoplásticos únicos (56) y la cepa EF-36 el menor (21) (Ángeles-Argáiz 2022). No se identificó relación entre el contenido genómico general de SSP y la capacidad colonizadora de las cepas de *L. trichodermorphora*; por lo que la identidad de las SSP, más que su cantidad, podría influir en dicha capacidad (Flores-Almaraz 2020).

4. Justificación

La simbiosis ectomicorrícica es de gran importancia en los ecosistemas forestales e influye en la diversidad y estabilidad de estos, así como en la salud, productividad y

sostenibilidad de los bosques. Esta asociación puede ser utilizada en la reforestación y/o restauración de los ecosistemas forestales. Debido a que parte de la variación intraespecífica de los hongos ectomicorrícicos, en términos del desarrollo de la simbiosis (i.e. capacidad colonizadora e interacción del hongo con distintos hospederos), está relacionada con el contenido genómico de moléculas involucradas en la interacción, es importante estudiar la abundancia e identidad de este tipo de moléculas en estos hongos. Algunas de estas moléculas son las MiSSP, pequeñas proteínas secretadas que ejercen un efecto sobre los hospederos, inducidas específicamente durante la interacción. En el presente estudio se predijeron y cuantificaron las MiSSP de *L. trichodermophora* usando herramientas bioinformáticas. Las predicciones son relevantes para la identificación de los genes simbióticos que codifican para estas proteínas, para el estudio de las relaciones de homología entre dichas proteínas, así como para la identificación de la relación entre la cantidad de MiSSP de *L. trichodermophora* y aspectos del desarrollo de su simbiosis.

5. Preguntas de investigación

1. ¿Es posible predecir eficientemente proteínas MiSSP con base en características específicas de sus secuencias de aminoácidos?
2. ¿Existe variación intraespecífica en el número de MiSSP de *Laccaria trichodermophora* inferidas bioinformáticamente?

6. Objetivos

General

Predecir y cuantificar las proteínas MiSSP potenciales de *Laccaria trichodermophora* usando protocolos bioinformáticos.

Particulares

1. Buscar MiSSP de *L. bicolor*, en los genomas de *L. trichodermophora*, *L. bicolor* y *L. amethystina* mediante alineamientos locales.
2. Generar protocolos específicos para la predicción de MiSSP a partir de su secuencia de aminoácidos y, evaluar su eficiencia con base en su capacidad para identificar MiSSP conocidas.

3. Usar los protocolos generados para determinar la variación de MiSSP predichas bioinformáticamente entre cepas de *L. trichodermorphora*.
4. Evaluar el efecto de utilizar distintos métodos de predicción de genes para la obtención de los archivos de aminoácidos que son utilizados para la predicción de proteínas MiSSP.

7. Hipótesis

Debido a que los protocolos generados predicen características específicas y distintivas de las proteínas efectoras secretadas, estos serán capaces de identificar tanto MiSSP conocidas de *L.bicolor*, como MiSSP potenciales en las cepas de las otras especies de *Laccaria* analizadas. Sin embargo, dado que cada protocolo involucra algoritmos de predicción diferentes, es posible que alguno sea más eficiente para la identificación de MiSSP.

Por otro lado, dada la variación intraespecífica reportada experimentalmente entre cepas de *L. trichodermorphora* y su posible relación con el contenido genómico de moléculas inducidas durante la simbiosis, se espera encontrar variación intraespecífica de las proteínas MiSSP predichas bioinformáticamente entre cepas.

8. Métodos

8.1 Diseño metodológico

Se realizaron los siguientes análisis (Fig. 3) en el orden indicado, con la intención de analizar y utilizar los genomas de *Laccaria* en los protocolos bioinformáticos de predicción, anotación y cuantificación de péptidos, para posteriormente evaluar la eficiencia de dichos protocolos y su posible relación con características (p. ej. calidad) de los genomas empleados.

- a. Evaluación de calidad de los ensamblajes genómicos.
- b. Búsqueda (BLAST) de MiSSP conocidas de *Laccaria* en todos los genomas del género.
- c. Predicción, anotación y cuantificación de MiSSP potenciales.
- d. Evaluación de la eficiencia de los protocolos analíticos.
- e. Evaluación del efecto de los protocolos de predicción de genes en la predicción de MiSSP potenciales.

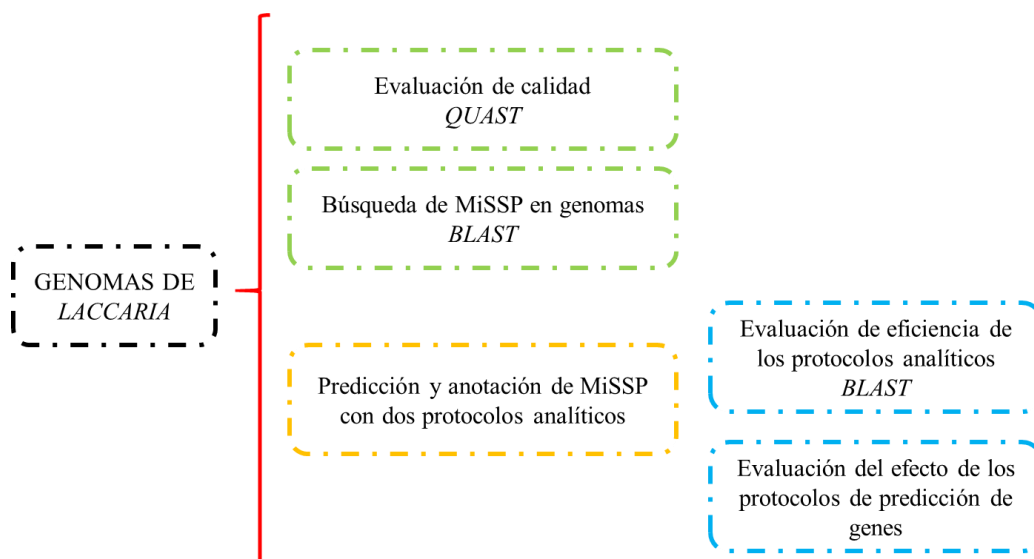


Figura 3. Diagrama general del diseño metodológico. Se presentan enmarcados en color verde los análisis realizados con genomas de *Laccaria* (ensambles genómicos y/o archivos de secuencias de aminoácidos), en color amarillo los que se realizaron a los archivos de secuencias de aminoácidos, y en color azul aquellos que se realizaron sobre los resultados de los protocolos analíticos.

Los códigos creados para la realización de cada análisis pueden encontrarse en el repositorio GitHub (https://github.com/elena-fc/Laccaria_MiSSPs_proyect).

8.2 Ensambles genómicos y archivos de aminoácidos analizados

Se analizaron 21 genomas, que corresponden a 21 cepas de tres especies del género *Laccaria*; dos cepas de *L. amethystina*, 15 cepas de *L. bicolor* y cuatro cepas de *L. trichodermophora* (Tabla 1). Los genomas de *L. trichodermophora* fueron generados por el laboratorio de Sistemática y Ecología de micorrizas del Instituto de Biología de la UNAM, mientras que los de las especies restantes fueron obtenidos de las bases de datos públicas NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y JGI Mycocosm (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>) (Tabla 1).

Tabla 1. Genomas de las cepas de *Laccaria* analizadas con sus respectivas tecnologías de secuenciación, métodos de predicción de genes y parámetros de calidad obtenidos con QUAST tales como N50 que hace referencia a la longitud mínima de un grupo de *contigs* que sumados acumulan el 50% de la longitud total del ensamble, L50 que representa el número de *contigs* correspondiente a N50, el promedio de bases no asignadas (N) por 100 kilopares de bases (kpb), la longitud total del ensamble y su número de *contigs*. Los genomas de *L. trichodermophora* fueron secuenciados y ensamblados por el laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas (Ángeles-Argáiz 2022), los genomas de *L. amethystina* fueron secuenciados y ensamblados por Kohler *et al.* (2015), y los genomas de *L. bicolor* fueron secuenciados y ensamblados por Grigoriev *et al.* 2012 y Nordberg *et al.* 2014, exceptuado el de la cepa v2.0 que lo fue por Martin *et al.* (2008). El genoma de la cepa LaAM-08-1 de *L. amethystina* fue descargado de NCBI bajo el número de acceso GCA_000827195.1 y, el de las restantes especies y cepas lo fueron de JGI Mycocosm.

Especies	Cepas	Tecnología de secuenciación	Longitud total (Mpb)	No. de <i>contigs</i>	N50 (kpb)	L50	N promedio por 100 kpb
<i>L. amethystina</i>	LaAM-08-1	Illumina gDNAs	52.22	4,756	121	111	8641.11
<i>L. amethystina</i>	LaAM-08-1 v2.0	Illumina gDNAs	52.6	1,299	122	112	1940.25
<i>L. bicolor</i>	81306 v1.0	Illumina gDNAs	50.95	946	195	74	4740.79
<i>L. bicolor</i>	CBS 594.89 v1.0	Illumina gDNAs	69.98	4,530	524	299	203.51
<i>L. bicolor</i>	CBS 559.96 v1.0	Illumina gDNAs	43.46	3,721	284	364	364.42
<i>L. bicolor</i>	S238N-H82xH70 v1.0	Illumina gDNAs	42.12	3,788	29	332	962.02
<i>L. bicolor</i>	Cham3 v1.0	Illumina gDNAs	44.65	3,327	325	338	560.86
<i>L. bicolor</i>	D101 v1.0	Illumina gDNAs	70.03	2,920	107	171	3772.59
<i>L. bicolor</i>	DR170 v1.0	Illumina	79.07	1,941	107	185	9614.9
<i>L. bicolor</i>	N203 v1.0	Illumina gDNAs	69.63	1,866	143	109	2517.36
<i>L. bicolor</i>	S238N-H70 v1.0	Illumina gDNAs	57.05	1,564	151	96	2650.58
<i>L. bicolor</i>	S238N v1.0	Illumina gDNAs	67.66	1,577	160	113	11607.61
<i>L. bicolor</i>	S238O v1.0	Illumina gDNAs	57.06	1,370	195	68	4337.48
<i>L. bicolor</i>	S238N-H53 v1.0	Illumina gDNAs	51.78	1,284	157	88	4169.33
<i>L. bicolor</i>	S238N 93-12 v1.1	PacBio	96.43	1,034	237	109	0
<i>L. bicolor</i>	S238N-H82	Illumina gDNAs	64.88	665	785	21	9548.21
<i>L. bicolor</i>	v2.0	Illumina gDNAs	60.71	55	431	5	2021.36
<i>L. trichodermophora</i>	CA15-F10	Illumina MiSeq; Illumina NextSeq	76.04	34,147	4	4809	97.97
<i>L. trichodermophora</i>	CA15-75	Illumina MiSeq; Illumina NextSeq	82.64	29,046	5	3932	140.46
<i>L. trichodermophora</i>	CA15-11	Illumina MiSeq; Illumina NextSeq	111.9	876	241	133	349.37
<i>L. trichodermophora</i>	EF-36	Illumina MiSeq; Illumina NextSeq	59.06	77	1464	12	91.36

Para la búsqueda de MiSSP conocidas de *Laccaria bicolor* en ensambles genómicos y secuencias de aminoácidos de *Laccaria*, se utilizaron los mismos 21 genomas previamente descritos (Tabla 1), cada uno con sus respectivos archivos de aminoácidos predichos. Los archivos de secuencias de aminoácidos de *L. trichodermophora* fueron predichos por Ángeles-Argáiz (2022) utilizando el software AUGUSTUS (Stanke y Morgenstern 2005) con su método de predicción *ab initio*, es decir, basado únicamente en la información contenida en el genoma, mientras que los de las especies restantes fueron descargados de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y JGI Mycocosm (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>). También se utilizaron 28 secuencias proteicas de MiSSP de *L. bicolor* S238N-H82M, que corresponden a las MiSSP conocidas para esta especie y, que están disponibles en la base de datos pública NCBI (ver **Apéndice B**).

Para la predicción y anotación de MiSSP potenciales, se utilizaron los mismos 21 archivos con secuencias de aminoácidos que corresponden a cada una de las 21 cepas de las tres especies de *Laccaria*, generados por NCBI con métodos de predicción basados en la combinación de búsqueda de homología con modelado *ab initio* (Sayers *et al.* 2022). Además, se incluyeron tres archivos de aminoácidos adicionales que corresponden a las cepas *L. amethystina* LaAM-08-1, *L. bicolor* S238N-H82 y *L. bicolor* D101 v1.0, generados con el mismo protocolo *ab initio* utilizado en el laboratorio de Sistemática y Ecología de micorrizas del Instituto de Biología de la UNAM (Ángeles-Argáiz 2022) para la predicción de las proteínas de *L. trichodermophora*. Por lo tanto, se ocupó un total de 24 archivos con secuencias de aminoácidos, predichos con metodologías diferentes, con la intención de evidenciar el efecto de los protocolos de predicción de genes y proteínas sobre la detección de MiSSP que aquí se presenta.

8.2.1 Evaluación de calidad de los ensambles genómicos

Se evaluó la calidad de los genomas mediante la herramienta QUAST (v5.0.2) (Mikheenko *et al.* 2018). QUAST genera varias métricas basadas en el número y tamaño de los *contigs* que componen a los ensambles genómicos (Gurevich *et al.* 2013). Los valores de N50 y N75 hacen referencia a la longitud mínima de un grupo de *contigs* que sumados acumulan el 50 o 75% de la longitud total del ensamble, respectivamente. A su vez, los valores de L50 y L75, representan el número del *contigs* correspondiente

a N50 o N75, respectivamente, al ordenarlos por su longitud de mayor a menor. Otros descriptores empleados son el tamaño del *contig* mayor, el promedio de bases no asignadas (N) por 100 kilopares de bases (kpb), el porcentaje de GC y el tamaño total del ensamble (Gurevich *et al.* 2013; Mikheenko *et al.* 2018). En general, en relación con su longitud total los ensambles de mejor calidad presentan números de *contigs* bajos, el tamaño de su *contig* más largo es alto y tienen pocas N, lo que se interpreta como una menor fragmentación del ensamble, menor probabilidad de errores en la asignación de bases y en el número de regiones repetidas. Los valores de N50 y N75 de un buen ensamble son altos y los de L50 y L75 son bajos, lo que indica que sus *contigs* son largos y que se necesita de un menor número de ellos para cubrir el ensamble genómico (Gurevich *et al.* 2013).

8.2.2 Búsqueda de MiSSP mediante BLAST

Para atender el objetivo particular I “Buscar MiSSP de *L. bicolor*, en los genomas de *L. trichodermophora*, *L. bicolor* y *L. amethystina* mediante alineamientos locales” se realizó la búsqueda de las 28 MiSSP descritas de la cepa S238N-H82 de *L. bicolor* en todos los genomas mediante el programa BLAST 2.11.0+ (Altschul *et al.* 1990) con parámetros de 99% de porcentaje de identidad y un valor E (e-value) de 0.0001. Esta herramienta hace alineamientos locales entre secuencias de nucleótidos o de aminoácidos y calcula la significancia estadística de las coincidencias (Altschul *et al.* 1990). Se usaron las funciones de búsqueda *tblastn* (translated BLAST) y *blastp* (protein-protein BLAST). La función *tblastn* permite comparar secuencias de aminoácidos contra bases datos de nucleótidos traducidos a aminoácidos, mientras que *blastp* permite comparar secuencias de aminoácidos contra bases de datos de aminoácidos (Altschul *et al.* 1990). Es decir, se buscaron las MiSSP usando sus secuencias de aminoácidos, tanto en los ensambles genómicos (usando secuencias de nucleótidos traducidos) como en las predicciones realizadas a partir de los propios ensambles (usando predicciones previas de las secuencias de aminoácidos) y se registraron el número de secuencias coincidentes u homólogas detectadas para cada MiSSP, y el número de MiSSP para las que se encontró al menos una coincidencia o secuencia homóloga. Para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre especies, se utilizó la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis con el programa PAST v 4.03 (Hammer *et al.* 2001).

8.2.3 Predicción y anotación de potenciales MiSSP

Con el fin de atender los objetivos particulares 2 “Generar protocolos específicos para la predicción de MiSSP a partir de su secuencia de aminoácidos y, evaluar su eficiencia con base en su capacidad para identificar MiSSP conocidas” y 3 “Usar los protocolos generados para determinar la variación de MiSSP predichas bioinformáticamente entre cepas de *L. trichodermophora*” se realizó la predicción de proteínas efectoras secretadas para cada una de las 21 cepas de *Laccaria* utilizando dos protocolos bioinformáticos personalizados (Fig. 4). En ambos protocolos se evaluaron criterios estructurales (presencia de péptido señal y dominios transmembranales) y de localización apoplástica o nuclear. Se evaluó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los péptidos efectores predichos para cada especie, utilizando la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis con el programa PAST v 4.03 (Hammer *et al.* 2001).

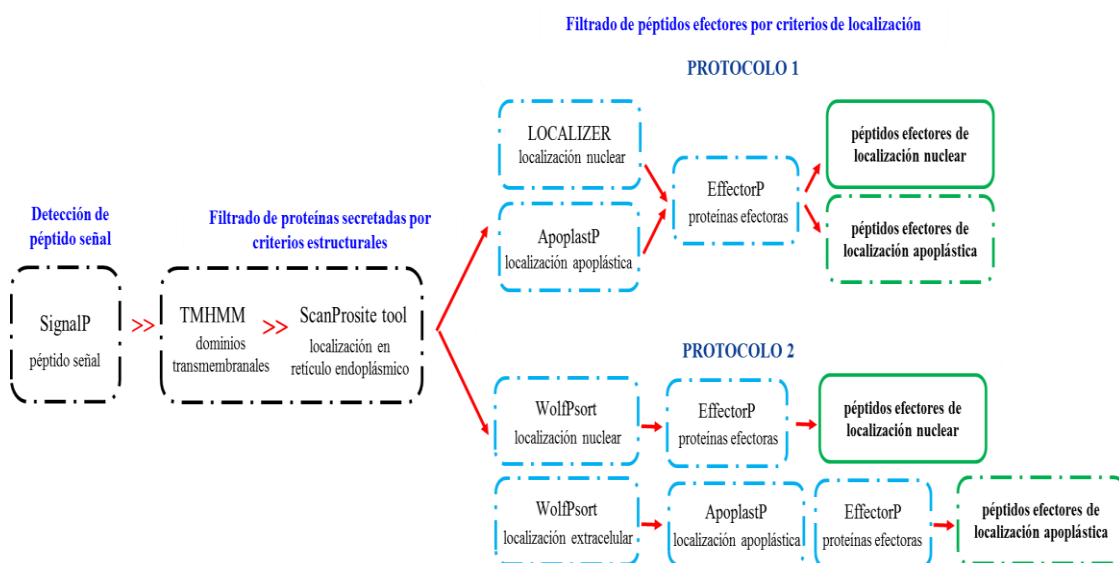


Figura 4. Protocolos analíticos para la predicción de MiSSP efectoras potenciales de localización nuclear y apoplástica. Enmarcados en color negro se indican los programas utilizados para evaluar criterios estructurales, estos programas son comunes a ambos protocolos. Enmarcados en color azul se indican los programas utilizados para evaluar la localización sub-celular de las proteínas. Enmarcados en color verde se indican los resultados obtenidos con cada protocolo. La línea continua señala péptidos nucleares y la discontinua péptidos apoplásticos. Las líneas rojas indican el orden de utilización de los distintos programas en cada protocolo de predicción.

Los programas utilizados para evaluar criterios estructurales fueron los mismos para ambos protocolos y se ejecutaron en el mismo orden. Mientras que los programas utilizados para evaluar los criterios de localización apoplástica y nuclear fueron distintos para cada protocolo o se utilizaron en diferente orden (Fig. 4). Ambos protocolos utilizaron secuencias de aminoácidos como datos iniciales, predichos por Ángeles-Argáiz (2022) para el caso de *L. trichodermophora* y, descargados de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o JGI Mycocosm (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>) para los casos de *L. bicolor* y *L. amethystina*.

Para ambos protocolos se utilizaron los programas SignalP v5.0 (Almagro *et al.* 2019; <https://services.healthtech.dtu.dk/>), TMHMM v2.0 (Melén *et al.* 2003; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y ScanProsite tool (Duvaud *et al.* 2021; <https://prosite.expasy.org/scanprosite/>). Para el protocolo 1 se usaron, además, LOCALIZER v1.0.5 (Sperschneider *et al.* 2017; <https://localizer.csiro.au/>), EffectorP v2.0 (Sperschneider *et al.* 2015; <https://effectorp.csiro.au/>) y ApoplastP v2.0 (Sperschneider *et al.* 2018; <https://apoplastp.csiro.au/>). Para el protocolo 2 se utilizaron los mismos programas que para el primero, con excepción de WolfPsort v0.2 (Horton *et al.* 2007; <https://www.genscript.com/wolf-psort.html>), que fue usado en lugar de LOCALIZER para la predicción de péptidos nucleares y como una herramienta adicional para la predicción de péptidos apoplásticos.

En ambos protocolos, para el filtrado por criterios estructurales, primero se tamizaron los archivos de predicciones de secuencias de aminoácidos con SignalP para la detección de proteínas con péptidos señal de secreción; es decir, de proteínas secretadas. Se utilizaron los valores de *cutoff* pre-establecidos como “sensibles”, es decir, aquellos con los que el programa discrimina con una alta especificidad a las secuencias secretoras de las no secretoras (v5.0; opción eucariota; Almagro *et al.* 2019). SignalP v5.0 detecta la presencia de péptidos señal y la ubicación de sus sitios de escisión con base en la arquitectura de redes neuronales recurrentes y convolucionales profundas (Almagro *et al.*, 2019). Dicha arquitectura de red es más adecuada para reconocer motivos de secuencia de longitud variable que las redes neuronales de alimentación directa tradicionales de versiones anteriores de SignalP.

Posteriormente se filtraron proteínas transmembranales con TMHMM v2.0, utilizando los parámetros predeterminados (Melén *et al.* 2003;

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). TMHMM es un método de predicción de topología de proteínas de membrana basado en un modelo oculto de Markov (HMM) (Krogh *et al.* 2001). Predice hélices transmembranales e identifica regiones que componen a las proteínas de membrana (i.e. la región terminal de las hélices, la región media de las hélices, regiones cercanas a la membrana y dominios globulares), por lo que discrimina entre proteínas solubles y de inserción en membrana con un alto grado de precisión. El programa TMHMM es muy adecuado para la predicción de hélices transmembranales porque incorpora restricciones gramaticales (las proteínas de membrana helicoidal siguen una “gramática” en la que los bucles citoplasmáticos y no citoplasmáticos tienen que alternarse), de hidrofobicidad, de sesgo de carga (abundancia de residuos con carga positiva en la parte de la secuencia en el lado citoplasmático) y de longitudes de hélice en su modelo (Durbin *et al.* 1998; Krogh *et al.* 2001).

En ambos protocolos, como último paso de evaluación de criterios estructurales, se filtraron proteínas que residen permanentemente en el lumen del RE utilizando el programa ScanProsite tool (Duvaud *et al.* 2021; <https://prosite.expasy.org/scanprosite/>). Las proteínas que residen permanentemente en el lumen del RE se distinguen de las proteínas secretadas recién sintetizadas por la presencia de la secuencia C-terminal Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) (Munro y Pelham 1987). Si bien KDEL es la señal común a muchas especies, algunas presentan variantes en esa señal (ver **Apéndice C**), por lo que ScanProsite tool detecta cualquier variante de la secuencia KDEL (número de acceso de prosite “PS00014”) de su base de datos (PROSITE; <https://prosite.expasy.org/>).

Para el filtrado por localización sub-celular se siguió una metodología diferente para cada protocolo. Con el protocolo 1 se predijeron las proteínas que se dirigen a los núcleos celulares vegetales utilizando el programa LOCALIZER v1.0.5 (Sperschneider *et al.* 2017; <https://localizer.csiro.au/>). LOCALIZER es un método de aprendizaje automático que predice la localización sub-celular de proteínas vegetales y de efectores de microorganismos patógenos en la célula vegetal (Sperschneider *et al.* 2017). Para ello, utiliza una colección de señales de localización nuclear (NLS, por sus iniciales en inglés Nuclear Location Signals) y para la localización en cloroplasto y mitocondria utiliza la predicción de péptidos de tránsito (Sperschneider *et al.* 2017). También se predijeron las proteínas de localización potencial en el apoplasto mediante el uso del

programa ApoplastP v2.0 (Sperschneider *et al.* 2018; <https://apoplastp.csiro.au/>). ApoplastP busca secuencias enriquecidas con ácido glutámico y en aminoácidos ácidos, pequeños y cargados, que son características para la localización apoplástica (Sperschneider *et al.* 2018).

Por otro lado, con el protocolo 2 se predijeron las proteínas de localización extracelular y nuclear con el programa WolfPsort v0.2 (Horton *et al.* 2007; <https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) con la opción “hongos”. WolfPsort clasifica a las proteínas en más de 10 sitios de localización basándose en motivos de “señal de clasificación” y en características correlativas de las secuencias, como el contenido de aminoácidos (Horton *et al.* 2007). Esas características se utilizan para convertir secuencias de aminoácidos en vectores numéricos que luego se clasifican con el método del vecino más cercano *k*-ponderado, lo que permite al programa seleccionar solo las características más relevantes (Horton *et al.* 2007). Se estima una sensibilidad y especificidad de alrededor del 70 % para localización en núcleo, mitocondrias, citosol, membrana plasmática, extracelular y (en plantas) cloroplasto (Horton *et al.* 2007). A continuación, a partir de las proteínas clasificadas como extracelulares, se predijeron aquellas con localización potencial en el apoplasto mediante el uso del programa ApoplastP v2.0 (Sperschneider *et al.* 2018).

Finalmente, con ambos protocolos, se predijeron péptidos potencialmente efectores a partir de las proteínas predichas como de localización en el núcleo o de localización apoplástica utilizando el programa EffectorP v2.0 (Sperschneider *et al.* 2015; <https://effectorp.csiro.au/>). EffectorP es un método de aprendizaje automático para la predicción de efectores fúngicos en secretomas. Está entrenado con péptidos efectores de hongos patógenos, incluyendo a oomicetos fitopatógenos. EffectorP toma en cuenta la carga neta de la proteína, la longitud de su cadena, el contenido de cisteína y la evidencia de selección diversificante (Sperschneider *et al.* 2015, 2018).

8.2.4 Evaluación de la eficiencia de los protocolos analíticos

Para atender el objetivo particular 2 “Generar protocolos específicos para la predicción de MiSSP a partir de su secuencia de aminoácidos y, evaluar su eficiencia con base en su capacidad para identificar MiSSP conocidas” se realizó la búsqueda de 28 MiSSP detectadas experimentalmente para la cepa S238N-H82 de *L. bicolor* (ver **Apéndice B**) entre las MiSSP predichas para la misma cepa por nuestros protocolos, utilizando el

programa BLAST 2.11.0+ (Altschul *et al.* 1990) con su función de búsqueda *blastp* (protein-protein BLAST) local. La eficiencia se estimó como la proporción de MiSSP predichas con los protocolos, con respecto al total de MiSSP buscadas con BLAST.

8.2.5 Evaluación del efecto de los protocolos de predicción de genes

Para atender el objetivo particular 4 “Evaluar el efecto de utilizar distintos métodos de predicción de genes para la obtención de los archivos de aminoácidos que son utilizados para la predicción de proteínas MiSSP” se comparó la cantidad de péptidos de *L. amethystina* (LaAM-08-1) y *L. bicolor* (cepas S238N-H82 y D101 v1.0) predichos para los archivos de secuencias de aminoácidos predichos con métodos de búsqueda de homología y *ab initio* de NCBI, contra los predichos para los archivos de secuencias de aminoácidos generados por el laboratorio de Sistemática y Ecología de micorrizas del Instituto de Biología de la UNAM con un método *ab initio* (AUGUSTUS, Stanke y Morgenstern 2005). Se contó el número de péptidos predichos en cada caso, se graficaron los datos y se analizaron en busca de patrones de abundancia que nos indicasen una relación entre el método de predicción de genes y la cantidad de MiSSP potenciales.

9. Resultados

9.1 Calidad de los ensamblajes genómicos de *Laccaria*

Los ensamblajes genómicos de mejor calidad de acuerdo a la relación tamaño del ensamblaje genómico-número de *contigs*, corresponden a las cepas S238N-H82 y v2 de *L. bicolor*, y a las cepas CA15-11 y EF-36 de *L. trichodermorphora*; en contraste, los ensamblajes de peor calidad corresponden a las cepas CA15-75 y CA15-F10 de *L. trichodermorphora* (Fig. 4).

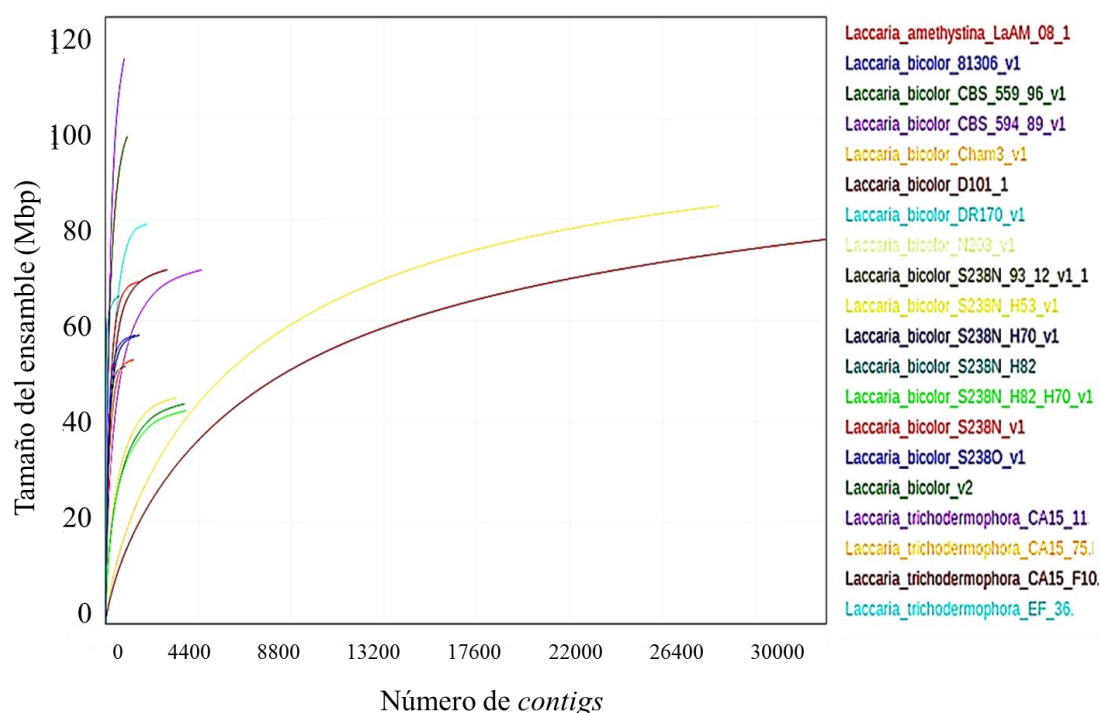


Figura 5. Relación entre el tamaño de los ensamblajes genómicos analizados y el número de *contigs*.

9.2 Las MiSSP de *Laccaria bicolor* S238N en genomas de *Laccaria*

Se registraron los *hits* de BLAST de las 28 MiSSP buscadas para los 21 genomas de *Laccaria* analizados (ver **Apéndice D**). En general, cuando se usaron las secuencias de aminoácidos como base para las búsquedas, hubo números menores de MiSSP identificadas y de *hits* en promedio, en comparación con los análisis basados en secuencias de nucleótidos traducidas a aminoácidos (ensamblajes genómicos), con excepción de los pertenecientes a *L. amethystina* (Fig. 6).

En los ensamblajes genómicos se encontraron coincidencias para prácticamente el total de las MiSSP conocidas (28) (ver **Apéndice D**). Las cepas de *L. bicolor* promediaron 27.4 (e.e. = 0.27), las de *L. amethystina* 25.3 (e.e. = 1.33) y las de *L. trichodermophora* 28 (e.e. = 0.00) (Fig. 6A). Las diferencias entre especies no fueron estadísticamente significativas ($H = 3.18$, $p = 0.0817$). En los archivos de secuencias de aminoácidos el comportamiento fue diferente (Fig. 6A): mientras que para *L. amethystina* y *L. bicolor* el promedio de MiSSP recuperadas fue parecido entre ellas (26.3, e.e. = 0.88 y 26.7, e.e. = 0.30, respectivamente), el encontrado en *L.*

trichodermophora fue significativamente menor (20.2, e.e. = 0.25; $H = 9.44$, $p = 0.0069$).

Con respecto al número de *hits* registrados cuando se usaron los ensambles genómicos el promedio no tuvo mucha variación. El valor mínimo fue de 123 (e.e. = 7.5) para *L. amethystina* y el valor máximo fue de 244.4 (e.e. = 34.9) para *L. trichodermophora* (Fig. 6B); mientras que los *hits* registrados usando los archivos de predicciones de aminoácidos se encontraron en un rango de 84.2 (e.e. = 7.9) en *L. trichodermophora* a 104 (e.e. = 2.67) *hits* en promedio para *L. bicolor* (Fig. 6B). Al comparar los resultados de los promedios de *hits* por especie para los ensambles genómicos y los archivos de predicciones de aminoácidos, se observó un rango amplio en los ensambles y uno muy estrecho en los archivos de predicciones de aminoácidos. También se observó que, aunque *L. trichodermophora* obtuvo el valor más alto en los ensambles genómicos, registró el valor más bajo en los archivos de predicciones de aminoácidos. Tanto para el número de *hits* registrados en ensambles genómicos como en archivos de predicciones de aminoácidos, las diferencias entre especies fueron estadísticamente significativas ($H = 8.4$, $p = 0.0148$ y $H = 8.15$, $p = 0.0166$ respectivamente).

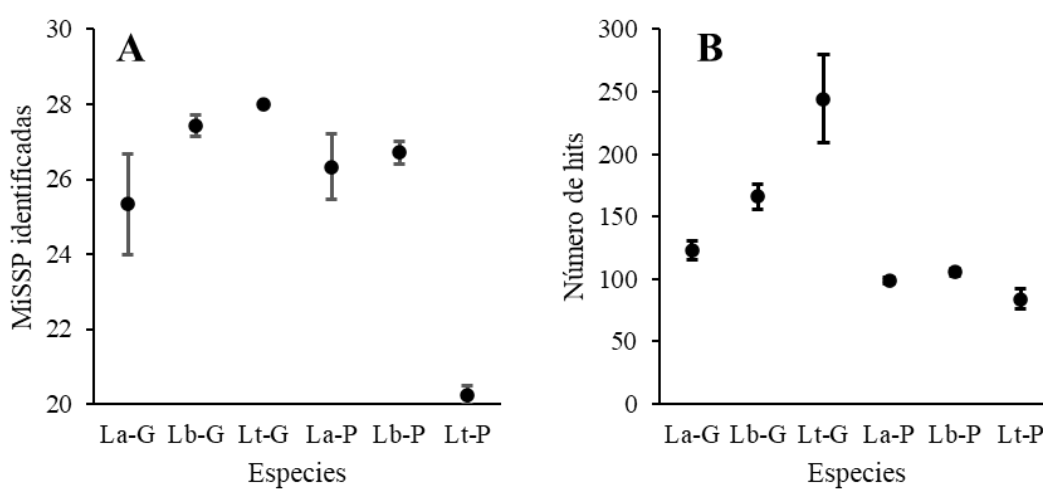


Figura 6. Promedio de MiSSP detectadas (A) y de *hits* registrados (B) en ensambles genómicos y archivos de secuencias de aminoácidos de *Laccaria*. La: *L. amethystina*; Lb: *L. bicolor*; Lt: *L. trichodermophora*. Las letras que siguen a los guiones, G y P, corresponden a ensambles genómicos y a archivos de predicciones de secuencias de aminoácidos, respectivamente. Las líneas verticales corresponden al error estándar.

De las tres especies analizadas, *L. trichodermophora* es la que presentó más diferencias, medidas como la proporción de diferencias entre las MiSSP detectadas y *hits* registrados, entre ensambles genómicos y archivos de secuencias de aminoácidos (0.277 y 0.655 respectivamente) (Fig. 7).

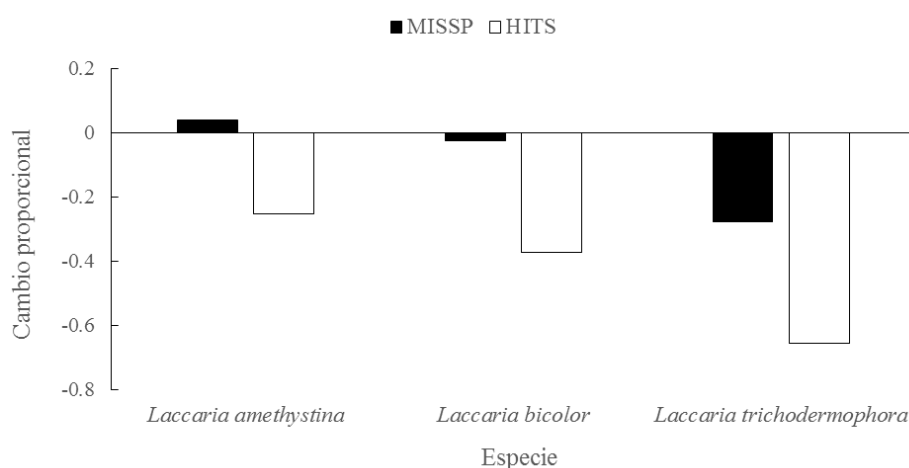


Figura 7. Cambio proporcional entre número de MiSSP detectadas y número de *hits* registrados para ensambles genómicos y archivos de secuencias de aminoácidos de las tres especies de *Laccaria* analizadas. *Laccaria trichodermophora* presentó la mayor proporción de cambio en MiSSP detectadas y *hits* registrados entre ensambles genómicos y archivos de predicciones de secuencias de aminoácidos (0.277 y 0.655 respectivamente).

9.3 Predicción de péptidos efectores del género *Laccaria*

El primer paso para la predicción de péptidos efectores es la predicción del secretoma. Los genomas con mayor número de posibles proteínas secretadas fueron los de *L. bicolor* con 1,075 proteínas en promedio (e.e. = 55.2), cerca del doble de las predichas para los genomas de *L. trichodermophora* (667, e.e. = 92.0) y más alto que las predichas para los genomas de *L. amethystina* (883, e.e. = 151.9) (Fig. 8). El secretoma varió en un rango entre 604 a 1,701 proteínas para *L. bicolor*, entre 580 y 1,048 para *L. amethystina* y entre 512 y 932 para *L. trichodermophora* (Fig. 8).

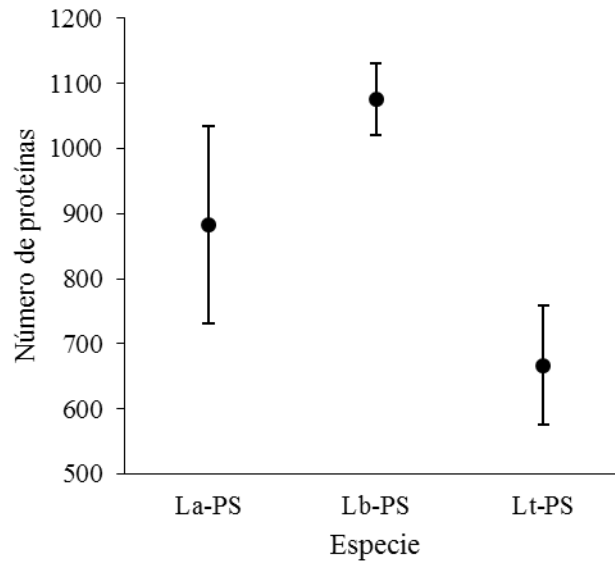


Figura 8. Tamaño de los secretomas. Número de proteínas con péptido señal para cada especie de *Laccaria* analizada. La: *L. amethystina*; Lb: *L. bicolor*; Lt: *L. trichodermophora*. La sigla que sigue a los guiones, PS, corresponde a proteínas secretadas. Las líneas verticales corresponden al error estándar.

Al filtrar proteínas de membrana y de localización permanente en RE, *L. bicolor* también presentó el valor más alto de proteínas secretadas con 859 proteínas en promedio (e.e. = 44.2), seguido de *L. amethystina* (684, e.e. = 122.1) y finalmente de *L. trichodermophora* (550, e.e. = 67.4) (Fig. 9). El número de proteínas secretadas con estas características varía en un rango entre 480 y 1,327 para *L. bicolor*, entre 440 y 818 para *L. amethystina* y entre 412 y 731 para *L. trichodermophora* (Fig. 9).

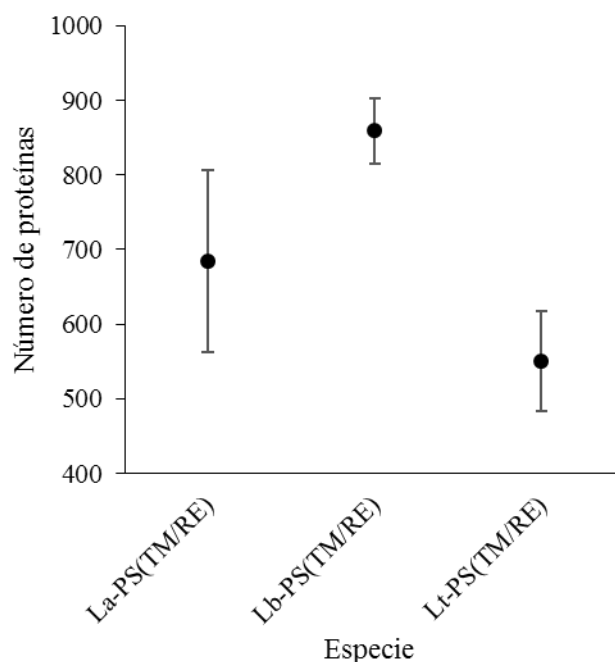


Figura 9. Número de proteínas secretadas predichas sin dominios transmembranales (TM) ni localización en RE para cada especie de *Laccaria* analizada. La: *L. amethystina*; Lb: *L. bicolor*; Lt: *L. trichodermophora*. La sigla que sigue a los guiones, PS(TM/RE), corresponde a proteínas secretadas predichas sin dominios transmembranales ni localización en RE. Las líneas verticales corresponden al error estándar.

Para ambos protocolos, el número de proteínas secretadas predichas con localización nuclear fue más alto para *L. bicolor*, con 148 (e.e. = 5.48) y 253 (e.e. = 14.14) proteínas en promedio respectivamente, seguido de *L. amethystina* (126, e.e. = 15.4 y 209.6, e.e. = 46.4) y finalmente de *L. trichodermophora* (100, e.e. = 14.9; y 171, e.e. = 16.3) (Fig. 10A). El número de proteínas de secreción predichas de localización nuclear varió entre 103 y 190 para *L. bicolor* con el primer protocolo, y entre 133 y 368 con el segundo; para *L. amethystina* varió entre 96 y 147 con el protocolo 1 y entre 117 y 259 para el segundo; finalmente para *L. trichodermophora* varió entre 77 y 144 con el primer protocolo, y entre 130 y 202 con el segundo (Fig. 10A).

El número de proteínas secretadas predichas con localización apoplástica también fue más alto para *L. bicolor* con ambos protocolos, contabilizando 473.9 (e.e. = 27.4) y 228.8 (e.e. = 15.2) proteínas en promedio respectivamente; seguido de *L. amethystina* (351.0, e.e. = 61.0 y 168.3, e.e. = 27.2) y, finalmente, de *L.*

trichodermophora (268.8, e.e. = 38.2 y 130.0, e.e. = 21.7) (Fig. 10B). El número de proteínas secretadas predichas de localización apoplástica varió en un rango entre 242 y 818 para *L. bicolor* con el primer protocolo, y entre 129 y 445 con el segundo; para *L. amethystina* varió entre 221 y 420 con el protocolo 1y entre 114 y 197 con el segundo; finalmente para *L. trichodermophora* varió entre 196 y 376 con el primer protocolo, y entre 106 y 195 con el segundo (Fig. 10B).

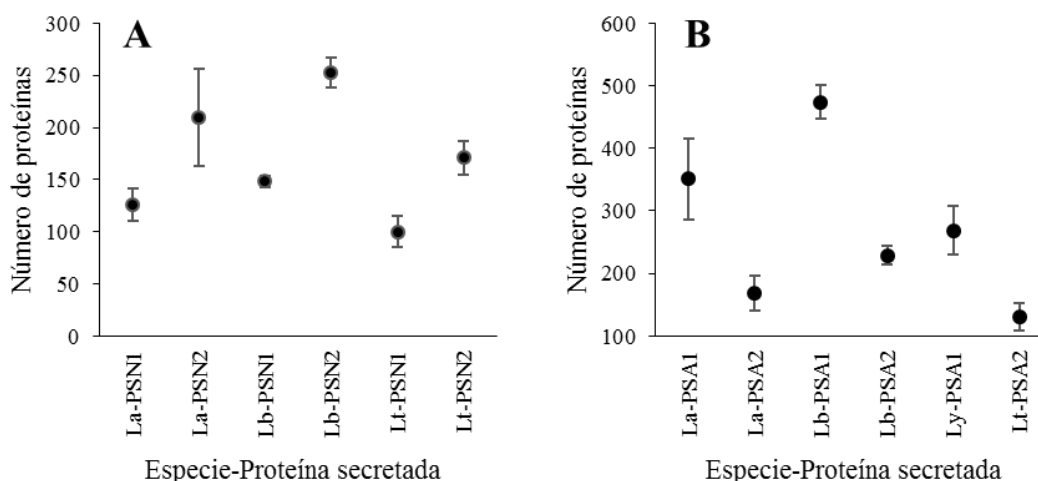


Figura 10. Número de proteínas secretadas de localización nuclear (A) y apoplástica (B) predichas con cada protocolo utilizado para cada especie de *Laccaria* analizada. La: *L. amethystina*; Lb: *L. bicolor*; Lt: *L. trichodermophora*. Las siglas que siguen a los guiones corresponden a las proteínas secretadas predichas con los protocolos 1 y 2. PSN1: proteínas secretadas de localización nuclear predichas con el protocolo 1; PSN2: proteínas secretadas de localización nuclear predichas con el protocolo 2; PSA1: proteínas secretadas de localización apoplástica predichas con el protocolo 1; PSA2: proteínas secretadas de localización apoplástica predichas con el protocolo 2. Las líneas verticales corresponden al error estándar.

El número de proteínas secretadas predichas como péptidos efectores con localización nuclear también fue más alto para *L. bicolor* con ambos protocolos, contabilizando 18.6 (e.e. = 1.1) y 63.6 (e.e. = 4.9) péptidos en promedio respectivamente; seguido de *L. amethystina* (15.3, e.e. = 4.8) y 54.7, e.e. = 19.5) y finalmente de *L. trichodermophora* (11.0, e.e. = 2.1 y 31.8, e.e. = 6.9) (Fig. 11A). El número de proteínas secretadas predichas como péptidos efectores con localización nuclear varió en un rango entre 8 y 25 para *L. bicolor* con el primer protocolo, y entre 18 y 95 con el segundo; para *L. amethystina* varió entre 6 y 22 para el protocolo 1y

entre 16 y 78 para el segundo; finalmente para *L. trichodermorphora* varió entre 6 y 16 con el primer protocolo, y entre 19 y 47 con el segundo (Fig. 11A).

Finalmente, el número de proteínas secretadas predichas como péptidos efectores con localización apoplástica también fue más alto para *L. bicolor* con ambos protocolos, contabilizando 119.4 (e.e. = 7.5) y 28.4 (e.e. = 1.8) péptidos en promedio respectivamente; seguido de *L. amethystina* (93.3, e.e. = 27.7 y 22.7, e.e. = 5.8) y finalmente de *L. trichodermorphora* (53.8, e.e.=8.0 y 13.5, e.e. = 1.6) (Fig. 11B). El número de proteínas secretadas predichas como péptidos efectores con localización apoplástica varió entre 37 y 64 para *L. bicolor* con el primer protocolo, y entre 11 y 38 con el segundo; para *L. amethystina* varió entre 38 y 125 para el protocolo 1y entre 11 y 29 para el segundo; finalmente para *L. trichodermorphora* varió entre 32 y 69 con el primer protocolo, y entre 11 y 18 con el segundo (Fig. 11B).

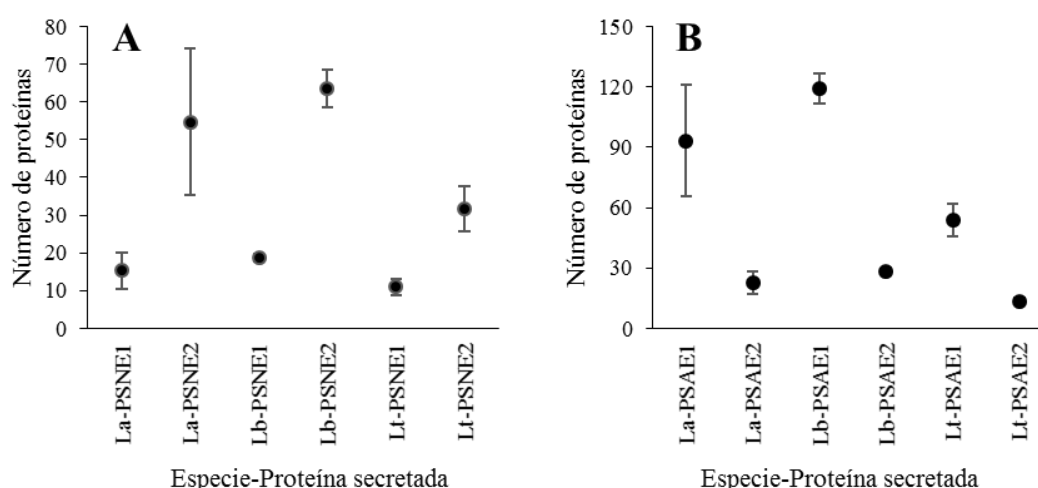


Figura 11. Número de proteínas secreción predichas como péptidos efectores de localización nuclear (A) y apoplástica (B) con cada protocolo utilizado para cada especie de *Laccaria* analizada. La: *L. amethystina*; Lb: *L. bicolor*; Lt: *L. trichodermorphora*. Las siglas que siguen a los guiones corresponden a los péptidos secretados predichos con los protocolos 1 y 2. PSNE1: péptidos secretados efectores de localización nuclear predichos con el protocolo 1; PSNE2: péptidos secretados efectores de localización nuclear predichos con el protocolo 2; PSAE1: péptidos secretados efectores de localización apoplástica predichos con el protocolo 1; PSAE2: péptidos secretados efectores de localización apoplástica predichos con el protocolo 2. Las líneas verticales corresponden al error estándar.

El porcentaje promedio de proteínas secretadas predichas como péptidos efectores con el protocolo 1 para las tres especies es cercano al 11% del secretoma (ver

Apéndice E); es decir, 138 (e.e. = 8.4) péptidos en promedio para *L. bicolor*, 108.7 (e.e. = 32.3) péptidos para *L. amethystina* y 64.7 (e.e. = 9.8) péptidos para *L. trichodermophora* (Fig. 11). Mientras que el porcentaje promedio de los péptidos predichos con el protocolo 2 es cercano al 8% del secretoma (ver **Apéndice F**); es decir, 92 (e.e. = 6.3) péptidos en promedio para *L. bicolor*, 77.3 (e.e.= 25.3) péptidos para *L. amethystina* y 45.2 (e.e. = 6.2) péptidos para *L. trichodermophora* (Fig. 12). En ambos casos con valores mayores para *L. bicolor* (Fig. 12). Existen diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de péptidos efectores predichos, indistintamente de su localización celular y del protocolo utilizado, para las tres especies de *Laccaria* analizadas (protocolo 1H = 7.55, $p = 0.0223$, protocolo 2H = 6.98, $p = 0.0351$). Es decir, se detectó variación interespecífica en el contenido de péptidos efectores predichos.

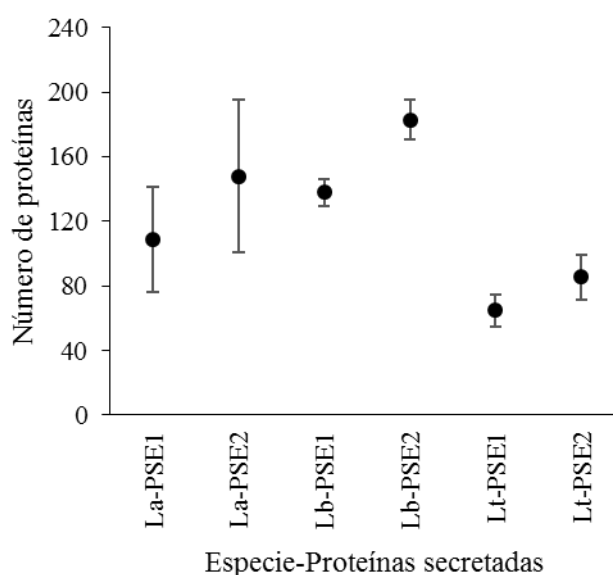


Figura 12. Número de proteínas secretadas predichas como péptidos efectores con cada protocolo utilizado para cada especie de *Laccaria* analizada. La: *L. amethystina*; Lb: *L. bicolor*; Lt: *L. trichodermophora*. Las siglas que siguen a los guiones, PSE1 y PSE2, corresponden a péptidos secretados efectores predichos con el protocolo 1 y con el protocolo 2, respectivamente. Las líneas verticales corresponden al error estándar.

Para las proteínas secretadas predichas como péptidos efectores de localización nuclear, con el protocolo 1 *L. bicolor* y *L. amethystina* mostraron los mayores porcentajes promedio con respecto al secretoma (1.7% en ambos casos), mientras que

L. trichodermophora mostró el más bajo (1.6%) (ver **Apéndice E**). En el caso del protocolo 2, *L. bicolor* es la especie que mostró el mayor porcentaje promedio del secretoma (5.8%), seguida de *L. amethystina* y finalmente de *L. trichodermophora* (5%) (ver **Apéndice F**). En general, con el protocolo 2 fue posible predecir un mayor porcentaje del secretoma (5.5%) de péptidos efectores con localización nuclear y un mayor número promedio de péptidos efectores (50) para las tres especies analizadas.

Finalmente, con respecto a las proteínas secretadas predichas como péptidos efectores de localización apoplástica y para los dos protocolos utilizados, *L. bicolor* mostró los mayores porcentajes promedio con respecto al secretoma (11% y 2.6% respectivamente), seguida de *L. amethystina* (10% y 2.5% respectivamente) y finalmente, de *L. trichodermophora* (8.3% y 2.1 % respectivamente) (ver **Apéndices E y F**). En general, con el protocolo 1 fue posible predecir un mayor porcentaje de péptidos efectores del secretoma (9.8%) con localización apoplástica y un mayor número promedio de estos péptidos para las tres especies (89).

9.3 Predicción de péptidos efectores en *Laccaria trichodermophora*

El mayor número de proteínas secretadas predichas fue el de la cepa CA15-F11 de *L. trichodermophora* con 932 proteínas, seguida de la cepa CA15-F10 con 637 proteínas y finalmente las cepas CA15-75 y EF-36 con 587 y 512 proteínas respectivamente (ver **Apéndices E y F**). Al filtrarse proteínas de membrana y de localización permanente en RE, la cepa CA15-11 también presentó el valor más alto con 731 proteínas, seguida nuevamente por la cepa CA15-F10 con 559 proteínas y de las cepas CA15-75 y EF-36 con 499 y 412 proteínas, respectivamente (ver **Apéndices E y F**).

Independientemente del protocolo utilizado, el mayor número de proteínas predichas como secretadas de localización nuclear y apoplástica, fue el de la cepa CA15-11 con 173 (e.e.= 29.0) y 285.5 (e.e.= 90.5) proteínas en promedio respectivamente, seguida de la CA15-F10 con 140 (e.e.= 52.0) y 184.5 (e.e.= 75.5) proteínas en promedio, de la CA15-75 con 118.5 (e.e.= 41.5) y 174.5 (e.e.= 68.5) proteínas en promedio, y finalmente de la EF-36 con 110.5 (e.e.= 19.5) y 153 (e.e.= 43.0) proteínas en promedio.

Para el caso de las proteínas predichas como péptidos efectores de localización nuclear, fue la cepa CA15-F10 la que presentó un mayor número de proteínas con 29.5

(e.e. = 17.5) péptidos en promedio, el cual es mayor a las de la CA15-75 con 25.5 (e.e. = 9.5) péptidos en promedio y cerca del doble de las predichas para las cepas CA15-11 y EF-36 con 18 (e.e. = 8.0) y 12.5 (e.e. = 6.5) péptidos en promedio. Por su parte, para el caso de las proteínas predichas como péptidos efectores de localización apoplástica, las cepas CA15-F10 y CA15-75 fueron las que presentaron el mayor número de proteínas con 40 (e.e. = 29.0 y e.e. = 22.0, respectivamente) péptidos en promedio, el cual es mayor a las de la cepa CA15-11 con 32.5 (e.e. = 19.5) péptidos en promedio y cerca del doble para la cepa EF-36 con 22 (e.e. = 10.0) péptidos en promedio.

En cuanto al número total de péptidos efectores predichos, la cepa CA15-F10 presentó los números más altos, independientemente del protocolo utilizado (ver **Apéndices E y F**), con 81 péptidos predichos con el protocolo 1 y 58 péptidos predichos con el protocolo 2, seguida de las cepas CA15-75, con un total de 78 y 53 péptidos, la CA15-11, con un total de 62 y 39 péptidos y, finalmente, la cepa EF-36 para la que se predijeron cerca de la mitad de los péptidos totales con respecto a la CA15-F10 (38 y 31 péptidos).

9.4 Evaluación de la eficiencia de los protocolos utilizados

De un total de 28 MiSSP disponibles en las bases de datos públicas y detectadas previamente por RNA-seq para la cepa S238N-H82 de *L. bicolor*, se detectó la presencia de 26 de ellas en el archivo de aminoácidos perteneciente a esta misma cepa. De las 26 MiSSP detectadas en el archivo de aminoácidos, 19 fueron detectadas también en su secretoma predicho, por lo que la eficiencia del proceso de filtrado es de un 73.08% (Fig. 13).

De las 19 MiSSP detectadas en el secretoma predicho, 6 fueron detectadas entre los péptidos efectores predichos (0 de localización nuclear y 6 de localización apoplástica) utilizando el protocolo 1 (Fig. 13); por lo que la eficiencia del proceso de filtrado es de 23.1% con respecto al archivo de aminoácidos, y de 31.6% con respecto al secretoma predicho de la cepa analizada (Fig. 13). Por su parte, usando el protocolo 2, de las 19 MiSSP detectadas en el secretoma predicho, 7 fueron detectadas entre los péptidos efectores predichos (5 de localización nuclear y 2 de localización apoplástica) (Fig. 13); por lo que la eficiencia del proceso de filtrado es de un 26.9% con respecto al archivo de aminoácidos, y de un 36.8% con respecto al secretoma predicho de la cepa analizada (Fig. 13).

En términos de la eficiencia para predecir péptidos efectores de localización en núcleo o apoplasto, de localización en núcleo o apoplasto, el protocolo 1 permitió predecir más MiSSP apoplásticas (Fig. 13), mientras que el protocolo 2 permitió predecir más MiSSP de localización en el núcleo (Fig. 13).

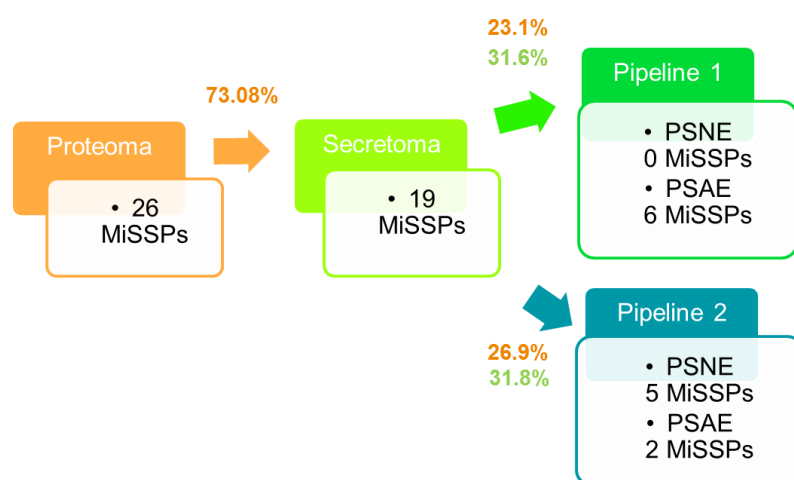


Figura 13. Eficiencia del proceso de predicción de péptidos efectores por cada protocolo con base en el número de MiSSP de la cepa S238N-H82 de *L. bicolor* detectadas entre los péptidos predichos para dicha cepa. La siglas PSNE y PSAE corresponden a péptidos efectores predichos de localización nuclear y apoplástica, respectivamente.

9.5 Evaluación del efecto de los protocolos de predicción de genes

En todos los casos se predijeron mayores números de proteínas para los archivos de aminoácidos disponibles en NCBI con respecto a los predichos para los archivos obtenidos por nuestro grupo de investigación en laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas (Fig. 14). El número de proteínas con péptidos señal predichos, es decir de proteínas secretadas (PS), fue cerca del doble en los archivos de aminoácidos descargados de NCBI con respecto a las predichas en los archivos obtenidos por el laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas (Fig. 14); con 1,048 y 508 proteínas para *L. amethystina* LaAM-08-1 respectivamente, 1,038 y 604 para *L. bicolor* S238N-H82, y 1,237 y 808 para *L. bicolor* D101 v1.0.

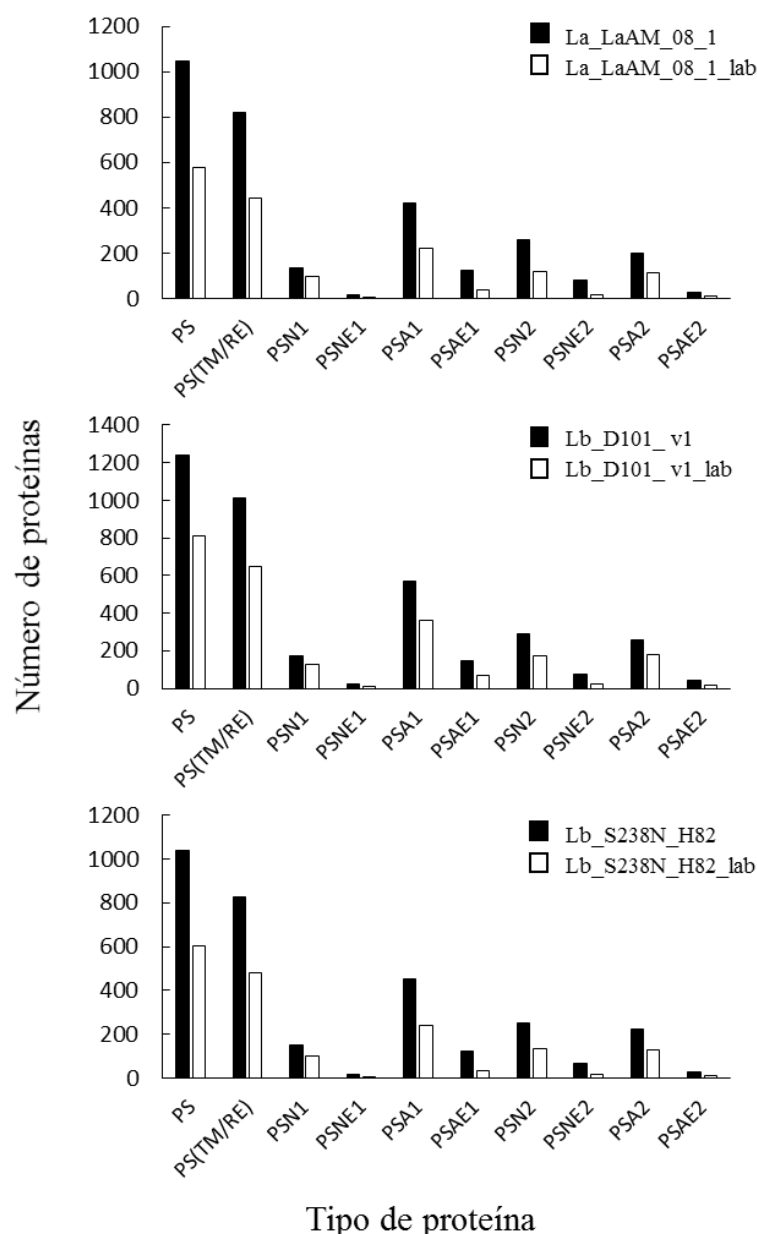


Figura 14. Comparación de la cantidad de proteínas secretadas predichas para una cepa de *L. amethystina* y dos cepas de *L. bicolor*, usando distintos métodos de predicción de genes. Donde *La_LaAM_08_1* corresponde a la cepa LaAM-08-1 de *L. amethystina*, *Lb_D101_v1* a la cepa D101 v1.0 de *L. bicolor*, y *Lb_S238N_H82* a la cepa S238N-H82 de *L. bicolor*; y la terminación *_lab* indica a aquellas cepas cuyos archivos de aminoácidos fueron obtenidos con el método de predicción empleado en el laboratorio de Sistemática y Ecología de Micorrizas, mientras que los archivos de aminoácidos de las cepas sin dicha terminación están disponibles en la base de datos pública de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y fueron predichos con sus propios métodos. En cuanto a las categorías de proteínas predichas, PS corresponde a proteínas secretadas, RE (PS(TM/RE)) a proteínas de membrana que no se localizan permanente en el RE, PSN1 y PSN2 a proteínas secretadas de localización nuclear predichas con el protocolo 1 y 2 respectivamente, PSA1 y PSA2 a proteínas secretadas de localización apoplástica predichas con el protocolo 1 y 2 respectivamente, PSNE1 y PSNE2 a péptidos efectores nucleares

predichos con el protocolo 1 y 2 respectivamente, y PSAE1 y PSAE2 a péptidos efectores apoplásticos predichos con el protocolo 1 y 2 respectivamente.

El número de proteínas secretadas que no corresponden a proteínas de membrana y que no se localizan permanente en RE (PS(TM/RE)) también fue cerca del doble en los archivos de aminoácidos de NCBI con respecto a las predichas en los archivos obtenidos por nuestro grupo de investigación (Fig. 14); con 818 y 440 proteínas para *L. amethystina* LaAM-08-1 respectivamente, 825 y 480 para *L. bicolor* S238N-H82, y 1,009 y 645 para *L. bicolor* D101 v1.0.

En cuanto al número de proteínas secretadas predichas con localización nuclear (PSN1/ PSN2), también fue mayor para los archivos de aminoácidos de NCBI con respecto a los archivos obtenidos por nuestro grupo de investigación, independientemente del protocolo utilizado (Fig. 14). Sin embargo, el protocolo 2 fue capaz de predecir un mayor número de proteínas con 266 (e.e = 11.57) y 141 (e.e. = 16.97) proteínas en promedio respectivamente, y una diferencia de casi el 90% entre ambos valores; mientras que con el protocolo 1 se predijeron 152 (e.e = 10.16) y 108 (e.e. = 8.74) proteínas en promedio respectivamente, con una diferencia del 41% entre ambos valores.

El número de proteínas secretadas predichas con localización apoplástica (PSA1/PSA2) también fue mayor para los archivos de aminoácidos de NCBI con respecto a los archivos obtenidos por nuestro grupo de investigación, independientemente del protocolo utilizado (Fig. 14). Sin embargo, en este caso el protocolo 1 fue capaz de predecir un mayor número de proteínas con 481 (e.e = 44.98) y 275 (e.e. = 44.25) proteínas en promedio respectivamente, con una diferencia de casi el 78% entre ambos valores; mientras que con el protocolo 2 se predijeron 226 (e.e = 17.98) y 141 (e.e. = 19.97) proteínas en promedio respectivamente con una diferencia del 63% entre ambos valores.

Finalmente, en cuanto a los números de proteínas secretadas predichas como péptidos efectores de localización nuclear y apoplástica, también fueron mayores para los archivos de aminoácidos de NCBI con respecto a los archivos obtenidos por nuestro grupo de investigación, independientemente del protocolo utilizado (Fig. 14). Sin embargo, para el caso de los péptidos efectores nucleares (PSNE1/PSNE2), el protocolo 2 predijo un mayor número de péptidos efectores con 72 (e.e. = 3.18) y 19 (e.e. = 2.40) péptidos en promedio respectivamente, y una diferencia de cerca del cuádruple entre

ambos valores; mientras que con el protocolo 1 se predijeron 21 (e.e. = 2.19) y 8 (e.e. = 1.45) péptidos en promedio, con una diferencia de cerca del triple entre ambos valores. Por otro lado, para el caso de los péptidos efectores apoplásticos (PSAE1/PSAE2), fue con el protocolo 1 que se predijo un mayor número de péptidos efectores con 132 (e.e. = 8.69) y 47 (e.e. = 9.88) péptidos en promedio respectivamente, y una diferencia de cerca del triple entre ambos valores; mientras que con el protocolo 2 se predijeron un promedio de 33 (e.e. = 5.36) y 13 (e.e. = 2.0) péptidos respectivamente, también con una diferencia de cerca del triple entre ambos valores.

10. Discusión

Al realizar las búsquedas BLAST se obtuvieron coincidencias de MiSSP descritas experimentalmente para la cepa S238N-H82 de *L. bicolor* en todos los ensambles y archivos de aminoácidos analizados (ver **Apéndice D**). Esto evidencia la capacidad de nuestros protocolos para detectar la presencia de MiSSP tanto en los genomas como en los archivos de aminoácidos derivados de ellos para las cepas de *L. bicolor*, *L. amethystina* y *L. trichodermophora* analizadas; lo que corresponde con el hecho de que se ha detectado experimentalmente la presencia de MiSSP en los genomas y secretomas de las especies del género *Laccaria* (Plett *et al.* 2014, 2015). Sin embargo, se observaron diferencias entre el número de *hits* y de MiSSP detectadas en los ensambles y archivos de aminoácidos para las distintas especies analizadas (Fig. 6), siendo *L. trichodermophora* la especie que presentó una mayor proporción de cambio. Esto nos habla de una pérdida importante de secuencias de MiSSP potenciales de ensambles genómicos a los archivos de aminoácidos derivados de ellos.

Para el caso de *L. trichodermophora*, dicha pérdida de secuencias podría deberse a la mala calidad de dos de los cuatro ensambles genómicos analizados (Fig. 5). Cuando un ensamble genómico es de mala calidad existe una mayor probabilidad de errores en la disposición de sus *lecturas nucleotídicas*, como pueden ser espacios no secuenciados en el ensamble y copias colapsadas, es decir, genes duplicados propensos a colapsarse en una sola región debido a la alta identidad entre ellos; errores que podrían ser importantes al momento de predecir proteomas a partir de ellos (Kelley y Salzberg 2010; Gurevich *et al.* 2013) y que, por ende, podrían comprometer análisis que se realicen a partir de estos archivos de aminoácidos predichos. Sin embargo, es necesario analizar si existe una correlación entre los parámetros que nos indican la calidad de los

ensambles genómicos y la pérdida de secuencias de MiSSP potenciales en los archivos de aminoácidos. Esto podría evaluarse con una correlación de Spearman.

Por otro lado, es importante tomar en cuenta que la calidad de los ensambles genómicos y, en consecuencia, las inferencias funcionales obtenidas a partir de ellos se relacionan directamente con la tecnología empleada para su secuenciación. La longitud de las lecturas tiene un impacto en el número de copias, en el tamaño de las familias génicas y en la capacidad de detección de funciones génicas (Ángeles-Argaíz 2022). Los ensambles de las cepas de *L. trichodermophora* secuenciados con tecnología de tercera generación Pacific Biosciences (PacBio) (CA15-11, EF-36), fueron evaluados como de mejor calidad con respecto a los secuenciados con Illumina de segunda y tercera generación (Illumina MiSeq, NextSeq) (CA15-F10, CA15-75). La principal diferencia entre Illumina y PacBio es que la primera se especializa en la secuenciación por síntesis de datos de lectura corta, mientras que PacBio se enfoca en datos de lectura larga (Hodkinson *et al.* 2015; Logsdon *et al.* 2020). La ventaja de las lecturas largas es que facilitan el ensamblaje del genoma y ofrecen una mayor precisión para identificar variantes raras y distinguir secuencias repetidas (Amarasinghe *et al.* 2020; Logsdon *et al.* 2020). Una forma sencilla de comprobar que las diferencias de calidad observadas en los ensambles se relaciona con la tecnología de secuenciación empleada, sería secuenciar nuevamente los genomas de las cepas de *L. trichodermophora* cuyos ensambles fueron secuenciados con tecnologías de secuenciación por síntesis de datos de lectura corta con tecnologías de secuenciación por síntesis de datos de lectura larga y, evaluar la calidad de los nuevos ensambles.

Los protocolos analíticos propuestos fueron útiles para predecir péptidos potenciales efectores MiSSP y los resultados obtenidos muestran variación interespecífica e intraespecífica en el número de péptidos predichos. Estudios previos han reportado variabilidad interespecífica (Kholer *et al.* 2015) e intraespecífica para el género *Laccaria* (Plett *et al.* 2012; Ángeles-Argaíz *et al.* 2020; Flores-Almaraz 2020). Esta variabilidad es de suma importancia debido a que puede tener un impacto significativo en aspectos del desarrollo de los hongos ectomicorrízicos; por ejemplo, en su capacidad para obtener el N de fuentes orgánicas (Sawyer *et al.* 2003; Guidot *et al.* 2005) o bien, para colonizar e interactuar con sus hospederos (Plett *et al.* 2015; Hazard *et al.* 2017a, b; Hortal *et al.* 2017; Flores-Almaraz 2020). Algo muy interesante en hongos ectomicorrízicos es que se presume que su esta variabilidad se ha generado,

cambiado y mantenido en función de los hospederos que colonizan y los factores ambientales a los que se encuentran sometidos (Ángeles-Argáiz y Garibay-Orijel 2019). La aparición de la condición ectomicorrízica generó diversificación de especies en muchos géneros que la adoptaron y el tamaño de ciertas familias génicas ha aumentado especialmente por la actividad de elementos transponibles (ET) que multiplican RNAi que puede actuar como mecanismo efector en la comunicación con la planta hospedera (Hess y Pringle 2014; Muszewska *et al.* 2017; Plett y Martin 2018). De hecho, se presume que el principal mecanismo de evolución de los genes que codifican para péptidos efectores es la actividad de ET (Ángeles-Argáiz y Garibay-Orijel 2019), lo que tendría como consecuencia que su evolución sea rápida y que su detección en los genomas se dificulte por el cambio constante. Los ET son eliminados constantemente por recombinación ectópica y por deleciones, aunque los mecanismos para eliminarlos no están muy estudiados en hongos (Muszewska *et al.* 2017). Particularmente en hongos ectomicorrícicos, por ser propensos a tener distribuciones restringidas en función de sus hospederos, son eventos demográficos como los “cuellos de botella” los que reducen los tamaños poblacionales, disminuyendo la tasa de pérdida de ET y propiciando que estos elementos se fijen en los genomas (Ángeles-Argáiz y Garibay-Orijel 2019).

Por otro lado, *L. bicolor* y *L. amethystina* presentaron una mayor cantidad de proteínas secretadas predichas con respecto a *L. trichoderma*; particularmente de péptidos efectores de localización apoplástica y nuclear, algunas de las cuales podrían ser MiSSP potenciales (Plett *et al.* 2011; Pellegrin *et al.* 2019). Estudios previos mencionan que las diferencias intra- e interespecíficas en la capacidad de colonización de las raíces hospederas de los hongos ectomicorrícicos podrían estar influenciadas por el contenido de genes relevantes para el establecimiento y mantenimiento de la interacción simbiótica (Hedh *et al.* 2009). Por lo tanto, el tener un mayor número de genes simbióticos podría permitirles a *L. bicolor* y *L. amethystina* establecer y mantener su interacción simbiótica con un mayor número de hospederos y, por ende, ser especies generalistas. En contraste con *L. trichoderma*, una especie cuya preferencia marcada por representantes jóvenes del género *Pinus* a lo largo de su rango de distribución natural (Mueller y Strack 1992) podría relacionarse con la presencia de un menor número de genes simbióticos en su genoma.

Al evaluar la eficiencia de los protocolos utilizados, se observaron eficiencias diferenciales tanto para la predicción de péptidos efectores en general, como de péptidos efectores de localización nuclear y de péptidos efectores de localización apoplástica. Estas diferencias no corresponden con la capacidad de los protocolos para predecir números mayores de estos tipos de proteínas, salvo en caso de considerarse criterios de localización. Dados estos resultados, resulta necesario buscar coincidencias entre las MiSSP predichas por los distintos protocolos, así como verificar sus características de localización sub-celular para asegurar que fueron predichas en la categoría adecuada. A reserva de hacer esto, la opción más prometedora es utilizar ambos métodos de manera complementaria con la intención de obtener resultados de mayor precisión (Min 2010; Sonah *et al.* 2016).

En cuanto a los resultados particulares de *L. trichoderma*, se observó variación intraespecífica en el número de péptidos efectores predichos de localización nuclear y apoplástica. La cepa CA15-F10 fue la que presentó un número mayor, mientras que la cepa EF-36 fue la que presentó el menor. Ensayos experimentales con diversas cepas de *L. trichoderma* han mostrado que existen diferencias en su capacidad de colonización (Flores-Almaraz 2020), pues de las cuatro cepas estudiadas, sólo *L. trichoderma* CA15-F10 desarrolló ectomicorrizas maduras y abundantes (Flores-Almaraz 2020). Dado que es necesaria la participación y coordinación de diferentes compuestos entre la planta y el hongo, como las MiSSP, para el desarrollo de una interacción exitosa (Plett *et al.* 2014; Veneault-Fourrey *et al.* 2014; Ditengou *et al.* 2015; Pellegrin *et al.* 2019), la capacidad colonizadora de la cepa CA15-F10 y la formación de micorrizas incipientes por parte de las cepas no infectivas, podría estar relacionada con la cantidad e identidad de las MiSSP predichas en la presente tesis. De acuerdo a lo reportado para *L. bicolor*, especie hermana de *L. trichoderma*, esta cuenta con un núcleo de genes cuya expresión es independiente de la identidad del huésped, enriquecido con genes que codifican para MiSSP y necesario para permitir su estilo de vida mutualista; además de contar con un conjunto de genes cuya expresión está regulada dependiendo del hospedero del hongo (Plett *et al.* 2015). Varios de estos genes podrían presentar relaciones de homología con los genes codificadores de MiSSP predichos para *L. trichoderma*, por lo que su identificación es necesaria para el estudio de su simbiosis. De ahí que resulte necesario generar datos transcriptómicos que nos permitan la identificación experimental de las MiSSP involucradas en la

micorrización, así como las posibles diferencias de expresión de éstas entre cepas. Para esto sería necesario secuenciar RNA extraído de ectomicorrizas formadas por las cepas de *L. trichodermophora* en presencia de *P. montezumae*, su hospedero natural; realizar análisis de expresión diferencial que permitan identificar similitudes y diferencias significativas en los patrones de expresión y, anotar funcionalmente a las MiSSP codificadas por los transcritos con respecto a bases de datos de familias y dominios de proteínas.

Por otro lado, los números obtenidos de MiSSP potenciales en *L. trichodermophora* son diferentes y menores con respecto a los previamente reportados para esta misma especie (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020). Esto puede deberse a que en los protocolos de predicción propuestos en esta tesis se incluyeron más criterios, como la ausencia de dominios transmembranales (TM) y de señales de localización que indicasen residencia permanente en el lumen del RE (KDEL) (Jones y Dangl 2006; Stergiopoulos y de Wit 2009; Djamei *et al.* 2011; Lo Presti *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2018). De igual modo, se incluyeron criterios de localización más específicos para los péptidos de localización en apoplasto y los que se introducen a la célula vegetal (particularmente aquellos de potencial localización nuclear) (Veneault-Fourrey y Martin 2011). Sin embargo, pese a que la inclusión de los criterios antes mencionados tuvo como consecuencia la detección de un número menor de péptidos efectores, se presume que los resultados obtenidos con nuestros protocolos son más robustos que los previamente reportados.

Finalmente, es importante tomar en cuenta que los diferentes métodos de predicción de genes empleados para predecir secuencias de aminoácidos a partir de ensambles genómicos, podría verse reflejado en la cantidad, e incluso la identidad de los genes predichos. Al realizar una comparación entre el número de proteínas predichas para los archivos de secuencias de aminoácidos pertenecientes a las mismas cepas, pero obtenidos mediante métodos de predicción distintos, se observó que los mayores números en promedio pertenecieron a los archivos descargados de NCBI independientemente del protocolo analítico utilizado. La principal diferencia entre los métodos predictivos utilizados para generar los archivos de aminoácidos es la utilización de información extrínseca a la secuencia genómica. Mientras que los archivos de aminoácidos generados por nuestro grupo de investigación se predijeron con un método *ab initio* (Ángeles-Argáiz 2022); es decir, basado únicamente en la

información contenida en el genoma; las predicciones realizadas por NCBI son una combinación de modelado *ab initio* con la búsqueda de similitudes en secuencias de genes entre EST (etiquetas de secuencias expresadas), proteínas u otros genomas para el genoma de entrada. Además, NCBI usa información experimental siempre que esté disponible.

11. Conclusiones

Los protocolos analíticos propuestos en la presente tesis permiten predecir MiSSP potenciales y MiSSP efectoras de localizaciones específicas. Sin embargo, la naturaleza y evolución de estos elementos génicos es tal que los predictores tienen limitaciones para detectar todas las MiSSP que ya se han detectado utilizando métodos experimentales. De igual modo, las diferencias en los métodos de secuenciación y de predicción de genes de los genomas analizados parecen estar relacionados con los resultados obtenidos a partir de ellos.

Si bien se detectó la presencia de MiSSP potenciales en todas las cepas de las tres especies de *Laccaria* analizadas, tanto las especies generalistas como la cepa infectiva de *L. trichodermophora* presentaron números más altos de MiSSP potenciales. De acuerdo con estos datos, tanto la preferencia por hospedero como la capacidad colonizadora de los hongos ectomicorrícicos podría estar relacionada con la cantidad e identidad de las MiSSP contenidas y expresadas por su genoma.

12. Referencias

- Aimanianda V., Bayry J., Bozza S., Knemeyer O., Perruccio K., Elluru S., Clavaud C., Paris S., Brakhage A., Kaveri S. *et al.* (2009). Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 460: 1117–1121.
- Amarasinghe S., Su S., Dong X. *et al.* (2020). Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome Biology* 21: 30.
<https://doi.org/10.1186/s13059-020-1935-5>
- Alfaro M., Oguiza J. A., Ramirez L., y Pisabarro A. G. (2014). Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *Journal of Proteomics* 102: 28–43.
10.1016/j.jprot.2014.03.001
- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E. y Lipman D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Almagro J., Konstantinos D., Tsirigos, Sønderby C., Petersen T., Winther O., Brunak S., von Heijne G., y Nielsen H. (2019). SignalP v5.0 *Nature Biotechnology* 37: 420-423, doi:10.1038/s41587-019-0036-z

- Ángeles-Argáiz R., Carmona-Reyes I., Quintero-Corrales C., Medina-Macías F., Blancas-Cabrera A., Valdez-Cruz N., Ulloa M., Trujillo-Roldán M., y Garibay-Orijel R. (2020). From field sampling to pneumatic bioreactor mycelia production of the ectomycorrhizal mushroom *Laccaria trichodermophora*. *Fungal Biology* 124 (3-4): 205-218.
- Ángeles-Argáiz R., y Garibay-Orijel R. (2019). La evolución de la simbiosis ectomicorrízica desde la perspectiva genómica. *Scientia fungorum*. <https://doi.org/10.33885/sf.2019.49.1247>
- Ángeles-Argáiz, R. (2022). *Genómica comparativa de Laccaria trichodermophora como herramienta para entender su potencial biotecnológico* (tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Atrebe (2013). *Ectomycorrhiza illustration*. Wikimedia Commons, <https://commons.wikimedia.org/wiki/>
- Baldrian P., Voríisková J., Dobiasova P., Merhautova V., Lisa L., y Valaskova V. (2011). Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Soil* 338: 111-125.
- Balestrini R., y Kottke I. (2016). Structure and development of ectomycorrhizal roots. In: Martin F, ed. *Molecular mycorrhizal symbiosis*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 47-62.
- Brun A., Chalot M., Finlay R., y Soderstrom B. (1994). Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. and *Betula pendula* Roth. I. Dynamics of mycorrhiza formation. *New Phytologist* 129: 487-493.
- Brundrett, M. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275-304.
- Brundett M., y Tedersoo L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220(4): 1108-1115.
- Boller T., y Felix G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60: 379–406.
- Bonfante P., y Genre A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant- fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* 148. doi: 10.1038/ncomms1046
- van den Burg H., Harrison S., Joosten M., Vervoort J., y de Wit P.. (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 19: 1420-1430.
- Carrasco-Hernández V., Pérez-Moreno J., Espinosa-Hernández V., Almaraz-Suárez J., Quintero-Lizaola R., y Torres-Aquino M. (2010). Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(4): 567-577
- Ceccaroli P., Buffalini M., Saltarelli R., Barbieri E., Polidori E., Ottonello S., Kohler A., Tisserant E., Martin F. y Stocchi V. (2010). Genomic profiling of carbohydrate

- metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* 189(3): 751-764. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03520.x>
- Chaparro J., Sheflin A., Manter D., y Vivanco J. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils* 48:489-499. doi:10.1007/s00374-012-0691-4
- Clemmensen K. *et al.* (2015). Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. *Science* 339: 1615.
- Daguerre Y., Plett J., y Veault-Fourrey C. (2017). Signaling pathways driving the development of ectomycorrhizal symbiosis. En: F. Martin (Ed.) *Molecular Mycorrhizal Symbiosis* 141-157.
- Di Battista C., Selosse M., Bouchard D., Stenström E., Le Tacon F. (1996). Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S238. *Mycological Research* 100(11):1315-1324.
- Ditengou F., Müller A., y Rosenkranz M. *et al.* (2015). Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nature Communications* 6: 6279. <https://doi.org/10.1038/ncomms7279>
- Dixon R., y Johnson P. (1992). Synthesis of ectomycorrhizae on Northern red oak seedlings in a Michigan nursery. *Journal of Arboriculture* 18: 266-272.
- Djamei A., Schipper K., Rabe F. *et al.* (2011) Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 478: 395-398.
- Doré J., Perraud M., Dieryckx C., Kohler A., Morin E., Henrissat B., *et al.* (2015). Comparative genomics, proteomics and transcriptomics give new insight into the exoproteome of the basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* and its involvement in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 208: 1169-1187. doi:10.1111/nph.13546
- Downie J. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews* 34: 150-170.
- Durbin R., Eddy S., Krogh A., y Mitchison G. (1998). Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids. Cambridge University Press, UK.
- Duplessis S., Courty P., Tagu D. y Martin F. (2005). Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist* 165: 599-611.
- Duvaud S., Gabella C., Lisacek F., Stockinger H., Ioannidis V., y Durinx C. (2021). Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Research* 49. 10.1093/nar/gkab225.
- Eastwood D., Floudas D., Binder M., Majcherczyk A., Schneider P., Aerts A., *et al.* (2011). The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. *Science* 333:762-765. doi: 10.1126/science.1205411
- Ellis J., Rafiqi M., Gan P., Chakrabarti A., Dodds P. (2009). Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 399-405.

- Felten. J., Kohler A., Morin E., Bhalerao R., Palme K., Martin F., *et al.* (2009). The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in Poplar and Arabidopsis through auxin transport and signaling. *Plant Physiology* 151: 1991-2005.
- Finlay, R. (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* 59: 1115-1126.
- Flores-Almaraz V. (2020). *Viabilidad, infectividad y efectividad del inóculo vegetativo ectomicorrízico de Laccaria trichodermorphora* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Fouché S., Plissonneau C., y Croll D. (2018). The birth and death of effectors in rapidly evolving filamentous pathogen genomes. *Current Opinion in Microbiology* 46: 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.020>
- Franklin O., Näsholm T., Högborg P., y Högborg M. (2014). Forests trapped in nitrogen limitation – an ecological market perspective on ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 203: 657-666. doi:10.1111/nph
- Galindo-Flores G., Castillo-Guevara C., Campos-López A., y Lara C. (2015). Caracterización de las ectomicorizas formadas por *Laccaria trichodermorphora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences* 93(4): 855-863.
- GBIF Secretariat. (2017a). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2019-05-16. *Laccaria trichodermorphora* G.M.Muell. accessed via GBIF.org on 2019-05-16.
- GBIF Secretariat. (2017b). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2019-05-16. *Pinus montezumae* Lamb. accessed via GBIF.org on 2019-05-16.
- Gea L., Normand L., Vian B., Gay G. (1994). Structural aspects of ectomycorrhizal of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol formed by an IAA-overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi. *New Phytologist* 128: 659-670.
- Gibson F. y Deacon J. (1988). Experimental study of the establishment of ectomycorrhizas in different regions of birch root systems. *Transactions of the British Mycological Society* 91: 239-251. doi.org/10.1016/S0007-1536 (88)80211-0
- Giollant M., Guillot J., Damez M., Dusser M., Didier P., Didier E. (1993). Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus*. Research on the possible involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation. *Plant Physiology* 101: 513-522.
- Giraldo M., y Valent B. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology* 11: 800-814. doi:10.1038/nrmicro3119.12840
- Girard V., Dieryckx C., Job C., y Job D. (2013). Secretomes: the fungal strike force. *Proteomics* 13: 597-608.
- Grigoriev I., Nikitin R., Haridas S., Kuo A., Ohm R., Otilar R., Riley R., Salamov A., Zhao X., Korzeniewski F., *et al.* (2014). MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research* 42: D699-D704.

- Grigoriev I., Nordberg H., Shabalov I., Aerts A., Cantor M., Goodstein D., Kuo A., Minovitsky S., Nikitin R., Ohm R., Otilar R., Poliakov A., Ratnere I., Riley R., Smirnova T., Rokhsar D., Dubchak I. (2012). *Nucleic Acids Research* 40: D26-32.
- Guidot A., Verner M., Debaud J., y Marmeisse R. (2005). Intraspecific variation in use of different organic nitrogen sources by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycorrhiza* 15(3): 167-177.
- Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., y Tesler G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29(8): 1072-1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086
- Hammer O., Harper D., y Ryan P. (2001). PAST Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):1-9.
- Hazard C., Kruitbos L., Davidson H., Mbow F., Taylor A., y Johnson D. (2017a). Contrasting effects of intra-and interspecific identity and richness of ectomycorrhizal fungi on host plants, nutrient retention and multifunctionality. *New Phytologist* 213(1): 852-863.
- Hazard C., Kruitbos L., Davidson H., Mbow F., Taylor A., y Johnson D. (2017b). Strain identity of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* is more important than richness in regulating plant and fungal performance under nutrient rich conditions. *Frontiers in microbiology* 8(1): 1874.
- van Der Heijden M., Martin F., Selosse M., y Sanders I. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* 205: 1406-1423.
- Hedh J., Johansson T., y Tunlid A. (2009). Variation in host specificity and gene content in strains from genetically isolated lineages of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* s. lat. *Mycorrhiza* 19: 549-558.
- Hentschel U., Steinert M., y Hacker J. (2000). Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends in Microbiology* 8: 226-231.
- Hess J., Pringle A. (2014). The natural histories of species and their genomes: asymbiotic and ectomycorrhizal *Amanita fungi*. In: Martin, F. (ed.), *Advances in botanical research* Vol. 70. Academic Press, London. Pp. 235-257.
- Hibbett D., Luz-Beatriz G., y Donoghue, M. (2000). Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in Basidiomycetes. *Nature* 407: 506-508. 10.1038/35035065
- Hobbie E., Jumpponen A., y Trappe J. (2005). Foliar and fungal 15N:14N ratios reflect developmental of mycorrhizae and nitrogen supply during primary succession: testing analytical models. *Oecologia* 146(2): 250-268.
- Hodkinson B., y Grice E. (2015). Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research. *Advances in wound care* 4(1): 50-58. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0542>
- Hortal S., Plett K., Plett J., Cresswell T., Johansen M., Pendall E., y Anderson I. (2017) Role of plant-fungal nutrient trading and host control in determining the competitive success of ectomycorrhizal fungi. *The ISME Journal* 11: 2666-2676, <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.116>.

- Horton P., Park K., Obayashi T., Fujita N., Harada H., *et al.* (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research* 35: W585-587.
- Jones J., y Dangl J. (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323-329. doi:10.1038/nature05286
- Kale S. (2012). Oomycete and fungal effector entry, a microbial Trojan horse. *New Phytologist* 193: 874-881.
- Kamoun S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* 44: 41-60.
- Kang H., Chen X., Kemppainen M., Pardo A., Veneault-Fourrey C., Kohler A., y Martin, F. (2020). The small secreted effector protein MiSSP7.6 of *Laccaria bicolor* is required for the establishment of ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental Microbiology* 22(4), 1435-1446. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14959>
- Kelley D. y Salzberg S. (2010). Detection and correction of false segmental duplications caused by genome mis-assembly. *Genome Biology* 11(3):R28.
- Khasa D., Piché Y., y Coughlan A. (2009). Advances in Mycorrhizal Science and Technology. NRC-Research Press.
- Koele N., Dickie I., Oleksyn J., Richardson S. y Reich P. (2012). No globally consistent effect of ectomycorrhizal status on foliar traits. *New Phytologist* 196: 845–852. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04297.x>
- Kohler A., Kuo A., Nagy L., Morin E., Barry K.W., Buscot F., *et al.* (2015). Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature Genetics* 47: 410-415. doi:10.1038/ng.3223
- Kloppholz S., Kuhn H., y Requena N. (2011). A secreted fungal effector of glomus intraradices promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology* 21: 1204-1209. doi:10.1016/j.cub.2011.06.044
- Krogh A., Larsson B., Von Heijne G., y Sonnhammer E. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology* 305(3): 567-580.
- Kropp B. y, Mueller G. (1999). *Laccaria*. En: J. W.G. Cairney, S. M. Chambers (Eds.), *Ectomycorrhizal Fungi: key genera in profile* (pp. 65-88). Berlin: Springer-Verlag.
- Kottke I., y Oberwinkler F. (1987). The cellular structure of the Hartig net: Coenocytic and transfer-cell like organization. *Nordic Journal of Botany* 7: 85-95.
- Kuo A., Kohler A., Martin F., y Grigoriev I. (2014). Expanding genomics of mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in Microbiology* 5: 582.
- Lakshmanan V., Selvaraj G., y Bais H. (2014). Functional soil microbiome: below ground solutions to an above ground problem. *Plant Physiology* 166: 689-700. doi:10.1104/pp.114.245811
- Larsen P., Sreedasyam A., Trivedi G., Podila G. K., Cseke L., y Collart F. (2011). Using next generation transcriptome sequencing to predict an ectomycorrhizal metabolome. *BMC Systems Biology* 5(1): 1-14.

- Lehto T. y Zwiazek J. (2011). Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza* 21(2):71-90.
- Linder M., Szilvay G., Nakari-Setälä T., y Penttilä M. (2005). Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 877-896. doi:10.1016/j.femsre.2005.01.004
- Logsdon G., Vollger M. y Eichler E. (2020). Long-read human genome sequencing and its applications. *Nature Reviews Genetics* 21: 597-614. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0236-x>
- López-Gutiérrez A., Pérez-Moreno J., Hernández-Santiago F., Uscanga-Mortera E., García-Esteva A., Cetina-Alcalá V., y Xoconostle-Cázares B. (2018). Nutrient mobilization, growth and field survival of *Pinus pringlei* inoculated with three ectomycorrhizal mushrooms. *Botanical Sciences* 96(2): 286-304.
- Lo Presti L., Lanver D., Schweizer G., Tanaka S., Liang L., Tollot M., *et al.* (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* 66: 513-545. doi:10.1146/annurev-arplant-043014-114623
- Luo Z., Wu C., Zhang C., Li H., Lipka U., y Polle A. (2014). The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. *Environmental and Experimental Botany* 108: 47-62.
- Marmeisse R., Guidot A., Gay G., Lambilliotte R., Sentenac H., Combier J., Melayah D., Fraissinet-Tachet L., y Debaud J. (2004). *Hebeloma cylindrosporum*— a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytologist* 163(3): 481-498. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01148.x>
- Martin F., Aerts A., Ahren D., Brun A., Danchin E., Duchaussoy F., *et al.* (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452: 88-92.
- Martin F., Kohler A., Murat C., Veneault-Fourrey C., y Hibbett D. (2016). Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology* 14: 760-773.
- Martin F., y Kamoun S. (2011). Effectors in Plant-Microbe Interactions. M. F, Kamoun S, ed. John Wiley & Sons, Oxford, U.K.
- Martin F., y Nehls U. (2009). Harnessing ectomycorrhizal genomics for ecological insights. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 508-515. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.007
- Martin F., y Selosse M. (2008) The *Laccaria* genome: a symbiont blueprint decoded. *New Phytologist* 180: 296-310.
- Melén K., Krogh A., y von Heijne G. (2003). Reliability measures for membrane protein topology prediction algorithms. *Journal of Molecular Biology*. 327: 735-744. doi:10.1016/S0022-2836(03)00182-7
- Mello A., y Ballestrini R. (2018). Recent insights on biological and ecological aspects of ectomycorrhizal fungi and their interactions. *Frontiers in Microbiology* 9:216.
- Mikheenko A., Prjibelski A., Saveliev V., Antipov D., Gurevich A. (2018). Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG, *Bioinformatics* 34 (13): 142-150. doi:10.1093/bioinformatics/bty266

- Min X. (2010). Evaluation of Computational Methods for Secreted Protein Prediction in Different Eukaryotes. *J Proteomics Bioinform* 3: 143-147. doi:10.4172/jpb.1000133
- Miyauchi S., Kiss E., Kuo A., Drula E., Kohler A., Sánchez-García M., Morin E., Andreopoulos B., Barry K., Bonito G., *et al.* (2020). Large-scale genome sequencing of mycorrhizal fungi provides insights into the early evolution of symbiotic traits. *Nature Communications* 11: 5125.
- Molina R., Massicotte H. y Trappe J. (1992). Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. En: M. R. Allen (Ed.) *Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungal process* (pp. 357-423). New York: Chapman & Hall.
- Montanini B., Levati E., Bolchi A., Kohler A., Morin E., Tisserant E., Martin F. y Ottonello S. (2010). Genome-wide search and functional identification of transcription factors in the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* 189(3): 736-750. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03525.x>
- Montoya A., Kong A., Estrada-Torres A., Cifuentes J., y Caballero J. (2004). Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. *Fungal Diversity* 17(11):115-143.
- Mortier F., Le Tacon F. y Garbaye J. (1988). Effect of inoculum type and inoculation dose on ectomycorrhizal development, root necrosis, and growth of Douglas fir seedlings inoculated with *Laccaria laccata* in a nursery. *Annals of Forest Science* 45: 301-310. doi.org/10.1051/forest:19880401.
- Mueller G. (1984). New North American species of *Laccaria* (Agaricales). *Mycotaxon* 20(1): 101-116.
- Mueller G., y Strack B. (1992). Evidence for a mycorrhizal host shift during migration of *Laccaria trichodermophora* and other agarics into neotropical oak forest. *Mycotaxon* 65(1): 249-256.
- Munro S., y Pelham H. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Journal of MAR Microbiology* 1348(5): 899-907. doi: 10.1016/0092-8674(87)90086-9. PMID: 3545499.
- Muszevska, A., Steczkiewicz K., Stepniewska-Dziubinska M. y Ginalski K. (2017). Cut-and-paste transposons in fungi with diverse lifestyles. *Genome Biology and Evolution* 9: 3463-3477.
- Nehls U. (2008). Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. *Journal of Experimental Botany* 59: 1097–1108. doi:10.1093/jxb/erm334.
- Nordberg H., Cantor M., Dusheyko S., Hua S., Poliakov A., Shabalov I., Smirnova T., Grigoriev I., y Dubchak I. (2014). *Nucleic Acids Research* 42(1):D26-31.
- Onwuchekwa N., Zwuiazek J., Quoreshi A., y Khasa D. (2014). Growth of mycorrhizal Jack pine (*Pinus banksiana*) and White spruce (*Picea glauca*) seedling planted in oil sands. *Mycorrhiza* 24: 431-441. doi.org/10.1007/s00572.
- Owji H., Nezafat N., Negahdaripour M., Hajiebrahimi A., y Ghasemi Y. (2018). A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *European Journal of Cell Biology* 97(6): 422-441. doi:10.1016/j.ejcb.2018.06.003

- van Ooij C. (2011). Symbiosis: establishing the roots of a relationship. *Nature Reviews Microbiology* 9: 629. doi:10.1038/nrmicro2642
- Osmundson T. (2003). Systematics of Rocky Mountain alpin *Laccaria* (Basidiomycota, Agaricales, Tricholomataceae) and ecology of Beartooth Plateau alpine macromycetes (tesis doctoral). Montana State University. Estados Unidos de América.
- Osmundson T., Cripps C., y Mueller G. (2005) Morphological and molecular systematics of Rocky Mountain alpine *Laccaria*. *Mycologia* 97: 949-972. <http://dx.doi.org/10.3852/mycologia.97.5.949>
- Pacheco-Cobos L., Rosetti M., Esquivel A., y Hudson R. (2015). Towards a traditional ecological knowledge-based monitoring scheme: a proposal for the case of edible mushrooms. *Biodiversity and Conservation* 24(5):1253-1269.
- Parladé J., y Álvarez I. (1993). Coinoculation of aseptically grown Douglas fir with pairs of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 3: 93-96.
- Pellegrin C., Daguerre Y., Ruytins J., Guinet F., Kemppainen M., Frei dit Frey N., et al. (2019). *Laccaria bicolor* MiSSP8 is a small-secreted protein decisive for the establishment of the ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental Microbiology*, in press (<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14727>)
- Pellegrin C., Morin E., Martin F. y Veneault-Fourrey C. (2015). Comparative Analysis of Secretomes from Ectomycorrhizal Fungi with an Emphasis on Small-Secreted Proteins. *Frontiers in Microbiology* 6:1278. doi: 10.3389/fmicb.2015.01278
- Pera J. y Parladé J. (2005). Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de plantas destinadas a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales* 14: 419-433.
- Pérez-Silva E., Herrera T., y Ocampo A. (2011). Nuevos registros de macromicetos para el municipio de Temascaltepec. Estado de México. *Revista Mexicana de Micología* 34(1):23-30.
- Perea-Estrada V., Pérez-Moreno J., Villarreal-Ruiz L., Trinidad-Santos A., De la I de Bauer M., Cetina-Alcalá V., y Tijerina-Chávez L. (2009). Humedad edáfica, nitrógeno y hongos ectomicorrícicos comestibles en el crecimiento de pino. *Revista Fitotecnica Mexicana* 32: 93-102.
- Petersen T., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8: 785-786.
- Peterson R. y Massicotte H. (2004). Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany* 82: 1074-1088.
- Peumans W., y van Damme E. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109: 347-352.
- Plassard C., y Dell B. (2010). Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiology* 30(9):1129-1139.
- Plett J. et al. (2012). Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Fungal Genetics and Biology* 49: 199-209.

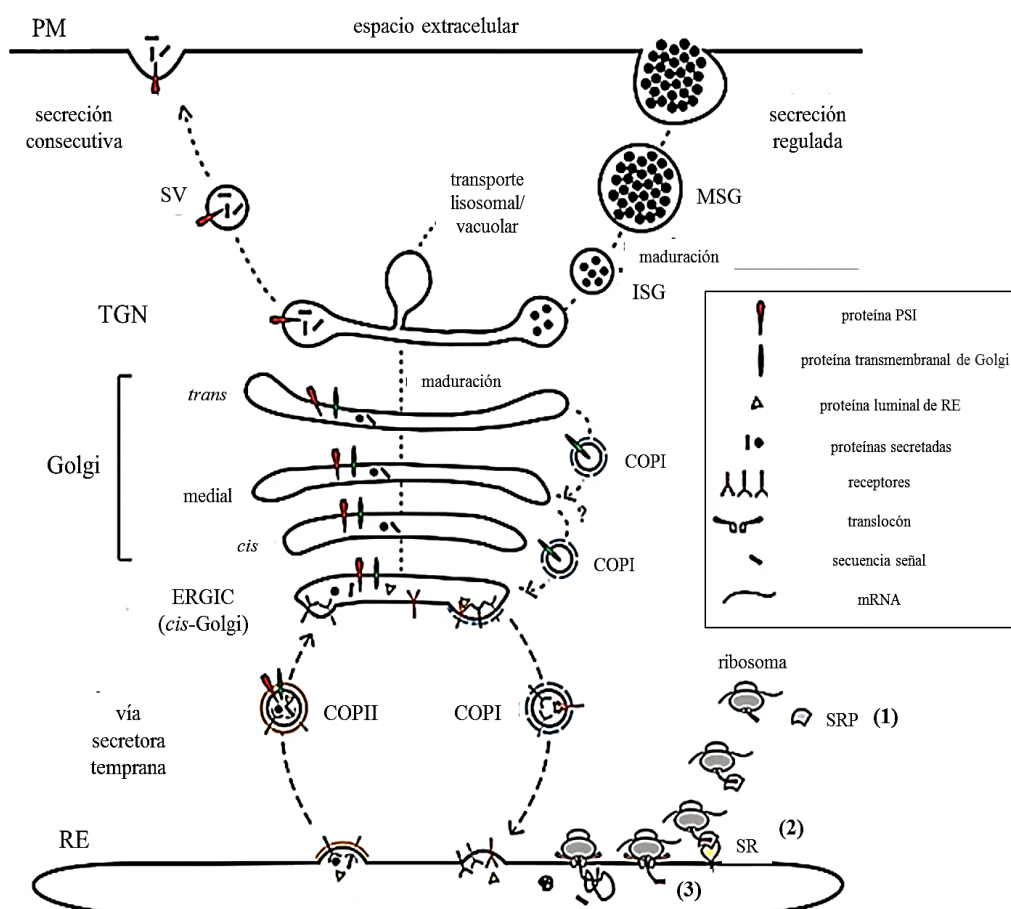
- Plett J., Daguerre Y., Wittulsky S., Vayssieres A., Deveau A., Melton S., Kohler A., Morrell-Falvey J., Brun A., Veneault-Fourrey C., y Martin F. (2014). Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(22): 8299-8304.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1322671111>
- Plett J., Kemppainen M., Kale S., Kohler A., Legue V., Brun A., *et al.* (2011). A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* is required for Symbiosis Development. *Current Biology* 21: 1197-1203.
- Plett J., Tisserant E., Brun A., Morin E., Grigoriev I., Kuo A., y Kohler A. (2015). The mutualist *Laccaria bicolor* expresses a core gene regulon during the colonization of diverse host plants and a variable regulon to counteract host-specific defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28(3): 261-273.
- Plett J., Plett K., Wong-Bajracharya J., Pereira M., Costa M., Kohler A., Martin F., y Anderson I. (2020). Mycorrhizal effector PaMiSSP10b alters polyamine biosynthesis in *Eucalyptus* root cells and promotes root colonization. *New Phytologist* 228: 712-727.
- Plett J., y Martin F. (2011). Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends in Genetics* 27: 14-22.
- Plett J., y Martin F. (2015). Reconsidering mutualistic plant-fungal interactions through the lens of effector biology. *Current Opinion in Plant Biology* 26: 45-50.
- Plett J., y Martin F. (2018). Know your enemy, embrace your friend: using omics to understand how plants respond differently to pathogenic and mutualistic microorganisms. *The Plant Journal* 93(4): 729-746.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13802>
- Quintero-Corrales C., Ángeles-Argáiz R. y Jaramillo-Correa J., Piñero D., Garibay-Orijel R., y Mastretta-Yanes A. (2020). Allopatric instead of parapatric divergence in an ectomycorrhizal fungus (*Laccaria trichodermorphora*) in tropical sky-islands. *Fungal Ecology* 47: 100966. 10.1016/j.funeco.2020.100966.
- Quoreshi A., Piché Y., y Khasa D. (2008). Field performance of conifer and hardwood species 5 years after nursery inoculation in the Canadian Prairie provinces. *New Forests* 35: 235-253. doi.org/10.1007/s11056-007-9074-3.
- Ramos A., Bandala V., y Montoya L. (2017). A new species and a new record of *Laccaria* (Fungi Basidiomycota) found in a relict forest of the endangered *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *MycKeys* 27 (1):77.
- Ramos J. (2018). *Estudio sobre la diversidad de los hongos y su conocimiento local del Cerro Comunal Teoca, Santa Cecilia Tepeltlapa, Xochimilco, Ciudad de México, México* (tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Raudaskoski M., y Kothe E. (2015). Novel findings on the role of signal exchange in arbuscular and ectomycorrhizal symbioses. *Mycorrhiza* 25: 243-252.
- Rep M. (2005). Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiology Letters* 253: 19-27.

- Rodríguez-Gutiérrez I., Ramírez-Martínez D., Garibay-Orijel R., Jacob-Cervantes V., Pérez-Moreno J., Ortega-Larrocea M. del P., y Arellano-Torres E. (2019). Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 90(0): 1-11. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2868>
- Rovenich H., Boshoven J., y Thomma B. (2014). Filamentous pathogen effector functions: of pathogens hosts and microbiomes. *Current Opinion in Plant Biology* 20C: 96-103.doi:10.1016/j.pbi.2014.05.001
- Sánchez-Ramírez S., Wilson A., y Ryberg M. (2017). Overview of phylogenetic approaches to mycorrhizal biogeography, diversity, and evolution. En: *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*. Springer, Cham.
- Sawyer N., Chambers S., y Cairney J. (2003). Distribution and persistence of *Amanita muscaria* genotypes in Australian *Pinus radiata* plantations. *Mycological Research* 105: 966-970.
- Sayers E., Bolton E., Brister J., Canese K., Chan J., Comeau D., Connor R., Funk K., Kelly C., Kim S., Madej T., Marchler-Bauer A., Lanczycki C., Lathrop S., Lu Z., Thibaud-Nissen F., Murphy T., Phan L., Skripchenko Y., Tse T., Wang J., Williams R., Trawick B., Pruitt K., Sherry S. (2022). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research* 7;50(D1):D20-D26. doi: 10.1093/nar/gkab1112. PMID: 34850941; PMCID: PMC8728269.
- Schimel J., y Schaeffer S. (2012). Microbial control over carbon cycling in soil. *Frontiers in Microbiology* 3:348.doi:10.3389/fmicb.2012.00348
- Simard S., Jones M., Durall D., Perry D., Myrold D., y Molina R. (1997). Reciprocal transfer of carbon isotopes between ectomycorrhizal *Betula papyrifera* and *Pseudostuga menziessi*. *New Phytologist* 137(3): 529-542.
- Simard S., Beiler K., y Bingham M. (2012). Mycorrhizal networks: mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews* 26(1): 39-60.
- Simard S. (2018). Mycorrhizal networks facilitate tree communication, learning and memory. En: Baluska, F., *et al.* (eds.) *Memory and Learning in plants*. Springer, 191-213.
- Smith S., y Read D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York, USA.
- Stanke M., y Morgenstern B. (2005). AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucleic Acids Research* 33:W465-7. doi: 10.1093/nar/gki458. PMID: 15980513; PMCID: PMC1160219.
- Stahl E., y Bishop, J. (2000). Plant-pathogen arms races at the molecular level. *Current opinion in plant biology*, 3(4): 299-304.
- Stergiopoulos I., y de Wit P. (2009). Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology* 47: 233-263.doi:10.1146 /annurev.phyto.112408.132637
- Stotz H., Mitrousia G., de Wit P., y Fitt B. (2014). Effector-triggered defense against apoplastic fungal pathogens. *Trends in Plant Science* 19: 491-500.

- Sonah H., Deshmukh R. y Bélanger R. (2016). Computational Prediction of Effector Proteins in Fungi: Opportunities and Challenges. *Frontiers in Plant Science* 7:126. doi: 10.3389/fpls.2016.00126
- Sperschneider J., Catanzariti A., DeBoer K., *et al.* LOCALIZER: subcellular localization prediction of both plant and effector proteins in the plant cell. *Scientific Reports* 7: 44598 (2017) doi:10.1038/srep44598
- Sperschneider J., Dodds P., Singh K., y Taylor J. (2018). Apoplast prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. *New Phytologist* 217(4):1764-1778. doi: 10.1111/nph.14946. Epub 2017 Dec 15. PMID: 29243824.
- Sperschneider J., Donald P., Dodds T., Francesco L., Covarelli-Lorenzo S., Karam J., Manners T. (2015). EFFECTORP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *The New phytologist* 210. 10.1111/nph.13794.
- Sudhakara R. y Natarajan K. (1997). Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza* 7: 133-138
- Talbot N., Kershaw M., Wakley G., De Vries O., Wessels J., Hamer J. (1996). MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* 8: 6985–6999.
- Tedersoo L., y Smith M. (2017). Ectomycorrhizal Fungal Lineages: Detection of Four New Groups and Notes on Consistent Recognition of Ectomycorrhizal Taxa in High-Throughput Sequencing Studies. In: Tedersoo, L. (eds) Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis. Ecological Studies, vol 230. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_6 10.1007/978-3-319-56363-3_6.
- Teste F., Jones M., y Dickie I. (2019). Dual-mycorrhizal plant: their ecology and relevance. *New Phytologist* 225(5): 1835-1851.
- Thomson B., Malajczuk N., Grove T., y Hardy G. (1993). Improving the colonization capacity and effectiveness of ectomycorrhizal fungal cultures by association with a host plant and re-isolation. *Mycological Research* 97:839-844.
- Trappe J. (1977). Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annual Review of Phytopathology*, 15: 203-222. doi.org/10.1146/annurev.py.15.090177.001223
- Trocha L., Weiser E., y Robakowski P. (2016). Interactive effects of juvenile defoliation, light conditions, and interspecific competition on growth and ectomycorrhizal colonization of *Fagus sylvatica* and *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 26(1): 47-56.
- Tschaplinski T., Plett J., Engle N., Deveau A., Cushman K., Martin M., y Martin F. (2014). *Populus trichocarpa* and *Populus deltoides* exhibit different metabolomic responses to colonization by the symbiotic fungus *Laccaria bicolor*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27(6): 546-556.
- Tucker S., Talbot N. (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39: 385–417

- Veneault-Fourrey C., y Martin F. (2011). Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 444-450. doi:10.1016/j.pbi.2011.03.022
- Viotti C. (2016). ER to Golgi-Dependent Protein Secretion: The Conventional Pathway. In: Pompa, A., De Marchis, F. (eds) *Unconventional Protein Secretion. Methods in Molecular Biology*, vol 1459. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3804-9_1
- Wadud M., Lian C., Nara K., Reza M., y Hogetsu T. (2008). Below ground genet differences of an ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* infecting *Salix* stands in primary successional stage. *Journal of Agroforestry and Environment* 2: 1-6.
- Wadud M., Nara K., Lian C., Ishida, A. y Hogetsu T. (2014). Genet dynamics and ecological functions of the pioneer ectomycorrhizal fungi *Laccaria amethystina* and *Laccaria laccata* in volcanic desert on Mount Fuji. *Mycorrhiza* 24: 551-563. doi.org/10.1007/s00572-014-0571.x.
- Wallander H., Nilsson L., Hagersberg D., y Baath E. (2001). Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytologist* 151: 753-760. doi:10.1046/j.0028-646x.2001.00199.x
- Wallenda T., y Kottke I. (1998). Nitrogen deposition and ectomycorrhizas. *New Phytologist* 139(1), 169-187. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00176.x>
- Wilson A., Hosaka K., y Mueller G. (2017). Evolution of ectomycorrhizas as a driver of diversification and biogeographic patterns in the model mycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. *New Phytologist* 213: 1862-1873. doi.org/10.1111/nph.14270.
- Wilson A., May T., y Mueller G. (2017). Biogeography of the Ectomycorrhizal Mushroom Genus *Laccaria*. *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* 273-297. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_13
- Win J., Chaparro-Garcia A., Belhaj K., Saunders D., Yoshida K., Dong S., y Kamoun S. (2012). Effector Biology of Plant-Associated Organisms: Concepts and Perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 77(0): 235-247. doi:10.1101/sqb.2012.77.015933
- Zadworny M., Werner A., e Idzikowska K. (2004). Behavior of the hyphae of *Laccaria laccata* in the presence of *Trichoderma harzianum* in vitro. *Mycorrhiza* 14: 401-40. doi.org/10.1007/s00572-004-0323-4.
- Zhao Z., Liu H., Wang C., y Xu J. (2014). Correction: comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell Wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics* 15:6. doi:10.1186/1471-2164-15-6
- Zhao L., Poschmann G., Waldera-Lupa D., Rafiee N., Kollmann M., y Stühler K. (2019). OutCyte: a novel tool for predicting unconventional protein secretion. *Scientific Reports* 9(1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55351-z>
- Zhang F., Anasontzis G., Labourel A., Champion C., Haon M., Kemppainen M., Commun C., Deveau A., Pardo A., Veneault-Fourrey C., Kohler A., Rosso M., Henrissat B., Berrin J., y Martin F. (2018). The ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* releases a secreted β -1, 4 endoglucanase that plays a key role in symbiosis development. *New Phytologist* 220(4), 1309-1321. <https://doi.org/10.1111/nph.15113>

13. Apéndices



Apéndice A. Ruta de secreción convencional de proteínas. Representación esquemática de la secreción convencional de proteínas en eucariontes. Las proteínas secretadas se translocan en el RE tras (1) el reconocimiento de la secuencia señal por parte de la partícula de reconocimiento de señal (SRP); (2) la interacción de la SRP con su receptor (SR); y (3) el transporte a través del translocón hacia la luz del RE. En el RE, la secuencia señal se escinde, las proteínas se pliegan mediante chaperones moleculares y se empaquetan en vesículas COPII tras la interacción receptor-ligando. Las vesículas de COPII se envían al *cis*-Golgi (en hongos y plantas). Las proteínas lumenales secretadas del RE se transportan desde el *cis*-Golgi al RE a través de vesículas COPI. Las proteínas de membrana plasmática (PM) y las proteínas secretadas se transportan a través de la maduración cisternal a la red del *trans* Golgi (TGN), mientras que las proteínas integrales de Golgi se recuperan a través del transporte mediado por COPI intra-Golgi. En el TGN, las proteínas destinadas a ser secretadas se clasifican en vesículas secretoras (SV) o gránulos secretores inmaduros (ISG). Los SV se entregan constitutivamente hacia la membrana plasmática, mientras que los ISG se acumulan en el citoplasma. Tras la llegada de estímulos específicos, los ISG forman gránulos secretores maduros (MSG) que se transportan a la membrana plasmática (modificado de Viotti 2016).

Apéndice B. MiSSP de *Laccaria bicolor* S238N-H82. Tabla de las MiSSP de *L. bicolor* S238N-H82 utilizadas, con su respectivo número de referencia en NCBI y secuencia de aminoácidos.

MiSSP	Número de referencia NCBI	Secuencia de aminoácidos
6.4	XP_001878966.1	mlswlyttsl lasfvsyydg lpifinplyq vpnstiltgh tnyltvheid fkantq
6.5	XP_001886529.1	mhsflvrstl cyiysfvfnl srvsprtdi hifdslvffa iviylhrfpgm qvny
6.6	XP_001876981.1	msvqttrall clgkwsimgf vhnndikkia klpevpeedg dsegevdmpd gwdtimwtt
7	EDR07554.1	mkllypnl ll iaalaispal sspvpgevgi vergpipnav frrvpepnff kdllralgqa sqggdlhr
7.2	XP_001881946.1	mkllypnl ll iaalaispal sspvpgevgi vergpipnav frrvpepnff kdllralgqa sqggdlhr
7.7	XP_001886546.1	mqlkpfvavi llfvaqsiaa ecivaqspgs geypspisid gsvmctsnac cpgqghccgi spdvqyclpi gtic
8.3	XP_001881844.1	myfhtlfaca tmlittaha sptvinslds rkadlngdve arhaadwrrd sdwrrdsdwr rdsdwrrdsd
10.4	XP_001884210.1	mhsfnaivtv lmtallastq avpqgqaapk aaaaaaacw kcpsdqgqfk fqqqagsdpl hcqflkdgvv ycydykvadg tliynaidaf cpasaipc
11.8	XP_001888067.1	mkvasllpfv aliasiavaa hgdynefear efvdalnare aveefharsv liedlttrel vdelnerlar rgnliskpkt yqcpycgsky ptaaqakdcs kfckak
12	XP_001888075.1	mhsfkftrp falvlaivcl aiatptpdvh adpghgsgav vhavgnapdg avikyitth lpeatsptdk tlggstlepd ssecfalgtl csfnsccsg hcnsiplifv lgfcyp
13.4	XP_001888541.1	matftiqtpv galfatapai pggpiqfiag nnfpnqqwvl tpagltqien vdfpgpgfas vvgpgvdel vnvpgaprnw fiaaagggst irladaepfl fwalndddea ilvaapaaif nivvpvfp
13.7	XP_001879934.1	mrctclmtif mlalgafaqd gtstgtdgsl tnlpvpttst tlpdattatd vtsittsvp tiststtps ttptansatt taptslvtsy artpapvttf rapplpngna afrlalsnhd titqsigfg hghm
16.2	XP_001887881.1	mrhslgtfv alvflplcl ahpqespppv vtttcsysc ppndysgfrl iskvdagyd saysifecvy rdevvggvykk aqtcyhhks glralssqai pscptqalpc magsqpvfns mdgktpetpp wvesgrflw kkenpsrd
16.5	XP_001881951.1	mhlktlcsal llslfptitv ayvrpdlyi vnrvtprga plavtlsgen kvavistktm sptqqwyite fdnggqaivs asdsslkaar vgnsltiph ssqvwvniqt pdgyyriqnp gggkagwvts adsgssvvg tefgqkgeui eaa
16.6	XP_001889616.1	mklplisla lslntftvln alassvvrar slatvdeatk relnllprd plppgqsaii lcdgtsrtgn cyayeaavgt cnavpdhft nlfsfanqg dvcltyttds ctannceav dydgwndmts faavyswkc vadsngcsda ncvhk

MiSSP	Número de referencia NCBI	Secuencia de aminoácidos
17.8	XP_001886750.1	mcaattlisl flisiganaq sskpastssa isatpsitac ilacvesaat angcaytnas cicasaqfqa daalcitqhc taddlknala lqtsqchsvs vrsrgtasit phtvsftaps svastaslts sihtsasla sasipansts vsssgvnqts elstrvtfgi ialismalii
19	XP_001888710.1	mvkfsaalfi aiaisapala iptekhevar elsenvyerg ldaedlnsv rdfyegdism revndlvre pffgaifsav kaavkigkga kkihdknrh rkrdledse vyqrsldgev merdfeedfq arevdhfar dfpdvdlfgr eldefyerei edld
21.37	XP_001888220.1	mkfsliflgl favataapla irraehapag vvsgrdiqtg dmlrrsdnsp iqvrands iknrlngenle trqveeiaei veavvelvtg lidainednt krgqftidtv tqsgewpgf nvwichtdht tafdgqtgtd wghthheldv tfgtigfely wfrsgtfrn gdggylnway edwwlpllsi t
21.9	XP_001880146.1	mhfaftldsi elaleilra sapvivsdet afgkstks yystalalas vsyairqvtm pyllhtvvlr stsnvhafin alrlqeeyseq cssrlqldyk mirhglytpl sniirarepr aefqviali qrtrarlcf rarvevstry agwahgevea idvyargvgv franyafdal dsrtfhlfgv psacf
22.2	XP_001881276.1	mpkgykvllp fflacstrt tsmipimnlhp llcysqhpve snhcailwd lreapvsiph vssldhflpd aeltqhatsp pvtifhvsdg ffeewsiev rnpqgvtdld vlkaihsalq pqihqhower lckkhqdrva avfdarwrvs aepeesrthg vlridcllhh twfgglsvsl edenscilsr rpr
22.4	XP_001884178.1	mllsnaflvi sltislases gsayslfrt sfffprdwep eicnpdfegs alsyvgnhge wgaesiepgs hiigtstrga eianadhft lthngetpr yviqdvhdad lvvgivnnkl qlqlnisdg tqiwsvqcef cdsgefageda ylaaydcis sptteecvel glntqpltl vpcsrdekq lfqfwtanat arge
23.4	XP_001879491.1	mhlfsfknsa lpvvalqvlv llssdqafga visiermkn agswtakdlk tsayrneamk ynkgsylpta nnnkvawikg aigdaehie pgahikpvl elgikkdtpf hkeikqvlh kdnlsmlhpg tnkakaqlat dprnpklka takhylqpp irqkastma klgraaekhk iknfeakvka kvkgilphik rselaeyhld
23.5	XP_001878846.1	mlvlqilsaa laislakanp vavdvhnwen psadgafkre elivaslagh ysqiyppte tslltryhqe ratcldqfww ycqipagaci aavgsiappi nlwslpcai aavcasvalt lgalcngvi kncdnpsgfa sgtrpvtgnv maalngngnd tpftrdtrn gfnsylwshg sevpndddfn nmynnlfnra fcsfgpgegg ngchpasvsv dspfevqssk rnkylca
23.6	XP_001882407.1	mqflsawaf aqtifdftli snydmsltp gtrahglrq srahaaasda amrafkveal asnasflqlr dpdgchhvsh nflnyqtypg ydnpigisgp gpngsiwitm rgapdsgkns nvvireelcv vgpldpngsh yhdceidia eiylgggnqa eftfytsqgs yipgqpkhq gggvytdtn gaagqefyky qvylergsis rslrm
24.2	XP_001878007.1	mtfklitvla tslflplptl slsynaysst ntcsgssfgc idnggaccgg mptgygystl fnnlpqgsqg qgyssgppct nfifnvfakc wnsgrsraa ylnwfhsper rrdevgasdp pleeqtaqdr lrtlstlrr eprgalcpmt pdtgpchhnn fdeslddqe lhrstvqvqq qsvldlthlr gitpmkegd pqvqrqtqp vkcgrevgs gavq

MiSSP	Número de referencia NCBI	Secuencia de aminoácidos
29.4	XP_001888712.1	mvkfiapvai liaapliafa aegeftrela evdvtytrdnf edtadlaard lesieydiae rgfpfgaisg iakglrsrskg vskgfssavk igkkansann hyqnaqanyq ngkstfqsik gkfgsrrgr dlealyerdf deefaerdlp edvlefverg fdedlleref ddellerevd edvferdvee dilereled lmerelddedi lerefdedlv vrdvedavle rfddeemer ddleerevdi deld
31	XP_001888724.1	mrfstisial aavafgssv laqeyditsl eardfdtdle vrelfdldla rfdldlear eieseltre ldssieerv deeleargh grkgrhgrgr khrggrkaaa paaeaapaea ppaevatref ieeleargh grkgrhgrgr khrggrkaaa paaeaapaea ppaevatref ieeleargh grkgrhgrgr khrggrkaaa paaeaapaea ppaevatref dpelearqie eieeliarap rggggrgggr rgggrggg grggrgrkaq qeqptevk
32.1	XP_001883153.1	mrwslilstf vaaqfalsfa tvipssdlq rrapadgav ssktyrkisq lhpaykfdk aggytrhrlt qsaripnhrt mllipktad hifehqvldh hldkhglkfg dlhpdllkqv kgimnspnl vvpaginrg kgqvfrqark gkaitpkdr dayiklsyts skktakldh afkkaghdfg qntvqrtl mmnnakimna ndspassrs ssrssskass kassrasspn rspassrs pqsnassnka ipkrpalvfi pkapnrksdr iaakppksyk v

Apéndice C. Secuencia KDEL y variantes. Tabla de la secuencia KDEL, detectada por el programa ScanProsit tool, y sus variantes en distintas especies.

Señal	Especies
KDEL	Vertebrados, <i>Drosophila</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> , plantas
HDEL	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , plantas
DDEL	<i>Kluyveromyces lactis</i>
ADEL	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (levadura de fisión)
ADEL	<i>Plasmodium falciparum</i>

Apéndice D. MiSSPs de *Laccaria bicolor* S238N en genomas de *Laccaria*. Matriz con el número de hits encontrado para cada MiSSP de *L. bicolor* disponible en bases de datos públicas, tanto en genomas (G) como proteomas (P) de especies del género *Laccaria*.

Especies	<i>Laccaria amethystina</i>										<i>Laccaria bicolor</i>																		<i>Laccaria trichodermophora</i>															
Cepas	LaAM-08-1				LaAM-08-1 v2.0		S1306 v1.0		CBS 559.96 v1.0		CBS 594.89 v1.0		Cham3 v1.0		D101-1		DR170 v1.0		N203 v1.0		S238N 93.12 v1.1		S238N-HS3 v1.0		S238N-H70 v1.0		S238N-HS2		S238N-HS2+H70 v1.0		S238N v1.0		S238O v1.0		v2.0		CA15-11		CA15-75		CA15-F10		EF-36	
HITS	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G	P		
MeSSP 6.4	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	-	2	1	1	-	1	-
MeSSP 6.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	-	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	4	-	2	-	2	-	2	-		
MeSSP 6.6	19	13	21	-	22	1	16	-	15	-	18	-	36	-	31	1	26	1	54	-	29	3	30	1	25	2	22	1	43	1	23	-	24	12	57	1	31	4	63	6	33	6		
MeSSP 7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	1	1	1	4	2	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	-	-	1	1	2	-	2	-	1	-	1	-		
MeSSP 7.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	1	1	1	4	2	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	-	-	1	1	2	-	2	-	1	-	1	-		
MeSSP 7.7	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	3	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	-	1	-	1	-	1	-
MeSSP 8.3	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	2	2	-	1	1	1	2	1	-	
MeSSP 10.4	9	6	9	6	4	5	9	8	9	8	11	7	16	8	15	9	12	8	7	5	5	6	7	6	7	5	5	5	5	5	8	5	5	6	25	-	10	2	20	4	8	2		
MeSSP 11.8	1	1	1	1	2	1	5	2	5	1	2	1	2	1	2	1	8	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	4	1	4	2	2	1	2	1		
MeSSP 12	-	1	-	1	10	9	13	12	14	13	12	12	12	16	23	21	13	12	16	11	9	10	9	9	10	10	8	8	11	11	8	6	10	10	18	1	8	2	9	-	3	1		
MeSSP 13.4	-	3	-	2	4	9	1	6	2	5	1	5	2	9	9	15	2	6	2	6	1	5	1	4	1	4	-	3	1	5	1	7	1	5	2	4	4	4	9	10	1	4		
MeSSP 13.7	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	4	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	1	1	3	-	2	1		
MeSSP 16.2	4	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	7	4	4	3	2	3	9	3	4	3	4	3	6	3	4	3	6	3	5	3	6	3	7	1	7	1	8	-	4	-		
MeSSP 16.5	3	5	3	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	5	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	1	3	2	3	3	-	1	3	2	6	2	7	4	8	2	3	1		
MeSSP 16.6	2	1	2	1	5	2	6	2	3	1	2	1	6	1	2	-	4	2	12	2	6	1	6	1	9	2	4	-	6	1	2	1	9	2	10	3	11	5	6	3	4	1		
MeSSP 17.8	4	4	4	4	6	4	3	3	3	2	5	3	5	3	4	2	3	3	9	4	4	3	2	2	4	3	3	2	4	3	4	4	6	4	4	1	9	-	8	2	3	1		
MeSSP 19	2	4	2	4	2	4	2	4	2	3	2	4	3	5	2	4	2	5	4	5	3	5	3	5	3	6	3	4	3	6	3	4	3	7	5	7	6	6	5	4	3	3		
MeSSP 21.37	15	5	15	6	10	3	10	4	10	3	8	4	16	5	12	6	8	4	9	6	4	4	11	6	5	4	8	6	5	4	8	5	4	3	16	4	16	2	15	6	6	2		
MeSSP 21.9	2	1	2	1	4	2	3	1	4	1	3	1	2	1	7	-	3	2	11	6	9	4	8	5	7	4	4	2	11	3	3	1	7	4	5	1	7	-	5	1	3	1		
MeSSP 22.2	8	10	8	10	11	12	10	12	15	17	10	12	15	15	6	8	12	10	12	10	8	11	8	10	8	8	9	11	8	10	6	8	8	10	13	15	8	9	11	7	7	8		
MeSSP 22.4	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	4	1	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	3	-	4	-	6	1	2	-		
MeSSP 23.4	6	3	6	3	5	3	5	3	6	3	7	3	6	3	8	3	9	4	16	4	8	4	7	4	8	4	7	4	8	4	13	7	8	4	22	10	21	6	23	8	11	6		
MeSSP 23.5	14	8	15	10	21	8	22	9	23	8	21	9	36	12	25	11	21	10	28	9	22	9	22	9	17	8	22	9	20	10	25	11	17	9	38	10	49	5	41	9	24	7		
MeSSP 23.6	2	1	2	1	4	2	7	3	4	2	3	1	2	1	4	3	22	6	35	17	14	7	11	6	18	8	4	3	20	8	3	2	18	11	6	3	6	3	8	4	4	2		
MeSSP 24.2	9	4	9	5	3	2	3	2	2	2	3	1	3	2	2	2	3	2	5	2	4	2	4	2	3	2	4	2	3	2	2	1	3	2	4	3	4	2	7	3	2	1		
MeSSP 29.4	3	3	3	5	1	6	1	6	1	6	1	8	2	7	1	4	1	6	2	4	3	5	3	5	3	5	3	4	3	5	2	6	3	5	4	14	4	10	2	5	1	6		
MeSSP 31	2	7	2	8	3	7	3	5	3	6	3	4	6	6	3	6	3	4	3	5	3	7	3	7	3	6	3	7	3	6	3	6	3	6	3	10	6	9	5	4	3	5		
MeSSP 32.1	-	-	-	-	4	3	4	3	7	4	4	3	15	6	10	5	7	3	11	4	4	3	7	4	7	4	7	4	7	4	1	3	7	2	21	6	21	8	22	7	7	3		

Apéndice E. Números y porcentajes de las categorías de proteínas predichas con el protocolo 1. Tabla de número y porcentaje de proteínas secretoras (PS tot), proteínas secretoras sin dominios transmembranales (PS(TM)) y sin localización permanente en RE (PS(TM/RE)), proteínas secretoras de localización nuclear (Nucl) y apoplástica (Apo) y proteínas secretoras efectoras de localización nuclear (Nucl_Efe) y apoplástica (Apo_Efe) predichas con el protocolo 1 para cada proteoma de las cepas analizadas de *Laccaria*. La terminación *lab* en un proteoma de las cepas LaAM-08, D101 v1.0 y S238N-H8, indica que estos proteomas son producto del Laboratorio de Sistemática y Ecología y Aprovechamiento de Micorrizas del Instituto de Biología de la UNAM.

			Proteínas de secreción (con péptido señal)					Localización				Efectores					
Especies	Cepa	Proteomas	PS tot	PS(TM)		PS(TM/RE)		Nucl		Apo		Nucl_Efe		Apo_Efe		TOTAL	
<i>L. amethystina</i>	LaAM-08-1	LaAM_08_1	1048	828	79.0%	818	78.1%	135	12.9%	420	40.1%	18	1.7%	124	11.8%	142	13.5%
		LaAM_08_1_lab	580	448	77.2%	440	75.9%	96	16.6%	221	38.1%	6	1.0%	38	6.6%	44	7.6%
	LaAM-08-1 v2.0	LaAM_08_1_v2	1022	804	78.7%	794	77.7%	147	14.4%	412	40.3%	22	2.2%	118	11.5%	140	13.7%
<i>L. bicolor</i>	81306 v1.0	81306_v1	1051	836	79.5%	826	78.6%	141	13.4%	454	43.2%	19	1.8%	109	10.4%	128	12.2%
	CBS 559.96 v1.0	CBS_559_96_v1	1061	852	80.3%	842	79.4%	140	13.2%	465	43.8%	19	1.8%	130	12.3%	149	14.0%
	CBS 594.89 v1.0	CBS_594_89_v1	1701	1349	79.3%	1327	78.0%	190	11.2%	818	48.1%	21	1.2%	147	8.6%	168	9.9%
	Cham3 v1.0	Cham3_v1	940	745	79.3%	736	78.3%	116	12.3%	433	46.1%	15	1.6%	111	11.8%	126	13.4%
	D101_v1.0	D101_v1	1237	1018	82.3%	1009	81.6%	170	13.7%	569	46.0%	25	2.0%	149	12.0%	174	14.1%
		D101_v1_lab	808	654	80.9%	645	79.8%	125	15.5%	363	44.9%	11	1.4%	67	8.3%	78	9.7%
	DR170 v1.0	DR170_v1	1208	998	82.6%	990	82.0%	163	13.5%	495	41.0%	19	1.6%	164	13.6%	183	15.1%
	N203 v1.0	N203_1	1105	892	80.7%	885	80.1%	152	13.8%	472	42.7%	18	1.6%	136	12.3%	154	13.9%
	S238N 93.12 v1.1	S238N_93_12_v1_1	1304	1075	82.4%	1066	81.7%	185	14.2%	537	41.2%	24	1.8%	144	11.0%	168	12.9%
	S238N-H53 v1.0	S238N_H53_v1	1016	814	80.1%	804	79.1%	151	14.9%	449	44.2%	20	2.0%	113	11.1%	133	13.1%
	S238N-H70 v1.0	S238N_H70_v1	1077	874	81.2%	866	80.4%	160	14.9%	484	44.9%	24	2.2%	124	11.5%	148	13.7%
	S238N-H82	S238N_H82	1038	835	80.4%	825	79.5%	151	14.5%	455	43.8%	19	1.8%	122	11.8%	141	13.6%
		S238N_H82_lab	604	487	80.6%	480	79.5%	103	17.1%	242	40.1%	8	1.3%	37	6.1%	45	7.5%
	S238N-H82xH70 v1.0	S238N_H82_H70 v1	968	774	80.0%	766	79.1%	136	14.0%	436	45.0%	16	1.7%	113	11.7%	129	13.3%
	S238N v1.0	S238N_v1	1094	895	81.8%	884	80.8%	150	13.7%	475	43.4%	20	1.8%	130	11.9%	150	13.7%
	S238O v1.0	S238O_v1	967	777	80.4%	769	79.5%	133	13.8%	443	45.8%	17	1.8%	100	10.3%	117	12.1%
	v2.0	v2	1097	897	81.8%	888	80.9%	157	14.3%	467	42.6%	22	2.0%	134	12.2%	156	14.2%
<i>L. tricodermophora</i>	CA15-11	CA15_11	932	742	79.6%	731	78.4%	144	15.5%	376	40.3%	10	1.1%	52	5.6%	62	6.7%
	CA15-75	CA15_75	587	504	85.9%	499	85.0%	77	13.1%	243	41.4%	16	2.7%	62	10.6%	78	13.3%
	CA15-F10	CA15_F10	637	563	88.4%	559	87.8%	88	13.8%	260	40.8%	12	1.9%	69	10.8%	81	12.7%
	EF-36	EF_36	512	418	81.6%	412	80.5%	91	17.8%	196	38.3%	6	1.2%	32	6.3%	38	7.4%

Apéndice F. Números y porcentajes de las categorías de proteínas predichas con el protocolo 2. Tabla de número y porcentaje de proteínas secretoras (PS tot), proteínas secretoras sin dominios transmembranales (PS(TM)) y sin localización permanente en RE (PS(TM/RE)), proteínas secretoras de localización nuclear (Nucl) y apoplástica (Apo) y proteínas secretoras efectoras de localización nuclear (Nucl_Efe) y apoplástica (Apo_Efe) predichas con el protocolo 2 para cada proteoma de las cepas analizadas de *Laccaria*. La terminación *lab* en un proteoma de las cepas LaAM-08, D101 v1.0 y S238N-H8, indica que estos proteomas son producto del Laboratorio de Sistemática y Ecología y Aprovechamiento de Micorrizas del Instituto de Biología de la UNAM.

			Proteínas de secreción (con péptido señal)					Localización					Efectores						
Especies	Cepa	Proteomas	PS tot	PS(TM)		PS(TM/RE)		Nucl		Extracelular		Apo		Nud_Efe		Apo_Efe		TOTAL	
<i>L. amethystina</i>	LaAM-08-1	LaAM_08_1	1048	828	79.0%	818	78.1%	259	24.7%	225	21.5%	197	18.8%	78	7.4%	29	2.8%	107	10.2%
<i>L. bicolor</i>		LaAM_08_1_lab	580	448	77.2%	440	75.9%	117	20.2%	132	22.8%	114	19.7%	16	2.8%	11	1.9%	27	4.7%
	LaAM-08-1 v2.0	LaAM_08_1_v2	1022	804	78.7%	794	77.7%	253	24.8%	222	21.7%	194	19.0%	70	6.8%	28	2.7%	98	9.6%
	81306 v1.0	81306_v1	1051	836	79.5%	826	78.6%	247	23.5%	249	23.7%	225	21.4%	67	6.4%	25	2.4%	92	8.8%
	CBS 559.96 v1.0	CBS_559_96_v1	1061	852	80.3%	842	79.4%	243	22.9%	256	24.1%	225	21.2%	76	7.2%	32	3.0%	108	10.2%
	CBS 594.89 v1.0	CBS_594_89_v1	1701	1349	79.3%	1327	78.0%	299	17.6%	496	29.2%	445	26.2%	66	3.9%	38	2.2%	104	6.1%
	Cham3 v1.0	Cham3_v1	940	745	79.3%	736	78.3%	182	19.4%	250	26.6%	220	23.4%	54	5.7%	28	3.0%	82	8.7%
	D101_v1.0	D101_v1	1237	1018	82.3%	1009	81.6%	289	23.4%	297	24.0%	259	20.9%	72	5.8%	44	3.6%	116	9.4%
		D101_v1_lab	808	654	80.9%	645	79.8%	174	21.5%	202	25.0%	180	22.3%	24	3.0%	17	2.1%	41	5.1%
	DR170 v1.0	DR170_v1	1208	998	82.6%	990	82.0%	368	30.5%	225	18.6%	195	16.1%	95	7.9%	34	2.8%	129	10.7%
	N203 v1.0	N203_1	1105	892	80.7%	885	80.1%	292	26.4%	240	21.7%	212	19.2%	74	6.7%	34	3.1%	108	9.8%
<i>L. tricolor</i>	S238N 93.12 v1.1	S238N_93_12_v1_1	1304	1075	82.4%	1066	81.7%	341	26.2%	284	21.8%	247	18.9%	94	7.2%	30	2.3%	124	9.5%
	S238N-H53 v1.0	S238N_H53_v1	1016	814	80.1%	804	79.1%	245	24.1%	244	24.0%	219	21.6%	56	5.5%	26	2.6%	82	8.1%
	S238N-H70 v1.0	S238N_H70_v1	1077	874	81.2%	866	80.4%	264	24.5%	268	24.9%	237	22.0%	72	6.7%	25	2.3%	97	9.0%
	S238N-H82	S238N_H82	1038	835	80.4%	825	79.5%	251	24.2%	248	23.9%	223	21.5%	67	6.5%	27	2.6%	94	9.1%
		S238N_H82_lab	604	487	80.6%	480	79.5%	133	22.0%	147	24.3%	129	21.4%	18	3.0%	11	1.8%	29	4.8%
	S238N-H82xH70 v1.0	S238N_H82_H70_v1	968	774	80.0%	766	79.1%	219	22.6%	245	25.3%	220	22.7%	57	5.9%	27	2.8%	84	8.7%
	S238N v1.0	S238N_v1	1094	895	81.8%	884	80.8%	263	24.0%	253	23.1%	220	20.1%	63	5.8%	27	2.5%	90	8.2%
	S238O v1.0	S238O_v1	967	777	80.4%	769	79.5%	222	23.0%	246	25.4%	218	22.5%	51	5.3%	27	2.8%	78	8.1%
	v2.0	v2	1097	897	81.8%	888	80.9%	269	24.5%	249	22.7%	216	19.7%	75	6.8%	30	2.7%	105	9.6%
	CA15-11	CA15_11	932	742	79.6%	731	78.4%	202	21.7%	226	24.2%	195	20.9%	26	2.8%	13	1.4%	39	4.2%
CA15-75	CA15_75	587	504	85.9%	499	85.0%	160	27.3%	125	21.3%	106	18.1%	35	6.0%	18	3.1%	53	9.0%	
CA15-F10	CA15_F10	637	563	88.4%	559	87.8%	192	30.1%	122	19.2%	109	17.1%	47	7.4%	11	1.7%	58	9.1%	
EF-36	EF_36	512	418	81.6%	412	80.5%	130	25.4%	125	24.4%	110	21.5%	19	3.7%	12	2.3%	31	6.1%	