



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN DE LA EVOLUCIÓN
MOLECULAR Y DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES
QUITINA-SINTASA EN EL HONGO *Mycosphaerella
fijiensis***

Tesis que presenta

LILIA PÉREZ OYOSA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

MAYO, 2014





RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Caracterización de la evolución molecular y de la expresión de los genes quitina-sintasa en el hongo *Mycosphaerella fijiensis*", fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado, dentro de la Opción Maestría en Biotecnología de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Felipe", is positioned above a horizontal line.

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

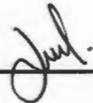
Coordinador de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: I.B.Q. Lilia Pérez Oyosa

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Arturo Pérez Vidal y Nelly Oyosa Ramos por su amor incondicional, por el apoyo que me han brindado siempre y por la fe que han tenido en mí, sin ellos simplemente no estaría aquí.

Al Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado por haberme dado la oportunidad de unirme a su grupo de trabajo, por su asesoramiento durante la realización del proyecto de investigación y también por la paciencia que me tuvo durante todo ese tiempo.

Al comité revisor integrado por la Dra. Cecilia Rodríguez, la Dra. Blondy Canto, la Dra. Daisy Pérez y la Dra. Laura Conde, por el tiempo que dedicaron a la revisión de la tesis, así como sus valiosas observaciones y correcciones en el trabajo de investigación.

A la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Ref. 255367) para realizar estudios de posgrado en el programa de Maestría en Ciencias Biológicas en el Centro de Investigación Científica de Yucatán.

A los técnicos Biol. Felipe Barredo Pool, a la M.C. Adriana Quiroz Moreno y al Dr. César de los Santos Briones, por el apoyo técnico que me brindaron durante el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos, Alejandra Ramos, Gloria Hernández, Miguel Canseco, Luis Carlos Leyva, a mi hermanito académico Ramón Pacheco, por el apoyo moral y los ánimos que siempre me dieron y por su valiosa amistad.

A Víctor Cancino, por las porras, los ánimos, la paciencia y el cariño que me ha brindado durante la realización del escrito de tesis y por haberse convertido en alguien especial para mí.

A las personas que conocí durante todo el trayecto de la maestría, a las chicas de posgrado que siempre me recibieron con una gran sonrisa Landy y Ale, en general a todas esas personas que estuvieron conmigo brindándome su apoyo y su amistad.

Al laboratorio de Marcadores Moleculares y Genómica Funcional a cargo del Dr. Felipe Sánchez Teller, por el apoyo brindado en cuanto a equipos y materiales.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

ÍNDICE

RESUMEN.....	IX
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 EL REINO FUNGI: GENERALIDADES	3
1.2 LA QUITINA COMO COMPONENTE DE LA PARED CELULAR DE LOS HONGOS	7
1.3 SÍNTESIS DE QUITINA POR MEDIO DE LAS ENZIMAS QUITINA SINTASAS.....	9
1.4 <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> Y LA ENFERMEDAD DE LA SIGATOKA NEGRA	14
1.4.1 Infección y Sintomatología.....	15
1.4.2 Agente causal	16
1.4.3 Interacción <i>Mycosphaerella fijiensis</i> – <i>Musa</i> spp	17
1.4.4 Control de la enfermedad	18
1.4.5 El genoma de <i>M. fijiensis</i>	18
1.5 VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA	20
1.5.1 Frecuencia de Alelos	21
1.6 TEORÍA NEUTRA DE LA EVOLUCIÓN	24
1.6.1 Pruebas de Neutralidad.....	25
1.6.1.1 Prueba D de Tajima.....	25
1.6.1.2 Prueba de Fu y Li.....	26
1.6.1.3 Prueba de Diferencias sinónimas y no sinónimas	27
1.7 JUSTIFICACIÓN	29
1.8 HIPÓTESIS.....	30
1.9 OBJETIVOS.....	30
1.9.1 General.....	30
1.9.2 Particulares.....	30
1.10 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
1.11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

CAPÍTULO II.....	43
EVOLUCIÓN MOLECULAR DEL DOMINIO QUITINA-SINTASA EN <i>M. FIJENSIS</i>	43
II.1 INTRODUCCIÓN.....	43
II.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
II.2.1 Material Biológico.....	45
II.2.2 Crecimiento y mantenimiento de los aislados de <i>M. fijiensis</i>	45
II.2.3 Extracción de ADN genómico	46
II.2.4 Amplificación de la secuencias ITS y del gen de actina por medio de PCR convencional	46
II.2.5 Diseño de cebadores	47
II.2.6 Amplificación por medio de PCR convencional de fragmentos de genes quitina sintasa	48
II.2.7 Purificación de fragmentos amplificados por PCR para secuenciación ...	49
II.2.8 Análisis Filogenético	49
II.2.9 Pruebas de Neutralidad	49
II.3 RESULTADOS	51
II.3.1 Material Biológico	51
II.3.2 Extracción de ADN genómico	52
II.3.3 Amplificación de regiones ITS y gen de actina	53
II.3.4 Diseño de Cebadores	56
II.3.5 Amplificación de fragmentos de genes <i>CHS</i>	57
II.3.5.1 Amplificación del gen 130240 <i>CHS</i> clase I	57
II.3.5.2 Amplificación del gen 1.7989.1 <i>CHS</i> clase II	58
II.3.5.3 Amplificación del gen 90038 <i>CHS</i> clase III	58
II.3.5.4 Amplificación del gen 1.11.8.1 <i>CHS</i> clase IV	59
II.3.5.5 Amplificación del gen 20866 <i>CHS</i> clase V	60
II.3.5.6 Amplificación del gen 20000123 <i>CHS</i> clase VI	60
II.3.5.7 Amplificación del gen 20862 <i>CHS</i> clase VII	61
II.3.7 Pruebas de Neutralidad	68
II.4 DISCUSIÓN	72
II.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

CAPÍTULO III.....	81
EXPRESIÓN MOLECULAR DE LOS GENES QUITINA-SINTASA EN <i>M. FUJENSIS</i>	81
III.1 INTRODUCCIÓN.....	81
III.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
III.2.1 Extracción de ARN total	82
III.2.2 Tratamiento con desoxirribonucleasa (ADNasa I)	83
III.2.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc)	83
III.2.4 Amplificación de transcritos parciales CHS a partir de ADNc	83
III.3 RESULTADOS	85
III.3.1 Extracción de ARN total	85
III.3.2 Expresión de los genes quitina sintasa en el aislado Fougamou 3	85
III.4 DISCUSIÓN	87
III.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
CAPITULO IV.....	91
IV.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	91
IV.2 CONCLUSIONES	93
IV.3 PERSPECTIVAS	95
IV.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

Índice de Abreviaturas

ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
ADNg	Ácido Desoxirribonucleico genómico
AFTOL	Assembling the Fungal Tree of Life
ARN	Ácido Ribonucleico
BCM	Bencimidazoles
CHS	Chitin Synthase
DMI	Inhibidores de la desmetilación
dn	Sitios no sinónimos
ds	Sitios sinónimos
EC	Enzyme Comission
GlcNAc	N-aceritl-D-glucosamina
GPI	Glicosilfosfatigilinositol
INIFAP	Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
ITS	Internal Transcribed Spacer
Mb	Mega bases
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA	Agar Papa Dextrosa
TAE	Tris-Acetato-EDTA
UDP	Uridin difosfato

Índice de figuras

FIGURA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS GENES QUITINA SINTASA, POR CHOQUER ET AL., (2004)..	14
FIGURA 2. DIAGRAMA DE GENES PROBABLES DE QUITINA SINTASAS EN <i>M. FIJENSIS</i>.	48
FIGURA 3. DIAGRAMAS DE LOS GENES CONCATENADOS PARA CADA AISLADO..	50
FIGURA 4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE CEPAS DE <i>M. FIJENSIS</i>	51
FIGURA 5. ELECTROFORÉISIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DE LAS EXTRACCIONES DE ADN GENÓMICO DE LOS DOCE AISLADOS.	52
FIGURA 6. ELECTROFORÉISIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5% DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR CON OLIGOS ITS ESPECÍFICOS PARA <i>M. FIJENSIS</i>.	53
FIGURA 7. ELECTROFORÉISIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5% DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN DE ACTINA; SE UTILIZARON LOS OLIGOS REPORTADOS POR ARZANLOU Y COLABORADORES (2007).	54
FIGURA 8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS ITS DE LAS 12 CEPAS.	55
FIGURA 9. ANÁLISIS FILOGENÉTICO CON LAS SECUENCIAS DEL GEN DE ACTINA DE LAS 12 CEPAS	56
FIGURA 10. ELECTROFORÉISIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5% DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN <i>CHS</i> DE CLASE I.	57
FIGURA 11. ELECTROFORÉISIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5% DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN <i>CHS</i> DE CLASE II.	58
FIGURA 12. ELECTROFORÉISIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5% DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN <i>CHS</i> DE CLASE III.	59
FIGURA 13. ELECTROFORÉISIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5% DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN <i>CHS</i> DE CLASE IV.	59
FIGURA 14. ELECTROFORÉISIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5% DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN <i>CHS</i> DE CLASE V.	60
FIGURA 15. ELECTROFORÉISIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5% DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN <i>CHS</i> DE CLASE VI.	61
FIGURA 16. ELECTROFORÉISIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5% DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN <i>CHS</i> DE CLASE VII.	61
FIGURA 17. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LAS SIETE CLASES DE <i>CHS</i> AISLADAS DE LAS 12 CEPAS USADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO, CON GRUPO EXTERNO	64

FIGURA 18. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SIETE CLASES DE <i>CHS</i> AISLADAS DE LAS 12 CEPAS USADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO, SIN GRUPO EXTERNO.	65
FIGURA 19. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS FRAGMENTOS DE GENES CONCATENADOS, CON GRUPO EXTERNO.....	66
FIGURA 20. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS FRAGMENTOS DE GENES CONCATENADOS, SIN GRUPO EXTERNO.....	67
FIGURA 21. PRUEBAS DE NEUTRALIDAD.....	69
FIGURA 24. ARN TOTAL, Y ARN TRATADO CON ADNasa, DE LA CEPA DE <i>M. FIJIENSIS</i> AISLADA DEL CULTIVAR FOUGAMOU 3	85
FIGURA 25. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES QUITINA SINTASA DEL AISLADO FOUGAMOU 3	86

Índice de cuadros

CUADRO 1. PREDICCIÓN BIOINFORMÁTICA DE GENES <i>CHS</i> EN <i>M. FIJENSIS</i>, TOMADO DE PACHECO-ARJONA (COMUNICACIÓN PERSONAL).....	19
CUADRO 2. CONCENTRACIÓN DE ADN EN LAS MUESTRAS OBTENIDAS EN EL PRESENTE TRABAJO.....	52
CUADRO 3. DISEÑO DE CEBADORES EMPLEADOS PARA AMPLIFICAR FRAGMENTOS DE LOS SIETE GENES <i>CHS</i> EN <i>M. FIJENSIS</i>.	57
CUADRO 4. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE NEUTRALIDAD A PARTIR DE LOS CONCATENADOS.....	68
CUADRO 5. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE NEUTRALIDAD PARA CADA UNO DE LOS GENES <i>CHS</i>.....	70
CUADRO 6. SUBSTITUCIONES SINÓNIMAS Y NO SINÓNIMAS.	71

Resumen

La quitina es un polímero cristalino formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina ensambladas por medio de enlaces β -1,4. Este compuesto es vital para la integridad de la pared celular y de los septos de los hongos, ya que proporciona fuerza a través de los enlaces de hidrógeno de sus múltiples cadenas organizadas en microfibrillas. La quitina es sintetizada por las enzimas Quitina-Sintasas (Chs), que polimerizan la cadena creciente de quitina mediante la transferencia de monómeros de N-acetilglucosamina a partir de UDP-N-acetilglucosamina.

Existen 7 clases de Chs y como es un componente de vital importancia dentro de la pared celular, todos los hongos necesitan al menos un gen que codifique para alguna de las clases de esta enzima. Dependiendo de la especie, se pueden encontrar diversas combinaciones de clases y número de copias de este gen.

El hongo *Mycosphaerella fijiensis* es el agente causal de la enfermedad Sigatoka negra, la enfermedad foliar más destructiva del banano y plátano en el mundo. Dentro de su genoma se han localizado 7 secuencias probables de genes *CHS* (una de cada clase); de las cuales no se tienen estudios previos, ni han sido aisladas *in vivo*.

En el presente trabajo se diseñaron cebadores para aislar fragmentos de los genes *CHS* con base en las secuencias localizadas en el genoma de *M. fijiensis*, dichos fragmentos contienen los motivos universales de las Chs. Con estos cebadores se aislaron los fragmentos de las siete clases de quitina sintasa a partir del ADN genómico de doce cepas aisladas de diferentes cultivares de plátano y banano que presentaban los síntomas de la Sigatoka negra. Con base en las secuencias obtenidas, se realizaron análisis de filogenia y se llevaron a cabo pruebas de desviación de la neutralidad para determinar si existen fuerzas de presión selectiva ejerciendo sobre las mutaciones acumuladas en la región de interés. Simultáneamente se hizo un análisis de expresión de los siete genes en una cepa de *M. fijiensis* creciendo en condiciones de laboratorio con el fin de conocer qué genes se expresan bajo estas condiciones.

Los resultados de la filogenia mostraron que los fragmentos aislados de cada una de las cepas se separan en las diferentes clases de Chs, quedando la clase VI en un clado aparte, siendo el más distante. En cuanto a las pruebas de desviación de

neutralidad, se llevaron a cabo las pruebas D de Tajima, D^* y F^* de Fu & Li, y la prueba de diferencias sinónimas y no sinónimas. Todas las pruebas mostraron que existe una desviación de la neutralidad, teniendo como resultado valores positivos, lo que sugiere que la población pudiera estarse viendo afectada por una fuerza de selección sobredominante sobre el locus estudiado.

Algunas clases de Chs están involucradas en la patogenicidad, por lo tanto en condiciones de laboratorio pudiera ser que alguna de las clases no se exprese. Con el análisis de expresión se observó que la clase VI de las Chs no se expresa bajo estas condiciones, lo que podría sugerir que esta clase pueda estar involucrada en eventos de infección o que se exprese en otras condiciones de cultivo.

ABSTRACT

Chitin is a crystalline polymer formed by units of N-acetyl-D-glucosamine assembled via β -1,4 links; this compound is vital to the integrity of the cell wall and septa of fungi, providing strength through the hydrogen bonding of the multiple chitin chains organized as microfibrils. Chitin is synthesized by the chitin synthase (CHS) enzymes, which polymerize the growing chain by transferring chitin monomers of N-acetylglucosamine from UDP-N-acetylglucosamine.

There are seven classes of Chs and as a vital component of the cell wall, all fungi need at least one gene encoding any of the enzyme classes. Depending on the species, it may possess various combinations of classes and copy numbers of this gene.

The fungus *Mycosphaerella fijiensis* is the causal agent of black Sigatoka disease, the most destructive foliar disease of banana and plantain worldwide. Within its genome have been localized 7 probable CHS gene sequences (one for each class).

In the present work, primers were designed to isolate *CHS* gene fragments based on sequences located on the *M. fijiensis* genome, this fragments containing the universal Chs motifs. With these primers we were able to isolate fragments of the seven classes of chitin synthase from genomic DNA from twelve different strains isolated of banana and plantain cultivars presenting symptoms of black Sigatoka. Based on the obtained sequences, phylogeny analyzes were performed and also were conducted tests of deviation from neutrality to determine whether there are evolutionary forces influencing the accumulated mutations in the region of interest. Simultaneous, analysis of expression of the seven genes in a strain of *M. fijiensis* growing under laboratory conditions, in order to know which genes are expressed under these conditions was made.

Phylogeny results showed that the fragments isolated from each of the strains were separated into the different Chs classes, the class VI being a separate clade, the most distant. As evidence of deviation from neutrality, Tajima's D, D* and F*, D and F of Fu & Li, and the ratio of synonymous and nonsynonymous differences were conducted. All tests showed that there is a deviation from neutrality, resulting in positive values, suggesting that the population may be affected by an overdominant selection force on the studied locus.

It has been determined that some Chs classes are involved in pathogenicity, therefore, under laboratory conditions it would be expected that some of the classes are not necessarily expressed. With the analysis of expression was observed that the *CHS* class VI is not expressed under these conditions, which might suggest that this class may be involved in infection events or expressed in other culture conditions.

INTRODUCCIÓN

Los hongos se encuentran entre los organismos más importantes del mundo, no sólo a causa de sus papeles vitales en los ecosistemas, sino también por su influencia en los seres humanos y las actividades relacionadas con el hombre. Abarcan una amplitud asombrosa de taxones, morfologías, ecologías. Sin embargo, sólo información limitada e incompleta se encuentra actualmente disponible para la mayoría de las especies y las estimaciones actuales del número de especies de hongos difieren significativamente. (Mueller & Bills 2004). En la naturaleza, la vida de la célula fúngica depende de una estructura extracelular, la pared celular. Esto proporciona un soporte esquelético para las células fúngicas al mismo tiempo que permite la interacción de dichas células con el ambiente circundante. La integridad de esta estructura es esencial para la supervivencia de la célula en ambientes hostiles (Roncero, 2002).

La pared celular de los hongos está constituida por diversos carbohidratos como manano, glucano y quitina, los cuales usualmente se encuentran asociados con proteínas para darle forma y rigidez. La quitina es vital para la integridad de la pared celular y septos de los hongos, ya que proporciona fuerza a través de los enlaces de hidrógeno de las múltiples cadenas de quitina organizadas en microfibrillas (Banks *et al.*, 2005).

La quitina es sintetizada por enzimas llamadas Quitina Sintetasas (CHS, EC 2.4.1.16) las cuales sintetizan la cadena creciente de quitina por medio de la transferencia de GlcNAc a partir de uridina difosfoglucona N-acetilglucosamina (Abramczyk & Szaniszlo, 2009; Horiuchi *et al.*, 1999).

Mycosphaerella fijiensis Morelet es el agente causal de la enfermedad de la raya negra de las hojas o Sigatoka negra, la cual es la enfermedad foliar más destructiva del banano y plátano en todo el mundo (Churchill, 2011).

Este patógeno puede afectar tanto a las hojas viejas como a las hojas jóvenes metabólicamente activas, causa pérdidas de rendimiento de hasta 50% o más, y causa graves problemas de exportación debido a la maduración prematura de los frutos (Cho

et al., 2008). *M. fijiensis* se encuentra ampliamente distribuido en la mayoría de los países productores del mundo, incluyendo las regiones bananeras de México.

Actualmente se cuenta con el genoma completo secuenciado de una cepa virulenta de *M. fijiensis*, con un tamaño estimado de 74.1 Mb, contenido en 56 scaffolds principales, incluyendo un total de 13 903 modelos de genes (Churchill, 2011).

Dentro de su genoma se encuentran secuencias de genes probables de quitina sintasas, las cuales no han sido estudiadas, por tal motivo en el presente trabajo se analizaron fragmentos de los genes de quitina sintasas de diferentes cepas de *M. fijiensis*, mediante el aislamiento y secuenciación de cada uno de los fragmentos pertenecientes a cada clase de Chs, se realizaron análisis de filogenia y se llevaron a cabo pruebas de neutralidad: D de Tajima, D* y F* de Fu & Li y prueba de sustituciones sinónimas y no sinónimas, con el fin de conocer qué tipo de presión selectiva se encuentra ejerciendo sobre estos fragmentos de genes *CHS*. También se llevó a cabo un análisis de expresión por medio de RT-PCR de una de las cepas de *M. fijiensis*, para saber que genes *CHS* se expresan bajo condiciones de laboratorio.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

I.1 El reino fungi: generalidades

Existen aproximadamente 1.5 millones de miembros pertenecientes al reino Fungi (Hawksworth, 1991); éstos tienen un impacto sobre casi todas las otras formas de vida, ya sea en relaciones benéficas o perjudiciales. Los hongos juegan un papel crítico en el ambiente mediante la descomposición de materia orgánica y las relaciones simbióticas con organismos procariotas, plantas y animales. En particular, los hongos comparten una larga historia con la civilización humana. La relación puede ser positiva, como en el caso de las biotransformaciones, por ejemplo la fermentación o la producción de antibióticos; o puede ser extremadamente perjudicial, como los efectos devastadores de las micosis, enfermedades de las plantas y las micotoxinas.

Los hongos tienen componentes claves comunes con las células de animales y vegetales, incluyendo la multicelularidad, estructuras del citoesqueleto, desarrollo y diferenciación, reproducción, ciclo celular, señalización intercelular, metilación del ADN, y modificación de la cromatina (Galagan *et al.*, 2005).

La Fundación Nacional de Ciencia de los Estados Unidos (US National Science Foundation) ha financiado el proyecto Assembling the Fungal Tree of Life (AFTOL), en el cual se está llevando a cabo un amplio estudio del reino de los hongos, utilizando el método de análisis de secuencias multilocus, se basan en las similitudes de sus secuencias genéticas y evalúan las relaciones entre los hongos y los organismos estrechamente relacionados. Este estudio proporciona evidencia de que el reino Fungi contiene al menos ocho diferentes *phyla*, en lugar de cuatro como se pensaba. Según el estudio de Hibbet y colaboradores (2007), los *phyla* incluidos en el Reino Fungi son:

1. Ascomycota
2. Basidiomycota
3. Zygomycota
4. Chytridiomycota
5. Glomeromycota
6. Blastocladiomycota
7. Neocallimastigomycota

8. Microsporidia

Las características que comparten estos organismos, en forma parcial o total, son las siguientes (Webster & Weber, 2007; Pontón *et al.*, 2002; Herrera & Ulloa, 1990):

- A. Nivel de organización unicelular o pluricelular; dimorfismo, el cual depende de las fases del ciclo biológico y las condiciones del medio en que se desarrollan. El cuerpo vegetativo o talo no presenta vasos conductores de savia, ni está diferenciado en raíz, tallo u hojas como en las plantas. Aunque el talo puede ser unicelular o plasmodial, en la mayoría de los casos es filamentososo, entonces se dice que es micelial, por estar construido por un conjunto de filamentos o hifas, que recibe el nombre de micelio. Los talos tienen paredes celulares bien definidas.
- B. Las paredes celulares están constituidas principalmente por quitina, en combinación con diversos polisacáridos como por ejemplo quitosano, β -glucano, manano, glicógeno y polímeros de galactosamina. Las paredes celulares son estratificadas, están generalmente constituidas por dos o varias láminas de microfibrillas dispuestas en una materia amorfa, quedando la lámina interna adherida a la membrana protoplasmática. Las sustancias de reserva son, generalmente, glicógeno y lípidos.
- C. En general, la estructura de las células de los hongos es muy semejante a la de las células de las plantas vasculares, porque presentan pared celular estratificada, núcleo eucariótico, mitocondrias, retículo endoplásmico, vacuolas y ribosomas, entre otras características. Difieren de las plantas en la falta de cloroplastos y en la constitución química de la pared celular y de las sustancias de reserva. Aunque carecen de clorofila, muchos hongos tienen pigmentos que les proporcionan coloraciones diversas.
- D. El talo puede ser unicelular y uninucleado, o bien pluricelular con células uninucleadas, binucleadas o multinucleadas. El núcleo celular es eucariótico; según su constitución genética puede ser haploide, diploide, poliploide o aneuploide. Cuando el talo es micelial, puede ser aseptado, y típicamente

cenocítico por ser multinucleado y tener un citoplasma continuo; o bien puede ser septado, si presenta septos o tabiques transversales.

- E. Presentan respiración fundamentalmente aerobia, aunque muchos hongos son microaerófilos o anaerobios facultativos, como la mayor parte de las levaduras y algunos mohos, que pueden tener gran capacidad fermentativa usando como sustrato diversos carbohidratos y otras sustancias orgánicas.
- F. La nutrición de los hongos es heterótrofa, todos requieren de algún tipo de materia orgánica para desarrollarse. La obtención de alimentos es de tipo absorbente y por tanto se efectúa directamente por osmosis. Hay formas saprobitas, simbióticas y parásitas, pero en todos los casos parte o todo el talo del hongo debe estar inmerso en el sustrato que contiene el alimento. Este hecho condiciona su modo de vida, ya que en la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado del carbono y otros elementos naturales o como patógenos oportunistas de los animales y plantas. Los hongos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de potentes exoenzimas que en algunos casos pueden servirles como factores de virulencia en el hospedero.
- G. La mayoría de los hongos presentan reproducción sexual y asexual de tipos muy diversos según los casos pero, generalmente, con la producción de esporas móviles o inmóviles y de pared a veces muy gruesa y, con frecuencia, producidas en fructificaciones más o menos sencillas o complejas. El estado sexual se denomina teleomorfo o meiospórico y el asexual anamorfo o mitospórico. Las esporas de origen asexual se producen sin que haya previos fenómenos sexuales, por el contrario, las esporas de origen sexual sólo se forman después de la unión de los gametos. En muchos casos, no se producen gametos diferenciados e individualizados y, entonces, son los órganos sexuales los que se unen siguiendo dos modalidades fundamentales: contacto gametangial y copulación gametangial; o sólo hay fusión de núcleos, que generalmente puede presentarse mucho tiempo después de la unión de los protoplastos de talos vegetativos o hifas indiferenciadas, hasta el momento en que se forman las fructificaciones del hongo. En un grupo importante de

hongos solamente se conoce la reproducción asexual, bien porque no se conocen las condiciones adecuadas para que se desarrolle la forma sexual o porque ésta se ha perdido a lo largo de la evolución. Aunque la reproducción asexual puede lograrse por fragmentación de las hifas, también llamada reproducción vegetativa, ya que cada fragmento puede producir una nueva colonia, normalmente los hongos se reproducen, tanto sexual como asexualmente, por medio de esporas.

- H. Cuentan con una distribución generalmente cosmopolita, pero hay especies y formas de distribución restringida o endémica, en particular las simbióticas y parásitas, cuyo desarrollo depende de la presencia del simbiote o del hospedero, la cual a su vez está ligada a un determinado hábitat.
- I. Los hongos que presentan crecimiento levaduriforme generalmente dan lugar a colonias lisas semejantes a las bacterianas en medios de cultivo sólido. Dichas colonias están formadas por agregados de células individuales (3-10 x 5-30 μm) denominadas levaduras. Los hongos levaduriformes se dividen por gemación o por fisión binaria. En algunos casos las células hijas no se separan de la célula madre, formándose cadenas cortas denominadas pseudohifas. Los hongos que presentan este tipo de crecimiento, denominado pseudomicelio, dan lugar a colonias similares a las que producen los hongos levaduriformes en medios sólidos.
- J. La clave para el crecimiento de la hifa fúngica se encuentra en el ápice, debido a la polaridad de la misma y a la secreción de enzimas degradativas. El citoplasma del ápice extremo está ocupado casi exclusivamente por vesículas secretoras y microvesículas. En los hongos superiores, las primeras están dispuestas como una cubierta esférica alrededor de las microvesículas, la formación completa es llamada *Spitzenkörper* o "cuerpo apical".
- K. Los cuerpos de Woronin, son orgánulos proteicos que pueden estar estrechamente agrupados cerca del poro central; son estructuras globosas o cristales hexagonales compuestos esencialmente por una proteína y están rodeados por una membrana. Miden 150-500 nm de anchura y son lo suficientemente grandes como para bloquear el poro del septo, actúan

rápida y cerca de regiones donde una hifa ha sido dañada físicamente. Los cuerpos de Woronin se forman cerca del ápice de la hifa y son transportados a regiones más distales de la hifa conforme se desarrollan los septos; se han registrado en ascomicetos y hongos relacionados.

- L. Sus requerimientos de temperatura y de pH son poco exigentes y la mayoría crecen en un rango de pH de 2 a 9 y a temperaturas entre 10 y 40 °C.

I.2 La quitina como componente de la pared celular de los hongos

La pared celular microbiana está involucrada en el crecimiento, desarrollo, señalización e interacción de los microorganismos con el ambiente. Representa una estructura esencial que confiere protección osmótica y mantiene la forma de la célula. En microorganismos patógenos, la pared celular es un reservorio de moléculas involucradas en el reconocimiento, adhesión y colonización del hospedero. El análisis de la estructura y composición de la pared celular permite la identificación de compuestos específicos que son blancos atractivos para el diseño de compuestos antimicrobianos (Badreddine *et al.*, 2008).

Las paredes celulares de los hongos son similares en parte a las paredes celulares de plantas y bacterias; poseen matriz extracelular similar a las de las células de mamíferos, una superficie aniónica y polisacáridos con enlaces β -1,4 y β -1,3 como componentes fibrosos. Mientras que las paredes celulares de eubacterias se encuentran entrelazadas por péptidos, las de las plantas se encuentran entrelazadas por compuestos fenólicos y polisacáridos que promueven asociaciones unidas por enlaces de hidrógeno (hemicelulosas o pectinas) (Cosgrove, 1997; Fry, 1986)

Las paredes celulares de los hongos son estructuralmente únicas y difieren significativamente de la pared celular vegetal, la cual es a base de celulosa. Las paredes celulares de los hongos están compuestas de glicoproteínas y polisacáridos, principalmente glucano y quitina. Las glicoproteínas presentes en la pared celular se modifican ampliamente con carbohidratos unidos por enlaces N- y O-glucosídicos, en muchos casos, contienen también un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI). El componente glucano es predominantemente β -1,3-glucano. La quitina se fabrica como cadenas de residuos de N-acetilglucosamina unidos por enlaces β -1,4 y es

típicamente menos abundante que las proporciones de glicoproteínas o glucano de la pared, sin embargo la quitina es esencial para la sobrevivencia de los hongos. La composición de la pared celular está sujeta a cambios y puede variar dependiendo de las condiciones y la etapa de crecimiento. Los componentes de glicoproteína, glucano y quitina están extensamente entrelazados para formar una red compleja, que forma la base estructural de la pared celular (Bowman & Free, 2006).

La quitina es un polímero cristalino que está formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina por medio de enlaces β -1,4; usualmente se encuentra asociada con otros polisacáridos y proteínas. La quitina se encuentra como componente principal de los exoesqueletos de crustáceos, insectos, moluscos, nemátodos (Veronico *et al.*, 2001) y es un componente esencial dentro de la pared celular de los hongos. La quitina se encuentra ampliamente distribuida y es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa, con al menos 10 gigatoneladas que son sintetizadas y degradadas cada año en la biósfera. Sin embargo, está ausente en vertebrados y en plantas superiores, y por lo tanto representa un blanco importante para el desarrollo de compuestos antimicrobianos con el fin de controlar enfermedades causadas por hongos en humanos y en cultivos (Magellan *et al.* 2010; Martín-Urdíroz *et al.* 2008; Choquer *et al.*, 2004).

La quitina es vital para la integridad de la pared celular y septos de los hongos, ya que proporciona fuerza a través de los enlaces de hidrógeno de las múltiples cadenas de quitina organizadas en microfibrillas (Banks *et al.*, 2005).

Los diversos efectos causados por la inhibición en la síntesis de quitina por medio de fármacos o por la disrupción de genes involucrados en la misma durante el crecimiento, morfología y virulencia de los hongos, comprueba que la quitina juega muchos papeles importantes en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Abramczyk & Szaniszlo, 2009).

Se considera que la quitina es un componente menor pero de gran importancia estructuralmente en la pared celular de los hongos levaduriformes. Mientras que en éstos constituye del 1 al 2% total del peso seco, para los hongos filamentosos, el contenido de quitina se ha reportado que puede ser hasta de un 40% del total en peso seco (Martín-Urdíroz *et al.*, 2008; Banks *et al.*, 2005).

I.3 Síntesis de quitina por medio de las enzimas quitina sintasas

Para producir la quitina, los hongos usan las enzimas quitina sintasas (CHS, EC 2.4.1.16), proteínas integrales, las cuales sintetizan la cadena creciente de quitina por medio de la transferencia de monómeros de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a partir de uridina difosfoglucosa N-acetilglucosamina (Abramczyk & Szaniszló, 2009; Horiuchi *et al.*, 1999). Las cadenas individuales de quitina pasan a través de la membrana plasmática para convertirse en un componente extracelular de la pared celular o del tabique (Banks *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004).

Varios autores han proporcionado evidencia de la existencia de un tipo especializado de vesículas en el citosol, llamadas quitosomas, donde la mayoría de las CHS son acumuladas. Estas vesículas sintetizan las microfibrillas de quitina a través de un mecanismo asimétrico, recibiendo los residuos de GlcNAc en la superficie citosólica y entregando las moléculas de quitina en la superficie interna. Por lo tanto, las quitosomas han sido consideradas como las vesículas responsables del transporte de CHS desde el retículo endoplásmico hacia la superficie de la célula (Treitschke *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2006; Martín-Urdíroz *et al.*, 2004).

Los hongos tienen múltiples genes *CHS*, los cuales están agrupados en dos divisiones, con siete clases. Se basan principalmente en la similitud de las secuencias primarias en la predicción de las proteínas que codifican. La división I incluye las clases I, II y III, las cuales tienen un dominio catalítico rodeado por una región N-terminal hidrofílica y una región C-terminal hidrofóbica. La división II incluye las clases IV, V y VII, las cuales contienen un dominio catalítico precedido por un dominio tipo citocromo-b5. Además, las clases V y VII contienen un dominio N-terminal tipo motor de miosina, que sugiere una interacción directa con el citoesqueleto de actina. La clase VI aún no ha sido asignada a ninguna división, ha sido identificada recientemente e incluye CHS con funciones que se desconocen (Riquelme *et al.*, 2007; Niño-Vega *et al.*, 2004).

Los genes que codifican las Chs pertenecientes a las clases III, V, VI y VII sólo se encuentran en hongos con altos contenidos de quitina en sus paredes celulares. (Fukuda *et al.*, 2009) Los hongos filamentosos pueden contener hasta 10 isoenzimas de Chs difundidas entre todas las clases de las dos divisiones (Choquer *et al.*, 2004). Pacheco-Arjona (comunicación personal); hace un estudio evolutivo y comparativo de

los genes *CHS* dentro de 61 genomas de hongos de diferentes géneros y *phyla*; en este estudio se reporta que la mayor cantidad de genes de quitina sintasa se encuentran en el hongo filamentoso *Phycomyces blakesleeanus*, con 21 genes *CHS* pertenecientes a las clases II, IV, V y 3 que no han podido ser clasificados, mientras que la levadura *Schizosaccharomyces pombe* cuenta con un solo gen *CHS*, perteneciente a la clase I.

La clase V de quitina sintasas, aparentemente se encuentra presente sólo en hongos filamentosos y en algunos hongos dimórficos y polimórficos que producen hifas verdaderas (Liu *et al*, 2004).

La síntesis de quitina ha sido mayormente caracterizada en la levadura *S. cerevisiae*, la cual tiene genes que codifican para tres Chs. Chs1, una Chs de clase I, está involucrada en la reparación de la pared celular de la célula hija, que es hidrolizada por quitinasas durante la división y separación celular. Chs2, una Chs de clase II, que se requiere para la formación del septo primario durante la citocinesis; la expresión de *CHS2* parece estar estrechamente regulada a través del ciclo celular. Finalmente, Chs3, una Chs de clase IV, genera el 90% de la quitina en *S. cerevisiae*; Chs3 sintetiza el anillo de quitina que aparece en la yema naciente, sintetiza la quitina de la pared lateral, y la quitina de la pared de la espora. Los niveles de *CHS3* como los de *CHS1* permanecen constantes durante el ciclo celular (Banks *et al.*, 2005; Kozubowski *et al.*, 2003; Osmond *et al.*, 1999)

La síntesis de quitina en los hongos es un proceso bastante complejo, regulado por familias multigénicas que codifican isoenzimas de quitina sintasas, algunas de ellas redundantes, cuyas actividades pueden ser reguladas espacialmente y estrictamente para cumplir con los varios papeles adscritos a ellas (Niño-Vega *et al.*, 2004).

Es probable que cada una de las siete clases de Chs sea funcionalmente divergente en los fenotipos, dependiendo tanto de los cambios en la estructura de dominios y la divergencia global de sus secuencias.

La quitina sintasa de Clase I, ScChs1p de *S. cerevisiae*, repara la quitina dañada durante la separación de células (Cabib *et al.*, 1992). Sin embargo, para los casos de CaChs2p y CaChs8p de *C. albicans*, ambas pertenecientes a la clase I, no se les

conoce funciones particulares (Munro *et al.*, 2003; Gow *et al.*, 1994). En *N. crassa*, la quitina sintasa de clase I juega un papel importante en la biogénesis de la pared celular (Yarden & Yanofsky, 1991). Uno de los dos genes *CHS* pertenecientes a la clase I en *A. nidulans*, *chsB*, participa en la formación de la pared celular normal en hifas vegetativas, conidióforos y en el desarrollo de conidios (Kong *et al.*, 2012).

Se sabe que las quitina sintasas de la Clase II tienen un papel importante en las levaduras, ya que sintetizan la quitina en el septo primario y son esenciales para la formación de septo en *S. cerevisiae* (Banks *et al.*, 2005). En *C. albicans*, *CaChs1p*, de clase II, está involucrada no sólo en la síntesis del septo primario, sino también en la integridad de la pared celular lateral (Munro *et al.*, 2001). La clase II de *A. nidulans*, *ChsA*, tiene un papel menor en la síntesis de quitina en las hifas y está involucrada en la formación de conidios (Culp *et al.*, 2000) mientras que aún no se conoce exactamente la función de *chsB* de *A. fumigatus* y *chs2* de *N. crassa* (Munro & Gow, 2001; Din & Yarden, 1994)

Las quitina sintasas de Clase III, se encuentran exclusivamente en hongos filamentosos. Estos genes son necesarios para la morfología normal de hifas en *N. crassa*, *A. nidulans* y *A. fumigatus*; las cepas con deleciones en los genes de esta clase muestran una disminución en la tasa de crecimiento radial, mala o nula formación de conidios y un aumento en la ramificación de hifas (Borgia *et al.*, 1996; Mellado *et al.*, 1996^a; Yarden & Yanofsky, 1991).

La Clase IV, de las quitina sintasas, en *S. cerevisiae* y en *C. albicans*, sintetizan la mayor parte de quitina *in vivo*, sin embargo deleciones en esta clase de *Chs* muestran que no es esencial (Mio *et al.*, 1996; Bulawa *et al.*, 1995; Valdivieso *et al.*, 1991). La clase IV en los hongos filamentosos *A. nidulans* (*chsE*) y *N. crassa* (*chs4*) tiene un papel importante en la síntesis de quitina *in vivo* (Din *et al.*, 1996; Specht *et al.*, 1996). Sin embargo, similar a lo descrito en levaduras; estudios donde se mutó el gen *chsF* en *A. fumigatus* no dieron lugar a ningún defecto aparente (Munro & Gow, 2001).

Las Clases V y VII, solo están presentes en hongos filamentosos. Las enzimas de clase V proporcionan una importante actividad *in vivo*, y cuando se mutan muestran una reducción en el contenido de quitina en *A. fumigatus* y *A. nidulans* (Aufauvre-Brown *et al.*, 1997; Specht *et al.* 1996). La clase V en *U. maydis*, *CHS6*, no sólo

proporciona una mayor actividad *in vivo*, sino que también es necesaria como factor de virulencia (Garcera-Teruel *et al.*, 2004). WdChs5p, una quitina sintasa de clase V en *Wangiella dermatitidis*, es necesaria para el crecimiento a la temperatura de infección y es esencial para virulencia; este reporte evidenció por primera vez que una quitina sintasa puede ser un factor específico de virulencia en un hongo patógeno de humanos (Liu *et al.*, 2004), así la clase V de las Chs es de particular interés debido a que ha sido reportada como factor de virulencia esencial en algunos hongos patógenos de plantas y humanos (Treitschke *et al.*, 2010). En *Magnaporthe oryzae*, la quitina sintasa de clase VII, tiene un papel importante en la formación del apresorio y por lo tanto es importante para la infección del hospedero (Kong *et al.*, 2012).

Se sabe que el gen AfchsD, perteneciente a la clase VI en *A. fumigatus*, se expresa durante el crecimiento de hifas (Mellado *et al.*, 1996b), mientras que en *M. oryzae*, es importante para virulencia (Kong *et al.*, 2012).

En *Botrytis cinerea*, se han aislado ocho genes pertenecientes a distintas clases de Chs (Magellan *et al.*, 2010) y *Coccidioides posadassi* cepa Silveira contiene una sola copia de cada uno de las siete clases filogenéticamente distintas de quitina sintasas de hongos (Mandel *et al.*, 2006).

En *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, patógeno de tomate, se han aislado y caracterizado cinco genes implicados en la síntesis de quitina, *chs1*, *chs2*, *chs3*, *chs7* y *chsV*, pertenecientes a las clases I, II, III y V, respectivamente (Martín-Urdiroz *et al.*, 2008).

Se han realizado estudios en diversos hongos que han mostrado que la eliminación de CHS resulta en un debilitamiento de la pared celular y causa crecimiento anormal de las hifas así como también del apresorio. Consecuentemente las CHS realizan un papel crucial en la infección de plantas (Treitschke *et al.*, 2010).

Mediante el uso de tecnologías de interrupción de genes, se ha observado que muchas de estas quitina sintasas contribuyen directamente en la integridad de la pared celular y morfogénesis de la célula. En hongos patógenos, algunas contribuyen directa o indirectamente a la virulencia (Liu *et al.*, 2004). Por ejemplo se ha reportado que la

clase III de las quitina sintasas participa en la virulencia de algunos patógenos (Fukuda *et al.*, 2009), aunque en otros casos se han visto involucradas otras clases de Chs.

El genoma de *U. maydis* codifica ocho Chs que son expresadas durante el crecimiento tipo levadura y el crecimiento por hifas. La mayoría de las Chs se localizan en los septos de las células levaduriformes e hifas, mientras que al menos cuatro Chs se concentran en la región de crecimiento. Esto sugiere que las quitina sintasas cooperan en las células levaduriformes, en las hifas y muy probablemente durante la infección del hospedero; pero la importancia de las Chs individuales varía dependiendo de la etapa de desarrollo. Es interesante que las Chs de la clase IV son importantes para la morfología de las células levaduriformes y de las hifas, mientras que las dos pertenecientes a la clase V, son cruciales para la patogenicidad (Weber *et al.*, 2006).

En un estudio de evolución y relaciones filogenéticas realizado en 2002 por Ruiz-Herrera y colaboradores, se llevaron a cabo alineamientos múltiples de las secuencias de aminoácidos de las quitina sintasas, observándose la conservación de motivos específicos característicos de clases, división y reino, y la conservación estricta de tres motivos: QXXEY, EDRXL y QXRRW, y siete aminoácidos aislados en la región central de todas las Chs.

En el 2004, Choquer y colaboradores identificaron siete clases de genes de quitina sintasa, usando como modelo de estudio el hongo ascomiceto *Botrytis cinerea*, causante del moho gris en diversos cultivos a nivel mundial. En la figura 1 se muestra la clasificación de los genes y los dominios característicos de sus proteínas.

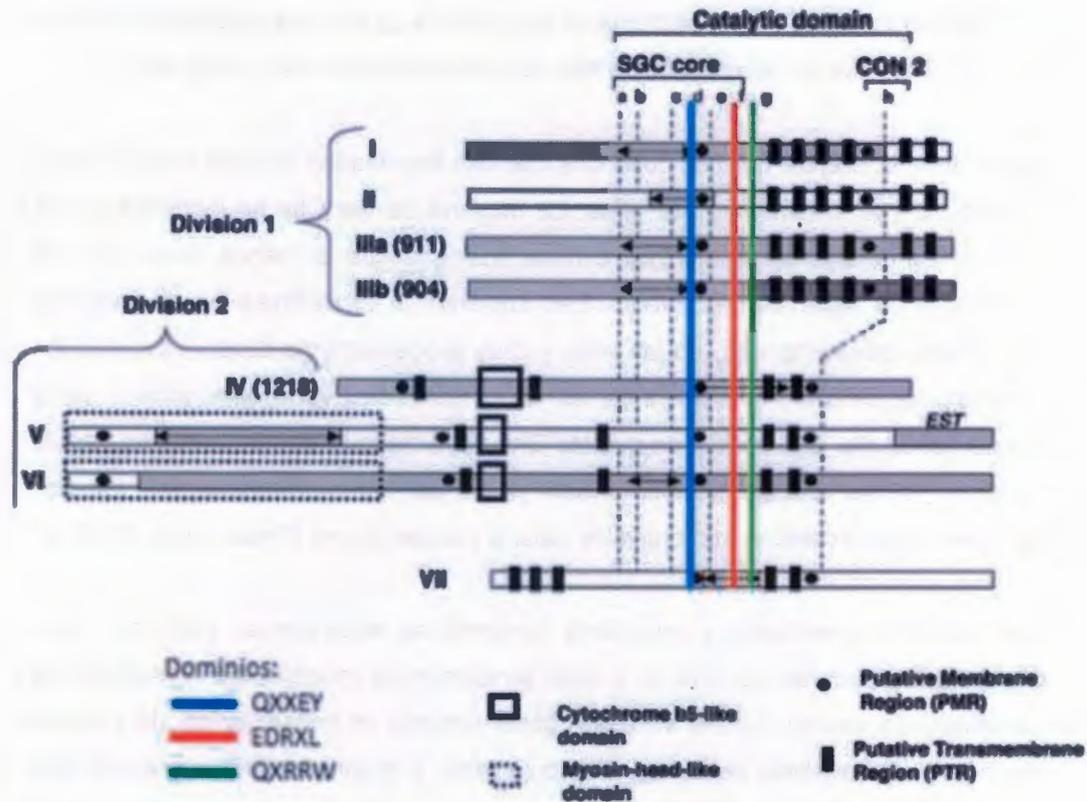


Figura 1. Clasificación de los genes quitina sintasa, por Choquer *et al.*, (2004). En colores se muestran los dominios característicos de las quitina sintasas. Las Chs de la división I se caracterizan por tener un dominio catalítico rodeado por una región N-terminal hidrofílica y una región C-terminal hidrofóbica. Las Chs de la división II, contienen un dominio catalítico precedido por un dominio tipo citocromo-b5. Además, las clases V y VI contienen un dominio N-terminal tipo motor de miosina.

1.4 *Mycosphaerella fijiensis* y la enfermedad de la Sigatoka negra

El género *Mycosphaerella* incluye especies que pueden habitar en diferentes nichos ecológicos como saprófitos, endófitos o como patógenos de plantas, y tiene una distribución mundial desde regiones tropicales y subtropicales, hasta regiones cálidas y frías. Las especies del género *Mycosphaerella* fitopatógenas, están dentro de los patógenos más comunes y destructivos, y pueden afectar a una amplia gama de huéspedes incluidos árboles y plantas herbáceas. La invasión de los tejidos de las hojas y los tallos, y la distorsión asociada a la fisiología de la planta huésped causan pérdidas económicas considerables en las plantaciones comerciales. La Sigatoka, es la enfermedad de mancha foliar más seria e importante económicamente en banano y

es ocasionada por tres especies del género *Mycosphaerella*; *Mycosphaerella fijiensis*, *M. musicola* y *M. eumusae* que conforman el complejo Sigatoka (Arzanlou *et al.*, 2008; Crous *et al.*, 2006).

La cronología de los registros de la enfermedad en todo el mundo y la estructura genética de las poblaciones de los patógenos sugiere, que el sudeste asiático, donde el hospedero del género *Musa* es nativo, es el centro de origen de las tres especies de hongos (Churchill, 2011; Arzanlou *et al.*, 2010).

M. fijiensis Morelet corresponde al estado teleomorfo del patógeno, teniendo a *Pseudocercospora fijiensis* como su estado anamorfo. Es un hongo Ascomiceto filamentoso, haploide, hemibiotrófico, con un sistema de apareamiento heterotálico; se encuentra dentro de la clase *Dothideomycetes*, orden *Capnodiales* y familia *Mycosphaerellaceae* (Crous, 2009).

La Sigatoka negra no mata a las plantas inmediatamente, sino que las debilita por la disminución de la capacidad fotosintética de las hojas, causa una reducción en la cantidad y la calidad de la fruta, y la inducción de la maduración prematura de la fruta cosechada de las plantas infectadas.

La enfermedad fue reportada por primera vez en el valle de Sigatoka, en las islas Fiji en 1963 y posteriormente se detectó en todo el Pacífico y el sudeste asiático. Desde la primera descripción de la enfermedad en Fiji en los años 60 (Rhodes, 1964), el patógeno se ha extendido a muchas áreas productoras de banano y ha causado epidemias en las islas del Pacífico y en América Latina (Cho *et al.*, 2008).

I.4.1 Infección y Sintomatología

Las esporas (ascosporas y conidios) de Sigatoka negra, son la principal fuente de infección, se desplazan a través del viento, por la lluvia y el rocío. Las ascosporas y conidios germinan en la hoja, seguido por un crecimiento epifítico de los tubos germinativos, los cuales entran a la hoja a través del estoma, para después proliferar en tejido intercelular de la hoja. El patógeno establece una relación biotrófica durante 3 a 4 semanas después de la penetración por el estoma, antes de la aparición de síntomas necróticos. El desarrollo de la enfermedad es favorecido por alta humedad y

altas precipitaciones, mientras que las temperaturas menores de 20°C y periodos secos inhiben el crecimiento del hongo.

Se han descrito seis estadios de la evolución de síntomas de la enfermedad: uno de punto, dos de estría y tres de mancha: 1) estado de punto inicial: Aparición de puntos pequeños de color amarillo pálido de 0.25 mm de diámetro visibles en el envés de la hoja; 2) primer estado de estría: formación de estrías de color castaño de 1 mm de ancho por 2 mm de largo, visibles en el haz y paralelas a las venas laterales de la hoja; 3) segundo estado de estría: alargamiento de las estrías hasta alcanzar 20-25 mm de longitud y 2 mm de ancho, las cuales toman una coloración marrón oscuro y son visibles en el envés como rayas amarillas; 4) primer estado de mancha: ensanchamiento de las estrías que se toman color marrón oscuro y son rodeadas por una zona amarilla pálida; 5) segundo estado de mancha: inicio del colapso del centro de color negro de la mancha y formación de un halo amarillo ligero en el tejido de la hoja que rodea el borde acuoso de la mancha; 6) tercer estado de mancha: el centro de la mancha se seca, adquiere un color gris claro y además se toma hundido o comprimido. La mancha es rodeada por un borde estrecho bien definido, color pardo oscuro o negro. Entre este borde y el color verde normal de la hoja, hay frecuentemente una zona de transición amarillo brillante (Meredith & Lawrence, 1969).

1.4.2 Agente causal

Estado sexual: *M. fijiensis*, se caracteriza por la formación de peritecios, espermagonios y ascosporas. El peritecio y el espermagonio se forman en los estados 2 y 3 del desarrollo de los síntomas. Los espermagonios son más abundantes en el envés de la hoja y se desarrollan en la cámara subestomática; contienen espermátidas en forma de bastoncillos, varillas translúcidas que actúan como gametos, fertilizan a los peritecios en los estados 5 y 6 de la enfermedad. Los peritecios son estructuras globosas, con un ostiolo esférico papilado, de paredes pardo oscuras y células poligonales, ligeramente hundidos en el tejido de la hoja. Contienen ascas bitunicadas con ocho ascosporas cada una, siendo estas resultado del proceso sexual, tienen forma de huso, son biseriadas, translúcidas, septadas con una constricción leve al nivel del septo y clavadas en el asca en la parte prominente de la célula; el tamaño de las ascosporas es de 11.5 a 15.6 x 2.5 a 5.0 mm con un promedio de 13.7 x 3.7 mm (Mülder & Stover, 1976; Meredith & Lawrence, 1969 citados por Manzo-Sánchez *et al.*,

2005); germinan en ambos lados de la superficie de las hojas y penetran al tejido del hospedero a través de los estomas (Marin *et al.*, 2003; Orozco-Santos, 1998; Stover, 1980 citados por Manzo-Sánchez *et al.*, 2005). Las ascosporas son la fuente principal del inóculo de la enfermedad, se diseminan por el viento y se depositan en la hojas más jóvenes de la planta (Múlder & Stover, 1976; Múlder & Holliday, 1974 citados por Manzo-Sánchez *et al.*, 2005). Las colonias cultivadas *in vitro* en medio PDA, creciendo a 26°C, con fotoperiodo de 12 h, presentan un color gris-oscuro a blanco rosado, de forma esférica o con zonas irregulares y con una consistencia algodonosa o compacta (Manzo-Sánchez *et al.*, 2001 citado por Manzo-Sánchez *et al.*, 2005).

Estado asexual. *Pseudocercospora fijiensis*, presenta conidios translúcidos cilíndricos, rectos o ligeramente curvos, 6 a 9 septos, delgados en el ápice (20 a 132 mm de longitud) y más anchos en la base (2.5 a 5 mm) con una cicatriz en el punto de unión entre el conidio y el conidióforo. Los conidióforos pueden emerger por el estoma de manera individual o en grupos, o pueden formarse a partir de células del estroma, son de color oscuro y se pueden observar en el estado 2 de la enfermedad; son septados, presentan de 0 a 5 compartimentos y 16.5 a 62.5 mm de longitud por 4 a 7 mm de ancho. De un solo conidióforo pueden formarse cuatro conidios maduros (Meredith & Lawrence, 1969 citados por Manzo-Sánchez *et al.*, 2005).

1.4.3 Interacción *Mycosphaerella fijiensis* – *Musa* spp.

La clasificación de los genotipos de *Musa* spp. con relación a su resistencia a la enfermedad ha sido caracterizada por medio de las interacciones planta-patógeno. Esta interacción inicia cuando las ascosporas o conidios de *M. fijiensis* llegan e inician la penetración de los espacios intercelulares del parénquima de la hoja, a través de los estomas. Los cultivares se han clasificado en tres categorías: los altamente resistentes que bloquean tempranamente la infección (interacciones incompatibles), los parcialmente resistentes que desarrollan los síntomas lentamente (interacciones compatibles), y los susceptibles que desarrollan los síntomas rápidamente (interacciones compatibles) (Lepoivre *et al.* 2002; Ortiz & Vuylsteke, 1994; citados por Manzo-Sánchez *et al.*, 2005).

1.4.4 Control de la enfermedad

La sensibilidad a fungicidas se prueba usando ascosporas o conidios, en ensayos de germinación, en los cuales la longitud de los tubos germinativos se mide para conocer la respuesta a un rango de concentraciones de fungicidas.

Dentro de los principales compuestos antifúngicos que se utilizan se encuentran las estrobirulinas, las cuales son llamadas Qols debido a que actúan inhibiendo la respiración mitocondrial de los hongos uniéndose al complejo enzimático de citocromo bc1 en el sitio Qo. Las DMIs (inhibidores de la desmetilación), como el propiconazol, actúan interrumpiendo la biosíntesis de ergosterol. Por último la actividad antifúngica de los BCMs (bencimidazoles) se confiere por su unión a β -tubulina, una subunidad de la proteína tubulina y componente de los microtúbulos, lo que evita la formación de microtúbulos e interrumpe la división celular del hongo (Cañas-Gutiérrez *et al.*, 2009; Marín *et al.*, 2003; Gisi *et al.*, 2002).

La susceptibilidad de los cultivos requiere el uso de fungicidas en múltiples frecuencias relativamente altas. Estas aplicaciones son potencialmente perjudiciales; para el ambiente y para aquellos que viven y trabajan en áreas en las que el banano es tratado con dichos fungicidas.

Las estimaciones de pérdidas ocasionadas por la Sigatoka negra para los bananos y plátanos están en el rango del 20-80% en ausencia de fungicidas (Churchill, 2011). Para el 2003, el costo anual del control de la enfermedad en las grandes plantaciones se estimó en aproximadamente \$1000 dólares por hectárea (Arias *et al.*, 2003). Como la superficie y la producción han aumentado, el uso de fungicidas y la resistencia han aumentado, lo que exige un máximo de 66 aplicaciones por año en algunos lugares. Más del 30% de los costos totales de producción de banano se destinan hacia el control químico de *M. fijiensis* (Kema, 2006).

1.4.5 El genoma de *M. fijiensis*

En mayo de 2010 se liberó la Version 2 del genoma secuenciado de la cepa virulenta CIRAD86 de *M. fijiensis* con una cobertura de 7.11X y un tamaño estimado del genoma de 74.1 Mb, contenido en 56 scaffolds principales. Aproximadamente la mitad

del genoma está contenido en cinco scaffolds, cada uno de al menos 5.9 Mb de longitud. La versión actual incluye un total de 13,903 modelos de genes estructural y funcionalmente anotados.

En el 2006, Rodríguez-García y colaboradores, reportaron los resultados del estudio de cariotipo molecular de cepas de *M. fijiensis* aisladas de tres diferentes lugares de México. En aislados de Colima y Chiapas se observaron bandas correspondientes a por lo menos 10 cromosomas, en un rango de tamaño entre 0.71 y 2.2 Mb. En un aislado de Veracruz se observaron por lo menos 14 cromosomas en un rango de tamaño entre 0.67 y 5.6 Mb.

Es notable que el genoma de *M. fijiensis* es aproximadamente 87% más grande que el de *M. graminicola* y que la secuencia mitocondrial completa es más de dos veces más grande que la del patógeno de trigo, principalmente como resultado de la presencia de secuencias repetidas en el genoma de *M. fijiensis* (Churchill, 2011). El genoma secuenciado de *M. graminicola* contiene 21 cromosomas, de los cuales 8 son prescindibles (Goodwin *et al.*, 2011).

Para la especie *M. fijiensis* se han identificado siete genes de quitina sintasa (Pacheco-Arjona, 2013; cuadro 1), los cuales corresponden cada uno a las siete clases según la clasificación de Choquer y colaboradores (2004).

Cuadro 1. Predicción bioinformática de genes *CHS* en *M. fijiensis*, tomado de Pacheco-Arjona (comunicación personal).

Locus	Clase CHS	Scaffold (Andamio)	Tamaño (pb)	Exones	Intrones	Tamaño de intrones (pb)
130240	I	4	2835	2	1	50
1.7.989.1	II	8	3375	1	0	0
90038	III	4	2932	3	2	55, 56
1.11.8.1	IV	8	3774	2	1	139
20866	V	2	6896	2	1	63
20000123	VI	2	2328	2	1	142
20862	VII	2	5684	3	2	74,60

1.5 Variación Intraespecífica

La composición de una comunidad está fuertemente influenciada por la diversidad genética de los individuos que la componen y por lo tanto debemos considerar cómo en una comunidad, la variación de los genotipos, y no sólo de las especies, puede contribuir al funcionamiento de un ecosistema (Wilkinson *et al.*, 2010)

La variación fenotípica dentro de las especies puede ser considerable, y cuando esta variación se expresa a través de los rasgos de importancia ecológica, la diversidad intraespecífica se convierte en un componente importante de la biodiversidad (Hughes *et al.*, 2008; Bangert *et al.*, 2005)

Aunque la biodiversidad es estimada comúnmente como el número de especies, las especies no son el único componente clave de la biodiversidad. Se reconoce cada vez más que las funciones y propiedades de una comunidad están conformadas por la diversidad genética de los individuos que la constituyen. De hecho, se ha reportado que la diversidad genética tiene efectos significativos sobre la productividad primaria, la competencia intraespecífica y sobre los flujos de energía y nutrientes (Seena *et al.*, 2012).

Los organismos patógenos comúnmente poseen variación intraespecífica ocurriendo naturalmente para rasgos asociados con patogenicidad o virulencia. Los estudios de interacción patógeno-hospedero con frecuencia no reconocen estas variaciones, especialmente en los estudios de patógenos necrotróficos de plantas, donde las bases moleculares de defensa son en gran parte desconocidas (Williamson *et al.*, 2007; Glazebrook, 2005; Oliver & Ipcho, 2004).

El mecanismo de defensa de las plantas contra patógenos biotróficos está mediada principalmente por el reconocimiento específico de los productos de genes de avirulencia (*avr*) del patógeno, directa o indirectamente por los productos de genes de resistencia (*R*) de la planta (Jones & Dangl, 2006).

La variación intraespecífica en los genes *avr* de patógenos es común, ya que estos genes se cree que confieren una ventaja selectiva al patógeno en ausencia del gen *R*

correspondiente en la planta (Rowe & Kliebenstein, 2010; Stukenbrock & McDonald, 2009; Salvaudon *et al.*, 2008; Kamoun, 2007).

La falta de reconocimiento de estas variaciones ha generado un punto de vista predominante en la comunidad de investigación en la defensa molecular de plantas, como no se ha reportado que los patógenos necrotróficos participen en interacciones específicas con el hospedero, se sugiere que todos los aislados de una especie patógena necrotrófica en particular son equivalentes. Esta opinión manifiesta por sí misma la escasez en el uso de diversidad necrotrófica en estudios publicados, así como la falta de información sobre la identificación de datos del patógeno, a pesar de la evidencia publicada de que los patógenos necrotróficos muestran variación intraespecífica que afectan a los rasgos relacionados con patogenicidad y virulencia (Kliebenstein *et al.*, 2005; Unger *et al.*, 2005; Schoonbeek *et al.*, 2001)

La selección de un aislado en particular de un organismo patógeno como modelo de laboratorio puede facilitar la comparación entre estudios realizados en diferentes laboratorios, los datos de un aislado único a menudo son representados como informativos para toda la especie patógena. Si el aislado de referencia es atípico se pueden extraer conclusiones erróneas en relación a la biología de la interacción planta-patógeno y prometedoras líneas de investigación pueden ser abandonadas (Rowe & Kliebenstein, 2010).

Las conclusiones extraídas de los estudios que emplean un solo, o incluso varios aislados no pueden representar con precisión la biología de la especie como un todo. La variación tanto en el hospedero como en el patógeno puede alterar estas relaciones y esto debe ser reconocido por lo menos en los estudios biológicos.

1.5.1 Frecuencia de Alelos

Los alelos son formas variantes de un gen que se encuentran en la misma posición, o locus genético, en un cromosoma. La frecuencia de alelos representa la incidencia de una variante de un gen en una población. Se calcula dividiendo el número de veces que se observa el alelo específico dentro de una población determinada por la cantidad total de copias de todos los alelos situados en ese locus genético específico en la población. Estas frecuencias pueden ser representadas como un porcentaje, un decimal, o una fracción. Se trata de un reflejo de la diversidad genética de una

población. Cuando estas frecuencias cambian con el tiempo, puede significar que la deriva génica está ocurriendo o que nuevas mutaciones se han presentado en una población (Nature Education, 2010).

La evolución ocurre cuando la variación dentro de una población se convierte en el tiempo y el espacio en variación entre poblaciones. Se piensa que la selección natural generalmente es el factor principal para descifrar la frecuencia de alelos relativa en una población. Esta distingue entre la capacidad de reproducirse en fenotipos de una población. Un fenotipo puede ser más exitoso para sobrevivir ataques endémicos de depredadores o parásitos, mientras que otro fenotipo puede ser más eficaz penetrando nuevos hábitats (Hartl, 1980).

La diversidad genética está influenciada por múltiples factores y por consiguiente varía considerablemente entre las poblaciones; entre los determinantes más importantes de la diversidad genética se encuentran la deriva génica, los cuellos de botella, la selección natural y los métodos de reproducción. Es importante tener en cuenta que ningún evento actúa de manera aislada, por otra parte, es difícil predecir la medida en que un factor en particular influirá en la diversidad genética debido a que no hay dos poblaciones iguales.

La deriva génica es un proceso aleatorio que modifica la frecuencia de alelos en una población de una generación a la siguiente. Debido a que algunos individuos se reproducen más que otros, no todos los alelos se reproducen en la misma medida, por lo tanto la frecuencia de los alelos varía de una generación a otra, resultando en cambios evolutivos no adaptativos. Los efectos de la deriva resultan ser mayores en poblaciones pequeñas donde, en ausencia de selección, la deriva hará que cada alelo se fije o se pierda en un periodo de tiempo relativamente corto, lo que tendrá como consecuencia una disminución en la diversidad genética (Freeland, 2005).

Los cuellos de botella poblacionales reducen el tamaño efectivo de una población y por lo tanto su nivel general de diversidad genética. La severidad de cualquier cuello de botella poblacional depende del tamaño que una población es reducida y de la velocidad con que se recupera. La pérdida inicial de alelos es proporcional a la reducción en el tamaño de la población. La deriva génica implica que la diversidad se seguirá agotando mientras el tamaño de la población sea bajo, por lo tanto las

poblaciones que pierden más diversidad son aquellas que tardan más en recuperarse que las que se recuperan más rápidamente (Freeland, 2005).

La selección natural altera la frecuencia de alelos de diferentes maneras, incrementando o disminuyendo la variación genética global. La selección estabilizadora y la selección direccional generalmente disminuyen la diversidad genética, ya sea favoreciendo al fenotipo promedio sobre un fenotipo extremo, por medio de selección negativa o purificante, que es selección "en contra" de cualquier mutación que reduzca las aptitudes de sus portadores, o a través de selección positiva, la cual selecciona "a favor" de una mutación particular que incremente las aptitudes de los portadores. Mientras la selección positiva incrementa la frecuencia de un alelo en particular, la diversidad aumenta temporalmente, lo que se conoce como polimorfismo transitorio, pero una vez que el alelo seleccionado llega a fijarse, el locus se convierte en monomórfico y se pierde la diversidad genética. Un tipo de selección que incrementa la variación es la selección disruptiva o diversificadora, la cual ocurre cuando dos o más fenotipos son más aptos que los fenotipos intermedios. La selección balanceada se da cuando la diversidad genética se mantiene, debido a que alelos particulares son seleccionados a favor en algunas situaciones y son seleccionados en contra en otras. Un tipo de selección balanceada es la ventaja heterocigota o sobredominancia; ocurre cuando los heterocigotos tienen una mayor aptitud que los homocigotos, y garantiza que ambos alelos se mantengan dentro de una población (Freeland, 2005).

La reproducción también influye en la diversidad genética. En la mayoría de especies sexuales la mitad de la descendencia suelen ser machos los cuales tienen como única función la fertilización de las hembras; mientras que una hembra asexual sólo producirá descendencia femenina. Por lo tanto, las hembras sexuales pasan sólo el 50 por ciento de sus genes a cada descendiente teniendo como resultado una reducción en su aptitud biológica en comparación con las hembras asexuales. La recombinación genera nuevos genotipos con el potencial de adaptarse a entornos cambiantes, como consecuencia se tiene una rápida generación de diversidad genética lo que significa que las poblaciones que se reproducen sexualmente por lo general tienen niveles más altos de diversidad genética que las poblaciones asexuales (Freeland, 2005).

I.6 Teoría Neutra de la evolución

La teoría neutra propone que la inmensa mayoría de las nuevas mutaciones caen en una de dos categorías: perjudiciales o selectivamente neutras (Kimura 1983). Se espera que las mutaciones perjudiciales sean eliminadas rápidamente, debido a la selección natural y por lo tanto probablemente contribuyen poco a la variación dentro y entre las especies. Por otro lado, las mutaciones que son selectivamente equivalentes a los alelos ya presentes en la población, se espera que tengan dinámicas regidas por la deriva génica como lo son los cuellos de botella o el efecto fundador y que compensen la gran mayoría de las variaciones observadas tanto dentro como entre las especies. Se espera que las mutaciones benéficas sean extremadamente raras y que contribuyan poco a los patrones de variación en las secuencias de ADN (Ford, 2002).

En general, los patrones de variación en la secuencia de ADN sostienen uno de los aspectos clave de la teoría neutral - que muchas de las diferencias observadas dentro y entre las especies son no adaptativas (Hughes, 1999; Kimura, 1983). Por ejemplo, existe una amplia correlación negativa entre la importancia funcional de un sitio de nucleótidos y su tasa de sustitución. Los sitios que supongan un cambio en una proteína o un cambio en la regulación de genes son en promedio más conservados que los sitios no funcionales, tal y como predice la teoría neutral. Además, gran parte de los genomas de muchos organismos contienen ADN no codificante que no tiene función conocida, y la mayoría de las mutaciones en estas áreas son supuestamente neutras.

Otro aspecto de la teoría neutral que no está bien sustentado por los patrones de datos de la secuencia de ADN es la hipótesis de que las variaciones adaptativas en el ADN se espera que sean extremadamente raras. Estrictamente hablando, esto puede ser cierto en una base de nucleótido por sitio, teniendo en cuenta que muchos cambios en la tercera posición del codón, intrones y las regiones no codificantes a menudo pueden ser selectivamente equivalentes. Sin embargo, la fracción de los genes para los que hay pruebas de selección positiva puede ser mayor que lo postulado por la teoría neutral (Ford, 2002).

I.6.1 Pruebas de Neutralidad

I.6.1.1 Prueba D de Tajima

Tajima en 1989 desarrolló una prueba estadística de la neutralidad que utiliza sólo datos de polimorfismo dentro de una población. Mide la distribución de frecuencias de alelos en datos de secuencias de nucleótidos. Esta estadística puede ser influenciada tanto por la historia de la población como por la selección natural. La prueba D de Tajima es una prueba de neutralidad ampliamente utilizada en la genética de poblaciones.

Bajo el modelo de la teoría neutral, para una población de tamaño constante en equilibrio:

$$E[\pi] = \theta = E \left[\frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}} \right] = 4N\mu$$

para diploides, y:

$$E[\pi] = \theta = E \left[\frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}} \right] = 2N\mu$$

para haploides.

En las fórmulas anteriores, S es el número de sitios segregantes, n es el número de muestras, i es el índice de suma, θ es la tasa de mutación de la población, π es la diversidad nucleotídica, $2N$ es el tamaño de la población haploide y μ es la tasa de mutación por generación. Pero la selección, las fluctuaciones demográficas y otras violaciones del modelo neutral (incluyendo la tasa de heterogeneidad y la introgresión) cambiarán los valores esperados de S y π , por lo que ya no se espera que sean iguales. La diferencia en las expectativas para estas dos variables (que puede ser positivo o negativo) es el punto esencial de la prueba estadística D de Tajima.

D se calcula tomando la diferencia entre los dos estimadores del parámetro de genética de población θ . Esta diferencia se llama d , y D se calcula dividiendo d entre la raíz cuadrada de su varianza $\sqrt{\hat{V}(d)}$ (su desviación estándar, por definición).

$$D = \frac{d}{\sqrt{\hat{V}(d)}}$$

Tajima demostró por simulación en una computadora que la estadística D descrita anteriormente puede ser modelada utilizando una distribución beta. Si el valor D de una muestra de secuencias está fuera del intervalo de confianza, entonces se puede rechazar la hipótesis nula de mutación neutral para la secuencia en cuestión.

Un valor positivo indica un exceso de alelos de frecuencia intermedia (polimórficos), mientras que un valor negativo indica un exceso de alelos raros. La hipótesis nula de la prueba D de Tajima corresponde a la evolución neutral en una población en equilibrio. Esto implica que no hay selección actuando en el locus y que la población no ha experimentado ningún crecimiento o contracción reciente (Tajima, 1989).

Aunque la estadística D de Tajima se utiliza comúnmente como una prueba de selección natural, ésta es confundida con la influencia de la historia de la población. Por ejemplo, una selección balanceada puede dar un valor positivo para D de Tajima, sin embargo, los procesos demográficos tales como la reducción de la población, subdivisión de la población, un cuello de botella reciente (Maruyama & Fuerst, 1985), o la migración también pueden producir este resultado. Del mismo modo, la vinculación a un barrido selectivo o una selección purificadora en el locus estudiado puede generar un valor negativo para D . Sin embargo, este patrón también puede ser debido a un crecimiento en la población (Maruyama & Fuerst, 1984), un cuello de botella menos reciente, o por migración. Se pueden tener valores D positivos o negativos con diferentes niveles de migración (Schmidt & Pool, 2002).

En resumen, D proporciona una vía diferente para conocer a fondo la historia evolutiva de una secuencia particular de nucleótidos.

$D = 0$: No hay evidencia de cambios en el tamaño de la población o de cualquier patrón particular de selección en el locus.

$D < 0$: El tamaño de la población puede estar aumentando o puede haber selección purificadora en este locus.

$D > 0$: La población pudo haber sufrido un cuello de botella reciente (o estar disminuyendo) o puede ser prueba de selección sobredominante en este locus.

1.6.1.2 Prueba de Fu y Li

En 1993 Fu y Li propusieron un enfoque ligeramente diferente para probar la evolución neutral. Las pruebas estadísticas D y F requieren datos de polimorfismo intraespecífico

y de un grupo externo (una secuencia de una especie relacionada), y D^* y F^* sólo requieren datos intraespecíficos.

Estas pruebas de neutralidad dependen de la suposición de que la población ha estado en un equilibrio mutación-deriva por un periodo largo de evolución. Esta hipótesis es poco probable que se mantenga en la mayoría de las poblaciones naturales. Otra suposición de estas pruebas es que todos los nucleótidos son igualmente mutables y están sujetos a las mismas dinámicas de población. Estas suposiciones no se sostienen cuando las pruebas se aplican a sitios codificantes de ADN, debido a que el grado de polimorfismo no es el mismo para la primer, segunda y tercer posición del codón y la tendencia al uso de codones complican el patrón de mutación (Fu & Li, 1993)

1.6.1.3 Prueba de Diferencias sinónimas y no sinónimas

Hill & Hastie (1987) y Hughes & Nei (1988) fueron los primeros en utilizar la relación entre las diferencias no sinónimas y las diferencias sinónimas entre secuencias de ADN, como una prueba de selección positiva. La idea detrás de la prueba es que si las mutaciones sinónimas son esencialmente neutras, ya que no resultan en un cambio en una proteína, la tasa de evolución de sitios sinónimos (ds) será igual a la tasa de mutación (Kimura, 1983).

Las mutaciones no sinónimas, como resultan en un cambio en el producto de una proteína, son más propensas a estar sujetas a selección natural. Si la mayoría de mutaciones no sinónimas son perjudiciales, entonces la tasa de evolución de sitios no sinónimos (dn) será inferior a la tasa neutra, resultando en $dn/ds < 1$. Sin embargo, si una fracción sustancial de mutaciones no sinónimas son benéficas, la tasa promedio de evolución de no sinónimos puede ser más alta que la tasa neutra, resultando en $dn/ds > 1$ (Yang & Nielsen, 2000; Nielsen, 1997).

Conceptualmente, todo lo que está implicado en la realización de una prueba de relación dn/ds permite estimar el número de sustituciones sinónimas y no sinónimas entre dos secuencias y el número de sitios sinónimos y no sinónimos en las secuencias, y a continuación realizar una prueba estadística para determinar si la diferencia entre las dos relaciones es mayor a los esperado por azar. En la práctica, las complicaciones tales como la contabilidad de múltiples sustituciones en el mismo

sitio, la estimación del número de sitios sinónimos y no sinónimos, y la contabilidad para relaciones de transiciones/transversiones añaden una complejidad considerable para el problema, especialmente para secuencias muy divergentes (Yang & Nielsen, 2000; Nielsen, 1997).

Las pruebas de relación dn/ds no requieren de ninguna suposición sobre la estructura de la población o condiciones de equilibrio, y por lo tanto pueden proporcionar pruebas convincentes sobre todo de selección positiva.

En el método de Nei-Gojobori (1986), las sustituciones sinónimas y no sinónimas se determinan calculando el número observado de sustituciones sinónimas y no sinónimas y el número de sitios con sustituciones potencialmente sinónimas y no sinónimas. Los sitios potencialmente sinónimos y no sinónimos son descritos a partir de cada codón asumiendo que existe igual probabilidad de cambio para todos los nucleótidos. El número de sitios potencialmente sinónimos (s) y no sinónimos (n) para un codón específico es calculado con la siguiente relación:

$$s = \sum_{i=1}^3 f_i$$

$$n = 3 - s$$

donde f_i es la proporción de cambios sinónimos (cociente del número de cambios sinónimos y no sinónimos excluyendo mutaciones sin sentido en la posición i).

En el caso de que cualquier cambio origine un codón de término, éste no será tomado en cuenta para el cálculo.

Para obtener el número total de sitios sinónimos (S) y no sinónimos (N) en una secuencia entera usamos la fórmula:

$$s = \sum_{j=1}^C s_j$$

donde s_j = valor de s para el codón j

C = número total de codones

$S + N = 3C$ (número total de nucleótidos comparados)

I.7 JUSTIFICACIÓN

La Sigatoka negra es la enfermedad más destructiva y devastadora de las hojas de bananos y plátanos a escala mundial. Esta enfermedad es causada por el hongo ascomiceto *M. fijiensis* Morelet y se caracteriza por la aparición de rayas y manchas de color oscuro o negro en las hojas de las plantas, reduciendo el área fotosintética de las plantas, causando la madurez prematura de los frutos y una baja producción de fruta.

M. fijiensis al ser un hongo filamentoso cuenta con una pared celular con un alto contenido de quitina, por lo que debe contar con la maquinaria necesaria para la biosíntesis de dicho compuesto; en consecuencia, las enzimas involucradas en la biosíntesis de carbohidratos secundarios en la pared celular como las quitina sintasas juegan un papel importante en la integridad de la célula y representan blancos potenciales en la búsqueda de antifúngicos específicos para este tipo de patógeno.

En un estudio *in silico* realizado por Pacheco-Arjona (comunicación personal), se reportó la existencia de un gen de quitina sintasa para cada una de las clases en *M. fijiensis*. Sin embargo a la fecha no se ha reportado la identificación experimental de estos genes.

Nuestro grupo de investigación plantea la posibilidad de aislar fragmentos de los genes que codifican a las quitina sintasas, hacer un estudio filogenético basándonos en las variaciones que pudieran haber entre los distintos aislados y conocer las fuerzas de presión selectiva que se encuentran afectando dichos fragmentos de genes *CHS*, así como evaluar la expresión de estos genes en un aislado de *M. fijiensis* bajo condiciones de laboratorio.

I.8 HIPÓTESIS

Los siete genes *CHS* de *M. fijiensis* se ven afectados por diferentes fuerzas de presión selectiva; aunque los siete genes son funcionales, *M. fijiensis* no necesita de la expresión de todos ellos para crecer en condiciones de laboratorio.

I.9 OBJETIVOS

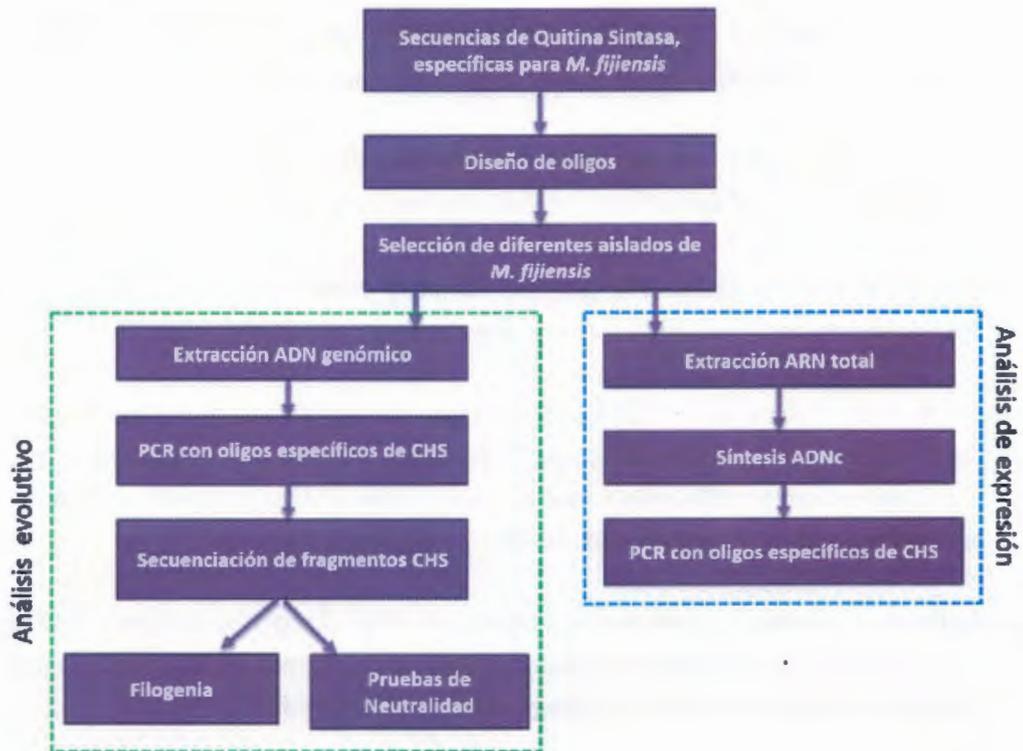
I.9.1 General

Caracterizar molecularmente la secuencia que contiene los motivos QXXEY, EDRXL y QXRRW, así como la expresión de los siete posibles genes de quitina sintasa en aislados de *M. fijiensis*.

I.9.2 Particulares

- a) Determinar la presencia de los siete genes de quitina sintasa en diferentes aislados de *M. fijiensis*
- b) Secuenciar, para todos los aislados, fragmentos que contengan los motivos QXXEY, EDRXL y QXRRW de las siete clases de Chs, para usar como marcadores moleculares para filogenia.
- c) Inferir qué fuerzas evolutivas afectan a los genes *CHS* de *M. fijiensis* mediante las pruebas de neutralidad.
- d) Caracterizar la expresión de los siete genes en al menos un aislado en condiciones de cultivo de laboratorio.

I.10 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



I.11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramczyk D., Szaniszló P.J. 2009. Immunoaffinity Purification of the Class V Chitin Synthase of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Prep Biochem Biotechnol.* 39(3): 277–288.
- Arias, P., Dankers, C., Liu, P. and Pilkauskas, P. 2003. The World Banana Economy, 1985–2002. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Arzanlou M., Crous P.W., Zwiers L-H. 2010. Evolutionary dynamics of mating-type loci of *mycosphaerella* spp. occurring on banana. *Eukaryotic cell*, p. 164–172 vol. 9, no. 1.
- Arzanlou M., Groenewald J.Z., Fullerton R.A., Abeln E.C.A., Carlier J., Zapater M.F., Buddenhagen I.W., Viljoen A., Crous P.W. 2008. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia* 20: 19–37.
- Aufauvre-Brown A., Mellado E., Gow N.A.R., Holden D.W. 1997. *Aspergillus fumigatus* chsE: a gene related to CHS3 of *Saccharomyces cerevisiae* and important for hyphal growth and conidiophore development but not pathogenicity. *Fungal Genet Biol* 21:141–152.
- Badreddine I., Lafitte C., Heux L., Skandalis N., Spanou Z., Martínez Y., Esquerré-Tugayé M-T., Bulone V., Dumas B., Bottin A. 2008. Cell Wall Chitosaccharides Are Essential Components and Exposed Patterns of the Phytopathogenic Oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eukaryotic cell*, p. 1980–1993.
- Bangert R.K., Turek R.J., Martinsen G.D., Wimp G.M., Bailey J.K. 2005. Benefits of conservation of plant genetic diversity to arthropod diversity. *Cons Biol* 19: 379–390.
- Banks I.R., Specht C.A., Donlin M.J., Gerik K.J., Levitz S.M., Lodge J.K. 2005. A Chitin Synthase and Its Regulator Protein Are Critical for Chitosan Production and Growth of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*. p. 1902–1912.
- Borgia P.T., Iartchouk N., Riggle P.J., Winter K.R., Koltin Y., Bulawa C.E. 1996. The chsB gene of *Aspergillus nidulans* is necessary for normal hyphal growth and development. *FungalGenet Biol* 20:193–203.
- Bowman S.M., and Free S.J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28:799–808.

- Bulawa C.E., Miller D.W., Henry L.K., Becker J.M. 1995. Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10570–10574.
- Cabib E., Silverman S.J., Shaw J.A. 1992. Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* 138:97–102.
- Cañas-Gutierrez G.P., Angarita-Velásquez M.J., Restrepo-Flórez J.M., Rodríguez P., Moreno C.X., Arango R. 2009. Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Manag. Sci.* 65, 892–899.
- Cho Y., Hou S., Zhong S. 2008. Analysis of Expressed Sequence Tags from the Fungal Banana Pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *The Open Mycology Journal*, 2, 61-73.
- Choquer M., Boccara M., Goncalves I.R., Soulie M.C., and Vidal-Cros A. 2004. Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *Eur. J. Biochem.* 271, 2153–2164.
- Churchill A.C.L. 2011. Pathogen profile *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular plant pathology* 12(4), 307–328
- Cosgrove D. J. 1997. Creeping, walls, softening fruit, and penetrating pollen tubes: the growing role of expansions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5504–5505.
- Crous P.W. 2009. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Fungal Divers.* 38, 1–24.
- Crous P.W., Wingfield M.J., Mansilla P., Alfenas A.C., Groenewald J.Z. 2006. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. II. *Studies in mycology* 55: 99–131.
- Culp D.W., Dodge C.L., Miao Y., Li L., Sag-Ozkal D., Borgia P.T. 2000. The *chsA* gene from *Aspergillus nidulans* is necessary for maximal conidiation. *FEMS Microbiol Lett* 182:349–353.
- Din A., Yarden O. 1994. The *Neurospora crassa chs-2* gene encodes a non-essential chitin synthase. *Microbiology* 140:2189–2197.

- Din A., Specht C.A., Robbins P.W., Yarden O. 1996. Chs-4, a class IV chitin synthase gene from *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* 250:214–222.
- Freeland J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd. 388 p.
- Ford M.J. 2002. Applications of selective neutrality tests to molecular ecology. *Molecular Ecology*. 11, 1245–1262
- Fry S.C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:165–186.
- Fu Y.X. and Li W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*. 133: 693-709.
- Fukuda K., Yamada K., Deoka K., Yamashita S., Ohta A., Horiuchi H. 2009. Class III Chitin Synthase ChsB of *Aspergillus nidulans* Localizes at the Sites of Polarized Cell Wall Synthesis and Is Required for Conidial Development. *Eukaryotic cell*, p. 945–956.
- Galagan J., Henn MR., Ma L.J., Cuomo CA., Birren B. 2005. Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology. *Genome Res*. 15: 1620-1631.
- Garcera-Teruel A., Xoconostle-Cazares B., Rosas-Quijano R., Ortiz L., Leon-Ramírez C., Specht C.A., Sentandreu R., Ruiz-Herrera J. 2004. Loss of virulence in *Ustilago maydis* by Umchs6 gene disruption. *Res. Microbiol.* 155, 87–97.
- Gisi U., Sierotzki H., Cook A., McCaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *PestManag. Sci.* 58, 859–867.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43: 205–227.
- Goodwin S.B., M'Barek S.B., Dhillon B., Wittenberg A.H.J., Crane C.F., Hane J.K., Foster A.J., Van der Lee T.A.J., Grimwood J., Aerts A., Antoniw J., Bailey A., Bluhm B., Bowler J., Bristow J., Van der Burgt A., Canto-Canché B., Churchill A.C.L., Conde-Ferrández L., Cools H.J., Coutinho P.M., Csukai M., Dehal P., De Wit P., Donzelli B., Van de Geest H.C., Van-Ham R.C.H.J., Hammond-Kosacks K.E., Henrissat B., Kilian A., Kobayashi A.K., Koopmann E., Kourmpetis Y., Kuzniar A., Lindquist E., Lombard V., Maliepaard C., Martin N., Mehrabi R., Nap J.P.H., Ponomarenko A., Rudds J.J., Salamov A., Schumtz J., Schouten H.J., Shapiro H., Stergopoulou I., Torriani S.F.F., Tu H., P. de Vries R., Waalwijk C., Whare S.B., Zwiers L.H., Oliver R.P., Grigoriev I.V., Kema G.H.J. 2011.

Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis. *PLoS Genetics*. Volume 7:6.

Gow N.A.R., Robbins P.W., Lester J.W., Brown A.J.P., Fonzi W.A., Chapman T., Kinsman O.S. 1994. A hyphal-specific chitin synthase gene (CHS2) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6216–6220.

Hartl, D.L. 1980. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Sudnerland, Mass. P. 256.

Hawksworth DL. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res* 95:641–655.

Herrera T., Ulloa M. 1990. El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada*. Fondo de Cultura Económica. Pp. 19-24.

Hibbet DS., Binder M., Bischoff JF., Blackwell M., Cannon PF., Eriksson OE., Huhndorf S., James T., Kirk PM., Lucking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F., Matheny PB., Mclaughlin DJ., Powell MJ., Redhead S., Schoch CL., Spatafora JW., Stalpers JA., Vilgalys R., Aime C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny GL., Castlebury LA., Crous PW., Dai YC., Gams W., Geiser DM., Griffith GW., Gueidan C., Hawksworth DL., Hestmark G., Hosaka K., Humber RA., Hyde KD., Ironside JE., Koljalg U., Kurtzman CP., Larsson KH., Lichtwardt R., Longcore J., Mia J., Dlikowska, Miller A., Moncalvo JM., Mozley-Stangrigde S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Roger JD., Roux C., Ryvarden L., Sampaio JP., Schubler A., Sugiyama J., Thorn RG., Tibell L., Untereiner WA., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White MM., Winka K., Yao YJ., Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*. 509-547.

Hill R.E., Hastie N.D. 1987. Accelerated evolution in the reactive centre regions of serine protease inhibitors. *Nature*. 326:96–99.

Horiuchi H., Fujiwara M., Yamashita S., Ohta A., Takagi M. 1999. Proliferation of Intrahyphal Hyphae Caused by Disruption of *csmA*, Which Encodes a Class V Chitin Synthase with a Myosin Motor-Like Domain in *Aspergillus nidulans*. *Journal of bacteriology*. p. 3721–3729.

Hughes A.L. 1999. *Adaptive Evolution of Genes and Genomes*. Oxford University Press, New York.

Hughes A.L., Nei M. 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*. 335:167–170.

Hughes A.R., Inouye B.D., Johnson M.T.J., Underwood N., Vellend M. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol Lett* 11: 609–623.

Jones J.D.G., Dangl J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.

Kamoun S. 2007. Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Curr Opin Plant Biol* 10:358–365.

Kema, G.H.J. 2006. The pesticide reduction plan for banana. In: Anais XVII Reunião Internacional ACORBAT (Soprano, E., Tcacenco, F.A., Lichtemberg, L.A. and Silva, M.C., eds), pp. 3–4. Joinville, Santa Catarina: Bananicultura: um negócio sustentável ACORBAT.

Kimura M. 1983. *The neutral theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, Massachusetts.

Kliebenstein D.J., Rowe H.C., Denby K.J. 2005. Secondary metabolites influence *Arabidopsis/Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *Plant J* 44: 25–36.

Kong L., Yang J., Li G.T., Qi L.L., Zhang Y.J., Wang C.F., Zhao W.S., Xu J.R., You-Liang Peng Y.L. 2012. Different Chitin Synthase Genes Are Required for Various Developmental and Plant Infection Processes in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens*. Volume 8:2.

Kozubowski L., Panek H., Rosenthal A., Bloecher A., DeMarini DJ., Tatchell K. 2003. A Bni4-Glc7 Phosphatase Complex That Recruits Chitin Synthase to the Site of Bud Emergence. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 14, 26–39.

Lepoivre P., Busogoro J.P., El Hadrami A., Carlier J., Harelimana G., Mourichon X., Panis B., Stella Riveros A., Roux N., Sallé G., Strosse H., Swenen R. 2002. Banana-*Mycosphaerella fijiensis* (black leaf streak disease) interactions. In: Proceedings of the

- 2nd International Workshop on *Mycosphaerella fijiensis* leaf spot diseases of bananas. INIBAP. CORBANA. CATIE, San José, Costa Rica, 20-23 May, 2002. 317 p.
- Liu H., Kauffman S., Becker J.M., Szaniszló P.J. 2004. *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* WdChs5p, a Class V Chitin Synthase, Is Essential for Sustained Cell Growth at Temperature of Infection. *Eukaryotic cell*. p. 40-51.
- Magellan H., Drujon T., Thellend A., Piffeteau A., Becker H.F. 2010. Expression in *E. coli* and characterization of the catalytic domain of *Botrytis cinerea* chitin synthase. *BMC Research Notes*. 3:299.
- Mandel A., Galgiani J.N., Kroken S., Orbach M.J. 2006. *Coccidioides posadasii* contains single chitin synthase genes corresponding to classes I to VII. *Fungal Genetics and Biology* 43: 775–788.
- Manzo-Sánchez G., Orozco-Santos M., Guzmán-González S. 2001. Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacífico-centro de México y su desarrollo en medios líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:66-71.
- Manzo-Sanchez G., Guzmán-Gonzales S., Rodríguez-García C.M., James A., Orozco-Santos M. 2005. Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista mexicana de Fitopatología*. Pp. 87-96 vol. 23 número 1.
- Marín D.H., Romero R.A., Guzmán M., Sutton T.B. 2003. Black sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease* 87:208-222.
- Maruyama T. and Fuerst P.A. 1984. Population Bottlenecks and Non-Equilibrium Models in Population Genetics. I. Allele Numbers when Population Evolve from Zero Variability. *Genetics*. 108:745-763.
- Maruyama T. and Fuerst P.A. 1985. Population Bottlenecks and Non-Equilibrium Models in Population Genetics. II. Number of Alleles in a Small Population that was Formed by a Recent Bottleneck. *Genetics* 111: 675-689.
- Martín-Urdiroz M., Roncero I., González-Reyes J.A., Ruiz-Roldán C. 2008. ChsVb, a Class VII Chitin Synthase Involved in Septation, Is Critical for Pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cell*. p. 112–121 Vol. 7, No. 1.

- Martín-Urdiroz M., Madrid M.P., Roncero M.I. 2004. Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology*. 150, 3175–3187.
- Marín S.L., Blackmon B.P., Guzmán M., Sutton T.B. 2003. Black Sigatoka: An increasing treat to banana cultivation. *Plant Disease* 87:208-222.
- Mellado E., Aufauvre-Brown A., Gow N.A.R., Holden D.W. 1996. The *Aspergillus fumigatus* chsC and chsG genes encode class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol* 20:667–679.
- Mellado E., Specht C.A., Robbins P.W., Holden D.W. 1996. Cloning and characterization of chsD, a chitin synthase-like gene of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 143:69–76.
- Meredith G.C., Lawrence J.S. 1969. Black leaf streak disease (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the British Mycological Society*. 52:459-476.
- Mio T., Yabe T., Sudoh M., Satoh Y., Nakajima T., Arisawa M., Yamada-Okabe H. 1996. Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 178, 2416–2419.
- Mueller G.M., Bills G.F. 2004. Introduction. In: Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S. (eds) *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 1–4
- Mülder J.L., Holliday M. 1974. *Mycosphaerella fijiensis*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacterial No. 413. Kew, Surrey, UK.
- Mülder J.L., Stover R.H. 1976. *Mycosphaerella* species causing banana leaf spot. *Transactions of the British Mycological Society* 67:77-82.
- Munro C.A., Gow N.A.R. 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol Suppl* 1 39:41–53.
- Munro C.A., Whitton R.K., Hughes H.B., Rella M., Selvaggini S., Gow N.A.R., 2003. CHS8-a fourth chitin synthase gene of *Candida albicans* contributes to in vitro chitin synthase activity, but is dispensable for growth. *Fungal Genet. Biol.* 40, 146–158.

Munro C.A., Winter K., Buchan A., Henry K., Becker J.M., Brown A.J., Bulawa C.E., Gow N.A.R. 2001. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol. Microbiol.* 39, 1414–1426.

Nature Education. 2010. Allele Frequency. Acceso 10 julio 2013
<http://www.nature.com/scitable/definition/allele-frequency-298>

Nei M., Gojobori T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3: 418-426.

Nielsen R. 1997. The ratio of replacement to silent divergence and tests of neutrality. *Journal of Evolutionary Biology.* 10, 217-231.

Niño-Vega G.A., Carrero, L., San-Blas, G. 2004. Isolation of the CHS4 gene of *Paracoccidioides brasiliensis* and its accommodation in a new class of chitin synthases. *Med. Mycol.* 42, 51–57.

Oliver R.P., Ipcho S.V.S. 2004. Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Mol Pathol* 5: 347–352.

Orozco-Santos M. 1998. Manejo Integrado de la Sigatoka Negra del Plátano. SAGAR, INIFAP, CIPAC. Campo Experimental Tecomán. Folleto Técnico No. 1. Division Agrícola. Tecomán, Colima, México. 95 p.

Ortiz R., Vuylsteke D. 1994. Inheritance of black sigatoka disease resistance in plantain-banana (*Musa spp.*) hybrids. *Theoretical and Applied Genetic* 89:146-152.

Osmond B., Specht CA., Robbins P. 1999. Chitin synthase III: Synthetic lethal mutants and "stress related" chitin synthesis that bypasses the CSD3y CHS6 localization pathway (*Saccharomyces* cell wall glucan synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 11206–11210.

Pacheco-Arjona R. 2013. Genómica computacional de la distribución y organización de las quitina-sintasas en hongos. (Comunicación personal)

Pontón J., Moragues M.D., Gené J., Guarro J., Quindós G. 2002. Hongos y actinomicetos alérgicos. *Rev Iberoam Micol.*

Rhodes P. L. 1964. A new banana disease in Fiji. *Phytopathological news* 10: 38-41.

- Rodríguez-García C.M., Raigosa-Flores N., Conde-Ferrález L., Peraza-Echeverría L., Canto-Canché B., James-Kay A. 2006. Variation in electrophoretic karyotype between Mexican isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28, 1–6.
- Riquelme M., Bartnicki-García S., González-Prieto J.M., Verdín-Ramos J.A., Beltrán-Aguilar A., Freitag M. 2007. Spitzenkörper Localization and Intracellular Traffic of Green Fluorescent Protein-Labeled CHS-3 and CHS-6 Chitin Synthases in Living Hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, Vol. 6, No. 10p. 1853–1864.
- Roncero C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* 41:367–378.
- Rowe H.C., Kliebenstein D.J. 2010. All Mold Is Not Alike: The Importance of Intraspecific Diversity in Necrotrophic Plant Pathogens. *PLoS Pathogen*. Volume 6(3):1-3.
- Ruiz-Herrera J., González-Prieto J.M., Ruiz-Medrano R. 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Research* 1: 247-256.
- Salvaudon L., Giraud T., Shykoff J.A. 2008. Genetic diversity in natural populations: a fundamental component of plant-microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol* 11: 135–143.
- Schmidt D., Pool J. 2002. The effect of population history on the distribution of the Tajima's D statistic.
- Schoonbeek H., Del Sorbo G., De Waard M.A. 2001. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Mol Plant-Microbe Interact* 14: 562–571.
- Seena S., Duarte S., Pascoal C., Cássio F. 2012. Intraspecific Variation of the Aquatic Fungus *Articulospora tetracladia*: An Ubiquitous Perspective. *PLoS ONE*. Volume 5(9):1-8.
- Specht C.A., Liu Y., Robbins P.W., Bulawa C.E., Iartchouk N. 1996. The chsD and chsE genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis. *Fungal Genet Biol* 20:153–167.
- Stover R.H. 1980. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant Disease* 64:750-756.
- Stukenbrock E.H., McDonald B.A. 2009. Population Genetics of Fungal and Oomycete Effectors Involved in Gene-for-Gene Interactions. *Mol- Plant-Microbe Interact* 22: 371–380.

- Tajima F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597-601.
- Treitschke S., Doehlemann G., Schuster M., Steinberg G. 2010. The Myosin Motor Domain of Fungal Chitin Synthase V Is Dispensable for Vesicle Motility but Required for Virulence of the Maize Pathogen *Ustilago maydis* W. *The Plant Cell*, Vol. 22: 2476–2494.
- Unger C., Kleta S., Jandl G., von Tiedemann A. 2005. Suppression of the defence-related oxidative burst in bean leaf tissue and bean suspension cells by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *J Phytopathol* 153: 15–26.
- Valdivieso M.H., Mol P.C., Shaw J.A., Cabib E., Duran A. 1991. CAL1, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 114:101–109.
- Veronico P, Gray LJ, Jones JT, Bazzicalupo P, Arbucci S, Cortese MR, Di Vito M, De Giorgi C. 2001. Nematode chitin synthases: gene structure, expression and function in *Caenorhabditis elegans* and the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. *Mol Genet Genomics*. 266(1):28-34.
- Weber I., Aßmann D., Thines E., Steinberg G. 2006. Polar Localizing Class V Myosin Chitin Synthases Are Essential during Early Plant Infection in the Plant Pathogenic Fungus *Ustilago maydis* W. *The Plant Cell*, Vol. 18, 225–242.
- Webster J., Weber R. 2007. Introduction to fungi. Cambridge University Press, New York. 841 p.
- Wilkinson A., Solan M., Taylor A., Alexander I.J., Johnson D. 2010. Intraspecific Diversity Regulates Fungal Productivity and Respiration. *PLoS ONE*. Volume 5(9):1-9.
- Williamson B., Tudzynsk B., Tudzynski P., van Kan J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol* 8:561–580.
- Yang Z., Nielsen R. 2000. Estimating synonymous and non-synonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution*. 17, 32-43.
- Yarden O., Yanofsky C. 1991. Chitin synthase 1 plays a major role in cell wall biogenesis in *Neurospora crassa*. *Genes Dev* 5:2420–2430.

CAPÍTULO II

EVOLUCIÓN MOLECULAR DEL DOMINIO QUITINA-SINTASA EN *M. fijiensis*

II.1 INTRODUCCIÓN

La síntesis de quitina en hongos es un proceso muy complejo, regulado por familias multigénicas que codifican isoenzimas de quitina sintasas, algunas de ellas redundantes, cuyas actividades pueden ser reguladas espacial y estrictamente para cumplir con los varios papeles adscritos a ellas (Niño-Vega *et al.*, 2004).

Las quitina sintasas se han clasificado en siete clases agrupadas dentro de dos divisiones, de acuerdo con las similitudes de las secuencias primarias en la predicción de las proteínas que codifican. La división I incluye las clases I, II y III, las cuales comparten un dominio catalítico rodeado por una región N-terminal hidrofílica y una región C-terminal hidrofóbica. La división II incluye las clases IV, V y VII, las cuales contienen un dominio catalítico precedido por un dominio tipo citocromo-b5. Además, las clases V y VII contienen un dominio N-terminal tipo motor de miosina. La clase VI fue identificada recientemente, aún no ha sido asignada a ninguna división, incluye Chs con funciones que se desconocen (Riquelme *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004).

La existencia sugerida de dos divisiones de Chs está respaldada por ciertas características diferenciales de las enzimas correspondientes, como es el tamaño molecular relativo de las proteínas; las Chs pertenecientes a la división 1 son más pequeñas que las enzimas de la división 2. Otra diferencia se refiere a la posición del pentapéptido QXRRW, la "firma motivo" de las Chs, éste se encuentra más hacia el extremo C-terminal en las enzimas que pertenecen a la división 2. Y la conservación de diferentes motivos en cada división también apoya la idea de la separación de Chs en dos divisiones (Ruiz-Herrera, 2002).

Los genes pertenecientes a las clases IV y V de la división 2, están presentes en los miembros de todos los *phyla*, excepto en la especie microsporidia *E. cuniculi*, cuyo único gen pertenece a la clase IV. Este resultado concuerda con el análisis filogenético que sugiere que la clase IV es más primitiva que la clase V. Para llegar a esta

conclusión Ruiz-Herrera y Ortíz-Castellanos (2009) llevaron a cabo un análisis estructural *in silico* de las secuencias de las quitina sintasas presentes en miembros de Protozoos y Animalia, en el cual mostraron que todos ellos poseían un motivo de quitina sintasa con una homología más cercana al motivo "quitina sintasa 2" perteneciente a la división 2 de las enzimas fúngicas y ninguno contenía el motivo motor de miosina, lo que sugiere que están más relacionados con la quitina sintasa de clase IV de los hongos. Estos datos apoyan el concepto de que los genes primitivos *CHS* estaban relacionados con la clase IV moderna (Ruiz-Herrera & Ortíz-Castellanos, 2009).

Nagahashi y colaboradores (1995) usando *Chs2* como modelo, asignaron el dominio catalítico de esta quitina sintasa, que contiene tres motivos (QXXEY, EDRXL, y QXRRW) que se encuentran en todas las quitina sintasas y se cree que es necesario para la transferencia de GlcNAc a la creciente cadena de quitina. Se llevó a cabo un alineamiento de 48 secuencias de aminoácidos de quitina sintasas de hongos, en el cual se extendió la secuencia consenso (QXXEYX n LPG / A, LA / GEDRXL, QR / GRRWL / IN), este dominio firma está incluido en una región de 250 aminoácidos, con una estructura secundaria predicha conservada (Ruiz Herrera *et al.*, 2002).

Se cree que el motivo QXRRW está relacionado con la capacidad de procesamiento de las quitina sintasas. El motivo EDRXL, es esencial para la actividad de *ScCHS2* en *S. cerevisiae*, y la función biológica del motivo QXFEY es aún desconocida (Choquer *et al.*, 2004).

En este capítulo se presenta el análisis filogenético de fragmentos de *CHS* obtenidos a partir de doce cepas de *M. fijiensis* aisladas de diferentes cultivares de plátano y banano. También se presentan los resultados del análisis de las pruebas de desviación de la neutralidad para determinar si existen fuerzas evolutivas ejerciendo alguna presión sobre estos genes.

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1 Material Biológico

Para el desarrollo del trabajo experimental se utilizaron cepas de *M. fijiensis*, las cuales fueron aisladas de cultivares de banano con diferentes respuestas a la enfermedad de la Sigatoka negra. Las cepas fueron aisladas en el campo experimental Uxmal del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Se trabajó con 12 cepas diferentes:

Aislados de cultivares susceptibles: 1 cepa aislada del cultivar Gran Enano y 2 cepas del cultivar Pisang Berlin;

Aislados de cultivares parcialmente resistentes: 3 cepas aisladas del cultivar Fougamou;

Aislados de cultivares altamente resistentes: 1 cepa aislada del cultivar Malaccensis, 3 del cultivar Yangambi km5, 1 del cultivar Kluai Namwa Khom, y 1 del cultivar Saba.

II.2.2 Crecimiento y mantenimiento de los aislados de *M. fijiensis*

Se inocularon fragmentos de micelio conservados a -80 °C, en cajas Petri con medio PDA para el crecimiento del hongo y su mantenimiento. Los aislados se incubaron a 26 °C, en fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad.

Una vez que se observó crecimiento micelial, se tomaron 16 mm de este y se inocularon en cajas Petri con medio V8, el cual se compone de 200 ml/L de jugo V8, 2 g/L de CaCO₃ y 2% de agar. Nuevamente se incubaron a 26 °C y fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad.

Se utilizó medio líquido con 200 ml/L de jugo V8 y 2 g/L de CaCO₃ inoculado con 0.5 ml de micelio desagregado de las diferentes cepas de *M. fijiensis* para la obtención de suficiente biomasa para las extracciones de ADN y ARN (Islas-Flores *et al.*, 2006).

El micelio fue cosechado después de 15 días de cultivo, filtrado por medio de gasa, pesado y distribuido en paquetes de 250 mg. El micelio se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

II.2.3 Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico de cada una de las cepas se llevó a cabo usando el kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit, siguiendo el protocolo de manufactura (QIAGEN, Netherlands). La integridad y calidad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en Buffer TAE (1x), corrido durante 90 min a 7 V/cm y posteriormente teñido con Bromuro de Etidio. Por otra parte, mediante espectrofotometría se calculó la concentración y pureza del ADN ($A_{260}/A_{280} > 1.8$), utilizando el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA)

II.2.4 Amplificación de la secuencias ITS y del gen de actina por medio de PCR convencional

Una vez evaluada la pureza e integridad del ADN, se procedió a utilizar aprox. 50 ng de ADN como molde para confirmación de identidad de los aislados mediante PCR (Mullis *et al.*, 1986) de las secuencias marcadoras ITS y actina.

Para la amplificación de ITS, la mezcla de reacción consistió de $0.2\text{ }\mu\text{M}$ de cada cebador; ITS-4 y MF-137 (Johanson & Jeger, 1993; White *et al.*, 1990), 1.5 mM de MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs, buffer 1X y 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen). El volumen final de la reacción fue de $25\text{ }\mu\text{L}$; los ciclos de amplificación consistieron de: Desnaturalización inicial a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 min y 35 ciclos en las siguientes condiciones: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 min. Al finalizar se efectuó una última extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min.

Para la amplificación de actina (Arzanlou *et al.*, 2007), la mezcla de reacción se llevó a cabo como se describió en el caso de los ITS con las siguientes excepciones: se utilizaron los cebadores (ACTR y MFactF) y las condiciones de reacción fueron las siguientes: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ de desnaturalización inicial durante 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ de desnaturalización por 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ de alineamiento por 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ de extensión por 60 s durante 36 ciclos y 7 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ de extensión final.

En ambos casos, tanto para amplificar las regiones ITS y el gen de actina en el aislado del cultivar Pisang Berlin 7, las condiciones de reacción en el termociclador se modificaron: se aumentó el tiempo de desnaturalización inicial a 5 minutos, y el tiempo de alineamiento a 1 minuto, las demás condiciones así como las temperaturas de alineamiento correspondientes se mantuvieron.

II.2.5 Diseño de cebadores

Los cebadores se diseñaron a partir de las secuencias codificantes de los siete probables genes *CHS* identificadas previamente *in silico*. Las secuencias se analizaron en el programa MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). Con el fin de alinear las secuencias de nucleótidos de acuerdo a los codones correspondientes al marco de lectura correcto, éstas fueron traducidas a proteína. Se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias peptídicas con el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Posteriormente se localizaron los motivos universales conservados de las CHS, para verificar su correcta alineación.

Con base en el alineamiento de proteínas se procedió a buscar aquellos sitios dentro de las secuencias que pudieran servir como cebadores, y que flanquearan los tres motivos universales conservados. Una vez hallados estos sitios en el alineamiento de proteínas, se localizaron dentro de las secuencias alineadas de nucleótidos. Se seleccionaron regiones de un tamaño de 17 a 21 nucleótidos, las cuales se analizaron en el programa Oligo Analyzer, para verificar contenido de GC's, temperatura de alineamiento y posibles oligomerizaciones de cada uno de los cebadores.

Posteriormente se hizo una búsqueda de los cebadores dentro del genoma de *M. fijiensis* por medio del programa perfectBLAST (Santiago-Sotelo & Ramírez-Prado, 2012), para verificar que no se alinearan en ningún otro sitio dentro del genoma, con el fin de tener cebadores que fueran específicos para cada una de las siete clases de Chs.

En la figura 2 se muestra un diagrama de los siete genes *CHS* encontrados en el genoma de *M. fijiensis*.



Figura 2. Diagrama de genes probables de quitina sintasas en *M. fijiensis*. Las barras verticales muestran la localización de los motivos universales conservados de las quitina sintasas. Así mismo se indica la posición de los intrones dentro de cada gen y la posición del lugar donde fueron diseñados los cebadores.

II.2.6 Amplificación por medio de PCR convencional de fragmentos de genes quitina sintasa

Se amplificó la región que contiene los tres motivos conservados universales de los siete genes de quitina sintasa para cada una de las cepas. Las mezclas de reacción se realizaron como se describe en la amplificación de ITS, excepto que se utilizaron los pares de cebadores específicos para cada clase Chs. Las condiciones de reacción fueron las mismas que para los ITS, exceptuando la temperatura de alineamiento específica para cada juego de cebadores. Las temperaturas de alineamiento de cada uno de ellos se muestran en el cuadro 2.

Para amplificar los fragmentos de los genes de la clase III, V y VII en el aislado del cultivar "Pisang Berlin 7", las condiciones de reacción en el termociclador se modificaron: se aumentó el tiempo de desnaturalización inicial a 5 minutos, y el tiempo de alineamiento a 1 minuto, las demás condiciones así como las temperaturas de alineamiento correspondientes se mantuvieron.

Los productos de las reacciones se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TAE (1x), 5 V/cm, durante 180 min. Al finalizar la corrida se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un fotoiluminador UV.

II.2.7 Purificación de fragmentos amplificados por PCR para secuenciación

Los fragmentos obtenidos por medio de PCR se purificaron usando el kit comercial PureLink PCR Purification Kit, siguiendo el protocolo de manufactura (Invitrogen).

Los fragmentos purificados fueron enviados a secuenciar al Instituto Genómico de la Universidad de Clemson (Clemson University Genomics Institute, CUGI).

II.2.8 Análisis Filogenético

Los resultados de la secuenciación fueron analizados por medio del programa Sequencher 5.0 de la siguiente manera: se hicieron alineamientos múltiples de los cromatogramas para cada uno de los siete genes putativos *CHS*. Se analizaron los cromatogramas y se hizo una limpieza de las secuencias, corroborando o rechazando los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) presentes en los alineamientos, así como descartando secuencias de mala calidad en los extremos de los fragmentos. Las secuencias alineadas y depuradas fueron exportadas para trabajarlas con el programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

En el programa MEGA 5, se trabajó con dos alineamientos para cada uno de los genes: uno sin grupo externo y un segundo alineamiento con grupo externo. Todos los fragmentos fueron "rasurados" en sus extremos de manera que el primer nucleótido de la secuencia correspondiera a la primera base de un codón del marco de lectura abierto correspondiente. Se realizó este procedimiento para cada uno de los siete genes de quitina sintasa.

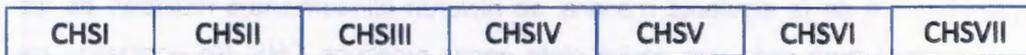
A partir de los alineamientos de nucleótidos, se procedió a buscar el mejor modelo para estimar la distancia evolutiva y se usaron los métodos de Máxima Verosimilitud y Vecino Cercano para la inferencia de los árboles, con un bootstrap de 10000 réplicas.

II.2.9 Pruebas de Neutralidad

La determinación de desviaciones a la neutralidad se realizó con base en un alineamiento múltiple en el cual se concatenaron las secuencias de los fragmentos secuenciados de los siete genes de quitina sintasas de *M. fijiensis*. Las secuencias se

concatenaron usando el programa DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2010). Posteriormente se asignaron las regiones codificantes y no codificantes, y se procedió a determinar los valores (como se describe en el artículo realizado por Rozas, 2009), para la secuencia total (análisis multilocus), así como en ventanas deslizantes de 100 nucleótidos (con pasos de 25 nucleótidos), para cada una de las siguientes pruebas: Prueba D de Tajima, Pruebas D* y F* de Fu & Li, y se hizo un análisis de sustituciones sinónimas y no sinónimas. Para las pruebas D y F de Fu & Li se utilizó un concatenado que no incluía las secuencias correspondientes a CHSVI para ningún aislado, ya que se requiere del uso de un grupo externo para su cálculo y no se tenía una secuencia para este gen de *Scolecobasidium* sp. También se calculó la diversidad de haplotipos Hd para el conjunto de secuencias.

a)



b)



Figura 3. Diagramas de los genes concatenados para cada aislado. a) Concatenado de los siete genes CHS de cada una de las cepas de *M. fijiensis*, en este concatenado no se incluye ninguna de las secuencias de *Scolecobasidium* sp. El concatenado incluye 11 secuencias (de cada cepa) con un total de 4805 posiciones. b) Concatenado de los genes CHS excluyendo las secuencias de la clase VI. El concatenado incluye 12 secuencias de nucleótidos (de cada cepa) con un total de 4225 posiciones.

II.3 RESULTADOS

II.3.1 Material Biológico

De las 12 cepas aisladas de diversos cultivares de plátano y banano con diferentes respuestas hacia la enfermedad de Sigatoka negra, once presentaron las características morfológicas que distinguen a la especie *M. fijiensis*. Las colonias presentaron un micelio aéreo con apariencia algodonosa, de un color gris-oscuro a blanco-rosado, algunas con formas esféricas bien delimitadas, otras con forma irregular (no circular) (Fig. 4).

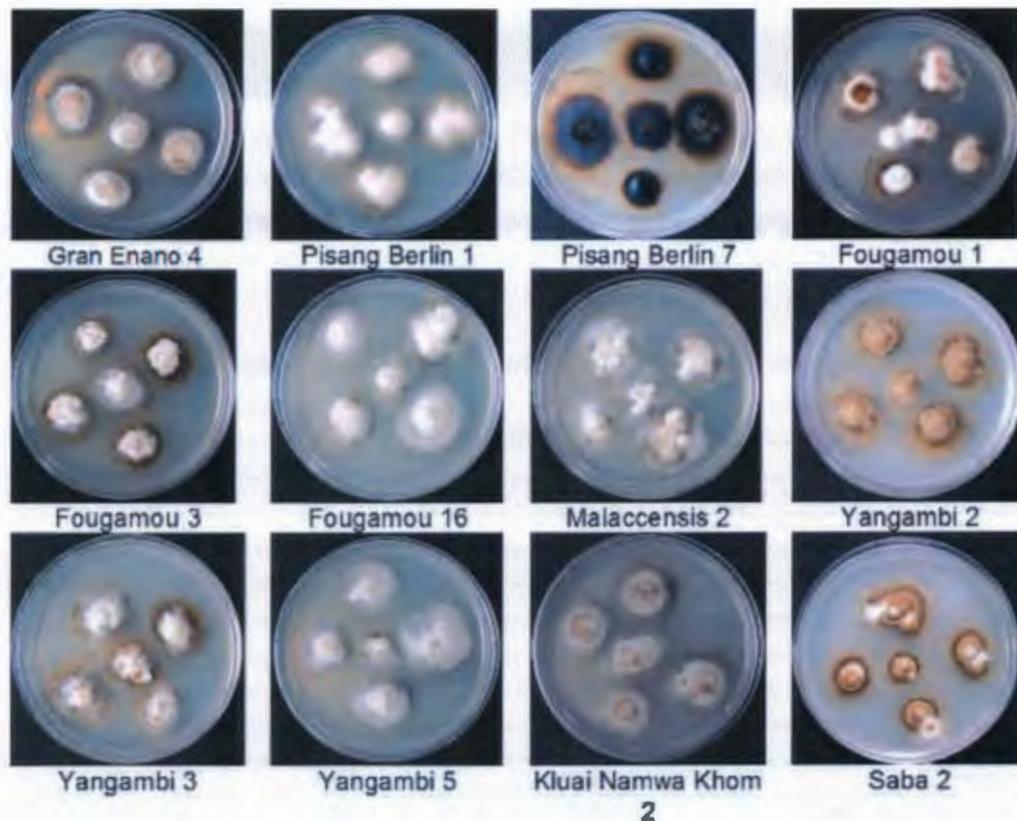


Figura 4. Características morfológicas de cepas de *M. fijiensis*

En el caso del aislado del cultivar Pisang Berlin 7 la morfología de la cepa es claramente diferente a las demás, presentando un color café oscuro casi negro. La

consistencia de las colonias es lisa en los bordes y presentan relieves al centro de la misma, lo que indica que esta cepa podría no corresponder a *M. fijiensis*.

II.3.2 Extracción de ADN genómico

En la figura 5 se puede observar la integridad del ADN extraído de los aislados, y en el cuadro 2 se muestra la concentración de cada una de las muestras así como la pureza de las mismas.

Se observan bandas intensas con una buena integridad del ADN.

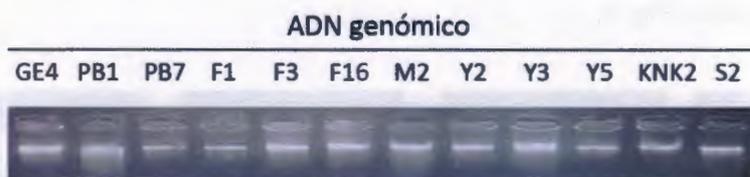


Figura 5. Electroforésis en gel de agarosa al 1% de las extracciones de ADN genómico de los doce aislados. GE4 = Gran Enano 4, PB1 = Pisang Berlin 1, PB7 = Pisang Berlin 7, F1 = Fougamou 1, F3 = Fougamou 3, F16 = Fougamou 16, M2 = Malaccensis 2, Y2 = Yangambi 2, Y3 = Yangambi 3, Y5 = Yangambi 5, KNK2 = Klwai Namwa Khom 2, S2 = Saba 2.

Cuadro 2. Concentración de ADN en las muestras obtenidas en el presente trabajo

Aislado del cultivar:	Concentración ng/μl	260/280	260/230
Gran Enano 4	35.0	1.87	1.81
Pisang Berlin 1	69.4	1.83	1.70
Pisang Berlin 7	40.5	1.90	1.93
Fougamou 1	23.7	1.85	1.41
Fougamou 3	64.3	1.93	1.81
Fougamou 16	55.8	1.87	2.08
Malaccensis 2	40.8	1.86	1.40
Yangambi km5 2	75.1	1.87	1.99
Yangambi km5 3	26.9	1.81	1.43
Yangambi km5 5	39.9	1.96	1.53
Kluai Namwa Khom 2	42.8	1.92	2.03
Saba 2	45.5	1.83	1.34

La pureza de los ácidos nucleicos está dada por la relación 260/280, una relación de 1.8 indica que el ADN es "puro" y una relación de 2 para el ARN. Para el caso de los 12 aislados se tuvieron relaciones mayores a 1.8, lo que indica que el ADN no está contaminado con proteínas o por compuestos fenólicos que absorben a 280. La

relación 260/230 es usada como una medida secundaria para la pureza de los ácidos nucleicos, los valores esperados están alrededor de 2.0 – 2.2, si el valor es menor puede indicar que la muestra está contaminada por solventes orgánicos que absorben a 230. En el caso del ADN extraído de las 12 cepas, los valores fueron menores de 2 lo que significa que el ADN no es tan puro y que está contaminado por compuestos orgánicos.

II.3.3 Amplificación de regiones ITS y gen de actina

Con el fin de llevar a cabo la identificación molecular de las cepas se amplificó las regiones ITS y el gen de actina, con cebadores específicos de *M. fijiensis* reportados en la literatura.

En la figura 6 se observan los fragmentos amplificados con los cebadores ITS-4 y MF137. Se muestran los 12 aislados de los cuales se amplificaron las regiones ITS. Como se aprecia para once de los aislados, los fragmentos son de alrededor de 400 pb, sin embargo, para el aislado del cultivar Pisang Berlin 7, se obtuvo un fragmento mayor de aproximadamente 500 pb, lo que indica que esta cepa no corresponde a *M. fijiensis*, sin embargo para corroborar la identidad de la cepa fue necesario mandar a secuenciar el fragmento obtenido, así como el de todas las cepas.

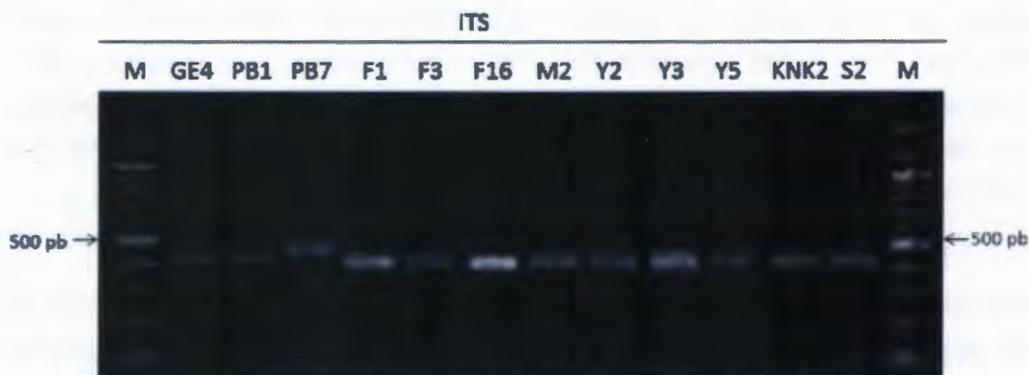


Figura 6. Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos amplificados por PCR con oligos ITS específicos para *M. fijiensis*. GE4 = Gran Enano 4, PB1 = Pisang Berlin 1, PB7 = Pisang Berlin 7, F1 = Fougamou 1, F3 = Fougamou 3, F16 = Fougamou 16, M2 = Malaccensis 2, Y2 = Yangambi 2, Y3 = Yangambi 3, Y5 = Yangambi 5, KNK2 = Kluai Namwa Khom 2, S2 = Saba 2. M = Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

En la figura 7 se muestran los fragmentos amplificados con los cebadores del gen de actina, reportados por Arzanlou y colaboradores (2007), para la identificación de cepas de *M. fijiensis*.

Se lograron amplificar los fragmentos para todos los aislados, sin embargo, como se describió en materiales y métodos para amplificar el gen de actina del aislado Pisang Berlin 7 se modificaron las condiciones de reacción (5 minutos de desnaturalización inicial y 1 minuto en el tiempo de alineamiento) con el fin de tener un fragmento el cual se pudiera enviar a secuenciar.



Figura 7. Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos del gen de actina; se utilizaron los oligos reportados por Arzanlou y colaboradores (2007), específicos de *M. fijiensis*. GE4 = Gran Enano 4, PB1 = Pisang Berlin 1, PB7 = Pisang Berlin 7, F1 = Fougamou 1, F3 = Fougamou 3, F16 = Fougamou 16, M2 = Malaccensis 2, Y2 = Yangambi 2, Y3 = Yangambi 3, Y5 = Yangambi 5, KNK2 = Kluai Namwa Khom 2, S2 = Saba 2. M = Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

Once de las secuencias de ITS resultaron ser casi idénticas entre sí, lo cual corroboró que pertenecían a la misma especie. Una búsqueda con Blastn en la base de datos Genbank confirmó su identidad con secuencias ITS de *Mycosphaerella fijiensis*. Por otro lado, la secuencia que correspondía al aislado del cultivar Pisang Berlin 7 resultó ser diferente a las demás, por lo tanto, se llevó a cabo un Blastn adicional para esta secuencia.

El Blastn dio como resultado hits contra varias secuencias pertenecientes a *Ochroconis sp.*, y a *Scolecobasidium sp.* con un porcentaje de identidad de 74% y un

porcentaje de similitud de 84%, descartando de esta manera que la cepa aislada del cultivar Pisang Berlin 7 corresponde a la especie *M. fijiensis*.

En las figuras 8 y 9 se muestran los análisis filogenéticos que se elaboraron a partir de las secuencias obtenidas de las regiones ITS y del gen de actina, para los doce aislados utilizados en el estudio.

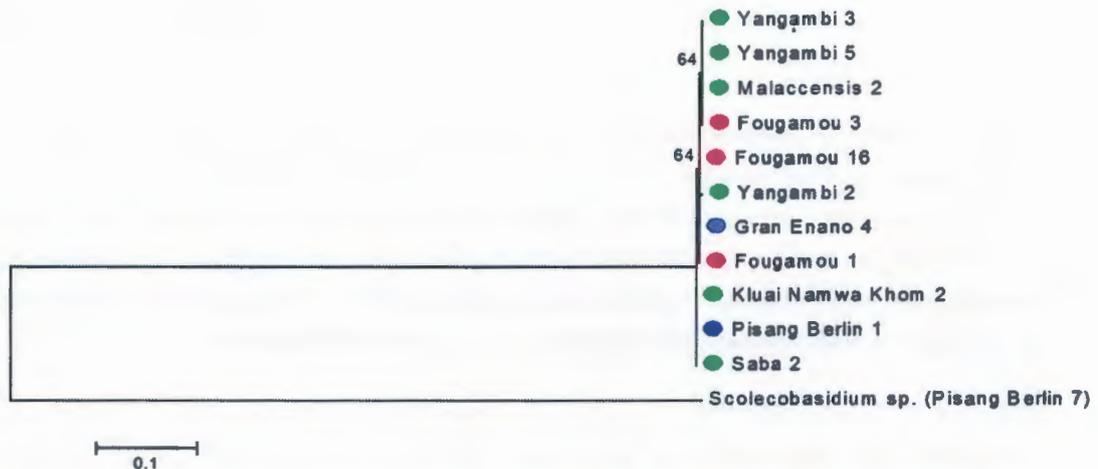


Figura 8. Análisis filogenético de las secuencias ITS de las 12 cepas. Los círculos azules indican aquellas cepas que fueron aisladas de cultivares susceptibles, los círculos rosados las que fueron aisladas de cultivares parcialmente resistentes y los círculos verdes indican las aisladas de cultivares altamente resistentes. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Máxima Verosimilitud, basado en un modelo de Kimura con 2 parámetros y un Bootstrap de 1000 réplicas. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA5

En la figura 9 se muestran las relaciones filogenéticas que hay entre los aislados utilizando las secuencias del gen de actina; se observa que los aislados se concentran en un solo clado debido a que las secuencias son muy parecidas entre ellas; también se puede observar como el aislado perteneciente al género *Scolecobasidium sp.* se separa de dicho clado.

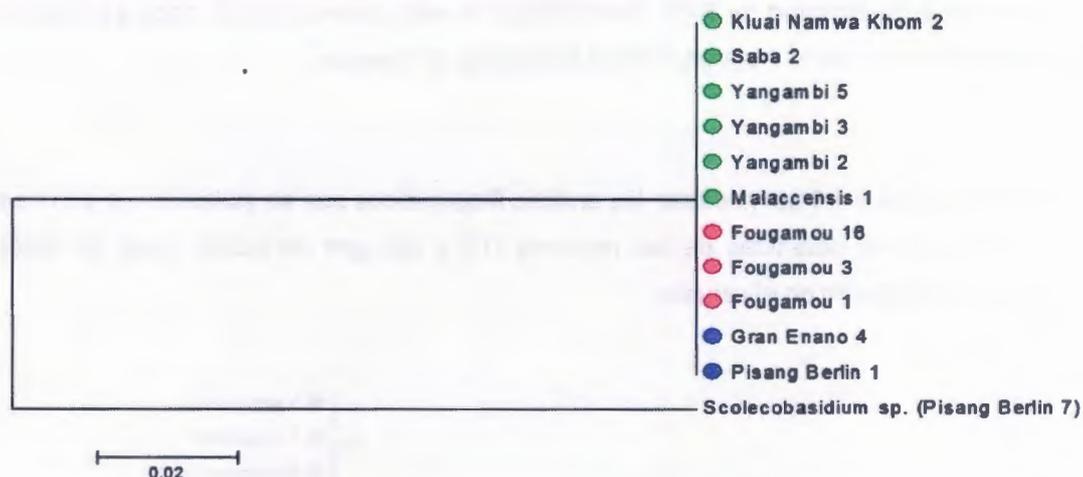


Figura 9. Análisis filogenético con las secuencias del gen de actina de las 12 cepas. Los círculos azules indican aquellas cepas que fueron aisladas de cultivares susceptibles, los círculos rosados las que fueron aisladas de cultivares parcialmente resistentes y los círculos verdes indican las aisladas de cultivares altamente resistentes. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Máxima Parsimonia basado en un modelo de Kimura con 2 parámetros y un Bootstrap de 1000 réplicas. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA5.

Tanto para las secuencias de ITS como de actina, los aislados de *M. fijiensis* presentan una variabilidad casi nula, tal como se esperaba. Aunque el aislado de *Scolecobasidium, sp.* parece ser muy lejano, en realidad su distancia evolutiva con *M. fijiensis* es corta (notar en ambas filogenias la escala de distancia: 0.1 para ITS y 0.02 para actina), presentando porcentajes de similitud con *M. fijiensis* de 67% para ITS y 82.3% para actina. Dada esta cercanía evolutiva, el hecho de que es también un patógeno del banano y que, al igual que *M. fijiensis*, contiene en su genoma una copia de cada una de las siete clases Chs (resultados preliminares previos), se decidió utilizar como grupo externo en los análisis posteriores.

II.3.4 Diseño de Cebadores

En el cuadro 3 se muestran las características de los cebadores que se diseñaron para los 7 genes probables de quitina sintasa. Se puede observar la secuencia de nucleótidos de cada uno, así como el tamaño, contenido de GC's, la temperatura de cada cebador y el tamaño del fragmento esperado, usando como molde ADN genómico y ADN complementario.

Cuadro 3. Diseño de cebadores empleados para amplificar fragmentos de los siete genes *CHS* en *M. fijiensis*. Se muestra la secuencia, tamaño, porcentaje de GC, la temperatura de alineamiento y el tamaño esperado para cada par de cebadores.

Cebadores	Clase <i>CHS</i>	Secuencia	Tamaño (nt)	GC%	Tm °C	Fragmento esperado	
						ADNg	ADNc
5.130240 F 5.130240 R	I	CAAGGAGAAGAACCAGAA	18	44.4	55.1	807	757
		ATGCGGAATACGAGGAAG	18	50	60.2		
1.1.7.989.1 F 1.1.7.989.1 R	II	GCATGAAGGAAAAGAACG	18	44.4	58.3	735	735
		CGAGAAGAAGGTGAAGAG	18	50	54.8		
7.90038 F 7.90038 R	III	GCAGAAGAACAGCAAGAAG	19	47.4	57.8	741	741
		GCCAAAGAGAACCAAGAG	18	50	57.4		
3.1.11.8.1 F 3.1.11.8.1 R	IV	GCAAAAAGTCATGTTCG	17	41.2	54.8	721	721
		GCAGGAAGAACCAGTGTA	18	50	56		
4.20866 F 4.20866 R	V	GCTTCCTGAACCGTGCC	18	61.1	63.4	766	766
		AATGTAGCCGACGATGAC	18	50	58.6		
6.20000123 F 6.20000123 R	VI	ACGGTGGCAAACGAAGC	17	58.8	65	739	739
		GATCTTTTGCAGGTGCT	18	50	60.5		
2.20862 F 2.20862 R	VII	GCATCATTTCTGCCAGA	17	47.1	58.2	801	741
		CGAGGTAGACCAAGTATG	18	50	52.7		

II.3.5 Amplificación de fragmentos de genes *CHS*

II.3.5.1 Amplificación del gen 130240 *CHS* clase I

Se logró amplificar el fragmento de la clase I en las 12 cepas utilizadas, como se observa en la figura 10 el tamaño esperado para este fragmento fue de 807 pb.

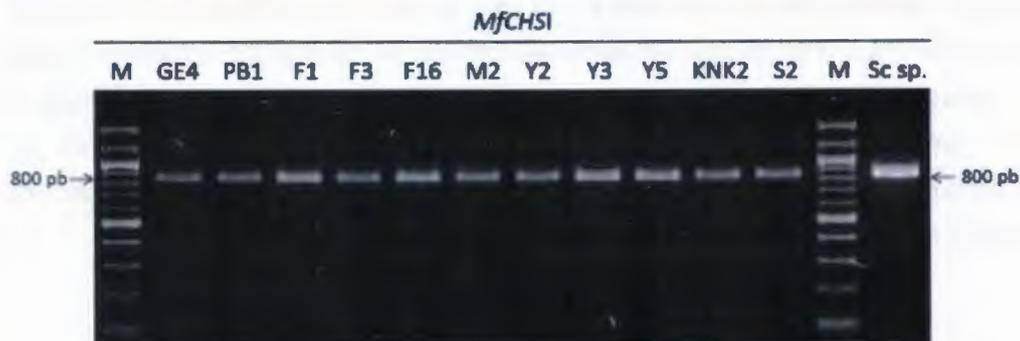


Figura 10. Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos del gen *CHS* de clase I, se usó como molde ADN genómico de los aislados: GE4 = Gran Enano 4, PB1 = Pisang Berlin 1, F1 = Fougamou 1, F3 = Fougamou 3, F16 = Fougamou 16, M2 = Malaccensis 2, Y2 =

Yangambi 2, Y3 = Yangambi 3, Y5 = Yangambi 5, KNK2 = Kluai Namwa Khom 2, S2 = Saba 2, Sc sp. = *Scolecobasidium* sp. M = Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

II.3.5.2 Amplificación del gen 1.7989.1 *CHS* clase II

En la figura 11 se muestran los fragmentos amplificados de cada uno de los aislados; el tamaño del fragmento esperado para este gen fue de 735 pb.

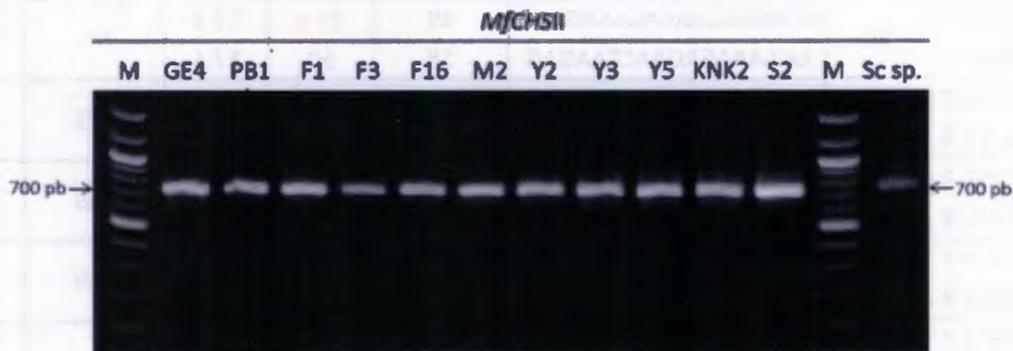


Figura 11. Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos del gen *CHS* de clase II, se usó como molde ADN genómico de los aislados: GE4 = Gran Enano 4, PB1 = Pisang Berlin 1, F1 = Fougamou 1, F3 = Fougamou 3, F16 = Fougamou 16, M2 = Malaccensis 2, Y2 = Yangambi 2, Y3 = Yangambi 3, Y5 = Yangambi 5, KNK2 = Kluai Namwa Khom 2, S2 = Saba 2, Sc sp. = *Scolecobasidium* sp. M = Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

II.3.5.3 Amplificación del gen 90038 *CHS* clase III

Para el fragmento del gen de clase III, se llevó a cabo la amplificación de las cepas correspondientes a *M. fijiensis* utilizando las condiciones de reacción establecidas para los cebadores de dicha clase, sin embargo, para poder amplificar este fragmento a partir del ADN genómico de la cepa *Scolecobasidium* sp., se modificaron las condiciones de reacción como se describió en materiales y métodos. En todos los aislados se obtuvo el fragmento del tamaño esperado (fig. 12).



Figura 12. Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos del gen *CHS* de clase III, se usó como molde ADN genómico de los aislados: GE4 = Gran Enano 4, PB1 = Pisang Berlin 1, F1 = Fougamou 1, F3 = Fougamou 3, F16 = Fougamou 16, M2 = Malaccensis 2, Y2 = Yangambi 2, Y3 = Yangambi 3, Y5 = Yangambi 5, KNK2 = Klui Namwa Khom 2, S2 = Saba 2, Sc sp. = *Scolecobasidium* sp. M = Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

II.3.5.4 Amplificación del gen 1.11.8.1 *CHS* clase IV

El fragmento esperado para el gen de la clase IV fue de 721 pb, como se observa en la figura 13, para todos los aislados de *M. fijiensis* se obtuvo el fragmento del tamaño esperado, interesantemente el fragmento amplificado de la cepa *Scolecobasidium* sp., resultó ser aproximadamente 100 pb más grande de lo esperado.

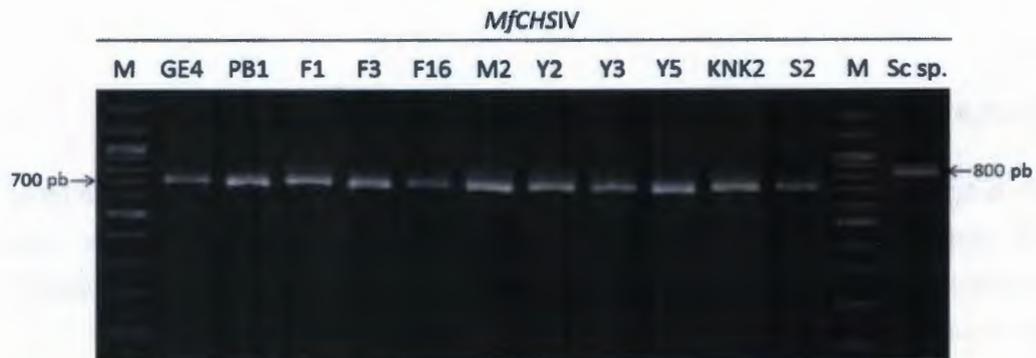


Figura 13. Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos del gen *CHS* de clase IV, se usó como molde ADN genómico de los aislados: GE4 = Gran Enano 4, PB1 = Pisang Berlin 1, F1 = Fougamou 1, F3 = Fougamou 3, F16 = Fougamou 16, M2 = Malaccensis 2, Y2 = Yangambi 2, Y3 = Yangambi 3, Y5 = Yangambi 5, KNK2 = Klui Namwa Khom 2, S2 = Saba 2, Sc sp. = *Scolecobasidium* sp. M = Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

II.3.5.5 Amplificación del gen 20866 *CHS* clase V

Para el caso del fragmento del gen quitina sintasa de clase V en *M. fijiensis*, el fragmento esperado fue de 766 pb, como se observa en la figura 14 se logró amplificar el fragmento para todos los aislados, incluyendo el de *Scolecobasidium sp.*, sin embargo para amplificar el fragmento de este último se modificaron las condiciones de reacción (tiempo de desnaturalización inicial y tiempo de alineamiento, las temperaturas correspondientes no se modificaron).

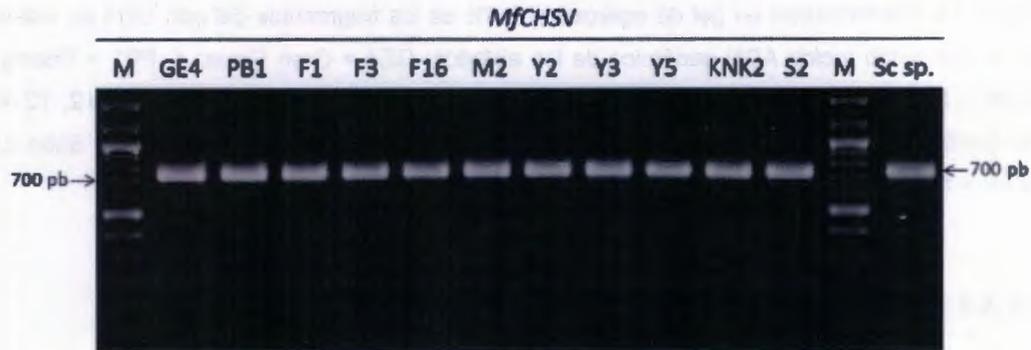


Figura 14. Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos del gen *CHS* de clase V, se usó como molde ADN genómico de los aislados: GE4 = Gran Enano 4, PB1 = Pisang Berlin 1, F1 = Fougamou 1, F3 = Fougamou 3, F16 = Fougamou 16, M2 = Malaccensis 2, Y2 = Yangambi 2, Y3 = Yangambi 3, Y5 = Yangambi 5, KNK2 = Kluai Namwa Khom 2, S2 = Saba 2, Sc sp. = *Scolecobasidium sp.* M = Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

II.3.5.6 Amplificación del gen 20000123 *CHS* clase VI

En la figura 15 se observa que el fragmento esperado de 739 pb se amplificó en todos los aislados. También se observa que el fragmento amplificado de la cepa *Scolecobasidium sp.* resultó ser mayor al tamaño esperado, el fragmento se observó por encima de las 800 pb.



Figura 15. Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos del gen *CHS* de clase VI, se usó como molde ADN genómico de los aislados: GE4 = Gran Enano 4, PB1 = Pisang Berlin 1, F1 = Fougamou 1, F3 = Fougamou 3, F16 = Fougamou 16, M2 = Malaccensis 2, Y2 = Yangambi 2, Y3 = Yangambi 3, Y5 = Yangambi 5, KNK2 = Kluai Namwa Khom 2, S2 = Saba 2, Sc sp. = *Scolecobasidium* sp. M = Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

II.3.5.7 Amplificación del gen 20862 *CHS* clase VII

El fragmento del gen de clase VII contiene un intrón dentro de la secuencia de ADN y el tamaño del fragmento esperado fue de 801 pb.

En la figura 16 se muestran los fragmentos amplificados del gen de clase VII. Se pueden observar los fragmentos de alrededor de 800 pb en la mayoría de los aislados, excepto para el aislado de *Scolecobasidium*, sp., en el cual se puede observar una gran variación en cuanto al tamaño del fragmento, el cual está por encima de las 1000 pb.



Figura 16. Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos del gen *CHS* de clase VII, se usó como molde ADN genómico de los aislados: GE4 = Gran Enano 4, PB1 = Pisang Berlin 1, F1 = Fougamou 1, F3 = Fougamou 3, F16 = Fougamou 16, M2 = Malaccensis 2, Y2 =

Yangambi 2, Y3 = Yangambi 3, Y5 = Yangambi 5, KNK2 = Kluai Namwa Khom 2, S2 = Saba 2, Sc sp. = *Scolecobasidium* sp. M = Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

Una vez depuradas las secuencias, la longitud final de cada fragmento quedó como sigue: clase I, 744 pb; clase II, 673 pb; clase III, 682 pb; clase IV, 662 pb; clase V, 663 pb; clase VI, 661 pb; y clase VII, 720 pb. La clase I presenta en esta región un intrón de 50 pb (del nucleótido 682 al 731); la clase VII posee un intrón de 60 pb (del nucleótido 213 al 272). Para las pruebas de neutralidad y la inferencia de árboles filogenéticos multilocus se concatenaron las secuencias, obteniendo fragmentos de una longitud total de 4805 pb. De las 11 secuencias concatenadas (una por cepa), 9 son únicas, y 2 son idénticas: Fougamou 3 idéntica a Kluai Namwa Khom 2, y Malaccensis 2 idéntica a Yangambi 5. Esto produce un valor de diversidad de haplotipos $H_d=0.9636$.

Las secuencias de los fragmentos de las clases I, III y VII, presentaron variaciones entre ellas. En el caso de las secuencias de las clases III y VII, se observaron pocas variaciones incluyendo las secuencias de la cepa *Scolecobasidium* sp. Para el caso de las secuencias de la clase I, aquellas que correspondían a las cepas de *M. fijiensis* presentaron pocas variaciones, en contraste la secuencia correspondiente a la cepa *Scolecobasidium* sp. presentó un alto número de variaciones comparada con las otras 11 cepas.

En el caso de los fragmentos obtenidos de las clases II y V todas las secuencias obtenidas, incluyendo las que se obtuvieron de la cepa *Scolecobasidium* sp. resultaron ser 100% idénticas.

Para el caso de las secuencias de la clase IV, se observaron algunas diferencias entre las secuencias de las cepas de *M. fijiensis*. La secuencia obtenida a partir del grupo externo presentó un intrón de aproximadamente 100 pb, el cual no se observó en las secuencias de *M. fijiensis*.

Por último se observó que para el grupo externo no se pudo amplificar el gen perteneciente a la clase VI de quitina sintasa con el juego de cebadores diseñados para dicho fragmento. Utilizando los cebadores correspondientes hubo una amplificación de tamaño similar al esperado, pero resultó ser una amplificación inespecífica, ya que en el análisis de las secuencias se observó que el fragmento

obtenido no codifica una quitina sintasa. Al hacer el Blastn usando la secuencia obtenida para este fragmento, dio como resultado hits contra O-metiltransferasas de *Aspergillus fumigatus* y *Neosartorya fischeri* con una cobertura de 51 y 47% y un porcentaje de identidad de 72 y 70% respectivamente.

II.3.6 Análisis filogenético

En la figura 17 se muestran los árboles realizados con los métodos de a) Máxima Verosimilitud y b) Vecino Cercano. En ambos árboles se incluyen las secuencias de cada clase aisladas del grupo externo, excepto la secuencia perteneciente a la clase VI, puesto que no se tiene una secuencia homóloga de este gen para el grupo externo.

En la figura 18 se muestra el árbol elaborado con el método de Vecino Cercano a partir del alineamiento de las secuencias de todas las clases de CHS aisladas de *M. fijiensis*.

Como se puede observar en ambas figuras, en los árboles se forman 7 clados principales, cada uno perteneciente a cada clase de quitina sintasa. También se puede observar que los clados de las clases I, II y III, las cuales pertenecen a la división I de las CHS quedan agrupados. Los clados de las clases IV, V y VII, también se agrupan; estas clases pertenecen a la división II de CHS, mientras que el clado de la clase VI es el más divergente.

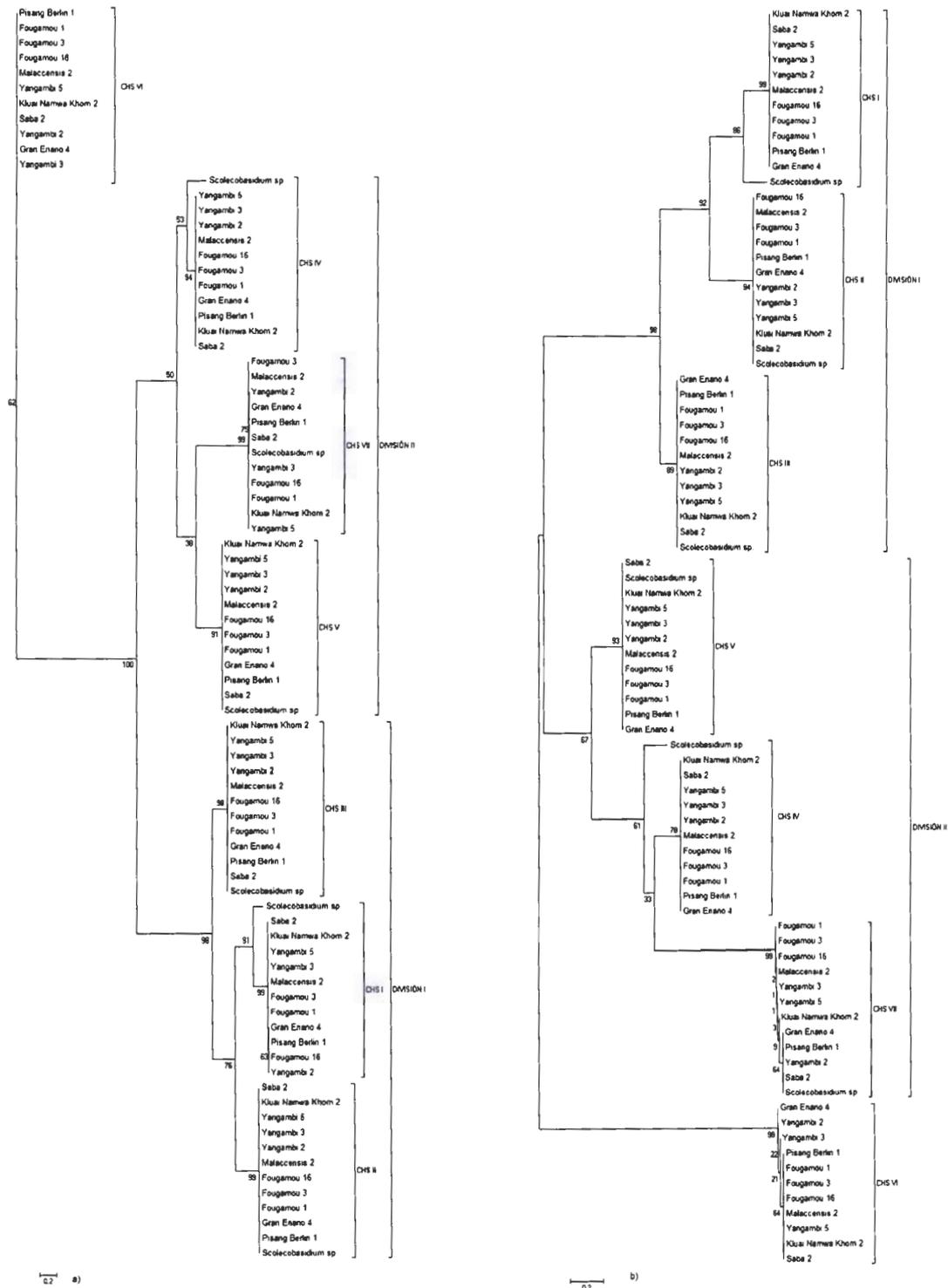


Figura 17. Árbol filogenético de las siete clases de CHS aisladas de las 12 cepas usadas en el presente estudio, con grupo externo. Método usado: a) Maxima Verosimilitud; b) Vecino Cercano. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el modelo de Kimura con 2 parámetros; la tasa de variación entre sitios fue modelada con una distribución gamma de 1.05 y un Bootstrap de 10000 réplicas. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA5

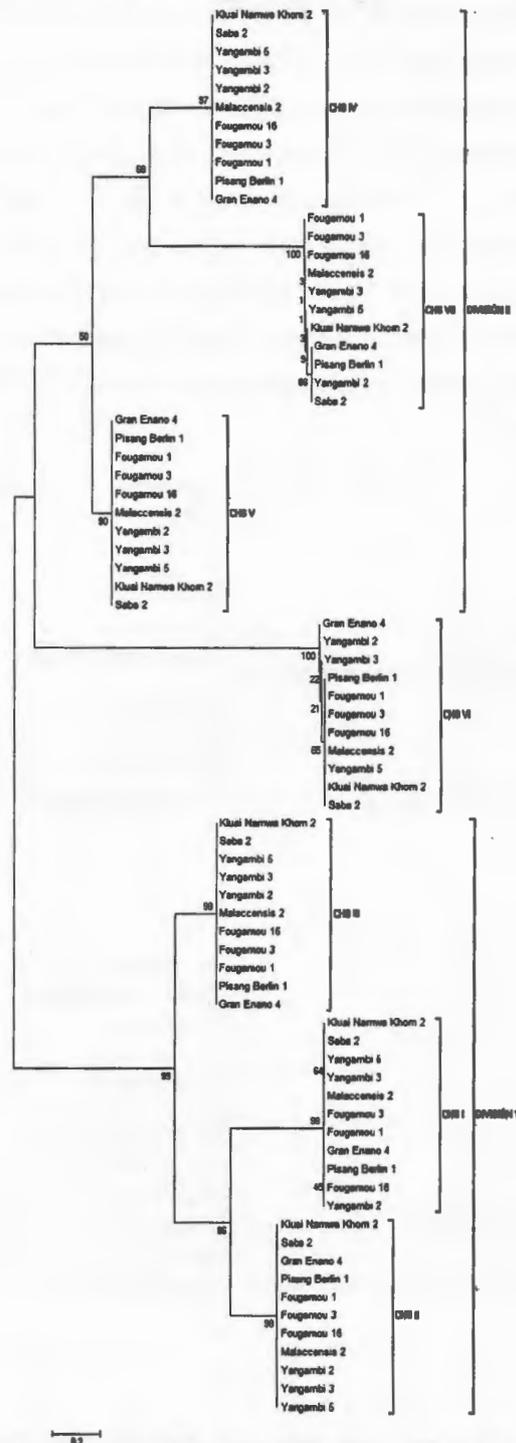
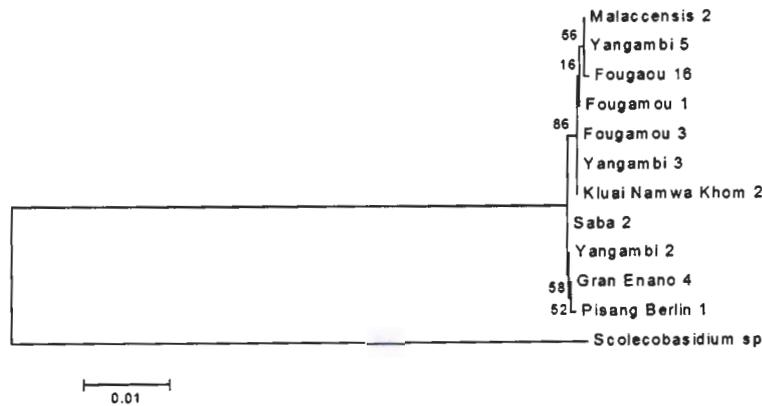
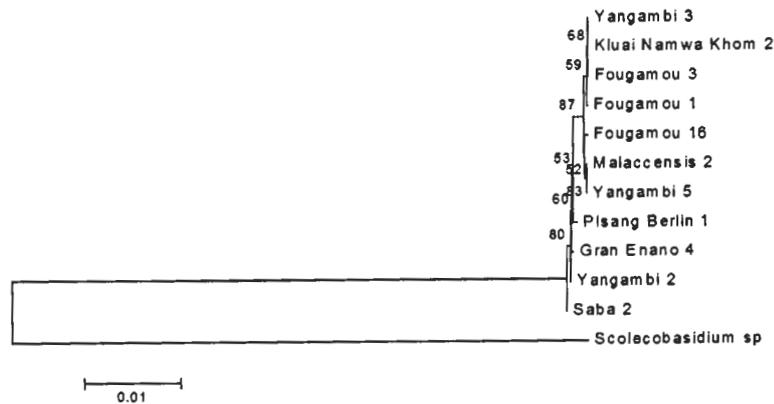


Figura 18. Análisis filogenético de las siete clases de CHS aisladas de las 12 cepas usadas en el presente estudio, sin grupo externo. Método usado: Vecino Cercano. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el modelo de Jukes-Cantor; la tasa de variación entre sitios fue modelada con una distribución gamma de 1.35 y un Bootstrap de 10000 réplicas. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA5

Los árboles filogenéticos de las figuras 19 y 20, se elaboraron usando un alineamiento con los fragmentos de los siete genes que previamente se concatenaron. Esto debido a que se observan pocas o ninguna mutación en algunos de los fragmentos; por ejemplo en los que pertenecen a la clase II y V, no se observó ninguna variación entre las secuencias. Los fragmentos se concatenaron con el fin de acumular las mutaciones y tener como resultado una secuencia multilocus. A partir de este alineamiento se elaboraron dos árboles, uno de caracteres y otro de distancias. En el caso de los árboles elaborados a partir de los alineamientos en los que se incluía el grupo externo, se excluyeron las secuencias pertenecientes a la clase VI debido a que no se encontró en el grupo externo.

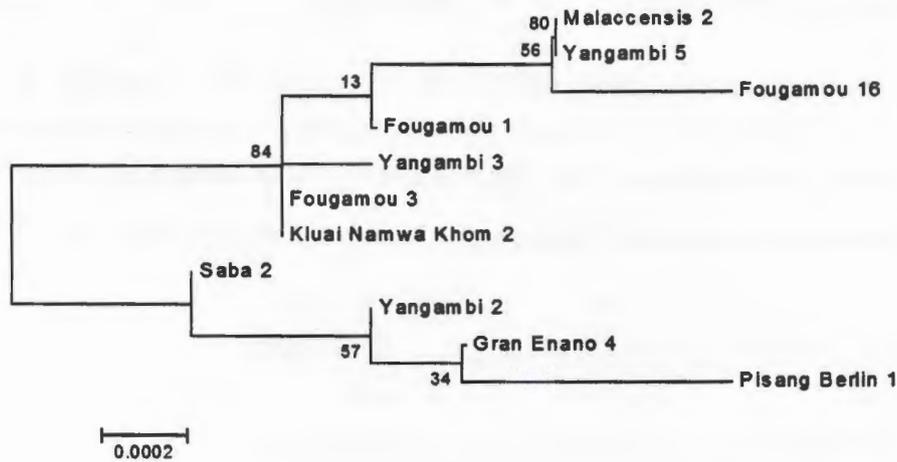


a)

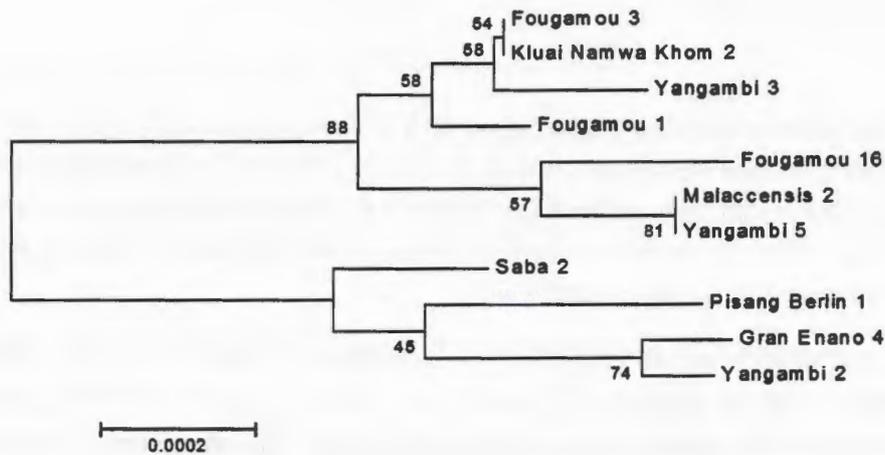


b)

Figura 19. Análisis Filogenético de los fragmentos de genes concatenados, con grupo externo. Método usado: a) Maxima Verosimilitud; b) Vecino Cercano. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el modelo de *Tamura con 3 parámetros*; la tasa de variación entre sitios fue modelada con una distribución gamma de 0.35 y un Bootstrap de 10000 réplicas. El análisis incluye 12 secuencias de nucleótidos con un total de 4225 posiciones por concatenado. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA5



a)



b)

Figura 20. Análisis filogenético de los fragmentos de genes concatenados, sin grupo externo. Método usado: a) Máxima Verosimilitud; b) Vecino Cercano. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el modelo de Kimura con 2 parámetros; la tasa de variación entre sitios fue modelada con una distribución gamma de 0.05 y un Bootstrap de 10000 réplicas. El análisis incluye 11 secuencias de nucleótidos con un total de 4805 posiciones por concatenado. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA5

II.3.7 Pruebas de Neutralidad

Para las secuencias concatenadas (multilocus) las pruebas de neutralidad, D de Tajima, F*, D*, F y D de Fu & Li, revelaron que, en promedio, existe una desviación de la teoría neutra, con valores positivos y estadísticamente significativos (Cuadro 4).

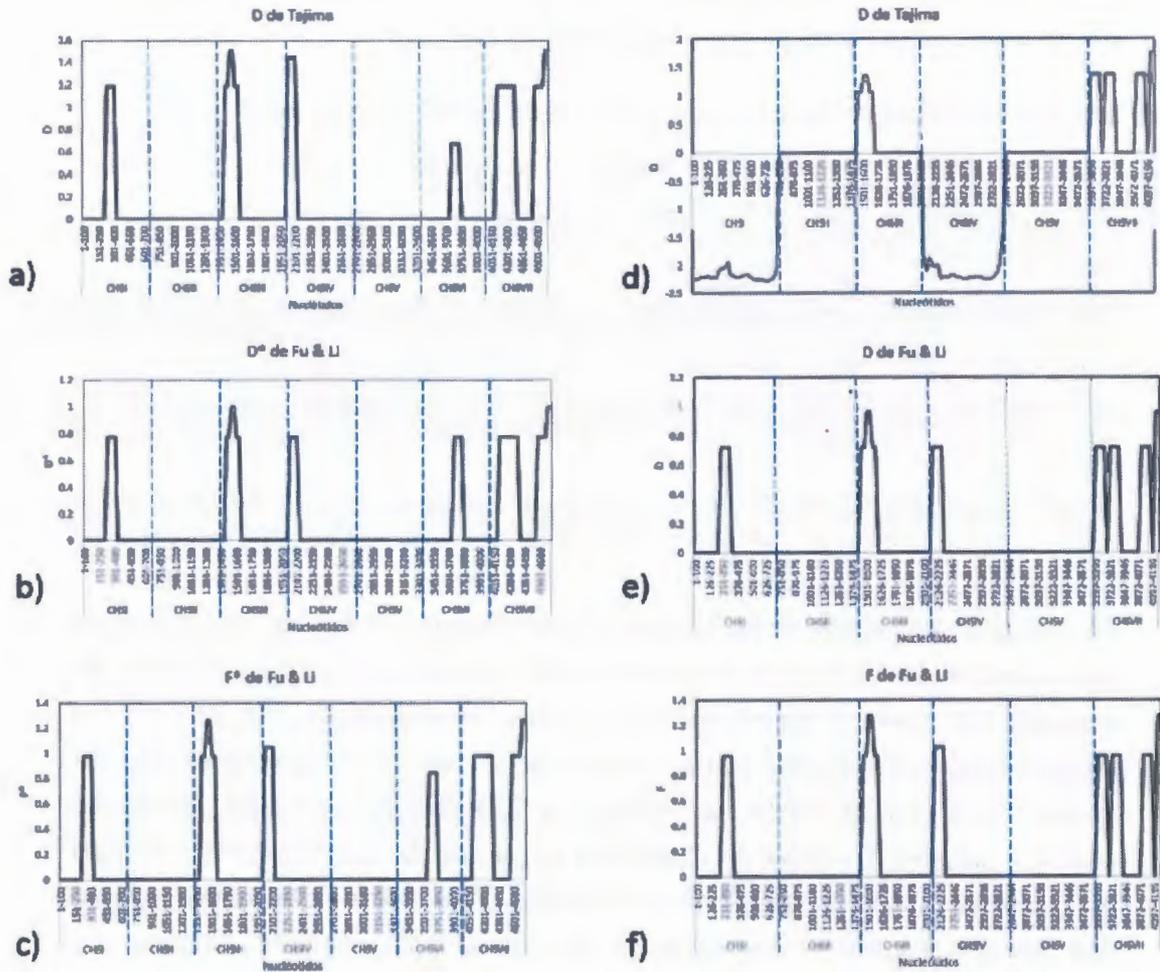
Cuadro 4. Resultados de las pruebas de neutralidad a partir de los concatenados.

Prueba	Valor	Significación Estadística
D de Tajima	2.04525	P < 0.05 *
D* de Fu & Li	1.44217	P < 0.05 *
F* de Fu & Li	1.80325	P < 0.02 **
D de Tajima (grupo externo)	-2.22530	P < 0.001 ***
D de Fu & Li	1.57293	P < 0.05 *
F de Fu & Li	2.06553	P < 0.002 **

Nota: Los resultados de las pruebas D de Tajima, D* y F* de Fu & Li, se obtuvieron a partir de los 7 genes concatenados de las once cepas de *M. fijiensis*, mientras que los resultados de las pruebas D de Tajima (con grupo externo), D y F de Fu & Li se obtuvieron a partir de los genes de clase I, II, III, IV, V y VII, de las doce cepas incluyendo *Scolecobasidium sp.*, excluyendo las secuencias de la clase VI. * Valores significativos

Como ya se mencionó en el apartado I.6.1.1, valores positivos de la D de Tajima pueden indicar que la población ha sufrido un cuello de botella reciente (efecto demográfico) o puede tratarse de una fuerza de selección sobredominante (balancing selection) sobre el locus estudiado. Si se tratase del primer caso, los eventos demográficos afectan a la mayoría de los genes de la misma manera. Ya que nuestro análisis contiene un total de 7 regiones pertenecientes (6 en el caso del concatenado con el grupo externo) a genes independientemente localizados en el genoma, las pruebas de neutralidad pueden ayudar a descartar o corroborar el efecto demográfico. El valor negativo de la prueba D de Tajima calculado en las 6 regiones del concatenado con el grupo externo, se debe a la alta sensibilidad de la prueba a los cambios, en este caso incorporados por el grupo externo, sin embargo para corroborar estos resultados se calcularon los valores de D y F de Fu & Li, los cuales fueron positivos, por lo cual se puede descartar el valor negativo de la D de Tajima calculada para el concatenado con el grupo externo, y debido a que los genes tienen valores diferentes y se comportan de maneras diferentes es más probable que se trate de fuerzas de selección de sobredominancia y se pueden descartar los efectos demográficos.

Se calcularon los valores para las pruebas D de Tajima, F^* y D^* de Fu & Li en ventanas deslizantes a lo largo de las secuencias concatenadas. Las regiones, en nucleótidos, correspondientes a cada gen *CHS* para el concatenado de las once secuencias de *M. fijiensis* son: CHSI, 1-693; CHSII 694-1365; CHSIII 1366-2046; CHSIV 2047-2706; CHSV 2707-3369; CHSVI 3370-4029; CHSVII 4030-4689. Para el concatenado con las doce secuencias, las regiones correspondientes son: CHSI, 1-693; CHSII 694-1365; CHSIII 1366-2046; CHSIV 2047-2706; CHSV 2707-3369; CHSVII 3370-4225. En la figura 21 se observan las gráficas para cada una de las



pruebas de neutralidad.

Figura 21. Pruebas de Neutralidad calculadas para: a – c) concatenado de los siete genes CHS sin grupo externo, sólo se usaron las once secuencias de los aislados de *M. fijiensis*. d – f) concatenado de los genes CHS excluyendo las secuencias de la clase VI de todos los aislados, en este concatenado se usaron las 12 secuencias de los genes I, II, III, IV, V y VII incluyendo las secuencias de *Scolecobasidium sp.* (grupo externo).

Las desviaciones a la neutralidad para cada una de las siete clases varían al analizarse independientemente (Cuadro 5). Las clases II y V tienen una desviación nula ($D=0$); las clases I, III, IV y VI tienen comportamientos similares (una única región altamente divergente), mientras que la clase VII es la que acumula un mayor número de mutaciones, ocasionando desviaciones de la neutralidad a lo largo de casi todo el fragmento analizado, estas variaciones pueden observarse en las gráficas de la figura 21. Dado que el efecto no es similar para todos los genes, se pueden descartar eventos demográficos (cuello de botella reciente) sobre la población, apuntando a una posible selección de balanceada o de sobredominancia.

Cuadro 5. Resultados de las pruebas de neutralidad para cada uno de los genes CHS.

Gen	D de Tajima	D° de Fu & Li	F° de Fu & Li	D de Tajima (grupo externo)	D de Fu & Li	F de Fu & Li
CHSI	1.18560 P > 0.10	0.77552 P > 0.10	0.97943 P > 0.10	-2.31337 P < 0.001 ***	0.72001 P > 0.10	0.95608 P > 0.10
CHSII	0	0	0	0	0	0
CHSIII	1.50194 P > 0.10	0.99697 P > 0.10	1.25816 P > 0.10	1.35640 P > 0.10	0.96616 P > 0.10	1.27769 P > 0.10
CHSIV	1.44272 P > 0.10	0.77552 P > 0.10	1.04939 P > 0.10	-2.29746 P < 0.001 ***	0.72001	1.02437
CHSV	0	0	0	0	0	0
CHSVI	0.67135 P > 0.10	0.77552 P > 0.10	0.83951 P > 0.10			
CHSVII	1.88169 P > 0.10	1.27814 P > 0.10	1.61103 P < 0.05*	2.21712 P < 0.05 *	1.34030 P > 0.10	1.75761 P > 0.10

Se calcularon los valores de las pruebas de sustituciones sinónimas y no sinónimas para determinar si las fuerzas de selección están afectando los genes analizados, en el cuadro 6 se muestran los resultados al comparar cada par de secuencias, así como los promedios para la población. En todos los casos, para la población en estudio, los valores de la relación Ka/Ks son menores a 1, indicando una fuerza de presión selectiva negativa o purificante. Cuando la proporción de sustituciones sinónimas (Ks) es mayor que la proporción de no sinónimas (Ka), $Ka/Ks < 1$, los datos sugieren una selección negativa o purificante. En el caso contrario, $Ka/Ks > 1$, se tiene una probable selección positiva o ventajosa. Estos resultados son de esperarse puesto que las regiones analizadas contienen los 3 motivos conservados universales de las CHS, los cuales tienen una fuerte presión para evitar mutaciones.

Cuadro 6. Substituciones sinónimas y no sinónimas.

Sec 1	Sec 2	Observadas							Estimadas		
		SynDif	SynPos	NSynDif	NSynDif	Ks	Ka	Ka/Ks	Ks	Ka	Ka/Ks
Gran Enano 4	Pisang Berlin 1	2	1111.17	1	3577.83	0.0018	0.0003	0.5000	0.0018	0.0003	0.1667
Gran Enano 4	Fougamou 1	6	1111.5	1	3577.5	0.0054	0.0003	0.1667	0.0036	0.0008	0.2222
Gran Enano 4	Fougamou 3	7	1111.5	1	3577.5	0.0063	0.0003	0.1429	0.0045	0.0008	0.1778
Gran Enano 4	Fougamou 16	8	1111.5	1	3577.5	0.0072	0.0003	0.1250	0.0054	0.0008	0.1481
Gran Enano 4	Malaccensis 2	8	1111.5	1	3577.5	0.0072	0.0003	0.1250	0.0054	0.0008	0.1481
Gran Enano 4	Yangambi 2	1	1110.83	0	3578.17	0.0009	0.0000	0.0000	0.0009	0	0.0000
Gran Enano 4	Yangambi 3	7	1111.17	0	3577.83	0.0063	0.0000	0.0000	0.0045	0.0006	0.1333
Gran Enano 4	Yangambi 5	8	1111.5	1	3577.5	0.0072	0.0003	0.1250	0.0054	0.0008	0.1481
Gran Enano 4	Kluai Namwa Khom 2	7	1111.5	1	3577.5	0.0063	0.0003	0.1429	0.0045	0.0008	0.1778
Gran Enano 4	Saba 2	2	1111.17	1	3577.83	0.0018	0.0003	0.5000	0.0018	0.0003	0.1667
Pisang Berlin 1	Fougamou 1	8	1111.83	0	3577.17	0.0072	0.0000	0.0000	0.0054	0.0006	0.1111
Pisang Berlin 1	Fougamou 3	9	1111.83	0	3577.17	0.0081	0.0000	0.0000	0.0063	0.0006	0.0952
Pisang Berlin 1	Fougamou 16	6	1111.83	0	3577.17	0.0054	0.0000	0.0000	0.0036	0.0006	0.1667
Pisang Berlin 1	Malaccensis 2	6	1111.83	0	3577.17	0.0054	0.0000	0.0000	0.0036	0.0006	0.1667
Pisang Berlin 1	Yangambi 2	3	1111.17	1	3577.83	0.0027	0.0003	0.3333	0.0027	0.0003	0.1111
Pisang Berlin 1	Yangambi 3	9	1111.5	1	3577.5	0.0081	0.0003	0.1111	0.0063	0.0008	0.1270
Pisang Berlin 1	Yangambi 5	6	1111.83	0	3577.17	0.0054	0.0000	0.0000	0.0036	0.0006	0.1667
Pisang Berlin 1	Kluai Namwa Khom 2	9	1111.83	0	3577.17	0.0081	0.0000	0.0000	0.0063	0.0006	0.0952
Pisang Berlin 1	Saba 2	4	1111.5	0	3577.5	0.0036	0.0000	0.0000	0.0036	0	0.0000
Fougamou 1	Fougamou 3	1	1112.17	0	3576.83	0.0009	0.0000	0.0000	0.0009	0	0.0000
Fougamou 1	Fougamou 16	4	1112.17	0	3576.83	0.0036	0.0000	0.0000	0.0036	0	0.0000
Fougamou 1	Malaccensis 2	2	1112.17	0	3576.83	0.0018	0.0000	0.0000	0.0018	0	0.0000
Fougamou 1	Yangambi 2	7	1111.5	1	3577.5	0.0063	0.0003	0.1429	0.0045	0.0008	0.1778
Fougamou 1	Yangambi 3	1	1111.83	1	3577.17	0.0009	0.0003	1.0000	0.0009	0.0003	0.3333
Fougamou 1	Yangambi 5	2	1112.17	0	3576.83	0.0018	0.0000	0.0000	0.0018	0	0.0000
Fougamou 1	Kluai Namwa Khom 2	1	1112.17	0	3576.83	0.0009	0.0000	0.0000	0.0009	0	0.0000
Fougamou 1	Saba 2	6	1111.83	0	3577.17	0.0054	0.0000	0.0000	0.0036	0.0006	0.1667
Fougamou 3	Fougamou 16	3	1112.17	0	3576.83	0.0027	0.0000	0.0000	0.0027	0	0.0000
Fougamou 3	Malaccensis 2	3	1112.17	0	3576.83	0.0027	0.0000	0.0000	0.0027	0	0.0000
Fougamou 3	Yangambi 2	6	1111.5	1	3577.5	0.0054	0.0003	0.1667	0.0036	0.0008	0.2222
Fougamou 3	Yangambi 3	0	1111.83	1	3577.17	0.0000	0.0003	NA	0	0.0003	NA
Fougamou 3	Yangambi 5	3	1112.17	0	3576.83	0.0027	0.0000	0.0000	0.0027	0	0.0000
Fougamou 3	Kluai Namwa Khom 2	0	1112.17	0	3576.83	0.0000	0.0000	NA	0	0	NA
Fougamou 3	Saba 2	5	1111.83	0	3577.17	0.0045	0.0000	0.0000	0.0027	0.0006	0.2222
Fougamou 16	Malaccensis 2	2	1112.17	0	3576.83	0.0018	0.0000	0.0000	0.0018	0	0.0000
Fougamou 16	Yangambi 2	7	1111.5	1	3577.5	0.0063	0.0003	0.1429	0.0045	0.0008	0.1778
Fougamou 16	Yangambi 3	3	1111.83	1	3577.17	0.0027	0.0003	0.3333	0.0027	0.0003	0.1111
Fougamou 16	Yangambi 5	2	1112.17	0	3576.83	0.0018	0.0000	0.0000	0.0018	0	0.0000
Fougamou 16	Kluai Namwa Khom 2	3	1112.17	0	3576.83	0.0027	0.0000	0.0000	0.0027	0	0.0000
Fougamou 16	Saba 2	8	1111.83	0	3577.17	0.0072	0.0000	0.0000	0.0054	0.0006	0.1111
Malaccensis 2	Yangambi 2	9	1111.5	1	3577.5	0.0081	0.0003	0.1111	0.0063	0.0008	0.1270
Malaccensis 2	Yangambi 3	3	1111.83	1	3577.17	0.0027	0.0003	0.3333	0.0027	0.0003	0.1111
Malaccensis 2	Yangambi 5	0	1112.17	0	3576.83	0.0000	0.0000	NA	0	0	NA
Malaccensis 2	Kluai Namwa Khom 2	3	1112.17	0	3576.83	0.0027	0.0000	0.0000	0.0027	0	0.0000
Malaccensis 2	Saba 2	8	1111.83	0	3577.17	0.0072	0.0000	0.0000	0.0054	0.0006	0.1111
Yangambi 2	Yangambi 3	6	1111.17	0	3577.83	0.0054	0.0000	0.0000	0.0036	0.0006	0.1667
Yangambi 2	Yangambi 5	9	1111.5	1	3577.5	0.0081	0.0003	0.1111	0.0063	0.0008	0.1270
Yangambi 2	Kluai Namwa Khom 2	6	1111.5	1	3577.5	0.0054	0.0003	0.1667	0.0036	0.0008	0.2222
Yangambi 2	Saba 2	1	1111.17	1	3577.83	0.0009	0.0003	1.0000	0.0009	0.0003	0.3333
Yangambi 3	Yangambi 5	3	1111.83	1	3577.17	0.0027	0.0003	0.3333	0.0027	0.0003	0.1111
Yangambi 3	Kluai Namwa Khom 2	0	1111.83	1	3577.17	0.0000	0.0003	NA	0	0.0003	NA
Yangambi 3	Saba 2	5	1111.5	1	3577.5	0.0045	0.0003	0.2000	0.0027	0.0008	0.2963
Yangambi 5	Kluai Namwa Khom 2	3	1112.17	0	3576.83	0.0027	0.0000	0.0000	0.0027	0	0.0000
Yangambi 5	Saba 2	8	1111.83	0	3577.17	0.0072	0.0000	0.0000	0.0054	0.0006	0.1111
Kluai Namwa Khom 2	Saba 2	5	1111.83	0	3577.17	0.0045	0.0000	0.0000	0.0027	0.0006	0.2222
		4.6182		0.436364		0.0042	0.0001	0.0294	0.0032	0.00041	0.1268

Nota: La prueba de substituciones sinónimas y no sinónimas se llevó a cabo a partir del concatenado de las once secuencias de *M. fijiensis*, se usaron las secuencias de los siete genes *CHS*.

II.4 DISCUSIÓN

Las doce cepas utilizadas en el estudio fueron recolectadas a partir de cultivares de plátano y banano que presentaban la sintomatología visible de la Sigatoka negra. Sin embargo cuando se cultivaron en condiciones de laboratorio se pudo observar que la cepa aislada del cultivar Pisang Berlin 7 resultó morfológicamente diferente a las demás cepas. Como se describió en los resultados, se descartó que la cepa aislada del cultivar Pisang Berlin 7 perteneciera a *M. fijiensis*. Esta se identificó como una cepa relacionada a especies de *Scolecobasidium spp.* Hao y colaboradores (2012) reportan a *Scolecobasidium*, como una nueva especie asociada con la enfermedad SBFS "Sooty Blotch and FlySpeck" que afecta al banano en zonas de producción en China. Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de manchas oscuras sobre la superficie del fruto, limitando el crecimiento de la producción de frutas orgánicas. La clasificación taxonómica de *Scolecobasidium sp.*, es la siguiente; pertenece al reino *Fungi*; subreino *Dikarya*; phylum *Ascomycota*; clase *Sordariomycetes*; orden *Hypocreales*; género *Scolecobasidium*.

A pesar de ser una especie e incluso un género diferente a *Mycosphaerella*, se pudo observar, por medio de análisis filogenético a partir de las secuencias tanto de ITS como de actina, que la cepa identificada como *Scolecobasidium spp.*, está estrechamente relacionada evolutivamente con las cepas de *M. fijiensis*; esto se observó en las distancias evolutivas que se obtuvieron a partir de los árboles filogenéticos.

Con relación al aislamiento y secuenciación de los fragmentos que contenían los motivos característicos de las quitina sintasas, se tuvieron resultados muy interesantes para las siete clases de CHS, incluyendo las de *Scolecobasidium spp.*, que como ya se explicó fue tomada como grupo externo.

Para el caso de la Clase I, dentro de las secuencias de *CHS* que pertenecían a las cepas de *M. fijiensis* se encontraron algunas variaciones, y la secuencia obtenida a partir de *Scolecobasidium* resultó ser más divergente. En los casos de las Clases II y V, es muy interesante resaltar que los fragmentos que se utilizaron para el análisis filogenético para ambas clases resultaron tener secuencias 100% idénticas, incluyendo a las secuencias obtenidas de la cepa identificada como *Scolecobasidium*

sp., no se cuenta con reportes previos sobre la alta conservación de estas regiones, pero se podría sugerir que el motivo de que estos fragmentos sea tan conservado pudiera deberse a que estos genes son los más recientes en éstas especies y por tal motivo no se han acumulado variaciones en las regiones pertenecientes a los dominios catalíticos de las clases II y V. Para las Clases III y VII, se obtuvieron secuencias con pocas variaciones entre ellas, incluyendo la secuencia que se tomó como grupo externo. En cuanto a las secuencias pertenecientes a la Clase IV de *M. fijiensis*, se encontraron pocas variaciones entre ellas, sin embargo, cuando se analizó la secuencia que se obtuvo de la cepa identificada como *Scolecobasidium sp.*, se observó que dicha secuencia era 100 pares de bases más larga que las secuencias de *M. fijiensis*, esto debido a que el grupo externo contiene un intrón adicional. En el caso de la Clase VI, se pudo observar que la secuencia amplificada para el grupo externo era muy divergente con respecto a las demás secuencias, por lo tanto se analizó mediante blastn y no se obtuvieron resultados contra ninguna de las clases de quitina sintasa, indicando que se trataba de una posible amplificación inespecífica.

A partir del análisis filogenético realizado con el alineamiento múltiple se observa que hay suficientes sitios variables y conservados en los fragmentos seleccionados, como para separarlos en clados pertenecientes a cada una de las clases de chs, lo cual valida la selección de estas regiones para los análisis de evolución molecular descritos. Los análisis filogenéticos resultaron en árboles donde se muestran las dos divisiones bien definidas, como se ha reportado anteriormente (Riquelme *et al.*, 2007; Niño-Vega *et al.*, 2004; Roncero, 2002; Ruiz-Herrera *et al.*, 2002), dentro de la división I se encuentran los fragmentos de las quitina sintasas de clases I, II y III, en la división II se encuentran las clases IV, V y VII, mientras que la clase VI sigue siendo la más divergente, incluso se ha propuesto como una nueva división (Riquelme & Bartnicki-García, 2008). De acuerdo a lo reportado por Roncero (2002), la duplicación de un gen *CHS* ancestral dio origen a los dos genes *CHS* en las divisiones I y II. Un gen chs de la división I se duplicó muy temprano en la evolución y es por esa razón que todos los hongos contienen las clases I y II. Una duplicación adicional dio lugar a la clase III que se encuentra exclusivamente en hongos filamentosos. Del mismo modo, un gen de clase IV en la división II, presente en todos los hongos, se duplicó y dio origen a los genes de clase V y VII. Sin embargo, la clase VI de las chs tienen un dominio con una estructura simple, lo que podría indicar que este gen representa el estado ancestral de todas las CHS (Mandel *et al.*, 2006).

Al llevarse a cabo las pruebas de desviación de la neutralidad sobre los genes individuales, se observó que para los fragmentos de los genes de clase II y clase V, se obtuvieron valores de 0 en todas las pruebas debido a la nula variabilidad que se encontró en las secuencias incluyendo las del grupo externo, indicando que estos fragmentos no están siendo afectados por procesos selectivos y que ambos se encuentran bajo el modelo de neutralidad. En contraste con estos resultados, Matute y colaboradores (2007) determinaron las fuerzas evolutivas afectando el gen *CHS* de clase II en *Paracoccidioides brasiliensis*, de acuerdo a las pruebas de neutralidad y a las diferencias sinónimas y no sinónimas, los datos obtenidos rechazaron la hipótesis nula, teniendo como resultados valores negativos en las pruebas y un mayor número de sustituciones no sinónimas en comparación con las sinónimas, esto debido a un gran exceso de polimorfismos únicos encontrados a lo largo del gen, sin embargo, los sitios sinónimos y los intrones no rechazaron la hipótesis nula; llegaron a la conclusión de que el gen estaba siendo afectado por procesos de selección purificadora en la cual la distribución de sitios neutros puede estar sesgada hacia un exceso de alelos raros debido a su asociación con mutaciones seleccionadas negativamente. Cabe resaltar que Matute y col., (2007) analizaron el gen completo de *CHSII*, mientras que en el presente trabajo se analizó únicamente el dominio conservado de los genes *CHS*, por lo tanto no tenemos datos sobre las regiones que flanquean los dominios y no sabemos el comportamiento que estas pudieran tener en cuanto a las variaciones entre las secuencias y a la relación de diferencias sinónimas y no sinónimas.

El análisis de las pruebas de neutralidad realizado sobre los genes *CHS* individuales como en la secuencia multilocus (concatenado) dieron como resultados valores positivos por encima de 0 y estadísticamente significativos, a excepción de los pertenecientes a las clases II y V que se encuentran bajo el modelo de neutralidad; estos valores indican que los genes pertenecientes a las clases I, III, IV, VI y VII se están viendo afectados por fuerzas de selección balanceada, se ha sugerido que este tipo de selección aumenta la variabilidad dentro de una población manteniendo alelos de frecuencias intermedias. Garzón-Ospina y colaboradores (2012) llevaron a cabo un estudio de diversidad genética y de selección, en tres genes que codifican para una proteína de superficie del merozoito (MSP) en el parásito *Plasmodium vivax* en una población colombiana, haciendo uso de las pruebas de desviación de la neutralidad (Tajima, Fu & Li) obtuvieron valores significativos por encima de 0 para dos de los genes *Pvmsp-7*, lo que indica un exceso de alelos de frecuencia intermedia. Las pruebas de la evolución neutral para el tercer gen no revelaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que este gen parece estar evolucionando bajo

expectativas neutras. Sin embargo, un análisis de ventana deslizante para las pruebas estadísticas D , D^* y F^* mostró que las diferentes fuerzas selectivas podrían estar actuando a través de los genes Pvmsp-7. Se encontró que la selección balanceada actuó en la región del gen central, mientras que la selección negativa podría estar actuando en los extremos de dichos genes.

Las pruebas de Tajima y Fu & Li se ven influidas no sólo por la selección, sino también por la historia de la población que puede alterar las expectativas neutras en la frecuencia de alelos. Por lo tanto, los valores positivos en las pruebas podrían haber sido el resultado de una disminución en la población. Sin embargo, una población afectada por la deriva génica, un mecanismo que disminuye la población, se puede descartar con un valor alto de diversidad de haplotipos.

El hecho de que, a pesar de existir una fuerte presión selectiva ($Ka/Ks < 1$) en las regiones analizadas, se observe un valor alto de diversidad de haplotipos ($Hd = 0.9636$) y desviaciones significativas de la neutralidad (selección de sobredominancia), demuestra el equilibrio que requiere el patógeno para mantener los motivos conservados de una familia de genes importantes y contar con una reserva de variantes funcionales de los mismos dentro de la población. La medida de diversidad de haplotipos, Hd , puede variar desde 0, significando que no hay diversidad, hasta 1.0, lo cual indica altos niveles de diversidad de haplotipos (Nei & Tajima, 1981). El valor de Hd sugiere una población estable que tiene un tamaño efectivo de la población a largo plazo, la distribución de frecuencias de alelos no está, por tanto, influenciada por un proceso demográfico.

Steriopoulos y colaboradores (2013) realizaron un estudio combinando pruebas de neutralidad y métodos de máxima verosimilitud basados en un modelo de sustitución de codones, para evaluar la variación alélica presente en genes efectores y de avirulencia en *M. fijiensis*, en poblaciones globales del patógeno. Sus resultados los llevaron a la conclusión que dos de los genes efectores se encuentran evolucionado bajo selección direccional positiva, mientras que otro gen efector se encuentra bajo selección balanceada, por otro lado el gen de avirulencia se encuentra evolucionando neutralmente. Estos autores consideran a la selección balanceada como otra forma de selección positiva diversificadora, la cual, junto con la selección de sobredominancia y la selección dependiente de la frecuencia, actúa como un mecanismo general para

mantener polimorfismos de proteínas en poblaciones naturales (Charlesworth, 2006; Nielsen, 2005).

II.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arzanlou, M., Abeln, E. C. A., Kema G. H. J., Waalwijk, C., Carlier, J., de Vries, I., Guzmán, M., and Crous, P. W. 2007. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology* 97:1112-1118.
- Charlesworth D. 2006. Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions. *Plos Genet.* 2, 379–384.
- Choquer M., Boccara M., Goncalves I.R., Soulie M.C., and Vidal-Cros A. 2004. Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *Eur. J. Biochem.* 271, 2153–2164.
- Edgar R. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32. 5: 1792-1797.
- Fu Y.X. and Li W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics.* 133: 693-709.
- Garzón-Ospina D., López C., Forero-Rodríguez J., Patarroyo M.A. 2012. Genetic Diversity and Selection in Three *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 7 (Pvmsp-7) Genes in a Colombian Population. *PLoS ONE* 7(9): e45962.
- Hao L., Chen C., Zhang R., Zhu M., Sun G., Gleason M.L. 2012. A new species of *Scolecobasidium* associated with the sooty blotch and flyspeck complex on banana from China. *Mycol Progress.*
- Islas-Flores I, Peraza-Echeverría L, Canto-Canché B, Rodríguez-García C. 2006. Extraction of High-Quality, Melanin-Free RNA from *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA Preparation. *Molecular Biotechnology.* Vol 34:45-50
- Johanson A., Jeger M.J. 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycological Research*, Volume 97, 6: 670-674.
- Lee J.I., Choi J.H., Park B.C., Park Y.H., Lee M.Y., Park H.M., Maeng P.J. 2004. Differential expression of the chitin synthase genes of *Aspergillus nidulans*, *chsA*, *chsB* and *chsC*, in response to developmental status and environmental factors. *Fungal Genet Biol.* 41, 635–646.
-

- Librado P., Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.
- Mandel A., Galgiani J.N., Kroken S., Orbach M.J. 2006. *Coccidioides posadasii* contains single chitin synthase genes corresponding to classes I to VII. *Fungal Genetics and Biology* 43: 775–788.
- Matute D.R., Torres I.P., Salgado-Salazar C., Restrepo A., McEwen J.G. 2007. Background selection at the chitin synthase II (*chs2*) locus in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fungal Genetics and Biology*. 44: 357–367
- Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S.J., Saiki R.K., Horn G.T., Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In Cold Spring Harb Symp Quant Biol. Vol. 51. No. 1: 263-273.
- Nagahashi S., Sudoh M., Ono N., Sawada R., Yamaguchi E., Uchida Y., Mio T., Takag. M., Arisawa M., Yamada-Okabe H. 1995. Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*: implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites. *J. Biol. Chem.* 270, 13961-13967.
- Nei M., Gojobori T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3: 418-426.
- Nei M., Tajima F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*. 97:145–163.
- Nielsen R. 2005. Molecular signatures of natural selection. *Annu. Rev. Genet.* 39, 197–218.
- Niño-Vega G.A., Carrero, L., San-Blas, G. 2004. Isolation of the CHS4 gene of *Paracoccidioides brasiliensis* and its accommodation in a new class of chitin synthases. *Med. Mycol.* 42, 51–57.
- Riquelme M., Bartnicki-García S. 2008. Advances in understanding hyphal morphogenesis: Ontogeny, phylogeny and cellular localization of chitin synthases. *Fungal Biology reviews*. 22: 56-70.
- Riquelme M., Bartnicki-García S., González-Prieto J.M, Verdín-Ramos J.A., Beltrán-Aguilar A., Freitag M. 2007. Spitzenkörper Localization and Intracellular Traffic of Green Fluorescent Protein-Labeled CHS-3 and CHS-6 Chitin Synthases in Living Hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, Vol. 6, No. 10p. 1853–1864.

- Roncero C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* 41:367–378.
- Rozas J. 2009. DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. *Methods in Molecular Biology*, Volume 537, pp 337-350.
- Ruiz-Herrera J., Ortiz-Castellanos L. 2009. Analysis of the phylogenetic relationships and evolution of the cell walls from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Research.* 1-19.
- Ruiz-Herrera J., González-Prieto J.M., Ruiz-Medrano R. 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Research* 1: 247-256.
- Santiago-Sotelo P, Ramirez-Prado J.H. 2012. pfectBLAST: a platform-independent portable front end for the command terminal BLAST+ stand-alone suite. *Biotechniques.* 53(5):299-300.
- Stergiopoulos I., Cordovez V., Ökmen B., Beenen H.G., Kema G.H.J., De Wit P. 2013. Positive selection and intragenic recombination contribute to high allelic diversity in effector genes of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of the black leaf streak disease of banana. *Molecular Plant Pathology.* 1-14.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 123: 585-595.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 5.05. *Molecular Biology and Evolution.* 24, 1596-1599.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.

CAPÍTULO III

EXPRESIÓN MOLECULAR DE LOS GENES QUITINA SINTASA EN *M. fijiensis*

III.1 INTRODUCCIÓN

La aparente simplicidad de la estructura primaria de quitina contrasta con un complejo proceso de biosíntesis subyacente. La quitina es sintetizada por las grandes familias de enzimas quitina sintasas (Chs) que se dividen en siete clases discernibles (Choquer *et al.*, 2004)

Las enzimas quitina sintasas (Chs) son codificadas por los miembros de una gran familia de genes, lo que sugiere la posibilidad tanto de especialización funcional, como de redundancia. Diferentes quitina sintasas producen quitina que se localiza en estructuras específicas de la pared celular o durante diferentes etapas de desarrollo (Rogg *et al.*, 2012; Lenardon *et al.*, 2007).

La predicción de función específica de las quitina sintasas, basada en homología es altamente deficiente, ya que clases individuales de Chs no necesariamente tienen la misma función en diferentes especies. La importancia funcional de todas las clases de CHS no es clara y parece diferir en diferentes hongos (Lenardon *et al.*, 2010).

La multiplicidad de enzimas Chs sugiere que pueden tener funciones redundantes en la síntesis de la pared celular. Este es el caso para algunas, pero no todas las enzimas de Chs. Es claro que la expresión y la actividad de Chs está altamente regulada tanto en todo el ciclo celular como en condiciones de estrés, tales como en respuesta a los retos potencialmente letales a la integridad celular impuestas por enzimas líticas o antibióticos. Cada una de las siete clases de Chs es probable que sea funcionalmente divergente en algún nivel fenotípico, dependiendo tanto de los cambios en la estructura de dominios y la divergencia global de sus secuencias (Lenardon *et al.*, 2010; Mandel *et al.*, 2006).

En este capítulo se presenta la expresión de los genes quitina sintasa en una cepa de *M. fijiensis* cultivada bajo condiciones de laboratorio.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1 Extracción de ARN total

La obtención de biomasa para extracción de ARN total se llevó a cabo de la misma manera que se describió en el capítulo II, sección II.2.2.

La extracción de ARN total se realizó mediante la metodología reportada por Islas-Flores y col. (2006), la cual consistió en la maceración de 0.25 g de micelio en un mortero con nitrógeno líquido. El tejido macerado se transfirió a un tubo Eppendorf con 1 ml de Trizol, se mezcló por completo y se incubó 5 minutos a 25 °C. Posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo y se invirtió el tubo manualmente por 15 segundos. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. A ésta se le añadió etanol absoluto, mezclando por completo y se transfirió a una columna Minispin (RNeasy® Plant Mini Kit de QIAGEN), centrifugando por 15 segundos a 10000 rpm y descartando el filtrado.

Posteriormente se añadió el Buffer RW1 (del kit de extracción) a la columna RNeasy spin, se centrifugó por 15 segundos a 10000 rpm y se descartó el filtrado. A continuación se añadió el buffer RPE a la columna, se centrifugó por 15 segundos a 10000 rpm descartando el filtrado, se volvió a añadir buffer RPE y se centrifugó por 2 minutos a la misma velocidad. Se colocó la columna en un tubo de colecta nuevo, se centrifugó a velocidad máxima por 1 minuto para secar la membrana. Por último se colocó la columna en un tubo de 1.5 ml y se añadió 40 µl de agua libre de ARNasas directamente al centro de la membrana de la columna y se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto para eluir el ARN.

La integridad y calidad del ARN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en Buffer TAE (1x), durante 180 min a 5 V/cm, el cual posteriormente fue teñido con bromuro de etidio. La concentración y pureza del ARN se midió mediante espectrofotometría esperando una relación de $A_{260}/A_{280} > \text{ó} = 2$, utilizando el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA).

III.2.2 Tratamiento con desoxirribonucleasa (ADNasa I)

Para la eliminación del ADN genómico (ADNg) de las muestras de ARN total, se procedió a tratarlas con ADNasa I de la marca Invitrogen, siguiendo el protocolo de manufactura (DNase I, Amplification Grade). Se partió de aproximadamente 1 µg de ARN total en un volumen de 10 µl.

Posteriormente, las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 1% (mismas condiciones que en III.2.1) para verificar la eliminación del ADNg y la integridad del ARN después del tratamiento.

III.2.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de ADN complementario se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del kit comercial ProtoScript® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (NEW ENGLAND BioLabs).

De forma general, la primera cadena de ADNc se obtuvo de la siguiente manera: en un tubo de PCR de 200 µl se adicionaron 600 ng de ARN total tratado con ADNasa, más 2 µl Oligo dT 5 µM, en un volumen final de 8 µl, y se incubó durante 5 minutos a 70 °C. Posteriormente se le agregaron los siguientes reactivos: 10 µl de la mezcla de reacción M-MuLV (10x), más 2 µl de la enzima M-MuLV (2x), en un volumen final de 20 µl. La mezcla de reacción se incubó a 42 °C por 1 hora. Posteriormente se inactivó la enzima incubando a 80 °C por 5 minutos y se llevó la reacción a un volumen final de 50 µl añadiendo 30 µl de H₂O grado PCR.

Simultáneamente se llevó a cabo una reacción en la cual se agregó agua libre de ARNAsas en vez de la enzima reversa transcriptasa (RT) M-MuLV; esta reacción sirvió como control negativo para descartar contaminación por ADN. Se siguieron las condiciones de reacción descritas para la síntesis de ADNc.

III.2.4 Amplificación de transcritos parciales CHS a partir de ADNc

Se llevó a cabo la amplificación de fragmentos de los transcritos correspondientes a los siete genes CHS, tomando como molde ADNc de una de las cepas del cultivar

Fougamou. Los fragmentos amplificados corresponden a las mismas regiones génicas seleccionadas en el capítulo II (II.2.5) utilizando los cebadores ya descritos. Las mezclas de reacción y las condiciones de amplificación se describen en el apartado II.2.6.

Adicionalmente se utilizó, como control de carga, oligos de un gen constitutivo (*actina*), junto con los controles negativos para cada uno de los fragmentos de *CHS*.

El producto de las reacciones se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TAE (1x), 5 V/cm, durante 180 min. Al finalizar la corrida se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un fotoiluminador UV.

III.3 RESULTADOS

III.2.1 Extracción de ARN total

El análisis de expresión de los genes de quitina sintasa en *M. fijiensis*, se llevó a cabo utilizando la cepa aislada del cultivar Fougamou 3, debido a que fue el aislado que creció con mayor rapidez y tuvo una buena producción de biomasa.

En la figura 23 se muestra el ARN total del aislado Fougamou 3; se observan la subunidad mayor 28 S y la subunidad 18 S.



Figura 22. ARN total, y ARN tratado con ADNasa, de la cepa de *M. fijiensis* aislada del cultivar Fougamou 3. M= marcador de peso molecular de 100 pb. Marca: Invitrogen.

La concentración del ARN del aislado Fougamou 3 fue de 239.1 ng/ μ l, con una pureza de 2.09 en la relación A_{260}/A_{280} y de 1.76 en la relación A_{260}/A_{230} , esto significó que el ARN estaba libre de contaminación por compuestos fenólicos y de proteínas y/o carbohidratos respectivamente.

III.3.2 Expresión de los genes quitina sintasa en el aislado Fougamou 3

En la figura 24 se muestran los resultados de la expresión de los siete genes de quitina sintasa para el aislado Fougamou 3.

Se llevó a cabo una PCR convencional, con las condiciones previamente descritas para cada juego de oligos, usando como molde el ADN complementario de la muestra Fougamou 3. Se usaron controles negativos para cada una de las reacciones descartando cualquier posible amplificación a partir de ADN genómico, y se usó como control positivo el gen de actina. Los controles positivos de los cebadores se muestran en las amplificaciones de los fragmentos a partir de ADN genómico (Capítulo II).

Se puede observar la expresión de los genes de clase I, II, III, IV, V y VII, sin embargo no hubo amplificación para la clase VI, lo cual podría indicar que este gen no se está expresando bajo las condiciones de cultivo de laboratorio.



Figura 23. Análisis de expresión de los genes quitina sintasa del aislado Fougamou 3 por medio de RT-PCR bajo condiciones de laboratorio. CHSI – CHSVII representan los transcritos parciales de cada uno de los genes de quitina sintasa a la temperatura correspondiente de cada cebador (Cuadro 2). El transcrito del gen de actina fue usado como control positivo. C- representa el control negativo para cada uno de los genes. M= Marcador molecular de 100 pb.

III.4 DISCUSIÓN

En este capítulo se llevó a cabo el análisis de expresión de los genes que codifican para las siete clases de quitina sintasa en una cepa de *M. fijiensis* aislada del cultivar Fougamou 3 con el fin de conocer cuáles de los 7 genes de *CHS* se expresan bajo condiciones de cultivo de laboratorio.

Como se pudo observar, en esas condiciones se encontró que los genes pertenecientes a las clases I, II, III, IV, V y VII, se expresan, mientras que no se observó expresión del gen de la clase VI. Este resultado sugiere que el hongo *M. fijiensis* no necesita ese gen para crecer en medio líquido, en condiciones de laboratorio; sin embargo, cabe la posibilidad de que ese gen se exprese en otras condiciones, tales como en condiciones de patogénesis, cuando el hongo se encuentre infectando a su hospedero. Se tienen pocos estudios en los que se relacione al gen de la clase VI con alguna función en específico; Mellado y colaboradores (1996) llevaron a cabo un estudio en el cual vieron los efectos que tenía la disrupción del gen AfCHSD, correspondiente al gen de clase VI en *Aspergillus fumigatus*, resultando en una reducción del 20% en el contenido total de quitina en el micelio, pero no observaron ningún otro fenotipo obvio.

En 2012, Kong y colaboradores reportan los resultados del análisis de expresión de los genes *CHS* en el patógeno de arroz *M. oryzae* en el proceso de infección. Observaron que el gen CHS7 perteneciente a la clase VI de las *CHS* tuvo un mayor nivel de expresión en conidios y apresorios pero tuvo menores niveles de expresión en hifas vegetativas y en hojas infectadas de arroz, entre los siete genes *CHS*. Llegaron a la conclusión que el gen CHS7 es importante para la formación del apresorio así como para la penetración del mismo y para el crecimiento invasivo en las hojas de arroz; por lo tanto, el gen CHS7 juega un papel importante en la infección de la planta.

Nuestros resultados se pueden comparar con el estudio de Choquer y colaboradores (2003) en el cual tomaron como modelo de estudio el hongo patógeno *Botrytis cinerea*, que cultivaron en diferentes medios. El tejido micelial fue cosechado tanto en la fase lag como en la fase exponencial. Choquer y colaboradores usaron el método semi

cuantitativo RT-PCR para medir los niveles de expresión en la familia multigénica de *CHS*. En su estudio demuestran que los transcritos de los genes *BcchsI*, *BcchsIIIa* y *BcchsIV* se detectaron en todos los tiempos muestreados; en contraste no se observó expresión del gen *BcchsIIIb*. La expresión de los genes *BcchsI* y *BcchsIV* fue constitutiva y estable durante la fase exponencial, mientras que la expresión de *BcchsIIIa* aumentó constantemente duplicándose a las 48 horas después de la incubación. En el estudio realizado por Choquer y col., demostraron que uno de sus genes no se expresa bajo condiciones de cultivo, como en el presente trabajo en el que se observó que uno de los genes *CHS* no se expresa bajo estas condiciones. Por el contrario, en un estudio realizado por Mellado y colaboradores (1996), se describe que cada miembro de la familia multigénica de *CHS* del patógeno oportunista *Aspergillus fumigatus* se expresa durante el crecimiento de hifas en cultivos sumergidos.

Estas evidencias indican que las múltiples quitina sintasas se sintetizan y se activan para producir quitina, ya sea en diferentes momentos durante el crecimiento vegetativo normal, o espacialmente cuando son inducidas por las condiciones ambientales. Por ejemplo, durante la progresión de una fase del ciclo celular a otro, cuando hay inserciones de quitina en nuevas áreas de la pared celular durante estrés, o durante la transición de una forma de crecimiento a otra (Pasricha *et al.*, 2013; Rogg *et al.*, 2012; Whiston *et al.*, 2012; Munro & Gow, 2001; Wang & Szaniszlo, 2000).

En el 2002, Wang y colaboradores analizaron la expresión de los genes *CHS* en el patógeno de humanos *Wangiella dermatitidis*, y observaron que sus genes muestran un patrón de expresión diferente en respuesta a las diferentes situaciones de crecimiento analizadas, lo que apoya la hipótesis de que la expresión de cada uno de los genes puede tener funciones especiales y diferentes en el crecimiento celular, la viabilidad y la virulencia.

Se ha demostrado que algunos genes *CHS* son regulados transcripcionalmente en una etapa específica del desarrollo del ciclo de vida del hongo (Arellano *et al.*, 2000; Sreenivasaprasad *et al.*, 2000; Lanfranco *et al.*, 1999) o bajo condiciones de estrés (Wang & Szaniszlo 2000). La síntesis de quitina se encuentra espacial y temporalmente regulada con el fin de permitir el correcto crecimiento de las hifas así como el desarrollo de estructuras diferenciadas incluyendo apresorios, esporas y conidios (Lanfranco *et al.*, 1999).

III.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arellano M., Cartagena-Lirola H., Hajibagheri M.A.N., Duran A., Valdivieso M.H. 2000. Proper ascospore maturation requires the *chs1+* chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 35:79–89.
- Choquer M., Boccara M., Goncalves I.R., Soulie M.C., and Vidal-Cros A. 2004. Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *Eur. J. Biochem.* 271, 2153–2164.
- Choquer M., Boccara M., and Vidal-Cros A. 2003. A semi-quantitative RT-PCR method to readily compare expression levels within *Botrytis cinerea* multigenic families in vitro and in planta. *Genet.* 43: 303–309.
- Kong L.A., Yang J., Li G.T., Qi L.L., Zhang Y.J., Wang C.F., Zhao W.S., Xu J.R., Peng Y.L. 2012. Different Chitin Synthase Genes Are Required for Various Developmental and Plant Infection Processes in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog* 8(2): 1-16.
- Lanfranco L., Vallino M., Bonfante P. 1999. Expression of chitin synthase genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *New Phytol* 142:347-354
- Lenardon M.D., Munro C.A., Gow N.A.R. 2010. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2010; 13:1–8.
- Lenardon M.D., Whitton R.K., Munro C.A., Marshall D., Gow N.A.R. 2007. Individual chitin synthase enzymes synthesize microfibrils of differing structure at specific locations in the *Candida albicans* cell wall. *Mol Microbiol.* 66:1164–1173.
- Mandel A., Galgiani JN., Kroken S., Orbach MJ. 2006. *Coccidioides posadasii* contains single chitin synthase genes corresponding to classes I to VII. *Fungal Genetics and Biology* 43: 775–788.
- Mellado E., Aufauvre-Brown A., Gow N.A.R., Holden D.W. 1996. The *Aspergillus fumigatus* *chsC* and *chsG* genes encode class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol* 20:667–679.

- Munro C.A., Gow N.A.R. 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol Suppl* 1 39:41–53.
- Islas-Flores I, Peraza-Echeverría L, Canto-Canché B, Rodríguez-García C. 2006. Extraction of High-Quality, Melanin-Free RNA from *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA Preparation. *Molecular Biotechnology*. Vol 34:45-50.
- Pasricha S., Payne M., Canovas D., Pase L., Ngaosuwankul N., Beard S., Oshlack A., Smyth G.K., Chaiyaroj S.C., Boyce K.J., Andrianopoulos A. 2013. Cell-Type-Specific Transcriptional Profiles of the Dimorphic Pathogen *Penicillium marneffei* Reflect Distinct Reproductive, Morphological, and Environmental Demands. *Genetics*. Vol, 3: 1997-2014.
- Rogg L.E., Fortwendel J.R., Juvvadi P.R., Steinbach W.J., 2012. Regulation of expression, activity and localization of fungal chitin synthases. *Med Mycol*. 50(1): 2-17.
- Sreenivasaprasad S., Burton K.S., Wood D.A. 2000. Cloning and characterisation of a chitin synthase gene Cdna from the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* and its expression during morphogenesis. *FEMS Microbiology Letters*. 189: 73-77.
- Wang Q., Liu H., Szaniszló P. 2002. Compensatory expression of five chitin synthase genes, a response to stress stimuli, in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*, a melanized fungal pathogen of humans. *Microbiology*. 148, 2811–2817.
- Wang Z., Szaniszló P. 2000. WdCHS3 a gene that encodes a class III chitin synthase in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*, is expressed differentially under stress conditions. *J Bacteriol*. 182:874-881.
- Whiston E., Wise H.Z., Sharpton T.J., Jui G., Cole G.T., Taylor J.W. 2012. Comparative Transcriptomics of the Saprobic and Parasitic Growth Phases in *Coccidioides spp.* *PLoS ONE*. Vol 7(7): 1-12.

CAPITULO IV

IV.1 DISCUSIÓN GENERAL

Los objetivos principales del presente trabajo fueron analizar las secuencias de los fragmentos pertenecientes a los genes de cada una de las clases de CHS, para inferir las fuerzas evolutivas afectando a estos genes, a partir de cepas de *M. fijiensis* aisladas de diferentes cultivares de plátano y banano, así como evaluar la expresión de dichos genes en una de las cepas.

Para llevar a cabo la inferencia de las fuerzas evolutivas actuando sobre los genes *CHS* en *M. fijiensis*, se usaron tres pruebas estadísticas de neutralidad (pruebas de Tajima, Fu & Li y diferencias sinónimas y no sinónimas) para examinar el desvío de neutralidad sobre los datos obtenidos de las secuencias. Todas las pruebas dieron resultados positivos y estadísticamente significativos para los genes de clase I, III, IV, VI y VII, dichos valores indican que estos genes se están viendo afectados por fuerzas de presión selectiva tipo selección balanceada lo cual indica un exceso de alelos de frecuencia intermedia (polimórficos). También se pueden tener valores positivos con estas pruebas cuando se tienen efectos tipo cuello de botella o una reciente disminución en la población, lo cual reduce el nivel de diversidad genética (Freeland, 2005); en el presente trabajo se pudo descartar cualquiera de estos procesos debido al valor de diversidad de haplotipos obtenido ($H_d=0.9636$) lo que indica altos niveles de diversidad (Nei, 1973), por lo tanto se puede inferir que los genes se encuentran bajo selección balanceada, este tipo de selección incrementa la variabilidad dentro de la población (Nielsen, 2005). Se encontraron pocos reportes en los que se encontraran resultados similares a los reportados en este trabajo sobre el desvío de neutralidad en genes particulares en organismos patógenos, un caso en el que se reporta el uso de las pruebas usadas en el presente trabajo, con valores positivos sobre las pruebas de neutralidad, es un estudio realizado por Garzón-Ospina y col. (2012) en el cual estudiaron la diversidad genética y el tipo de selección actuando sobre los genes *msp* en el patógeno *Plasmodium vivax*, encontrando que estos genes se ven afectados por fuerzas de selección balanceada con el fin de generar diferentes variantes de alelos como un mecanismo de evasión. También se encontró un reporte en el cual hay evidencia de selección balanceada actuando sobre genes efectores en *M. fijiensis*, debido a la ocurrencia de múltiples alelos de dichos genes en poblaciones globales y

locales del patógeno, también mencionan que la selección balanceada es un patrón frecuentemente visto para genes de avirulencia en hongos (Stergiopoulos *et al.*, 2013).

Contrastando con lo obtenido para los genes discutidos anteriormente, los genes pertenecientes a las clases II y V parecen estar bajo un modelo neutral estándar de evolución molecular ya que los valores obtenidos en las pruebas de neutralidad fueron de 0 para ambos genes, lo que indica que no hay desviación de la teoría neutra y que las regiones analizadas de estos genes no se encuentran bajo ninguna fuerza de presión selectiva. Por el contrario, Matute y colaboradores (2007) determinaron las fuerzas evolutivas afectando el gen *CHS* de clase II en *Paracoccidioides brasiliensis*, teniendo valores negativos en las pruebas de neutralidad llegaron a la conclusión de que el gen estaba siendo afectado por procesos de selección purificadora debido a un gran exceso de polimorfismos únicos encontrados a lo largo del gen.

Por otra parte, el análisis de expresión de los siete genes *CHS* en una cepa de *M. fijiensis*, mostró que seis de los siete genes se expresaban en condiciones de cultivo de laboratorio, en una cepa en particular, se sugiere que dicha cepa no necesita del gen de clase VI para crecer bajo estas condiciones, pero que podría expresarlo en diferentes condiciones de cultivo o en el proceso de infección sobre el hospedero. Se ha reportado que el gen de clase VI en *M. oryzae* es importante en el proceso de infección sobre su hospedero, tiene un papel importante en la formación y penetración del apresorio así como en el crecimiento invasivo sobre las hojas de arroz (Kong *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que algunos genes *CHS* son regulados transcripcionalmente en una etapa específica del desarrollo del ciclo de vida del hongo (Arellano *et al.*, 2000; Sreenivasaprasad *et al.*, 2000; Lanfranco *et al.*, 1999) o bajo condiciones de estrés (Wang & Szaniszló, 2000). Así también la expresión de cada uno de los genes puede tener funciones especiales y diferentes en el crecimiento celular, la viabilidad y la virulencia (Wang *et al.*, 2002)

IV.2 CONCLUSIONES

Se aislaron fragmentos de genes de las siete clases de quitina sintasa en once cepas de *M. fijiensis* y una cepa relacionada reportada como *Scolecobasidium sp.* la cual, al igual que *Mycosphaerella*, se ha reportado que afecta cultivos de plátano y banano causando importantes pérdidas económicas.

Se diseñaron cebadores específicos para cada clase de quitina sintasa con los cuales se pudieron aislar fragmentos de dichos genes a partir de cepas de *M. fijiensis*, para esta especie se pudieron aislar cada uno de los 7 genes *CHS*, y para una cepa de *Scolecobasidium sp.* sólo se pudieron aislar 6 de los 7 genes.

Los análisis filogenéticos muestran las agrupaciones de los fragmentos de cada una de las clases, separándose en siete clados principales correspondientes a cada una de las siete clases de *CHS*.

Con base en las pruebas de desviación de la neutralidad, se tuvieron resultados positivos para las pruebas de Tajima y Fu & Li, con valores estadísticamente significativos, lo que implica que los loci estudiados pueden estarse viendo afectados por una fuerza de selección sobredominante. En cuanto a la prueba de sustituciones sinónimas y no sinónimas se tuvo una relación Ka/Ks menor a 1, indicando que se está ejerciendo una fuerza de presión selectiva negativa o purificante.

En cuanto al análisis de expresión se encontró que seis de los siete genes de quitina sintasa, I, II, III, IV, V y VII, se están expresando en una cepa de *M. fijiensis*, cultivada bajo condiciones de cultivo de laboratorio. No se observó expresión para el gen de la clase VI.

IV.3 PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo las pruebas de desviación de neutralidad usando las secuencias de los genes completos de cada clase de CHS para saber si las fuerzas de selección se ejercen de igual manera en todo el gen.
- Corroborar la ausencia o presencia del gen de Clase VI en la cepa de *Scolecobasidium sp.*
- Hacer el análisis de expresión de los genes *CHS* en dos cepas de *M. fijiensis* en condiciones de infección sobre el hospedero.
- Analizar de manera cuantitativa la expresión de los genes *CHS* en dos cepas de *M. fijiensis* tanto en condiciones de laboratorio como de infección.

IV.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arellano M., Cartagena-Lirola H., Hajibagheri M.A.N., Duran A., Valdivieso M.H. 2000. Proper ascospore maturation requires the *chs1+* chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 35:79–89.
- Freeland J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd. 388 p.
- Garzón-Ospina D., López C., Forero-Rodríguez J., Patarroyo M.A. 2012. Genetic Diversity and Selection in Three *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 7 (PvmSP-7) Genes in a Colombian Population. *PLoS ONE* 7(9): e45962.
- Kong L.A., Yang J., Li G.T., Qi L.L., Zhang Y.J., Wang C.F., Zhao W.S., Xu J.R., Peng Y.L. 2012. Different Chitin Synthase Genes Are Required for Various Developmental and Plant Infection Processes in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog* 8(2): 1-16.
- Lanfranco L., Vallino M., Bonfante P. 1999. Expression of chitin synthase genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *New Phytol* 142:347–354.
- Matute D.R., Torres I.P., Salgado-Salazar C., Restrepo A., McEwen J.G. 2007. Background selection at the chitin synthase II (*chs2*) locus in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fungal Genetics and Biology*. 44: 357–367
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3321–3323.
- Nielsen R. 2005. Molecular signatures of natural selection. *Annu. Rev. Genet.* 39, 197–218.
- Sreenivasaprasad S., Burton K.S., Wood D.A. 2000. Cloning and characterisation of a chitin synthase gene Cdna from the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* and its expression during morphogenesis. *FEMS Microbiology Letters*. 189: 73-77.
- Stergiopoulos I., Cordovez V., Ökmen B., Beenen H.G., Kema G.H.J., De Wit P. 2013. Positive selection and intragenic recombination contribute to high allelic diversity in effector genes of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of the black leaf streak disease of banana. *Molecular Plant Pathology*. 1-14.

Wang Q., Liu H., Szaniszlo P. 2002. Compensatory expression of five chitin synthase genes, a response to stress stimuli, in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*, a melanized fungal pathogen of humans. *Microbiology*. 148, 2811–2817.

Wang Z., Szaniszlo P. 2000. WdCHS3 a gene that encodes a class III chitin synthase in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*, is expressed differentially under stress conditions. *J Bacteriol*. 182:874-881.

