

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA
DE PLANTAS**

**Clonación y caracterización del gen *MfAtr4*,
transportador tipo ABC, en *Mycosphaerella*
fijiensis y evaluación de su papel en la
virulencia**

**Tesis que para obtener el grado de Doctora
en Ciencias presenta:**

BIÓL. YENY LIZZET COUOH UICAB

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

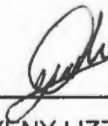
2012



Mérida, Yucatán, México a 9 de Enero del 2012

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen 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 desarrollo 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.



BIÓL YENY LIZZET COUOH UICAB

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis titulado Clonación y caracterización del gen *MfAtr4*, transportador tipo ABC, en *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su papel en la virulencia, fue realizado en los laboratorios de las Unidades de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., bajo la Dirección de los Doctores: Ignacio Islas Flores y Blondy Canto Canché, dentro de la opción de Doctorado Directo, perteneciente al posgrado de Ciencias y Biotecnología de Plantas de este Centro.

Atentamente

Dr. Oscar Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C.

RECONOCIMIENTO

Al CONACyT por el financiamiento otorgado al Proyecto 45788-Z y por la beca No. 204766 otorgada a Yeny L. Couch Uicab.

RECONOCIMIENTO



En el marco de la presente hago constar que el trabajo de tesis titulado "Caracterización y caracterización del gen MIP4, transportador del ABC en *Schistosoma japonicum* y evaluación de su papel en la virulencia del parásito en los laboratorios de las Unidades de Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad de Yucatán, A.C. por la Dirección de los Doctores Ignacio José Flores y María Elena Cortés dentro de la opción de Doctorado en Ciencias de la Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Investigación Científica y Tecnológica de Yucatán, A.C.


Yeny L. Couch Uicab
Directora Académica
Unidad de Investigación Científica de Yucatán A.C.

AGRADECIMIENTOS

Al CICY por las instalaciones prestadas para realizar el trabajo experimental, en especial a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas y a la Unidad de Biotecnología.

No hubiera sido posible realizar esta tesis doctoral, sin el apoyo siempre generoso de mi tutor, el Dr. Ignacio Islas Flores, quien mediante su comprensión, motivación, orientación, paciencia y amistad siempre me instó a perseverar hasta alcanzar mis metas.

Especialmente debo reconocer y agradecer la contribución de la Dra. Blondy Canto Canché por su cotutoría e infatigable disponibilidad en mi trabajo de tesis y formación académica.

Agradezco las aportaciones del mí comité tutorial y al comité evaluador de tesis integrado por: Dr. Víctor Suarez Solís, Dr. Enrique Sauri Duch, Dr Felipe Sánchez Teyer, Dr. Oscar Moreno Valenzuela y Dra. Marcela Gamboa Angulo.

Asimismo se agradece el apoyo recibido de la Dra. Begofía Benito Casado en la estancia de investigación realizada en su laboratorio.

A la familia Carballo Bautista por todo el apoyo recibido durante el Doctorado.

A todos mis amigos y compañeros del CICY

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis doctoral especialmente a ti madre Manuela Uicab Narváez, por tu amor incondicional por todos los sacrificios que realizaste para educarme sin importarte las consecuencias, y por enseñarme, mediante el ejemplo, a no rendirme jamás. Es mucha la paciencia que has tenido para ver llegar este momento, pero finalmente aquí esta, con todo mi corazón...

A mi padre Mariano, de quien he heredado esa gran fortaleza.

A mis hermanos María, Fermín, Mariano y Karime, por mantenernos unidos en todos los buenos y malos momentos de nuestras vidas. A todas mis sobrinas a quienes quiero tanto: Yesi, Lilian, Luna y Mariana.

A mi abuelos Lorenzo y Juliana, por enseñarme que hay que luchar todos los días.

A la familia Castillo-Valladares, en especial a Don José y Doña Victoria, por haberme dado la oportunidad de continuar con mis estudios profesionales, por su confianza y todo su cariño, Gracias!!!

“Yo pienso que si tú haces algo y resulta bastante bueno, entonces deberías de hacer algo más grandioso, no pienses en ello por mucho tiempo. Sólo imagina qué es lo que viene”

Steve Jobs

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein

“La vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite triunfar a los que se asocian”

Lynn Margulis

INDICE GENERAL

	Pág.
DECLARACIÓN DE PROPIEDAD	iii
RECONOCIMIENTO	v
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIAS	ix
INDICE GENERAL	xi
INDICE DE FIGURAS	xvii
INDICE DE CUADROS	xxi
RESUMEN	xxiii
ABSTRACT	xxv
CAPÍTULO I	1
Antecedentes	1
I Generalidades de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	1
1.1 Ciclo de vida de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> y síntomas de la enfermedad	2
1.1.1 Clasificación taxonómica de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	5
1.1.2 Diseminación de <i>M. fijiensis</i>	6
1.1.3 Factores que influyen en el desarrollo y dispersión de la enfermedad	6
1.1.4 Métodos de control de la sigatoka negra	7
1.1.5 Interacción banano- <i>M. fijiensis</i>	7
1.1.6 Los transportadores ABC	9
1.1.6.1 Estructura general de los transportadores ABC	9
1.1.6.2 ¿Cómo funcionan los transportadores abc?	11
1.1.6.3 Clasificación de los transportadores ABC	11
1.1.7 Transportadores ABC en hongos	12
1.1.7.1 Transportadores ABC involucrados en patogénesis	13

1.2 Hipótesis	16
1.3 Objetivos	16
1.3.1 Objetivo general	16
1.3.2 Objetivos particulares	16
1.4 Estrategia experimental	17
1.5 Referencias	18
CAPÍTULO II	23
Cloning, <i>in silico</i> structural characterization and expression analysis of <i>mfatr4</i> , an abc transporter from the banana-pathogen <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	23
Abstract	24
2.1 Introduction	25
2.2 Materials and Methods	28
2.2.1 Biological material	28
2.2.2 DNA extraction	28
2.2.2.1 <i>MfAtr4</i> cloning	28
2.2.3 Determination of intron exon boundaries	30
2.2.4 Software and websites for bioinformatics analysis	31
2.2.5 RT-PCR and <i>MfAtr4</i> expression analysis at different stages of the interaction <i>M. fijiensis</i> - <i>Musa acuminata</i> cv Grande Naine	31
2.3 Results	32
2.3.1 Cloning and <i>in silico</i> characterization of <i>MfAtr4</i>	32
2.3.2 Features of <i>MfAtr4</i>	33
2.3.3 <i>MfAtr4</i> classification	35
2.3.4 Comparative analysis with <i>MgAtr4</i>	36
2.3.5 Phylogenetic relationship between <i>MfAtr4</i> and other fungal ABCs	37
2.3.5.1 PHylogenetic relationship between <i>MfAtr4</i> and other ABCs involved in virulence	37
2.3.6 Analysis of expression of <i>MfAtr4</i> in Black Sigatoka-infected	39

banana leaves	
2.4 Discussion	40
2.4.1 Cloning	40
2.4.2 <i>MfAtr4</i> classification	40
2.4.2.1 Features of <i>MfAtr4</i>	41
2.4.2.2 Phylogenetic relationship between <i>MfAtr4</i> and other fungal ABCs	41
2.4.2.3 Intron in <i>MfAtr4</i>	42
2.4.3 ¿ <i>MfAtr4</i> , ortholog of <i>MgAtr4</i> ?	42
2.4.4 Analysis of expression of <i>MfAtr4</i> in Black Sigatoka-infected banana leaves	44
2.5 References	46
CAPÍTULO III	53
Expresión de la proteína MFATR4	53
3.1. Sistemas de expresión de proteínas heterólogas	53
3.1.1 Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas	54
3.1.2 Ventajas de la expresión de proteínas heterólogas en <i>Pichia pastoris</i>	55
3.1.3 Promotor AOX en <i>P. pastoris</i> : aspectos de su regulación	56
3.1.4 Vectores de expresión y cepas comerciales de <i>P. pastoris</i>	57
3.1.5 Expresión heteróloga del transportador <i>MfAtr4</i> de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	61
3.2 Materiales y Métodos	61
3.2.1 Medios de cultivo	61
3.2.2 EXtracción de ARN y síntesis de ADNc de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	62
3.2.3 Síntesis de ADNc con el kit GENERACER	62
3.2.4 Síntesis de ADNc-RACE	63
3.2.5 Amplificación del Marco de Lectura Completo (ORF) del gen <i>MfAtr4</i>	63

3.2.6	Diseño de un híbrido correspondiente al ORF del gen <i>MfAtr4</i>	64
3.2.7	Clonación del ORF de <i>MfAtr4</i> en el vector pGEM-T Easy	65
3.2.8	Construcción del vector pPICZA e inserción en <i>E. coli</i>	65
3.2.9	Inserción del ORF de <i>MfAtr4</i> en el vector pPICZA	65
3.2.10	Transformación de <i>Pichia pastoris</i> con el cassette pPICZA-MFATR4	66
3.2.11	Inducción de la expresión de la proteína MFATR4 recombinante	67
3.2.12	Extracción de la proteína MFATR4 recombinante	67
3.2.13	Análisis de la proteína recombinante en geles de SDS-PAGE y Western Blot	67
3.2.14	Análisis bioinformáticos del gen <i>MfAtr4</i>	68
3.3	Resultados	68
3.3.1	Amplificación de <i>MfAtr4</i> a partir de ADNg y ADNc de <i>M. fijiensis</i> .	68
3.3.2	Diseño del híbrido <i>MfAtr4</i>	72
3.3.3	Construcción del vector pPICZA-MFATR4 para la expresión en <i>P. pastoris</i>	77
3.3.4	Transformación de <i>Pichia pastoris</i> con el cassette pPICZA-MFATR4	78
3.3.5	Expresión de la proteína MFATR4 recombinante	82
3.4	Discusión	83
3.4.1	Amplificación del ORF del transportador <i>MfAtr4</i>	83
3.4.2	Construcción del vector pPICZA-MFATR4 y transformación de <i>Pichia pastoris</i>	84
3.5	Conclusiones	85
3.6	Referencias	86
CAPÍTULO IV		89
Construcción del vector pSILENT- <i>MfAtr4</i> para el silenciamiento del gen <i>MfAtr4</i>		89
4.1	Introducción	89

4.1.1 Clasificación de los ARNs pequeños y mecanismos de los ARN de interferencia	90
4.1.2 Vectores de expresión de silenciamiento shARN	90
4.1.3 El vector pSILENT-1	91
4.1.4 El vector pSILENT-1 herramienta molecular usada en hongos	92
4.2 Materiales y Métodos	94
4.2.1 Material biológico	94
4.2.2 Extracción de ARN y síntesis de ADNc	94
4.2.3 Construcción del vector pSILENT- <i>MfAtr4SA</i>	94
4.2.4 Transformación de <i>M. fijiensis</i>	95
4.3 Resultados	96
4.3.1 Extracción de ARN total a partir de micelio de <i>M. fijiensis</i>	96
4.3.2 Clonación del fragmento <i>MfAtr4-S</i> (569 pb) en el vector pSILENT-1	97
4.3.3 Clonación del fragmento <i>MfAtr4-A</i> en antisentido (569 pb) en el vector pSilent- <i>MfAtr4S</i>	99
4.3.4 Transformación de <i>M. fijiensis</i>	100
4.4 Discusión	102
4.5 Conclusiones	104
4.6 Referencias	104
CAPÍTULO V	107
Sensibilidad de la cepa C1233 de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a los fungicidas Clorotalonil, Benomil y Mancozeb	107
5.1 Introducción	107
5.1.2 Métodos de control químico	108
5.1.4 Resistencia a fungicidas	110
5.1.5 Resistencia a fungicidas el caso de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	112
5.2 Materiales y Métodos	113
5.2.1 Cepa y medios de cultivo	113
5.2.2 Ensayo de fungicidas en medio V8/agar	113

5.2.3 Ensayo de fungicidas en medio V8/líquido	113
5.2.4 extracción de RNA y síntesis de ADNc	114
5.2.5 Amplificación de 5 transportadores ABC por PCR convencional	114
5.3 Resultados	114
5.3.1 Ensayo de fungicidas en medio V8/agar	114
5.3.2 Sensibilidad de la cepa C1233 a Benomil	116
5.3.3 Crecimiento del micelio en medio líquido en presencia de los fungicidas Clorotalonil, Mancozeb y Benomil	117
5.3.4 Expresión de los transportadores ABC, <i>MfAtr1</i> , <i>MfAtr2</i> , <i>MfAtr3</i> , <i>MfAtr4</i> Y <i>MfAtr5</i> en presencia de los fungicidas Clorotalonil, Mancozeb y Benomil	119
5.4 Discusiones	121
5.4.1. Resistencia a fungicidas en hongos patógenos	121
5.4.2 Expresión de los transportadores ABC, <i>MfAtr1</i> , <i>MfAtr2</i> , <i>MfAtr3</i> , <i>MfAtr4</i> Y <i>MfAtr5</i> en presencia de los fungicidas Clorotalonil, Mancozeb y Benomil	123
5.5 Conclusiones	125
5.6 Referencias	125
CAPÍTULO VI	
Discusión general y Perspectivas	129
6.1 Transportador <i>MfAtr4</i>	129
6.2 Homología y función de los transportadores ABC	133
6.3 Construcción del vector pPICZA-MFATR4 y transformación de <i>Pichia pastoris</i> cepa GS115	135
6.4 Construcción del vector pSILENT- <i>MfAtr4SA</i>	136
6.5 Expresión del transportador <i>MfAtr4</i> durante el proceso infeccioso del banano y en presencia de fungicidas	138
6.6. Perspectivas	140
6.7 Referencias	141

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Ciclo de vida de <i>M. fijiensis</i>	4
Figura 1.2. Estadios de la enfermedad ocasionada por <i>M. fijiensis</i>	5
Figura 1.3. Esquematización de la estructura de un transportador ABC.	10
Figura 1.4. Representación esquemática de la topología de los transportadores ABC.	12
Figure 2.1. <i>MfAtr4</i> genomic fragment amplified by degenerated PCR.	33
Figure 2.2. Two-dimensional topological model of <i>MfAtr4</i> .	34
Figure 2.3. Prosite program identification of the two NBD domains in <i>MfAtr4</i> .	35
Figure 2.4. Presence of intronic sequence in <i>MfAtr4</i> .	36
Figure 2.5. Phylogenetic tree of ABC transporters related to <i>MfAtr4</i> .	38
Figure 2.6. Analysis of expression of <i>MfAtr4</i> in field samples of <i>Musa acuminata</i> cv. Grande Naine with black-Sigatoka disease.	39
Figura 3.1. Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas.	55
Figura 3.2. Esquematización que indica la posición de los oligonucleótidos en el ORF (4.977 kb) del gen <i>MfAtr4</i> predicho.	64
Figura 3.3. Mapa del vector pPICZA.	66
Figura 3.4. Análisis en gel de 1% de agarosa de los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos F1-R1 y F2-R1 para amplificar el ORF de <i>MfAtr4</i> .	70
Figura 3.5. Análisis en geles de 1% de agarosa de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos F1-R5Sil y FMF-R1.	70
Figura 3.6. Análisis en gel de 1% de agarosa del producto de PCR anidada.	71
Figura 3.7. Análisis en gel de 1% de agarosa de los productos de PCR de larga distancia.	72
Figura 3.8. Análisis en geles de 2% de agarosa de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos ForIABC y RevIABC.	73

Figura 3.9. Esquematación de los plásmidos pGEM-MfAtr4g y pGEM-3110c.	74
Figura 3.10. Análisis en geles de 0.8% de agarosa de los productos de restricción con las enzimas <i>BspEI</i> y <i>BstXI</i> .	75
Figura 3.11. Análisis en geles de 0.8% y 1.5 % de agarosa de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos FORFAtr4-RORFAtr4 y ForIABC y RevIABC.	76
Figura 3.12. Análisis en geles de 0.8% de agarosa de los productos de restricción con las enzimas <i>SacII</i> y <i>Apal</i> .	77
Figura 3.13. Análisis en geles de 0.8% de agarosa de los productos de PCR de larga distancia con los oligonucleótidos AOX5F–AOX3R.	78
Figura 3.14. Análisis en geles de 1% de agarosa de los productos de 850 pb amplificados por PCR con los oligonucleótidos sentido AOX5' y reverso R5sil.	79
Figura 3.15. Análisis en geles de 1% de agarosa de los productos de 2.7 KB y 1.02 amplificados por PCR en colonia a partir de <i>P. pastoris</i> transformada con el vector pPICZA-MFATR4.	80
Figura 3.16. Análisis en geles de 1% de agarosa del ADN genómico de la levadura <i>P. pastoris</i> .	81
Figura 3.17. Análisis en geles de 1% de agarosa de los productos amplificados por PCR de larga distancia con los oligonucleótidos AOX5F- RORFAtr4.	81
Figura 3.18. Análisis de la proteína total de <i>P. pastoris</i> .	82
Figura 3.19. Inmunodetección de la proteína recombinante MFATR4.	82
Figura 4.1. Esquematación del vector pSilent-1 y sus diferentes componentes.	92
Figura 4.2. Esquema del vector pSilent-MfAtr4SA.	95
Figura 4.3. Aspecto general de cultivos <i>in vitro</i> de <i>M. fijiensis</i> cepa C1233.	96
Figura 4.4. Fraccionamiento electroforético del ARN total de <i>M. fijiensis</i> en geles desnaturalizantes de 1.2% de agarosa.	96
Figura 4.5. Esquema del ORF del gen <i>MfAtr4</i> .	97
Figura 4.6. Análisis en gel de 1% de agarosa del fragmento de 569	98

pb amplificado por PCR utilizando ADNc como templado.	
Figura 4.7. Análisis en geles de 1% de agarosa de los productos de restricción con la enzima <i>HindIII</i> .	99
Figura 4.8. Análisis en geles de 1% de agarosa de productos de restricción con las enzimas <i>BglII</i> y <i>Apal</i> .	100
Figura 4.9. Análisis en gel de 1% de agarosa de los productos de restricción con la enzima <i>KpnI</i> del vector pSilent- <i>MfAtr4SA</i> .	101
Figura 4. 10. Transformación de la cepa C1233 de <i>M. fijiensis</i>	101
Figura 5.1. Inhibición del crecimiento de la cepa C1233 de <i>M. fijiensis</i> 6 días después de la aplicación del fungicida.	115
Figura 5.2. Inhibición del crecimiento de la cepa C1233 de <i>M. fijiensis</i> 26 días después de la aplicación del fungicida.	116
Figura 5.3. Inhibición del crecimiento de <i>M. fijiensis</i> con benomil.	117
Figura 5.4. Gráfico del crecimiento del micelio de la cepa C1233 de <i>M. fijiensis</i> en presencia de diferentes concentraciones de benomil.	117
Figura 5.5. Biomasa del micelio de la cepa C1233 de <i>M. fijiensis</i> en presencia de clorotalonil (100 µg), mancozeb (100 µg) y benomil (12.5 µg).	118
Figura 5.6. Expresión de los transportadores ABC en presencia de los fungicidas clorotalonil (100µg), mancozeb (100µg) y benomil (12.5 µg).	120
Figura 6.1. Esquema de un transportador ABC tipo PDR en hongos.	132

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. List of primers used in this study.	31
Cuadro 2 Pairwise comparison of <i>MfAtr4</i> and <i>MgAtr4</i>	44
Cuadro 3. Comparative analysis of <i>MfAtr4</i> and <i>MgAtr4</i> features	45
Cuadro 4. Vectores comerciales utilizados para la expresión heteróloga en <i>Pichia pastoris</i>	58
Cuadro 5. Cepas comerciales de <i>Pichia pastoris</i>	59
Cuadro 6. Lista de proteínas expresadas en <i>P. pastoris</i> , vector de expresión (integrativo I ó de secreción S) y la cantidad de proteína obtenida	60
Cuadro 7. Secuencia de aminoácidos de los 12 TMS del transportador MFATR4	1333

RESUMEN

La Sigatoka negra es una de las enfermedades más devastadoras de los bananos y plátanos, ocasionada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Se han utilizado diversos métodos de control químico para contrarrestar los efectos de la enfermedad, no obstante, estos métodos de control muchas veces resultan ineficientes debido a que el patógeno ha desarrollado resistencia contra los fungicidas aplicados. Se han planteado diversos mecanismos por los cuales el patógeno es capaz de generar resistencia, uno de ellos es el transporte mediado por transportadores ABC. Estos se encuentran involucrados en diversos procesos celulares entre los que se destaca su participación en la patogénesis. En el caso de *M. fijiensis* poco se conoce acerca de su mecanismo de su patogenicidad. No obstante, es probable que algún transportador ABC participe como un factor de virulencia. En este trabajo a partir de *M. fijiensis* se amplificó el ORF del transportador *MfAtr4* presunto ortólogo del transportador *MgAtr4* de *Mycosphaerella graminicola*, involucrado en la virulencia de dicho patógeno sobre trigo. Asimismo, a partir de la secuencia se realizaron los análisis bioinformáticos para predecir la topología y estructura del transportador MFATR4. También se analizó la expresión de *MfAtr4* durante la interacción *M. fijiensis*-banano y en presencia de los fungicidas clorotalonil, mancozeb y benomil. Por otro lado se generaron dos vectores de clonación uno denominado pSilent-*MfAtr4*SA, el cual se está utilizando para determinar la función del gen *MfAtr4* en la patogénesis de *M. fijiensis* y otro denominado pPICZA-MFATR4, el cual está siendo empleado para producir la proteína MFATR4 recombinante.

ABSTRACT

The Black Sigatoka is one of the most devastating diseases of banana and plantain and is caused by the fungus *Mycosphaerella fijiensis*. A variety of chemical methods (fungicides) are being used to counteract the effects of the disease; however, these methods are often ineffective because the pathogen has developed resistance against fungicides applied. The fungus have raised a number of mechanisms by which it is able to generate resistance; one of them is mediated by ABC transporters. The ABC transporters are involved in various cellular processes including their involvement in the pathogenesis. In the case of *M. fijiensis* little is known about its mechanism of pathogenicity. However, it is likely that some ABC transporters participate as virulence factors. In this work, it was amplified the ORF of *MfAtr4* transporter from *M. fijiensis*, a presumed ortholog of *MgAtr4* transporter from *M. graminicola*, and which is involved in the virulence of this pathogen on wheat. Also, from the nucleotide sequence were performed the bioinformatic analysis to predict the topology and structure of transporter MFATR4. We also analyzed the expression of gene *MfAtr4* during the interaction of *M. fijiensis* with banana and during the exposure of the fungus to the fungicides chlorothalonil, mancozeb and benomyl. On the other hand, we generated two cloning vectors: one called pPsilent-*MfAtr4*SA which is being used to determine the function of gene *MfAtr4* in the pathogenesis of *M. fijiensis* and another called pPICZA-MFATR4, which is being used to produce the recombinant protein MFATR4.



Capítulo I

Antecedentes

I GENERALIDADES DE *Mycosphaerella fijiensis*

El plátano es el cuarto cultivo más importante del mundo, después del arroz, trigo y maíz; es además un cultivo básico, cuya producción y exportación constituye una importante fuente de empleo e ingresos en numerosos países. En México el cultivo de plátano genera 3 mil millones de pesos al año y más de 200 mil jornales en los estados de Tabasco, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Puebla, Oaxaca y Veracruz (www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2006/junio/B155). Una de las principales enfermedades que afecta a este cultivo a nivel mundial es la Sigatoka negra, enfermedad causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Este patógeno fue reportado por primera vez en Fiji en 1964 (Bennet, 2003) y actualmente se encuentra distribuido en todas las zonas bananeras del mundo. La severidad de la Sigatoka negra impacta fuertemente en el sistema agrícola del banano en el que el monocultivo en grandes extensiones de suelo, la reproducción asexual del cultivo y su uniformidad genética favorecen el ataque por *M. fijiensis* (Lepoivre *et al.*, 2003, Marin *et al.*, 2003).

Este patógeno hemibiotrófico infecta las hojas y produce un importante deterioro del área foliar, afectando en consecuencia el crecimiento y productividad de las plantas al disminuir el área fotosintética. También ocasiona una reducción en la calidad de la fruta porque ocurre una maduración prematura de los frutos. Cuando no se le combate puede ocasionar pérdidas de entre un 50 y 100% en la producción, impactando de manera notoria la economía del productor (Pérez, 2006). En México la producción comercial de bananos y plátanos está siendo afectada por la Sigatoka negra desde 1981 y actualmente continúa causando importantes pérdidas económicas. La inversión para la prevención de la enfermedad es de 900 a 1400 dólares por hectárea lo cual evidencia la importancia económica de la enfermedad para los productores mexicanos (www.redbio.org/rdominicana/redbio2004rd/Memoria_REDBIO_2004/simposios).

1.1 CICLO DE VIDA DE *Mycosphaerella fijiensis* Y SÍNTOMAS DE LA SIGATOKA NEGRA

El agente causal de la Sigatoka negra es el hongo hemibiotrófico ascomiceto llamado *M. fijiensis*, el cual durante su ciclo de vida (Fig. 1.1) se reproduce en forma sexual y asexual (Douglas y Ronald, 1992). La fase asexual se presenta durante el desarrollo de las lesiones de la enfermedad conocidas como pizca y mancha respectivamente; en dichas etapas se detecta la presencia de un número relativamente bajo de conidióforos; estructuras que emergen de los estomas, principalmente en la superficie inferior de la hoja (Manzo-Sánchez *et al.*, 2005). Los conidios son hialinos, cilíndricos, rectos o ligeramente curvos, de seis a nueve septos, delgados en el ápice y más anchos en la base, con una cicatriz en el hilio basal del conidio (Orozco-Santos, 1998). Los conidióforos pueden emerger directamente de los estomas, ya sea de manera individual o en pequeños grupos, o pueden formar fascículos sobre el estoma. Los conidios miden de 0.3-1.32 μm de largo y de 0.25 a 0.5 μm en la parte más ancha. Las estructuras reproductoras se producen en mayor abundancia en la superficie inferior o abaxial de las hojas, pero también pueden ser encontradas en la parte superior o adaxial de las hojas. Los conidios generalmente son diseminados por la lluvia y solo recorren cortas distancias, causando infección en otras áreas de la misma hoja o entre hojas de la misma planta, de la planta madre a los hijos y entre plantas cercanas (Orozco-Santos *et al.*, 2002).

La fase sexual es la más importante en la reproducción de la enfermedad así como diseminación, ya que en esta etapa se produce un gran número de ascosporas, en estructuras llamadas pseudotecios (peritecios). Las ascosporas son una de las principales fuentes de inóculo y el medio de dispersión a grandes distancias de la enfermedad; son diseminadas por la lluvia y el viento (Burt & Gonzales, 1997). Las ascosporas son hialinas, fusiformes clavadas, con dos células y ligeramente constrictivas en el septo. Las ascosporas miden de 1.4-2.0 μm de longitud y de 0.4 a 0.6 μm de ancho.

Los primeros síntomas de la enfermedad son numerosos puntos diminutos de color pardo que se desarrollan hasta formar finas rayas de 1.5 mm de largo, visibles en la superficie superior de la hoja. Los puntos se unen y oscurecen, entonces las zonas muertas y negras se secan y adquieren un color más pálido. Las manchas suelen ser intensas hacia las puntas de las hojas; las hojas afectadas pueden morir en tres o cuatro semanas y el

resultado es una defoliación severa y rápida de la planta (Leach, 1964). Se ha establecido que durante el desarrollo de la enfermedad se pueden identificar estadios característicos (Fig.1.2), mismos que han sido clasificados como:

a) Estadio I: Pequeñas pecas menores de 0.25 mm de color pardo rojizo en la superficie inferior de la hoja; no hay síntomas en la parte superior. Cuando el ataque es severo pueden observarse pecas en la segunda hoja abierta de las plantas que no han producido racimo pero generalmente aparecen en la tercera y cuarta hoja abierta.

b) Estadio II: La peca inicial se alarga hasta 20 mm de longitud y 2 mm de ancho, hacia las nervaduras de la hoja; estas lesiones son más evidentes y numerosas en el envés de la hoja.

c) Estadio III: La raya se alarga ligeramente y cambia de color pardo rojizo a pardo oscuro, casi negro. La raya es visible en la superficie superior de la hoja; cuando son numerosas y están distribuidas uniformemente, las hojas toman un color negruzco.

d) Estadio IV: Las rayas se ensanchan y se hacen de contornos fusiformes. Esta transición se caracteriza por un halo verde acuoso. El efecto acuoso es claro en horas tempranas de la mañana, cuando aún existe rocío en las hojas o después de llover.

e) Estadio V: El área central de la mancha se vuelve ligeramente comprimido y el borde oscuro es más pronunciado debido al oscurecimiento.

f) Estadio VI: Estado maduro; el centro de la mancha se seca y se vuelve gris y después cóncavo. La mancha está rodeada de un borde estrecho, bien definido entre éste y el color verde de la hoja. Se observa una zona amarilla de transición. Después que la hoja se colapsa y cuelga, las manchas quedan claramente visibles debido al centro claro y al borde oscuro.

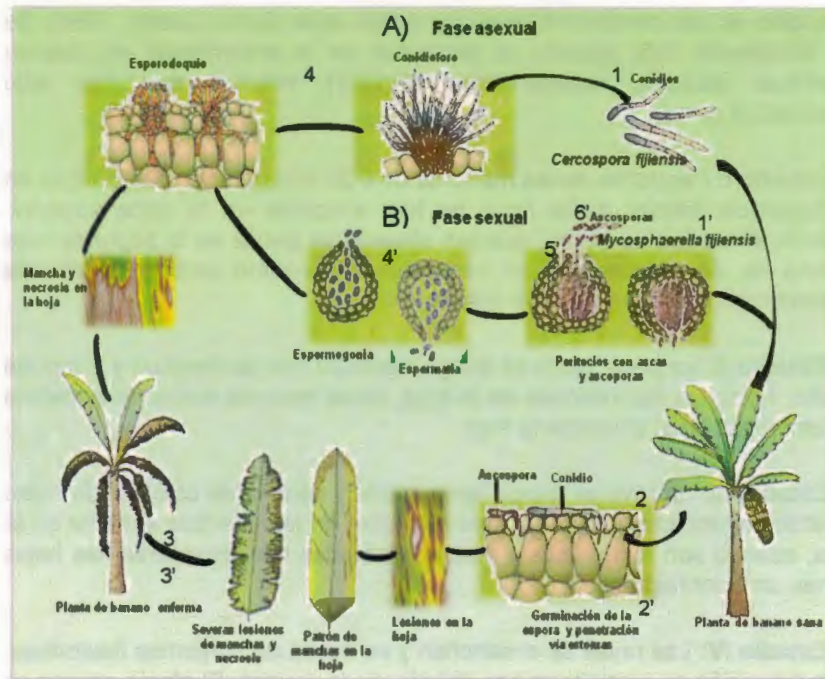


Figura 1.1. Ciclo de vida de *M. fijiensis*. A) Ciclo asexual: 1) diseminación local de conidios, 2) generación de esporas y penetración en la hoja a través de los estomas, 3) crecimiento del micelio, lesiones de las hojas, necrosis, 4) desarrollo de conidióforos y producción de conidios y B) ciclo sexual: 1') depósito de ascosporas en la hoja, 2') germinación de la ascospora y penetración del talo germinativo en los estomas, 3') crecimiento del micelio, lesiones en las hojas, necrosis, 4') desarrollo de espermogonios y liberación de espermatias, 5') desarrollo de las ascas y 6') liberación de las ascosporas (tomado de Churchill, 2010 y modificado por el autor de este trabajo).

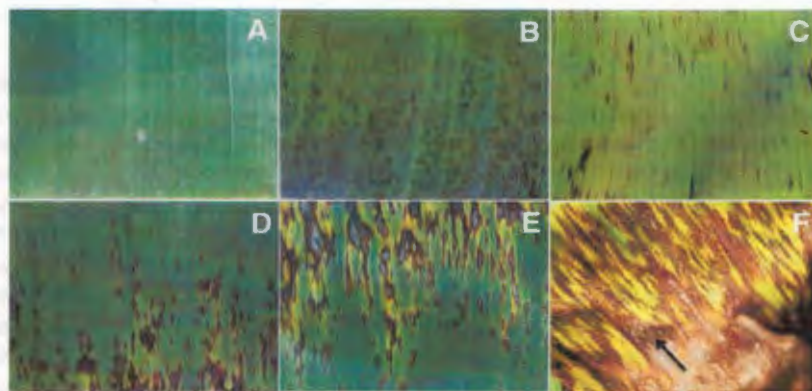


Figura 1. 2. Estadios de la enfermedad ocasionada por *M. fijiensis*. A) estadio inicial de pizca, B) estría C) raya, D) mancha, E) mancha con halo clorótico, F) mancha necrótica (Churchill, 2010).

1.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Mycosphaerella fijiensis*

El primer registro de *M. fijiensis* fue hecho por Leach (1964), quien estableció que el patógeno tiene un estado perfecto o teleomorfo (fase sexual) y una fase imperfecta o anamorfo (fase asexual). En el cuadro 1 se muestra la clasificación taxonómica de *M. fijiensis*.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Mycosphaerella fijiensis*.

Fase sexual: Teleomorfo	
Reino	Fungi
Subreino	Dikarya
Filum	Ascomycota
Subfilum	Pezizomycotina
Clase	Dothideomycetes
Subclase	Dothideomycetidae
Orden	Capnodiales
Familia	Mycosphaerellaceae
Género	<i>Mycosphaerella</i>
Especie	<i>Mycosphaerella fijiensis</i> M.

1.1.2 DISEMINACIÓN DE *M. fijiensis*

Como se ha descrito previamente, la diseminación del hongo es principalmente mediante los conidios (forma asexual) y las ascosporas (forma sexual). Los conidios se forman mayormente en condiciones de alta humedad y son dispersados principalmente por la lluvia y el agua al salpicar, contaminando las hojas de la parte baja de la planta y plantas adyacentes (Orozco-Santos, 1998). Las ascosporas son diseminadas por corrientes de aire, hasta 4-5 kms, desde la fuente de inóculo. Esto ocurre principalmente en períodos prolongados de lluvia y alta humedad. La infección ocurre en las hojas más jóvenes. El mejor lugar para que la enfermedad se desarrolle es en la hoja candela, que es más tierna y ofrece menos resistencia al viento, por lo que los conidios del hongo se depositan más fácilmente. Los conidios tardan 48-96 horas en penetrar por los estomas, dependiendo de la humedad relativa y la temperatura (Stover, 1990).

En un cultivar susceptible el ciclo infectivo puede tomar 10-33 días y se observa muerte extensiva del follaje, reducción del rendimiento, maduración prematura y dispareja de los frutos. El primer síntoma de rayas cloróticas ocurre 10-12 días después de la infección. En un cultivar resistente la enfermedad se desarrolla lentamente y la etapa de manchas se observa al terminar el proceso natural de senescencia de la planta (Almodóvar *et al.*, 2001). El ciclo de la enfermedad varía de acuerdo a las condiciones ambientales de humedad y temperatura, naturaleza y vigor del hospedero, agresividad del patógeno y cantidad de inóculo que llega a las hojas (Bennet, 2003).

1.1.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO Y DISPERSIÓN DE LA ENFERMEDAD

M. fijiensis presenta una alta tasa de recombinación, lo que potencia la ocurrencia de cambios genéticos dentro de las poblaciones del patógeno. Esto puede conducir a una rápida adaptación del patógeno a las condiciones ambientales cambiantes y puede ser la razón para explicar la elevada variabilidad patogénica detectada en el mismo (Orozco, 1998).

1.1.4 MÉTODOS DE CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA

Control biológico y variedades resistentes.

El control biológico de la Sigatoka negra se ha intentado por medio del empleo de bacterias epifíticas como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* sp. No obstante su utilidad, en campo es difícil de predecir porque la Sigatoka negra es una enfermedad policíclica y su hospedero (banano) es un cultivar que está presente todo el año (Bennet, 2003). El uso de cultivares resistentes tales como FHIA01, FHIA02, FHIA03, CIEMBTA-03 y Yangambi Km 5 (Valerio *et al.*, 2002) constituyen una alternativa para los pequeños agricultores para controlar la Sigatoka negra, debido a que permite disminuir el uso de fungicidas, los cuales son de alto costo. No obstante, aunque existen cultivares de plátanos y bananos resistentes a la enfermedad, son poco aceptados comercialmente debido a las preferencias locales de consumo (Hidalgo *et al.*, 2006).

Control químico

Hasta ahora el principal método de control contra *M. fijiensis* es el uso de fungicidas; los programas de control están basados en la aplicación de fungicidas protectores como el mancozeb y el clorotalonil. El mancozeb frecuentemente se aplica en combinación o en rotación con fungicidas sistémicos tipo morfolinas, con inhibidores de demetilación (triadimefón), o con fungicidas tipo estrobilurinas (Qols). Se ha visto que *M. fijiensis* desarrolla una rápida resistencia ante el uso intensivo de fungicidas, lo cual es común en las áreas de producción de banano (Bennet, 2003; Manzo-Sánchez, 2005).

1.1.5 INTERACCIÓN BANANO-*M. fijiensis*

Durante la etapa de colonización y sobrevivencia, los hongos fitopatógenos se enfrentan a diversos compuestos producidos por la planta tales como metabolitos secundarios (fenoles, fitotoxinas, antibióticos naturales), e igualmente son confrontados con una gran cantidad de químicos artificiales (fungicidas), ante los cuales el hongo ha desarrollado diversas estrategias de sobrevivencia (Duffy *et al.*, 2003; Schoonbeeck, 2001).

En el caso de *M. fijiensis*-banano, la interacción se inicia cuando las ascosporas o conidios del hongo alcanzan las hojas del banano, germinan y penetran en los espacios intercelulares de la hoja a través de los estomas

(Manzo-Sánchez, 2005). Ante el reconocimiento del patógeno las plantas activan sus mecanismos de defensa e inducen la producción de proteínas relacionadas a patogénesis (PR), fitoalexinas y metabolitos secundarios. No obstante, se ha visto que estos compuestos pierden rápidamente su efecto sobre hongos fitopatógenos debido a que estos pueden detoxificar o neutralizar dichos compuestos (Beltrán *et al.*, 2006). Se han descrito diversos mecanismos involucrados en la resistencia del hongo ante compuestos antifúngicos; estos mecanismos están relacionados a factores cualitativos como lo es la ausencia o presencia de sitios blanco, y cuantitativos como son el transporte almacenaje y metabolismo de los compuestos tóxicos. Uno de los mecanismos con el que los patógenos adquieren resistencia es la modificación del sitio blanco, es decir el sitio de acción del compuesto antifúngico, de tal forma que a medida que pasa el tiempo, el efecto de estos compuestos disminuye sobre el patógeno (Schoonbeek *et al.*, 2001). En *M. fijiensis* el cambio en un solo nucleótido en el gen que codifica para la β -tubulina le confiere resistencia al patógeno contra el fungicida benomil (Cañas *et al.*, 2006). Las toxinas contra el patógeno pueden también ser expulsadas a través de la membrana hacia el exterior de la célula fúngica, reduciendo la concentración de sustancias dafinas en su interior. Se ha demostrado que existe un mecanismo de activación de bombas biológicas cuyas funciones incluyen la exportación de toxinas endógenas, fungicidas y compuestos de defensa de la planta (De Waard *et al.*, 2006). Este último mecanismo está involucrado en la sensibilidad a compuestos tóxicos como fungicidas y es posible que sea debido a proteínas transmembranales denominadas transportadores tipo ABC (ATP Binding Cassette). A través de estos transportadores el hongo no permite la acumulación de compuestos químicos en su interior (Stergiopoulos *et al.*, 2003).

Los transportadores ABC por tanto pueden considerarse como una de las principales barreras de defensa de los hongos contra compuestos tóxicos (e.g. fungicidas). Algunos transportadores ABC actúan como factores de virulencia, debido a que proporcionan protección contra compuestos de defensa fungitóxicos producidos por el hospedante, también median la secreción de metabolitos relacionadas a la patogenicidad por lo que juegan un papel importante en la interacción planta-hongo (Hayashi, 2002; Stergiopoulos *et al.*, 2007).

1.1.6 LOS TRANSPORTADORES ABC

Los transportadores ABC son una familia de proteínas transmembranales parálogas y están presentes desde las *Archaea* hasta el hombre (Schmitt & Tampe, 2002).

La denominación de "transportadores tipo ABC" se debe a que en todos ellos existen una o dos regiones expuestas de la proteína que poseen un dominio (de unos 200 aminoácidos) conservado evolutivamente, denominado "cassette de unión del ATP o NBD (dominio de unión a nucleótido) que permite la unión del ATP. Este dominio es muy antiguo y conservado, al parecer existía antes de la divergencia evolutiva entre procariontes y eucariontes (Daumke & Knittler, 2001).

Inicialmente se creyó que los transportadores ABC eran "exportadores" de proteínas recién sintetizadas. Posteriormente se descubrió que las proteínas ABC están involucradas en el transporte de iones, azúcares, aminoácidos, vitaminas, péptidos, polisacáridos, hormonas, lípidos y compuestos xenobióticos. Adicionalmente, los transportadores ABC participan en diversos procesos celulares como es el mantenimiento de la homeostasis celular, regulación genética, reparación del ADN, resistencia a xenotoxinas, y patogenicidad (Martinoia, 2002; Jones & George, 2004). La energía que utilizan los transportadores para ejercer su función de transporte es generada por la hidrólisis del ATP, y por esta razón se les considera como un sistema primario de transporte activo (De Waard *et al.*, 2006).

1.1.6.1 ESTRUCTURA GENERAL DE LOS TRANSPORTADORES ABC

Los transportadores ABC consisten de dos proteínas integrales de membrana; cada una consta de un arreglo de α -hélices que cruzan entre seis y once veces (usualmente 6) la bicapa fosfolipídica. Esos dominios transmembranales determinan la especificidad por el sustrato y evitan que moléculas no deseadas se unan al transportador (George & Jones., 2004). Flanqueando los dominios transmembranales hay un dominio de unión al ligando, el cual se localiza en la cara extracelular de la proteína en el caso de los ABC's que actúan como importadores y en la cara citoplasmática en las proteínas ABC's que actúan como exportadores (Tam & Saier, 1993; Saurin *et al.*, 1999).

Los dominios transmembranales (TMDs por sus siglas en inglés Transmembranal Domain) forman un canal que contiene el sitio de unión al

sustrato, mientras que los dominios de unión a nucleótidos son los motores que transforman la energía química del ATP en energía mecánica, ocasionando un cambio conformacional en la proteína (Altenberg, 2003). El modo en que se acopla la energía metabólica con el transporte de solutos aún no está bien dilucidado, pero se han postulado dos hipótesis para explicar el mecanismo de transporte y su acoplamiento a la hidrólisis del ATP. De forma general una vez que la proteína ha captado su sustrato y éste se encuentra en estrecha asociación, la energía de la hidrólisis del ATP cambia la conformación de la proteína y es entonces cuando se transportan sustancias hacia el interior o el exterior de la célula (Skov *et al.*, 2004).

Todas las proteínas ABC's también contienen dos dominios de unión a ATP conocidos también como "Nucleotide binding Fold" (NBFs), NBD ó ABC; localizados en la cara citoplásmica de la membrana. Estos pliegues se dividen en dominios o cajas denominadas Walker A y Walker B, los cuales se encuentran separados por aproximadamente 90 a 120 aminoácidos. Anterior al dominio Walker B se localiza un tercer motivo, el cual es corto y altamente conservado y se le denomina el motivo LSGGG o motivo C; dicho motivo corresponde a la firma ABC (Nikaido, 2002). Al igual que los dominios Walker A y B, el motivo C es único y característico de los transportadores ABC's (Fig. 1.3). Los dominios transmembranales y los pliegues de unión a nucleótidos generalmente tienen el siguiente ordenamiento; amino terminal-dominio transmembranal-pliegue de unión al nucleótido-carboxilo terminal (De Waard *et al.*, 2006). Los ABC exportadores contienen 12 hélices transmembranales, mientras que los importadores contienen entre 10 y 12 hélices transmembranales, dependiendo del peso y de la naturaleza química del sustrato que translocan (Saurin *et al.*, 1999).

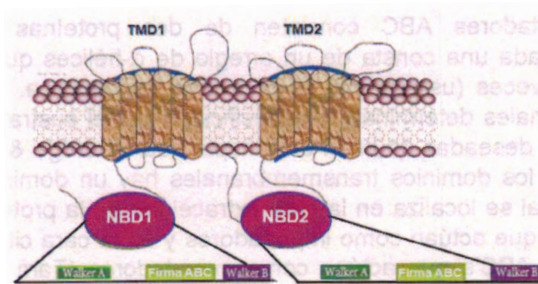


Figura 1.3. Esquematización de la estructura de un transportador ABC; con sus regiones transmembranales y sus dominios de unión a ATP (tomado de Prasad *et al.*, 2011 y modificado por el autor de este trabajo).

1.1.6.2 ¿CÓMO FUNCIONAN LOS TRANSPORTADORES ABC?

Para explicar la función y mecanismo de los transportadores ABC se han propuesto dos modelos: el modelo de ciclo catalítico alternante y el modelo de interruptor de ATP. El primero sugiere una alternancia catalítica de los dos NBD's durante la hidrólisis del ATP, es decir que los dos sitios de unión a ATP (uno en cada NBD) son necesarios para la funcionalidad del transportador y para que tenga lugar el ciclo de hidrólisis del ATP; ambos sitios hidrolizan el ATP en momentos diferentes es decir de manera alternada y no al mismo tiempo (Senior *et al.*, 1995). Este modelo asume que la energía para el transporte de sustratos procede de la hidrólisis del ATP y que los NBD's al funcionar de manera alterna están acoplados a distintas etapas del ciclo de transporte. No obstante, estudios bioquímicos sugieren que es la unión del ATP más que su hidrólisis lo que ocasiona cambios conformacionales en el transportador para promover el transporte de sustratos (Higgins, 1998; Higgins & Linton, 2002). El segundo modelo llamado de interruptor o "switch" de ATP postula dos cambios alternantes en la conformación de los NBD's: la formación de un dímero cerrado tras la unión de dos moléculas de ATP en la interfase del mismo y la disociación del dímero abierto tras la hidrólisis del ATP y la liberación del Pi y ADP (Jones & George, 1999; Vander Does & Tampe, 2004). Estudios cinéticos de este modelo indican que existe una cooperatividad entre los sitios de unión a ATP, hecho que puede ser finamente regulado por señales procedentes de los TMD's. El cambio procedente de la conformación cerrada y abierta del dímero causa modificaciones conformacionales de los TMD's, factor que es necesario para el transporte del sustrato a través de la membrana; esto sugiere que la fuerza para transportar al sustrato es ocasionado por la formación cerrada (asociación) y abierta (disociación) del dímero (Altenberg, 2003; Lu *et al.*, 2005).

1.1.6.3 CLASIFICACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES ABC

Los transportadores ABC se clasifican en importadores o exportadores de acuerdo a si realizan el transporte hacia dentro ó hacia fuera de la célula. También han sido clasificados con base en su topología, por ejemplo en eucariontes se han descrito dos topologías; el tipo MDR (de sus siglas en inglés "Multidrug drug resistance") presenta la topología NBD_2-TMD_6 y el tipo PDR (de sus siglas en inglés "Pleiotropic resistance") con topología TMD_6-NBD_2 (Fig 1.4) (Stergiopoulos *et al.*, 2007). En las bacterias; los TMD's-NBD's son producidos como polipéptidos de cadena separada y solo

un dominio TMD se encuentra unido a un motivo NBD formando la mitad de un transportador inactivo; este TMD-NBD requiere dimerizarse para ser funcional. En el caso de eucariontes, los dominios TMD-NBD se encuentran en un solo polipéptido.

En los ABC importadores, cada dominio TMD-NBD cuenta con varios sitios de unión al sustrato; se postula que los TMD-NBD deben poseer alta especificidad. Por su parte los ABC exportadores, reclutan su sustrato en el citoplasma o en la bicapa lipídica, aunque el mecanismo no está bien dilucidado (Dawson *et al.*, 2007).

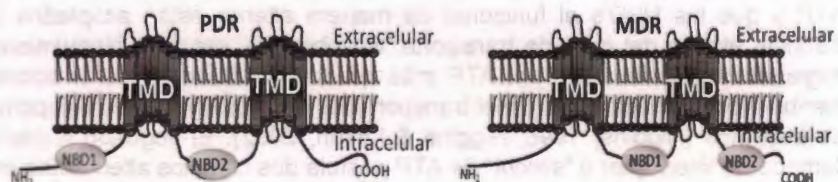


Figura 1.4. Representación esquemática de la topología de los transportadores ABC: NBD_2-TMD_6 (PDR) y TMD_6-NBD_2 (MDR). NBD 1 y 2; Dominio de Unión a Nucleótido, TMD; Dominio transmembranal. PDR; Resistencia pleiotrópica a drogas, MDR; Resistencia a Multidrogas.

1.1.7 TRANSPORTADORES ABC EN HONGOS

Dos de las familias de transportadores más ampliamente estudiadas son: los transportadores ABC y los transportadores MFS (de sus siglas en inglés Major Facilitator Superfamily) (Holger *et al.*, 2008). En los hongos una gran parte de su genoma codifica para transportadores; es decir por cada megabase de ADN genómico 10 de cada 30 genes codifican para transportadores. Siendo el grupo mayoritario los transportadores MFS. Sin embargo, en el mecanismo de transporte primario los transportadores ABC son los más comunes (Vermeulen *et al.*, 2001).

La secuenciación de genomas fúngicos ha revelado un amplio repertorio de proteínas ABC en un amplio rango de especies. El primer genoma fúngico secuenciado fue el de *Saccharomyces cerevisiae* y se encontró entre 29-30 proteínas ABC; en el caso de *Candida glabrata* se ha descrito que contiene 18 transportadores ABC; *Candida albicans* contiene en su genoma 27 transportadores ABC. Mientras que *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus*

neoformans poseen 49 y 54 transportadores ABC, respectivamente (Paumi *et al.*, 2009). No obstante a pesar del amplio número de transportadores ABC presentes en los genomas fúngicos, solo pocos se han caracterizado funcionalmente, siendo los más estudiados aquellos involucrados en la resistencia a multidrogas de hongos patógenos de humanos. Se pueden mencionar por ejemplo los estudios en *C. albicans*, *A. fumigatus* y *C. neoformans*. En *C. albicans* la expresión de dos transportadores ABC: Cdr1p y Cdr2p, le confieren resistencia a azoles. En *C. glabrata* la resistencia a azoles es causada por la expresión del transportador ABC Cdr1p (Gaur *et al.*, 2005; Kovalchu & Driessen, 2010).

1.1.7.1 TRANSPORTADORES ABC INVOLUCRADOS EN PATOGÉNESIS

Los transportadores ABC de hongos filamentosos pueden desempeñar diferentes funciones (Stergiopoulos *et al.*, 2003). Por ejemplo, la sobreexpresión de estos transportadores puede tener un efecto pleiotrópico dando como resultado la resistencia simultánea a numerosos componentes químicos (De Waard *et al.*, 2006). En hongos patógenos tales como *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Gibberella pulicaris*, *Magnaporthe grisea* y *Mycosphaerella graminicola* se ha demostrado la participación de los transportadores ABC en la patogénesis; probablemente estén involucrados en la secreción de toxinas, en la liberación de feromonas para el apareamiento (mating type) y en la protección contra componentes de defensa de la planta (Stergiopoulos *et al.*, 2003).

M. grisea, un hongo que infecta arroz, requiere del transportador ABC1 para invadir exitosamente a su hospedero. Puesto que *M. grisea* se enfrenta a fitoalexinas del arroz, se cree que este transportador le permite compartimentalizar o excretar dichas fitoalexinas. Cuando se mutó este transportador se afectó el desarrollo y la virulencia del patógeno (Urban *et al.*, 1999).

En 2007 Gupta & Chattoo realizaron un escrutinio para identificar transformantes obtenidas vía ATMT (de sus siglas en inglés *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation) de *M. grisea*, que fueran deficientes en patogenicidad e identificaron una mutante deficiente en el transportador denominado ABC4, el cual tiene un tamaño de 5045 pb y que codifica para una proteína de 1654 aminoácidos. Dicha mutante no forma apresorios y tampoco es patógena; la mutante presentó sensibilidad a compuestos antifúngicos y a fitoalexinas. El análisis por PCR en tiempo real mostró que

la expresión del gen ABC4 se incrementa cuando la cepa silvestre es expuesta a diversos antifúngicos. La expresión del gen ABC4 fue nula en la cepa mutante. Además de la función del gen ABC4 en respuesta a múltiples drogas, se demostró que dicho gen también es requerido para la patogenicidad de *M. grisea*.

G. pulicaris, un hongo necrotrófico que infecta *Solanum tuberosum*, se ve expuesto a las fitoalexinas rishitina y lubimina. Un estudio demostró que *G. pulicaris* destoxifica estas fitoalexinas y que el proceso es mediado por un transportador ABC, el cual es codificado por el gen *Gpabc1*, necesario para la virulencia del patógeno. Se encontró que existe una correlación entre el transporte de las fitoalexinas y la virulencia del patógeno, sugiriendo que la tolerancia hacia estas es esencial para la virulencia del patógeno (Fleibner *et al.*, 2002).

En *Aspergillus nidulans* se reportó la identificación de dos transportadores ABC denominados *AtrA* y *AtrB*; la expresión de estos genes es altamente regulada y sus productos transportan un amplio rango de compuestos tóxicos naturales y compuestos tóxicos sintéticos. Análisis funcionales por mutación del gen *AtrB* demostraron su participación en la protección contra componentes antifúngicos como los anilinoimidolaminos, azoles, benzimidazoles, estrobilurinas, alcaloides como la campotecina y el resveratrol, demostrando que los transportadores ABC en *A. nidulans* desempeñan un papel importante en la defensa contra productos tóxicos y fungicidas (Pizeta *et al.*, 2002).

El hongo *B. cinerea* afecta a un amplio rango de hospederos, por lo que este patógeno se expone a una amplia variedad de compuestos fungitóxicos. Se ha observado que *B. cinerea* es capaz de contrarrestar el efecto de estos compuestos mediante la presencia del gen *BcatrB* que codifica un transportador ABC, cuya secuencia proteica es de 1439 aminoácidos. El gen *BcatrB* tiene 31-67% de identidad con otros transportadores ABC de hongos. Los tratamientos con resveratrol y fenpiclonil en cepas mutantes en el gen *BcatrB* evidencian un mayor efecto de los fungicidas en las cepas mutantes. Las mutantes en el gen *BcatrB* presentaron un bajo nivel de virulencia, lo que indica que el gen *BcatrB* es determinante en la sensibilidad a los fungicidas descritos, así como en la virulencia (Schoonbeeck *et al.*, 2001).

El hongo *F. culmorum* es un patógeno que afecta las raíces de cebada. En este hongo se identificó el gen *FcABC1*, el cual codifica para un transportador ABC homólogo a los transportadores ABC1 de *M. grisea* y de

G. pullicaris. Cuando el gen *FcABC1* se mutó se redujo la agresividad de *F. culmorum*, demostrando que desempeña un papel en la patogénesis. El gen *FcABC1* se expresa durante la infección en cebada, lo cual apoya la importancia de los transportadores ABC como factores de patogenicidad (Skov *et al.*, 2004).

El hongo *M. graminicola*, agente causal de la enfermedad conocida como mancha de la hoja del trigo, causa pérdidas del 30 al 40% de la producción. La virulencia de este patógeno no está bien dilucidada a nivel molecular y bioquímico. No obstante, en el 2003 se aislaron 5 transportadores ABC de *M. graminicola* denominados *MgAtr1*, *MgAtr2*, *MgAtr3*, *MgAtr4* y *MgAtr5*, los cuales han sido clonados y caracterizados. Los transportadores *MgAtr1-5* proveen al patógeno de protección contra fungicidas y compuestos tóxicos de la planta. En el caso del transportador *MgAtr4* se demostró que este es un factor de virulencia necesario para que el hongo desarrolle la enfermedad. Asimismo se determinó que el transportador *MgAtr4* le confiere a *M. graminicola* protección contra compuestos con actividad antifúngica (Stergiopoulos *et al.*, 2003).

1.2 HIPÓTESIS

Dado que se ha determinado que el gen *MgAtr4* de *Mycosphaerella graminicola*, es un factor de virulencia, entonces es posible que el gen homólogo de *M. fijiensis* tenga la misma función.

1.3 OBJETIVOS

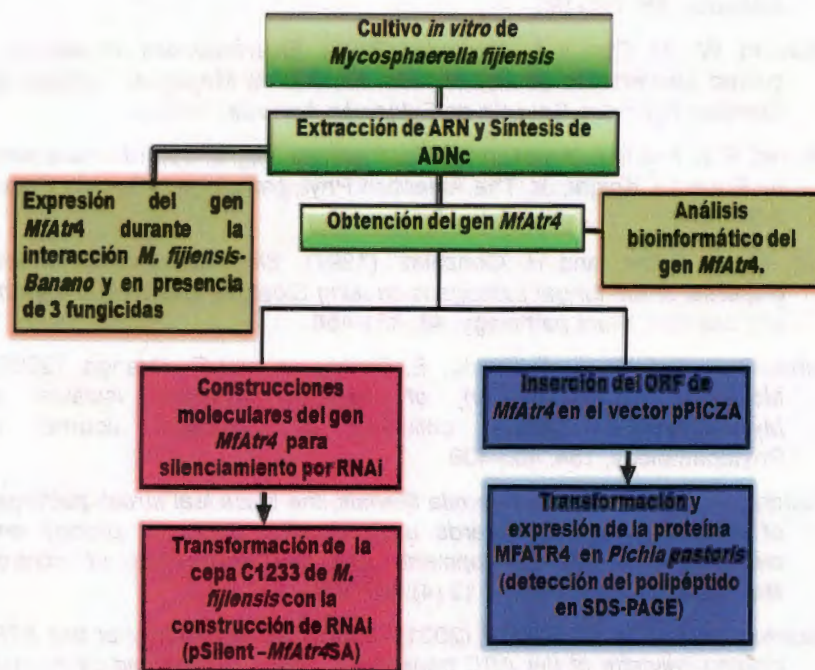
1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar al gen *MfAtr4* de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

1.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Clonar el gen *MfAtr4* de *M. fijiensis* a partir de RNA total del hongo.
2. Obtener el marco de lectura completo de *MfAtr4* de *M. fijiensis*.
3. Identificar los dominios estructurales de la proteína MfATR4 de *M. fijiensis in silico*.
4. Realizar un análisis filogenético para determinar la relación del gen *MfAtr4* con otros transportadores ABCs de hongos.
5. Analizar la expresión del gen *MfAtr4* durante la interacción *M. fijiensis*-banano y en presencia de tres fungicidas.
6. Construir el vector pSilent-*MfAtr4*SA y transformar a *M. fijiensis* con dicho vector.
7. Expresar la proteína MFATR4 en *Pichia pastoris* y purificar la proteína recombinante.

1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



1.5 REFERENCIAS

- Altenberg, G. (2003). *The engine of ABC proteins*. News in Physiological Sciences, 18: 191-195.
- Alvarado, W., M. Díaz y A. Alvarado. (2001). *Enfermedades de plátano y guineo*. Universidad de Puerto Rico. Recinto de Mayaguez. Colegio de Ciencias Agrícolas-Servicio de Extensión Agrícola, 1-13pp.
- Bennett, R.S. and P.A. Arneson (2003). *Sigatoka Negra*. Spanish translation by Robert J. Knight, Jr. The American Phytopathological Society Press. 1-6.
- Burt, P., J. Rutter, and H. González. (1997). *Short distance windborne dispersal of the fungal pathogens causing Sigatoka diseases in banana and plantain*. Plant pathology, 46: 451-458.
- Cañas-Gutierrez, G., L. F Patiño, E. Rodriguez and R. Arango. (2006). *Molecular characterization of benomil resistant isolates of Mycosphaerella fijiensis, collected in Colombia*. Journal of Phytopathology, 154: 403-409.
- Churchill, A. (2010). *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.
- Daumke, O. and M. R. Knittler (2001). *Functional asymmetry of the ATP-binding-cassette of the ABC transporter TAP is determined by intrinsic properties of the nucleotide binding domains*. European Journal of Biochemistry, 268: 4776-4786.
- Dawson, R., K. Hollenstein and K. Locher (2007). *Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporter suggest a common mechanism*. Molecular Microbiology, 65 (2): 250-257.
- De Waard, M., A. Andrade, K. Hayashi, H. Schoonbeek, I. Stergiopoulos and L. Zwier. (2006). *Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence*. Pest Management Science, 62: 195-207.
- Douglas, M. and R. Ronald. 1992. *El combate de la Sigatoka negra*. Boletín No. 4. Departamento de investigaciones. CORBANA. p22.
- Duffy, B., A. Schouten and J. Raaijmakers (2003). *Pathogen self defense: mechanisms to counteract microbial antagonism*. Annual Reviews of Phytopathology, 41: 501-538.

- Jones P.M. and A.M. George (2004). *The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research*. Cellular and Molecular Life Sciences, 61: 682-699.
- Kovalchuk, A. and A. Driessen. (2010). *Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters*. BMC Genomics, 11-177
- Leach, R. (1964). *A new form of banana leaf spot in Fiji, black leaf streak*. In world crops. p 60-64.
- Lepoivire, P., JP. Busogoro, J.J. Etame, J. Carlier, G. Harelimana, X. Mourichon, B. Panis, AS. Riveros, G. Salle, H. Strosse and R. Swennen. (2003). *Banana Mycosphaerella fijiensis interaction*. 2° Internacional workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José Costa Rica. pp. 151-159.
- Lu, G., Westbrooks J., Davidson A. and Chen J. (2005). *ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation*. Proceedings of the National Academic of Sciences, 102 (50): 17969-17974.
- Manzo-Sánchez, G., S. Guzmán-González, C. Rodríguez-García, A. James y Orozco Santos M. (2005). *Biología de Mycosphaerella fijiensis Morelet y su interacción con Musa spp.* Revista Mexicana de Fitopatología, 23(1): 87-96.
- Marín, D.H., R.A. Romero, M. Guzmán and T.B. Sutton (2003). *Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation*. Plant Disease, 87 (3): 208-222.
- Martinoia, E., M. Klein, M. Geisler, L. Bovel, C. Fosertier, U. Kolukisaoglu, R. Muller and B. Schulz (2002). *Multifunctionality of plant ABC transporter- more than just detoxifiers*. Planta, 214: 354-355.
- Nikaido, H. (2002), *“¿How are the ABC transporters energized?”*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 23, 9609-9610
- Oswald, C., LB. Hollan and Schmitt M. (2006). *The motor domains of ABC transporter. What can structures tell us?*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 372: 385-399.
- Orozco- Santos, M. (1998). *Manejo integrado de la Sigatoka negra del plátano*. SAGAR, INIFAP, CIPAC. Campo experimental Tecomán, Colima, México. Folleto técnico N.º 1 División Agrícola 95p
- Orozco-Santos, M., J. Farías-Larios, G. Manzo-Sánchez y Gúzman-González. S, 2001. *La Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis*

- Fleibner, A., C. Sopalla and K. Weltring (2002). *An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of Gibberella pulvicaris to phytoalexins and virulence on potato tubers*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 15 (2): 102-108.
- Gaur, M., D. Choudhury and R. Prasad. (2005). *Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, Candida albicans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2005, 9:3-15.
- Gupta, A. and B. Chatoor (2007). *Functional analysis of a novel transporter ABC4 from Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters* 278: 22-28.
- Hayashi, K., H. Schoonbeek and M. De Waard. (2002). *Bcmfs1, a novel major facilitator superfamily transporter from Botrytis cinerea, provides tolerance towards the natural toxic compounds camptothecin and cercosporin and towards fungicides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (10): 4996–5004
- Hidalgo, M., A. Tapia, W. Rodríguez, y E. Serrano (2006). *Efecto de la Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar de banano (Musa sp. AAA cv Valery)*. *Agronomía Costarricense*, 30 (1): 35-41.
- Higgins, C.F. (1992). *ABC transporter: from microorganism to man*. *Annual Review of Cell Biology*, 8: 67-113.
- Holger, D., S. Reiman, and S. Pascholati. (2008). *Mechanism and significance of fungicide resistance*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 286-295.
- Linton, K. J. and C. F. Higgins. (2002). *P-glycoprotein misfolds in Escherichia coli: evidence against alternating-topology models of the transport cycle*. *Molecular Membrane Biology*. 19 (1): 51-58.
- Jones P.M. and A.M. George. (1999). *Subunits interactions in ABC transporter: toward a functional or architecture*. *FEMS Microbiology Letters*, 179(2): 187-202
- Jones P.M. and A.M. George (2002). *Mechanism of ABC transporter: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide binding subunit*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 99 (2): 12639-12644.

- Morelet*) in México. Infomusa, La revista internacional sobre banano et plátano. 10 (1): 33p
- Paumi, C M., C. Matthew, Jamie Snider, Igor Stagljari, and Susan M. (2009). *ABC Transporters in Saccharomyces cerevisiae and their Interactors: New Technology Advances the Biology of the ABCC (MRP) Subfamily*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 73(4): 577–593.
- Pérez, V. (2006). *Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra en bananos: estado actual y perspectivas*. Fitosanidad, 10 (1):56-72.
- Pizeta, S., M. Mozart, M. Goldman and G. Goldman. (2002). *Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter Atr genes in Aspergillus nidulans by real-time reverse transcription-PCR assay*. Applied and Environmental Microbiology, 68 (3): 1351–1357.
- Prasad, R., M. Sharme and M. Rawal. (2011). *Functionally relevant residues of Cdrp1: A multidrug ABC transporter of human pathogenic Candida albicans*. Journal of aminoacid, Article ID531412, 12 pages, 2011.doi:104061/2011/531412.
- Saurin, W., M. Hofnung and E. Dassa (1999). *Getting In or Out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters*. Journal of Molecular Evolution, 48: 22-41.
- Schmitt, L. and R. Tampe (2002). *Structure and mechanism of ABC transporters*. Current Opinion in Structural Biology, 12: 754-760.
- Senior, M., A. Shawi and W. Bastch. (1995). *The catalytic cycle of P-glycoprotein*. FEBS Letters, 377: 285-289.
- Schoonbeek, H., Del Sorbo G. and De Waard M. (2001). *The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of Botrytis cinerea to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil*. Molecular Plant Microbe Interaction, 14 (4): 562-571.
- Skov, J., M. Lemmens and H. Giese. (2004). *Role of Fusarium culmorum ABC transporter (FcABC1) during infection of wheat and barley*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 64: 245–254.
- Stergiopoulos, I., L. Zwier and M. De Waard (2003). *The ABC Transporter MgAtr4 is a virulence factor of Mycosphaerella graminicola that affects colonization of substomatal cavities in wheat leaves*. Molecular Plant Microbe Interaction, 16(8): 689-698.

- Stergiopoulos, I., M. Groenewald, M. Staats, P. Lindhout, P. Cerous. and J. Pierre. (2007). *Mating-type genes and the genetic structure of a world-wide collection of the tomato pathogen Cladosporium fulvum*. Fungal Genetics and Biology, 44: 415-429.
- Stover, R. H. (1990). *Sigatoka leaf spot: thirty years of changing control strategies: 1959-1989.*, 66-74p. In *Sigatoka leaf spot diseases of banana*: Proceeding of an international workshop held at San José, Costa Rica, Marzo 28–Abril 1 28. INIBAP. Montpellier, France.
- Tam, R. and Saier M.H. (1993). *Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria*. Microbiological Reviews, 57: 320–346.
- Urban, M., T. Bhargava and J. E. Hamer (1999). *An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease*. The Embo Journal, 18(3): 512-521.
- Van der Does, C. and R. Tampe (2004). *How do ABC transporter drive transport?* Biological Chemistry, 385: 927-933.
- Valerio, R., H. Lindorf and E. de García (2002). *Anatomía foliar comparada de ocho cultivares de banano con relación a la resistencia o susceptibilidad a la Sigatoka (amarilla y negra)*. Agronomía Tropical, 52: 507-521.
- Vermeulen, T., H. Schoonbeek and M. De Waard. (2001). *The ABC transporter BcatrB from Botrytis cinerea is a determinant of the activity of the phenylpyrrole fungicide fludioxonil*. Pest Management Science, 57 (5): 393-402.
- www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2006/junio/B155
- www.redbio.org/rdominicana/redbio2004rd/Memoria_redbio_2004/simposios

Capítulo II

Title: Cloning, *in silico* structural characterization and expression analysis of *MfAtr4*, an ABC transporter from the banana-pathogen *Mycosphaerella fijiensis*

Authors: Y. Couch-Uicab¹, I. Islas-Flores^{1*}, N. Kantún-Moreno², L.-H. Zwiers³, M. Tzeç-Simá², S. Peraza-Echeverría², L. Brito-Argáez¹, L. Peraza-Echeverría², R. ²Grijalva-Arango², A. James², C. Rodríguez-García², and B. Canto-Canché²

Address: ¹Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, ²Unidad de Biotecnología; Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200, Mérida, Yucatán, México. ³CBS-KNAW, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.

Accepted for its publication in the African Journal of Biotechnology (2011).

ABSTRACT

ABC transporters are membrane proteins that use the energy released from the hydrolysis of ATP to drive the transport of compounds across biological membranes. In some plant pathogenic fungi ABC transporters play a role as virulence factors by mediating the export of plant defense compounds or fungal virulence factors. *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black Sigatoka disease in banana, is the main constraint for the banana industry worldwide. So far little is known about molecular mechanism which it uses to infect the host. In this study, degenerated primers designed from fungal ABC transporters known to be involved in virulence were used to isolate homologs from *M. fijiensis*. Here we report the full cloning of *MfAtr4* a putative ortholog of *MgAtr4* an ABC transporter of the related *M. graminicola* with a function in virulence. Similarities and differences with its presumed ortholog *MgAtr4* are described, and the putative function of *MfAtr4* is discussed. Analysis of *MfAtr4* gene expression in field banana samples exhibiting visible symptoms of black Sigatoka disease indicated a higher expression of *MfAtr4* during the first symptomatic stages in comparison to the late necrotrophic phases, suggesting a role for *MfAtr4* in the early stages of pathogenic development of *Mycosphaerella fijiensis*.

Key words: ABC transporters, virulence factors, *MgAtr4* ortholog, *Mycosphaerella fijiensis*, black Sigatoka, *Musa* sp.

2.1 INTRODUCTION

The ATP-binding cassette (ABC) protein family constitutes one of the largest and ancient protein families. Currently, more than 10,000 members are known and it is expected that this number increases as new genome sequences become available (Kovalchuk and Driessen 2010). ABC proteins are present in all organisms, from archaea to higher eukaryotes (Davidson and Maloney 2007). Most of the ABC proteins characterized are classified as transmembrane proteins involved in the active transport of a broad range of substrates across biological membranes (Higgins 1992; Laleh *et al.* 2008). However, to a lesser extent, some ABC proteins act as ion channels or receptors or are involved in ribosome biogenesis (Kovalchuk and Driessen 2010).

Based upon the topology and ordering of specific domains normally present within ABC transporters they can be divided in several subfamilies (ABC-A to ABC-H; Jie *et al.* 2010)

The structure of typical ABC transporters consists of four core domains, two transmembrane domains (TMDs) and two nucleotide-binding domains (NBDs). The domains TMD-NBD may be expressed as TMD-NBD in separate polypeptide chains or alternatively, as TMD₂-NBD₂ in multidomain proteins. Based upon the number of TMD-NBD domains inside polypeptides two arrangements are common for eukaryotic ABC transporters. The functional unit is either composed of two "half transporters", each containing its own TMD and NBD, or consists of one large polypeptide chain ("full transporters") that includes all four domains (Del Sorbo *et al.* 2000; Kovalchuk and Driessen 2010). ABC proteins containing the NBD but lacking TMDs are generally not involved in membrane transport (Kovalchuk and Driessen 2010).

In fungi, the most common ABC transporters are the so-called full-size ABC transporters, in which all domains are contained in one polypeptide chain (Del Sorbo *et al.* 2000) The best characterized examples either belong to the ABC-A (multidrug resistance, MDR) or ABC-G (pleiotropic drug resistance, PDR) protein subfamilies. At the structural level, members of the ABC-A MDR subfamily exhibit the characteristic (TMD₆-NBD)₂ topology, while members of the ABC-G PDR subfamily exhibit the reverse topology (NBD-TMD₆)₂. The TMD impart ligand specificity and the NBDs are responsible for binding and hydrolysis of ATP needed to drive the transport of the substrate against a concentration gradient (Kenneth 2007).

Fungal ABC transporters play key roles in many cell vital processes including toxin detoxification, secretion of mating peptides and the transport of a broad variety of substrates ranging from simple ions to complex

polypeptides (Jones and George 2004). These proteins can act as biological export machines (Stergiopoulos *et al.* 2002; De Waard *et al.* 2006) providing protection against endogenously produced toxic compounds, (e.g., secondary metabolites such as mycotoxins) and against exogenous toxic compounds from natural or man-made origin (e.g. fungicides, antibiotics, and plant defense compounds), by preventing their cytoplasmic accumulation (De Waard *et al.* 2006; Coleman and Mylonakis 2009).

ABC transporters can be involved in providing protection against fungicides. Characteristic for the involvement of ABC transporters in fungicide resistance is the development of multidrug resistance (MDR). MDR is the simultaneous development of resistance to structurally and functionally unrelated compounds. This phenomenon has originally been described in medicine where it is of great clinical significance. Since the early 1990's it was established that an active efflux-mechanism based on the ABC1 (Pgp1 glycoprotein) was preventing the adequate intracellular accumulation of anticancer drugs inside cancerous cells (Gottesman *et al.* 2002; Szakacs *et al.* 2006; Nikaido 2009; Kuo *et al.* 2010).

Nowadays MDR has also been widely described in filamentous fungi both of agricultural and medical relevance. AtrB of *Aspergillus nidulans* mediates resistance to camptothecin and resveratrol, natural toxic metabolites, but additionally AtrB confers resistance to all major classes of fungicides (Andrade *et al.* 2000). In *Botrytis cinerea*, a fungal pathogen with a broad host range, the ABC transporter BcatrB is upregulated by resveratrol, a grapevine phytoalexin, and also the fungicide fenpiclonil (Schoonbeek *et al.* 2001). ABC transporters from the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* have substrates ranging from fungicides, plant secondary metabolites, bacterial antibiotics and fungal mycotoxins (Zwierns *et al.* 2003). It has been found that in various fungal pathogens ABC transporters can play a role in pathogenesis (Kretschmer *et al.* 2009). The first report was about *Magnaporthe grisea* in which the ABC1 gene, encoding an ABC transporter, was identified in a screening of pathogenicity mutants derived by insertional mutagenesis. Gene-replacement mutants of the ABC1 gene produced a mutant that was arrested in growth early in pathogenesis and unable to detoxify the rice-produced sakuranetin phytoalexin (Urban *et al.* 1999). Since this report several papers have correlated the disruption or deletion of particular ABC transporters (especially belonging to the ABC-G subfamily) with a decrease in aggressiveness or loss of pathogenicity. Virulence-related ABC transporters have been described in *Botrytis cinerea* (Schoonbeek *et al.* 2001), the necrotrophic fungus *Gibberella pulicaris* (Fleibner *et al.* 2002), the human pathogen *Candida albicans* (Theiss *et al.* 2002), the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* (Stergiopoulos *et al.* 2003) and the causal agent of cereal blight and rot *Fusarium culmorum* (Skov *et al.* 2004). Recently, Gupta and Chattoo (2008) reported a second ABC transporter (called ABC4) required for pathogenesis in *M. grisea*. Both

virulence-associated ABC transporters, ABC1 and ABC4, are required during early steps in pathogenesis. *Abc1* mutants formed appressoria that failed to elaborate extensive infection hyphae, while *abc4* mutants were defective in appressoria formation. However, it can not be ruled out that both transporters have a partial overlap in function. All these findings clearly show that fungal ABC transporters can be involved in pathogenesis and it is possible that multiple members of this large family could be involved in host-fungal interaction in the same species.

Mycosphaerella fijiensis, a hemibiotrophic pathogen, causes the disease known as black Sigatoka, the most important threat for the banana and plantain industry worldwide (Fahleson *et al.* 2009; Vásquez *et al.* 2009; Abiala *et al.* 2010). The fungus affects leaf tissues causing a reduction of photosynthetic area, which leads to premature fruit ripening, and loss of production. The methods being used to control *M. fijiensis* (chemical control, cultural practices) have failed or are inefficient (Romero and Sutton 1998; Amil *et al.* 2007; Orozco *et al.* 2008). Rapid acquisition of resistance to strobilurin (Qo respiration inhibitors) and benzimidazole (interfering with mitosis) fungicides has occurred (Sierotzki *et al.* 2000; Albertini *et al.* 1999; Cañaz-Gutiérrez *et al.* 2006). In both cases the resistance is the result from a single change at the nucleotide level of target genes. Very little is still known about *M. fijiensis* pathogenicity or virulence factors. We hypothesize that ABC transporters are involved in the virulence of this fungus. Therefore we set out an *in silico* strategy to identify putative virulence related ABC transporters in this important pathogen on the basis of homology (Igarashi *et al.* 2004; Piehler *et al.* 2008; Seret *et al.* 2009; Sturm *et al.* 2009). The closest related fungus with the same infection strategy as *M. fijiensis* in which a virulence-related ABC transporter has been identified is *M. graminicola*, a hemibiotrophic pathogen of wheat. Seven ABC transporters denominated *MgAtr1* to *MgAtr7* have been described in this fungus. Besides *MgAtr7* which is involved in the maintenance of iron homeostasis (Zwiers *et al.* 2007), most of them play a role in providing protection against toxic compounds. A role in pathogenicity has only been attributed to *MgAtr4*. The expression of *MgAtr4* occurs concomitantly with the development of necrotic lesions in infected wheat leaves and *MgAtr4* disruption mutants displayed reduced intercellular growth and an impaired capacity to colonize substomatal cavities (Stergiopoulos *et al.* 2003). Here we report the full cloning of the putative *MgAtr4* homolog in *M. fijiensis*, the sequence characterization of *MfAtr4* and the analysis of its expression in naturally infected banana leaves with different degrees of black Sigatoka disease. This study is a first step in improving our understanding of the pathogenicity of *M. fijiensis* on banana.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 BIOLOGICAL MATERIAL

Mycosphaerella fijiensis strain C1233 was grown on modified solid V8 medium according to Mourichon *et al.* (1987). Briefly, 200 mL V8 juice were added to 2 g/L CaCO₃ and 2% agar-agar, autoclaved, and placed on Petri dishes. Individual plates were inoculated with 16 mm² mycelium, and left to grow at 26 ± 2°C, with a 12 h light/12 h dark photoperiod. Liquid V8 culture medium was prepared by the same procedure but without agar. The liquid medium was inoculated with 0.5 mL of *M. fijiensis* mortar and pestle disaggregated mycelium (1 g mycelium from an active culture disaggregated in 5 mL sterile water), using the same temperature and light conditions stated previously. For DNA extraction, mycelium was harvested after 15 days of culture, filtered through two pieces of fine cheesecloth, weighed, and distributed in portions of 0.3 g mycelium and immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until DNA extraction.

2.2.2 DNA EXTRACTION

Genomic DNA extraction was carried out according to Johanson (1997). DNA concentration in samples was determined using a spectrophotometer (Genesys 10 UV).

2.2.2.1 MFATR4 CLONING

To improve the chance to obtain an ortholog of *MgAtr4* from *M. fijiensis* a two- step strategy was followed. First the *MgAtr4* protein (AAK15314) was analyzed for the presence of particular specific motifs by comparison with the other known ABC-G transporters from *M. graminicola*; *MgAtr1* (CAB46279), *MgAtr2* (CAB46280), *MgAtr3* (AAK62341), *MgAtr5* (AAK62340) and *MgAtr7* (EF062310); this strategy successfully identified amino acids characteristic for *MgAtr4* (Supplement 1). Furthermore, to prevent the selection of motifs unique for *M. graminicola*, *MgAtr4* and the other *MgAtrs* were aligned with ABC transporter proteins from fungal plant and human pathogen species: CAC40023 (*Gibberella pulicaris*; *Sordariomycete*), T30541 (*Magnaporthe grisea*; *Sordariomycete*), CAD10327 (*Aspergillus fumigatus*; *Eurotiomycete*), CAF32148 (*Aspergillus fumigatus*; *Eurotiomycete*), CAC42218 (*Emericella nidulans*; *Eurotiomycete*), CAC41639 (*Botryotinia fuckeliana*; *Leotiomycete*), AAF05069 (*Candida glabrata*; *Saccharomycotina*), O74676 (*Candida glabrata*; *Saccharomycotina*), P43071 (*Candida albicans*; *Saccharomycotina*), BAC67160 (*Botryotinia fuckeliana*; *Leotiomycete*), AAN28699 (*Trichophyton rubrum*; *Eurotiomycete*), AAK62810 (*Venturia inaequalis*; *Dothideomycete*)

and CAA93140 (*Emericella nidulans*; *Eurotiomycete*); a phylogenetic tree was made using MEGA 4.0 (supplemental material 2). In a second step, a third alignment was developed with sequences of ABC transporters clustering in the same clade with *MgAtr4* protein (AAN28699, AAK62810, BAC67160 and CAA93140).

Motifs identified in the first multi-alignment were manually searched in the last one. Degenerated primers were designed on motifs (mentioned from amino to carboxyl ends) EVDKHFP (forward 1; 320 degenerancies), and AFYHPATE (reverse 1; 2728 degenerancies), TFSTAENVLV (forward 2; 2180 degenerancies) and FAHMCIAA (reverse 2; 136 degenerancies). Nucleotide sequences of primers are given in Table 1. Amplification was performed by standard polymerase chain reaction (PCR) in 25 μ L final volume containing 2 μ M of each one of the degenerated primers, 0.2 μ M of each dNTP, 0.2 mM $MgCl_2$, 25 ng of *M. fijiensis* genomic DNA and 1 μ L (10 U) Taq DNA polymerase (Invitrogen). PCR cycle conditions were; 4 min of 95°C; followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 40 s, and 72°C for 1.2 min; and a final elongation at 72°C for 10 min. The PCR products were analyzed on 1% agarose gel electrophoresis and photographs were taken in a UV-Gel DOC photodocumentation system (Bio Rad). The 1 Kb DNA ladder (Invitrogen) was used as reference for size.

The amplicon was cloned in the pGEM-Teasy vector (Promega) according to the manufacturer instructions, transferred into *E. coli* and then sequenced.

During our research the full genome sequence of *M. fijiensis* (JGI, <http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=Mycf1&advanced=1/>) became publicly available and we benefitted from this by using the cloned sequence as query to retrieve the full genomic DNA sequence.

Specific primers (ORF-MfAtr4-5', ORF-MfAtr4-3', Table 1) were designed on basis of the downloaded genomic sequence. The complete ORF was amplified by long distance-PCR using similar PCR mixture as above but using 5 U Gotaq DNA polymerase (Promega). PCR was performed as above but extension step was for 5.2 min at 72°C each cycle. The PCR product was ligated into pGEM®-T Easy Vector (PROMEGA) and sequenced.

Table 1. List of primers used in this study.

Primer name	Type	Sequence (5' - 3')	Observation
dAtr4-F1	Degenerated	CARGARGTIGAYAARCA YTTYCC	
dAtr4-R1	Degenerated	CIGTIGCIGGRTGRTARAAIGC	dAtr4-F1 + dAtr4-R1 Expected the amplification of a <i>MfAtr4</i> fragment
dAtr4-F2	Degenerated	GTITTYMGIMGIGGICAYGTICC	
dAtr4-R2	Degenerated	ATIGCIGCIA ^T RCACATRTGIGC	dAtr4-F2 + dAtr4-R2 Expected the amplification of a <i>MfAtr4</i> fragment
ORF-MfAtr4-5'	Specific	GCCACCATGTCGTCAACGGACAA GGAC	
ORF-MfAtr4-3'	Specific	CTAAATGATCTGGGCATTCTCCT ATTC	ORF-MfAtr4-5' + ORF- MfAtr4-3' Amplification of complete <i>MfAtr4</i> ORF (from ATG to TGA)
IFAtr4	Specific	TACGGCTACACATACGATCATG	
IRAtr4	Specific	AAGGAAAGCACAGATAGACCAAG	IFAtr4 + IRAtr4, primers flanking the putative intron
MfAtr4267F	Specific	GGTCTTCTCTACGATCGTGACG	
MfAtr4267R	Specific	GAAGGTCGATGCATAGATCAAGA AG	Specific primers to amplify a 267 bp fragment of <i>M.</i> <i>fijiensis</i> <i>MfAtr4</i> gene
MfAct247F	Specific	CATCACCATTGGCAACGAGC	
MfAct247R	Specific	GATCTTGACCTTCATGCTGG	Specific primers to amplify a 247 bp fragment of <i>M.</i> <i>fijiensis</i> actin gene
Mac267F	Specific	CTGCTGGTATCCATGAGACC	
Mac267R	Specific	CCTTGAGATCCACATCTGC	Specific primers to amplify a 267 bp fragment of <i>M.</i> <i>acuminata</i> actin gene

2.2.3 DETERMINATION OF INTRON EXON BOUNDARIES

RNA from *M. fijiensis* was obtained according to Islas-Flores (2006) and cDNA synthesis was conducted using SuperScript III (Invitrogen) according to supplier's instructions. Primers IFAtr4 and IRAtr4 (Table 1) flanking the putative intron were used to amplify a fragment of *MfAtr4*, using *M. fijiensis*

gDNA and cDNA as templates. Resulting PCR amplified cDNA or DNA product was ligated into pGEM®-T Easy Vector (PROMEGA) and then sequenced.

2.2.4 SOFTWARE AND WEBSITES FOR BIOINFORMATICS ANALYSIS

Tools to analyze protein structure were used directly in the ExPASy Server (Expert Protein Analysis System), proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) (<http://www.expasy.org>). The Prosite (Bairoch 1991) was used to determine the Nucleotide Binding Domains (NBDs), TMHMM and SOSUI program (<http://www.expasy.org>) were used to predict the Transmembrane Domains (TMD's). Topology prediction was carried out in the PredictProtein website (<http://www.predictprotein.org>).

Fungal ABC PDRs were retrieved by multiple blastp searches against the National Center for Biotechnology Information website and using the *M. graminicola* ABC transporters (ATRs) as queries.

Phylogenetic analysis was performed with the program package MEGA4 (Tamura *et al.* 2007) using neighbor-joining algorithm and bootstrapping with 500 replicates. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. In the last phylogenetic analysis, all virulence-associated ABC proteins identified so far were included, independently of the ABC family to which they belong; accession numbers are indicated in the figures.

The percent amino acid identity and amino acid similarity between *MfAtr4* and *MgAtr4* sequences were calculated by pairwise analyses using the Matrix Global Alignment Tool (MatGAT) v.2.01 (Campanella *et al.* 2003), and comparing complete sequences or particular domains.

2.2.5 RT-PCR and *MfAtr4* expression analysis at different stages of the interaction *M. fijiensis*-*Musa acuminata* cv Grande Naine.

Banana plants (*Musa acuminata* cv. Grande naine) naturally infected with *M. fijiensis* were collected in an experimental banana plantation located at Uxmal, Yucatan, Mexico. The plant material was cotton-cleaned using 70% ethanol, leaf areas showing stages I, II, III, IV and V of Sigatoka disease were excised with sterile knife and immediately stored in liquid nitrogen and transported to the laboratory. Different stages of the disease were selected according to Fouré (1985). Total RNA was obtained using the Concert™ reagent (Invitrogen) according to the instructions of the manufacturer (0.25 g leave tissues/1.5 mL reagent). Total RNA samples (5 µg/10 µL) were

independently DNase I (Sigma) treated for 30 min at room temperature. RNA samples were ethanol precipitated, air dried by 5 min and resuspended in bidistilled sterile RNase-free water (10 μ L). Of each RNA sample 2 μ g was used as template for cDNA synthesis using the SuperScript III RT-PCR kit (Invitrogen), according to instructions of the manufacturer. Subsequently, 500 ng of cDNA was used independently for RT-PCR, with primers to amplify fragments of the *M. fijiensis* genes, *MfAtr4* (amplicon 267 bp) and actin (247 bp), and the *M. acuminata* actin (267 bp) (sequences of primers in supplemental Table 1). As negative control uninfected banana were included. The result is representative of at least three independent experiments.

2.3 RESULTS

2.3.1 CLONING AND *IN SILICO* CHARACTERIZATION OF *MfAtr4*

The degenerated PCR amplification yielded few unspecific bands but also a ~1095 bp amplicon (Fig. 1a) which was purified and cloning. Two clones were picked and 940 pb sequenced; both clones yielded an identical sequence (Fig. 1b). tBlastx analysis using the sequence of the 940 bp DNA fragment as query against the NCBI database gave highest hit with *MgAtr4* ($E = 2e^{-124}$, showing amino acid 73% identity and 82% amino acid similarity).

Upon the availability of the whole genome sequence of *M. fijiensis* the 940 bp nucleotide sequence was also used to query the whole genome sequence of *M. fijiensis* by BLASTN, this resulted in one hit with a gene with local 98% homology with the query. This gene was annotated as *MfAtr4*. Pairwise comparison of the deduced full amino acid sequences of *MfAtr4* and *MgAtr4* results in 73% identity and 82% similarity. Furthermore, *in silico* PCR with these degenerate primers and annotated ABC-G genes in the *M. fijiensis* genome predict only short amplicons (51-104 nt; data not shown), thus validating our approach.

MfAtr4 was amplified from the deduced translational start to translational stop (ATG to TAG), this resulted in an amplicon of 4977 nucleotides which was fully sequenced twice in two independent clones to rule out possible PCR or sequencing errors. Comparison of the *MfAtr4* nucleotide sequence obtained in this study (*M. fijiensis* strain C1233) to the sequence from the *M. fijiensis* genome portal (isolate CIRAD86) indicated 99.1% identity. Most changes are silent. A comparison on protein level between the *MfAtr4* from isolate C1233 and from CIRAD86 indicated that the predicted proteins

exhibited a 99.8% similarity and a 99.7 % identity. In general, changes were synonymous, *i. e.* glutamine to histidine at the C-terminal end, alanine to valine in NBD1, isoleucine to alanine in TMS2 and lysine to arginine in NBD2-TMS7 linker.

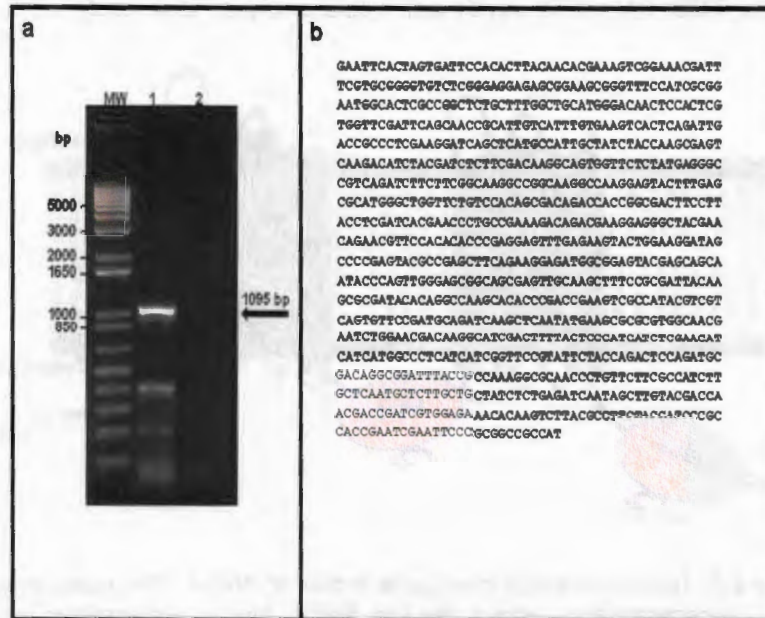


Figure 2.1. *MfAtr4* genomic fragment amplified by degenerated PCR. (A) PCR product separated on a 1% agarose gel. The arrow indicates the DNA band with the expected size, which was purified from gel and cloning for sequencing. (B) The nucleotide sequence obtained for two independent clones.

2.3.2 FEATURES OF *MfAtr4*

The predicted *MfAtr4* structure consists of two hydrophilic nucleotide binding domains (NBDs) located at the cytoplasmic surface, and two transmembrane domains (TMDs). Within each of the putative TMD (amino acid residues 613-880 and 1279-1566) six membrane-spanning segments (TMS) are predicted. The amino and carboxyl ends of the protein are oriented toward the cytoplasm (Fig. 2). Four small intracellular loops are predicted (ICLs), ICL1 (25 amino acids), ICL2 (8 amino acids), ICL3 (32

amino acids) and ICL4 (13 amino acid) and all them inside of the cell. On the extracellular side *MfAtr4* has four small extracellular loops (ECLs), ECL1 (5 amino acids), ECL2 (11 amino acids), ECL4 (10 amino acids), and ECL5 (5 amino acids), and two large ECLs (ECL3, between TMS5/6, and ECL6, between TMS11/12) of 77 and 91 amino acid residues, respectively.

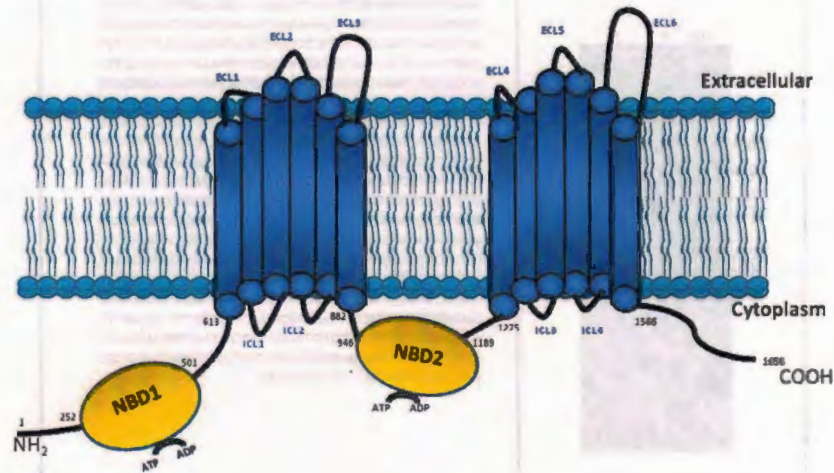


Figure 2.2. Two-dimensional topological model of *MfAtr4*. The model shows the 12 transmembrane helices, the two NBDs, the six extracellular loops (ECL 1–6) and the four intracellular loops (ICL 1–4), with amino and carboxy terminal ends and NBD motifs oriented toward cytoplasm. SOSUI website was used to deduce structure and PredictProtein website for topology. Number of first and last amino acids in each NBD and TMD are indicated.

The amino terminal Walker A and Walker B motifs of *MfAtr4* (GRPGSGCST and LAAWDNSTRGLD) are degenerated when compared to the canonical motifs (Walker A: GXXGXGKS/T, Walker B: $\phi\phi\phi\phi$ D, where ϕ is any hydrophobic amino acid), (Walker *et al.* 1982). The conserved lysine in the Walker A motif is replaced in *MfAtr4* by a cysteine amino acid (Fig. 3). Walker motifs are flanking the ABC signature motif of *MfAtr4*, sequence GVSGGERKRVSIAEMA (canonical sequence is LSGGQ).

The Walker A motif of the C-terminal NBD of *MfAtr4* (GTSGAGKT) contains the canonical lysine; the Walker B sequence is LLFLDEPTSGLD and the second signature ABC sequence LNVEQRKLLTIGVELAA (Fig. 3).

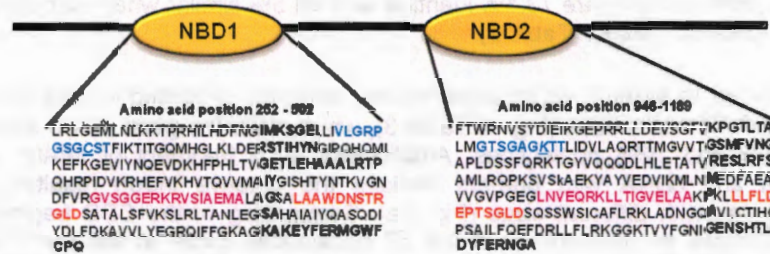


Figure 2.3. *Prosite* program identification of the two NBD domains in *MfAtr4*. NBDs were located 252-502 and 846-1189 residues downstream to the amino terminal end. Sequences of Walker A, Walker B and the signature sequence in each NBD domain are indicated with blue, red and pink letters respectively. The cysteine amino acid in the Walker A in NBD1 and the equivalent position of lysine in NBD2 are indicated with cursive underlined letters.

2.3.3 *MfAtr4* CLASSIFICATION

MfAtr4 has the predicted NBD-TMS₆-NBD-TMS₆ topology (Fig. 2; Table 3). This topology is characteristic for the ABC-G transporter sub-family, in contrast to the reverse (TMS₆-NBD)₂ topology observed in the ABC-A, ABC-B (MDR), ABC-C (MRP) and ABC-D sub-families (Table 3; Kovalchuk and Driessen 2010). The predicted topology of *MfAtr4* corresponds to the topology of eukaryotic-type exporters (Igarashi *et al.* 2004; Cannon *et al.* 2009; Coleman and Mylonakis 2009).

2.3.4 COMPARATIVE ANALYSIS WITH *MgAtr4*

Comparison of the deduced *MfAtr4* protein with *MgAtr4* showed 63.2% identity and 74.4% similarity on amino acid level. Major differences between *MfAtr4* and *MgAtr4* proteins are at the N- (cytosolic stretch of amino acids before NBD1) and C- (cytosolic stretch of amino acids after TMS12) terminal ends. Both proteins are 73.1% identical and 84.5% similar when comparing from NBD1 to TMS12 (Table 2).

In contrast to *MgAtr4*, which jacks introns, *MfAtr4* is predicted to contain an intron of 52 nucleotides (Fig. 4; Table 3), which splits the gene in two exons of 2979 and 1998 nucleotides. Amplification of a fragment of *MfAtr4* on gDNA and cDNA with primers flanking the putative intron resulted in amplicons with different sizes (Fig. 4a). Sequencing of the CDS fragment corroborates the occurrence of the 52 nucleotides intron at the predicted position (Fig. 4b). Comparison of the sizes of *MfAtr4* PCR products amplified with different combinations of primer pairs, and using *M. fijiensis* gDNA and cDNA, excluded the presence of other introns in this gene (data not shown).

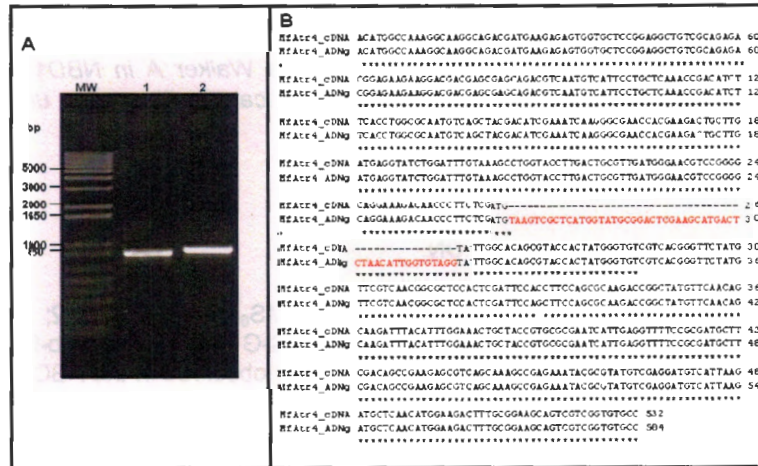


Figure 2.4. Presence of intronic sequence in *MfAtr4*. (A) Amplification of a fragment of *MfAtr4* with primers flanking the expected intron. Lane 2, amplicon obtained by using *M. fijiensis* cDNA as template; lane 3 using *M. fijiensis* gDNA as template. Lane 1, molecular markers. (B) Comparison of the nucleotide sequences obtained in each case. Red letters show nucleotides in gDNA which are absent in the cDNA.

2.3.5 PHYLOGENETIC RELATIONSHIP BETWEEN *MfAtr4* AND OTHER FUNGAL ABCs

All ABC transporters which cluster with *MfAtr4* belong to fungi in the Pezizomycotina subphylum. This group is separate from the ABC-G proteins in the Saccharomycotina subphylum's (i.e. *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *K. lactis*) and the Basidiomycetes phylum (i. e. *Ustilago maydis*, *Cryptococcus neoformans*, *Coprynopsis cinerea*). As expected, *MfAtr4* clusters in the same clade as the ABC transporters, initially used in the design of the degenerated primers (Fig. 5).

2.3.5.1 PHYLOGENETIC RELATIONSHIP BETWEEN *MfAtr4* AND OTHER ABCs INVOLVED IN VIRULENCE

Phylogenetic analysis of multiple ABC-G proteins from several fungi indicated that *MgAtr4* and *MfAtr4* cluster together and in a different clade than the other ABC transporters with a proven function in pathogenicity. Virulence-associated ABC transporters fall in three different PDR-(ABC-G) subgroups and one non ABC-G group. One ABC-G clade contains *MgAtr4* and *MfAtr4*, the second ABC-G cluster consists of ABC1 from *M. grisea*, ABC1 from *G. pullicaris* and ABC1 from *F. culmorum* and the third cluster contain *B. fuckeliana* BcAtrB. The non ABC-G group includes *C. albicans* MLT1 (a MRP ABC transporter) and *M. grisea* ABC4 (a MDR ABC transporter) and cluster separate from all the other virulence-associated ABC-G members (Fig. 5).

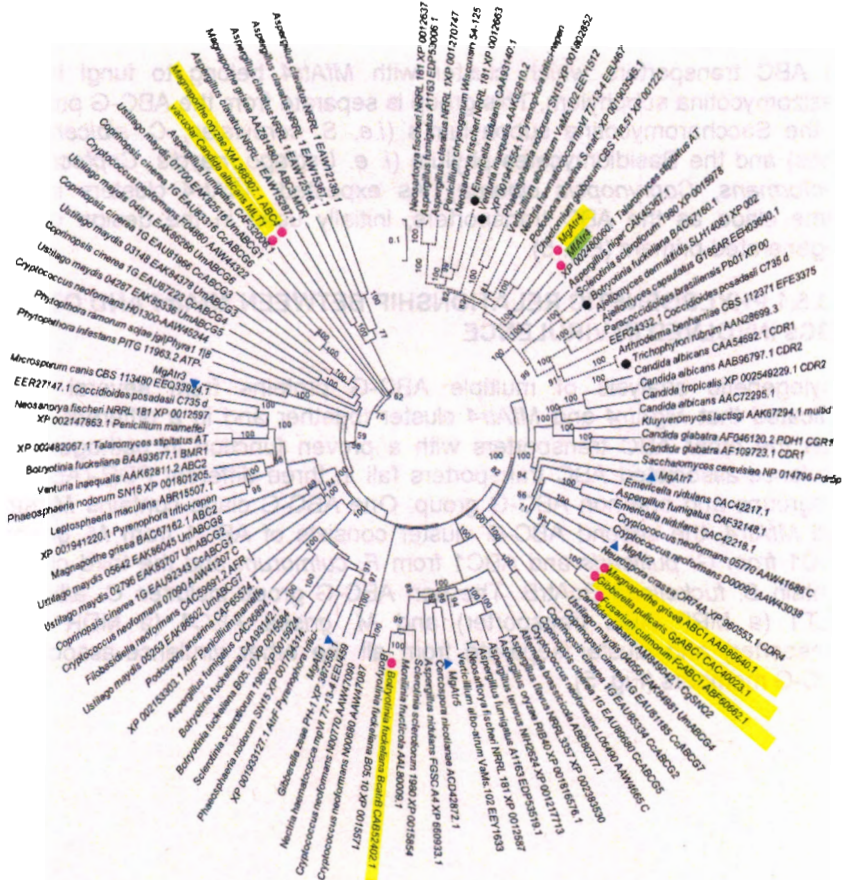


Figure 2.5. Phylogenetic tree of ABC transporters related to MfAtr4. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method with the MEGA program version 4. Numbers on the branches indicate the percentage of 500 bootstrap replications (only >50% are shown). GenBank accession numbers are given for each sequence, except for *M. graminicola* Atrs (MgAtr1-7) and MfAtr4. MgAtrs are highlighted with blue triangles. Virulence-associated ABC transporters are highlighted with pink circles and yellow labeled (MfAtr4 is highlighted in green). The clade clustering the MfAtr4 is indicated with dotted branches. The ABC transporters clustering with MgAtr4 in supplement 2 (tree which helped to design the degenerated primers to amplify the first fragment of MfAtr4) are highlighted with black circles.

2.3.6 ANALYSIS OF EXPRESSION OF *MfAtr4* IN BLACK SIGATOKA-INFECTED BANANA LEAVES

Symptomatic plant material showing visual stages I, II, III, IV and V of the Sigatoka disease was selected in the field and then each stage individually harvested for the analysis (Fig. 6, panel A). The actin genes from *M. fijiensis* and *M. acuminata* were used as reference genes (Fig. 6 panels C, D). *Mf*-actin expression was lower at stages I and II than in later stages (Fig. 6, panel C), which is congruent with the fungal biomass increment in the banana tissues with the disease progress (Arzanlou *et al.* 2007). RT-PCR revealed the expression of *MfAtr4* in banana infected material and its probable temporal regulation during the infection process (Fig. 6, panel B). Compared to the *Mf*-actin expression, *MfAtr4* expression was highest in the initial infection stages and decreased with the progress of the necrotrophic phase (stages III and later). The apparently complete absence of *MfAtr4* expression during the necrotrophic stage V was very striking and could definitely not be attributed to the absence of fungal biomass. Panel D shows the expression of the *M. acuminata* actin as reference gene.

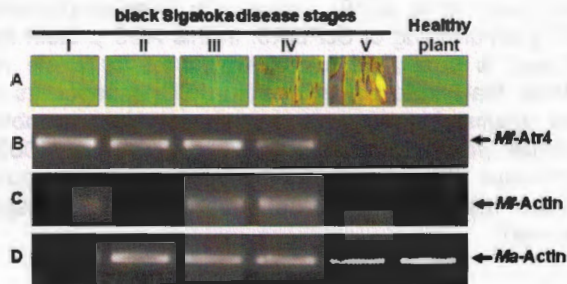


Figure 2.6. Analysis of expression of *MfAtr4* in field samples of *Musa acuminata* cv. Grande Naine with black-Sigatoka disease, at different stages. The photographs show the material used for this analysis (A). Reverse transcription–polymerase chain reactions (RT-PCR) of *MfAtr4* (B). RT-PCR of *M. fijiensis* actin, as reference fungal gene (C). RT-PCR of *M. acuminata* actin, as reference plant gene (D). cDNA prepared from healthy banana leaves was included as negative control.

2.4 DISCUSSION

2.4.1 CLONING

The degenerated primers enabled us to get a fragment of *MfAtr4* in the first attempt. Therefore, these primers could be suitable to clone *MgAtr4* homologs from closely related fungi with no available genomes—other dothideomycetes, particularly in the order capnodiales to which *M. graminicola* and *M. fijiensis* belong. In addition, this strategy for designing primers could be extrapolated to clone other particular members or subfamilies in the ABC transporter family, or in other large gene families (*i.e.* kinases, permeases).

Comparison at nucleotide level of *MfAtr4* as cloned in this study and *MfAtr4* from the *M. fijiensis* genomic portal showed an identity of 99.7% and a similarity of 99.8%. This suggests a low degree of polymorphism in *MfAtr4*. Single nucleotide polymorphisms with similar degree occur in PDR5, an important ABC transporter implicated in pleiotropic drug resistance in *S. cerevisiae* (Guan *et al.* 2010), and also in *Candida glabrata* CDR1 (Haque *et al.* 2007), an ortholog of ScPDR5. In this ABC protein the polymorphism, although low, is supposed to be significant for azole resistance. Some reports show that virulence-associated ABC transporters can contribute to resistance against fungicides and other cytotoxic xenobiotics (Gupta and Chattoo 2008; Schoonbeek *et al.* 2001; Zwiars *et al.* 2003) but occurrence and contribution of polymorphism to tolerance to natural substrates or xenobiotics in these or other classes of fungal ABC transporters remains to be determined.

2.4.2 *MfAtr4* CLASSIFICATION

The predicted *MfAtr4* topology (NBD-TMS₆- NBD-TMS₆), the presence of a cysteine residue in the N-terminal Walker A motif instead of a lysine residue, and the specific LNVEQ motif in the C-terminal ABC signature are all characteristics of a full-sized ABC-G (PDR) type transporter *sensu stricto* (Seret *et al.* 2009; Fig. 3; Table 3). Many members of the ABC-G (PDR) family are involved in the prevention of the intracellular accumulation of toxicants (Cannon *et al.* 2009; Coleman and Mylonakis 2009). Except for one, all the virulence-associated ABC transporters identified so far in fungal phytopathogens are members of the PDR family of ABC transporters. The only exception is ABC4 of *Magnaporthe grisea* which belongs to the ABC-B (MDR) family (Gupta and Chattoo 2008; Coleman and Mylonakis 2009).

2.4.2.1 FEATURES OF *MfAtr4*

The ABC signature in the N-terminal NBD of *MfAtr4* is canonical while the signature in the C-terminal NBD is degenerated; an asymmetric organization that is quite common in fungal ABC transporters (Rai *et al.* 2006; Preeti *et al.* 2006; Ernst *et al.* 2008; Cannon *et al.* 2009). The conserved lysine in the N-terminal Walker A motif is replaced in *MfAtr4* by a cysteine amino acid (Fig. 3). This seems to be a feature characteristic for most of the fungal ABC-G transporters (Preeti *et al.* 2006), but the functional relevance of the change of the lysine by the cysteine amino acid is unknown.

2.4.2.2 PHYLOGENETIC RELATIONSHIP BETWEEN *MfAtr4* AND OTHER FUNGAL ABCs

MfAtr4 clusters in a different clade than other PDR virulence associated ABC transporters. This suggests that fungal ABC transporters with roles in pathogenicity might have diversified in different times. Virulence-associated ABC1 transporter members are apparently ancient since they cluster with *Cryptococcus neoformans* (a Basidiomycete fungus) PDRs, suggesting these PDRs existed before the diversification of the major fungal lineages Ascomycetes and Basidiomycetes. *MgAtr2* and *MgAtr7* fall in this clade (Fig. 5).

Similar to other ABC families (i.e., ABC-B, ABC-C subfamilies) which all are present as multigene families in the genome of eukaryotic fungal species (Kovalchuk and Driessen 2010), the fungal ABC-G (PDR) family might have become expanded by a series of gene duplications (Lupski 2007; Seret *et al.* 2009). PDR transporters have taken a massive expansion in fungal genomes, especially in species belonging to the Pezizomycotina group, and several groups of these proteins are specific for this subphylum (Kovalchuk and Driessen 2010). This seems to be the case of the clade containing the *MfAtr4* and the *MgAtr4*. All ABC transporter proteins in this clade are PDRs from fungi belonging to the Pezizomycotina group, belonging to the classes Dothideomycetes, Leotiomycetes, Eurotiomycetes and Sordariomycetes. This suggests that these PDRs evolved after the divergence of the main fungal lineages.

MfAtr4 and *MgAtr4* fall in a different clade than *MgAtr1*, *MgAtr2*, *MgAtr3*, *MgAtr5*, and *MgAtr7*, the other ABC-G transporters identified in *M. graminicola*. Each of these PDR members cluster separate from each other (Fig. 5). They are paralogous among themselves but according to the phylogenetic tree, with putative orthologues in other fungi. Because of the complexity of the PDR family, this is common in fungi (Cannon *et al.* 2009; Kovalchuk and Driessen 2010).

2.4.2.3 INTRON IN *MfAtr4*

ABC transporters grouping in the same clade as *MgAtr4* (supplemental material 2) have no introns. However, this is not a characteristic feature of genes present in the clade clustering with *MfAtr4* (in Fig. 5). Fifty percent of the PDRs in this clade contain 4 to 6 introns, but curiously the Dothideomycetes PDRs in this clade (*Venturia inaequalis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Alternaria brassicicola*) have no introns, suggesting that the intron is a recently gain in *MfAtr4*. Occurrence of intron gain in fungal individual genes or gene families has been previously reported. Nielsen *et al.* (2004) analyzed *in silico* a set of orthologous 1-phosphoribosyl-5-pyrophosphate (PRPP) synthetase genes and found a significant higher number of introns in *N. crassa* (six introns) and in *M. grisea* (fourteen introns) as compared to the PRPPs of other fungi. Nielsen *et al.* (2004) suggested that intron gain is a significant driving force that might be involved in the evolution of genes in fungi. Haugen *et al.* (2004) aligned ascomycete and basidiomycete S788 intron family and inferred that S788 gained access to basidiomycete by lateral transferring and vertical inheritance. Punctual deletion events in S788 introns (e.g., by unequal crossing over, or by stepwise deletion) drive to genetic changes. In *Aspergillus* intron gain is the outcome of the error-prone repair of DNA mediated by the capture of DNA fragments during non-homologous end joining of double strand breaks; intron gain or loss is the dynamics of evolution that cause changes in the rates of mutations, thus introducing variants (mutations bias) or transmitting variants which further may be fixed or eliminated by selection (Zhang *et al.* 2010; Farlow *et al.* 2011).

As mentioned above, the PDR ABC transporter family is rapidly evolving in this kingdom, particularly by gene duplication (Coleman and Mylonakis 2009). In addition to gene duplication, intron gain may be contributing to the evolution of individual genes; such seems to be the case of *MfAtr4*. Except *MgAtr4*, all PDR-ABC transporter encoding genes in *M. graminicola* contain introns, 19 introns in *MgAtr7* (Zwiers *et al.* 2007), supporting a potential important role of introns in fungal PDR gene evolution.

2.4.3 ζ *MfAtr4*, ORTHOLOG OF *MgAtr4*?

ABC transporter orthologs can be identified by neighborhood and similarity searches (Seret *et al.* 2009). Eukaryotic ABC transporters have no substrate binding component as prokaryotic's, but ligand recognition and specificity are mediated by the TMS (Igarashi *et al.* 2004). The active pocket has to allocate a variety of structurally different compounds because most ABC transporters can have multiple substrates. Congruent with their function, these structural components are the most divergent regions in ABC

transporters. When TMDs are used as BLAST queries, generally this retrieves only proteins belonging to the same subfamily (Kovalchuk and Driessen 2010). The first *MfAtr4* fragment (obtained in this study) contains the MTS1 and MTS2; when this fragment was used as query to Blast the GenBank it retrieved as first hit the *MgAtr4*.

Considering that *MgAtr4* and *MfAtr4* cluster in the same clade in the phylogenetic tree (Fig. 5) and the high overall similarity between them (Table 2 and 3), we hypothesize that *MfAtr4* is the ortholog of *MgAtr4*.

Although *M. graminicola* belongs to the same genus as *M. fijiensis*, it is phylogenetically more distant to *M. fijiensis* than other *Mycosphaerella* species. Closer phylogenetic relatives of *M. fijiensis* are *M. musicola* and *M. eumusae*, *M. africana*, *M. keniensis*, *M. marksii*, among many others (Carlier *et al.* 2000; Goodwin *et al.* 2001). Therefore, orthologs of *MfAtr4* may exist in other *Mycosphaerella* species.

Table 2 Pairwise comparison of *MfAtr4* and *MgAtr4*

Comparison of:	% Identity	% similarity
Complete amino acid sequences	63.2	74.4
From NBD1 to TMS12	73.1	84.5
NBD1	78.9	91.6
TMD1	75.7	88.4
NBD2	91.8	96.3
TMD2	74.6	86.1

Table 3. Comparative analysis of *MfAtr4* and *MgAtr4* features

	<i>MfAtr4</i>	<i>MgAtr4</i>
Class	PDR (ABC-G family)	PDR (ABC-G family)
CDS size (ATG-TGA)	4977	4908
Peptide (number of amino acids)	1658	1635
Introns	One	None
Topology	(NBD-TMS ₆) ₂	(NBD-TMS ₆) ₂
Function	Exporter	Exporter
Role in virulence	Not determined	Yes
Walker A-1	VLGRPGSGCST	VLGRPGSGCST
Q-loop 1	VGETL	VGQTL
Signature-1	VSGGERKRVSIAEMA	VSGGERKRVSIAEMA
Walker B-1	LAAWDNSTRGLD	LAAWDNSTRGLD
Walker A-2	GTSGAGKTT	GTSGAGKTT
Q-loop 2	VQQQD	VQQQD
Signature-2	LNVEQRKLLTIGVELAA	LNVEQRKLLTIGVELAA
Walker B-2	LLFLDEPTSGLD	LLFLDEPTSGLD
Symmetry	Asymmetric	Asymmetric

2.4.4 ANALYSIS OF EXPRESSION OF *MfAtr4* IN BLACK SIGATOKA-INFECTED BANANA LEAVES

It was previously demonstrated that ABC4 from *Magnaporthe grisea* (Gupta and Chatoos 2008) and *MgAtr4* from *Mycosphaerella graminicola* (Stergiopoulos *et al.* 2003), are involved in fungal virulence of these plant pathogens. Disruption or deletion of these genes reduced the ability of mutant strains to colonize the hosts. Molecular analysis of the full infection process using an artificial infection assay of wheat with *M. graminicola* showed no expression of *MgAtr4* during biotrophic phase. *MgAtr4* expression was observed from days 12 to 18 post-inoculation, and at day 22 no expression of *MgAtr4* was detectable; these times corresponded to the

early/middle and late necrotrophic phase respectively (Stergiopoulos *et al.* 2003). A similar pattern of expression was found in this study for *MfAtr4* gene in field samples of black Sigatoka infected-banana leaves (Fig. 6, panel B). The expression of *MfAtr4* was higher at early necrotrophic stages in comparison with later stages of the fungal infection. As *MgAtr4* in *M. graminicola*-wheat pathosystem, *MfAtr4* expression was undetectable in the late necrotrophic phase of *M. fijiensis*. The positive expression of the fungal reference gene (*Mf-actin*) indicates that the absence of *MfAtr4* transcripts at this stage is not due to the absence of fungal biomass, but could be explained by assuming a regulation dependent on the disease progress. This suggests a role of *MfAtr4* during the early-middle stages of the disease progress, but a role of *MfAtr4* during the biotrophic phase of *M. fijiensis* cannot be ruled out. Further exploration of *MfAtr4* expression during the biotrophic stages of black Sigatoka disease is necessary.

Taking all together the analysis presented here suggests that *MfAtr4* could play a role in *M. fijiensis* pathogenesis, similar to the role previously described for *ABC4* and *MgAtr4* of *M. grisea* and *M. graminicola*, respectively.

A number of reports have suggested that virulence-associated ABC transporters may be primarily involved in protection against exogenous compounds (Urban *et al.* 1999; Del Sorbo *et al.* 2000; Fleibner *et al.* 2002; Stefanato *et al.* 2009). Therefore, although its role in the efflux of fungal secondary metabolites or virulence factors cannot be discarded (Cruz-Cruz *et al.* 2009; Chuc-Uc *et al.* 2011), *MfAtr4* could be involved in the efflux of banana defense toxic compounds, *e.g.* preformed phytoprotectants as banana phytoanticipins (Cruz-Cruz *et al.* 2010) or inducible banana phytoalexins (Lazzaro *et al.* 2004). Work is currently being conducted to analyze the role of *MfAtr4* in *M. fijiensis* virulence and its probable role in detoxification of banana toxicants.

Acknowledgements

To the Joint Genome Institute for the facilities provide to our group to gain access to the sequence of the *M. fijiensis* genome. To CONACyT for the economical support to project No. 45788Z and for the Ph. D., scholarship No. 204766 to Y. Couoh-Uicab.

2.5 REFERENCES

- Abiala, MA., AA. Ogunjobi, AC. Odebode and MA. Ayodele (2010) *Microbial control of Mycosphaerella fijiensis Morelet a notable pathogen of bananas and plantains*. Nature and Science, 8(10):299-305.
- Albertini, C., M. Grend and P. Leroux (1999). *Mutations of the β -tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi Tapesia yallundae and Tapesia acuformis*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 64: 17-31.
- Amil, AF., SP. Heaney, C. Stanger and MW. Shaw (2007). *Dynamic of Qol sensivity in Mycosphaerella fijiensis in Costa Rica during 2000 to 2003*. Journal Phytopathology, 97(1):1451-1457.
- Andrade, AC., G. Del Sorbo, Van JGM Nistelrooy and M. De Waard (2000). *The ABC transporter AtrB from Aspergillus nidulans mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds*. Microbiology, 146: 1987-1997
- Arzanlou, M, C. Waalwijk, M. Guzmán, PW. Crous and J. Carlier (2007). *Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana*. Journal Phytopathology, 97:1112-1118
- Bairoch, A (1991). *Prosite: a dictionary of sites and patterns in proteins*. Nucleic Acids Res, 19:2241-2245
- Campanella, J., L. Bitincka and J. Smalley (2003) *MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences*. BMC Bioinformatics, 4:29–29
- Cannon, RD, E. Lamping, AR. Holmes, K. Niimi, PV. Baret, MV. Keniya, K.Tanabe, M. Niimi, A. Goffeau and BC. Monk (2009). *Efflux-mediated antifungal drug resistance*. Clinical Microbiology Reviews, 22(2):291-321.
- Cañaz-Gutierrez, GP., Patiño LF, Rodríguez-Arango E, and R. Arango (2006) *Molecular characterization of benomyl resistant isolates of Mycosphaerella fijiensis, Collected in Colombia*. Journal Phytopathology, 154:403-409
- Carlier, J, MF. Zapater, F. Lapeyre, DR. Jones and X. Mourichon (2000). *Septoria leaf spot of banana: a newly discovered disease caused by Mycosphaerella eumusae*. Journal Phytopathology, 90:884–90
- Coleman, JJ. and E. Mylonakis (2009) *Efflux in Fungi: La Pie`ce de Resistance*. PLoS Pathog, 5(6): e1000486. doi:10.1371/journal.ppat.1000486.

- Chuc-Uc, J, L. Brito-Argáez, B. Canto-Canché, M. Tzec-Simá, C. Rodríguez-García, L. Peraza-Echeverría, S. Peraza-Echeverría, A. James-Kay, CA. Cruz-Cruz, LM. Peña-Rodríguez and I. Islas-Flores (2011). *The in vitro secretome of Mycosphaerella fijiensis induces cell death in banana leaves*. Plant Physiology and Biochemistry, 49(6): 572-578.
- Cruz-Cruz, CA, F. Escalante-Erosa and LM. Peña-Rodríguez (2009). *Production of hydrophilic phytotoxins by Mycosphaerella fijiensis*. Journal of General Plant Pathology, 75: 191-195.
- Cruz-Cruz, CA, G. Ramírez-Tec, K. García-Sosa, F. Escalante-Erosa, L. Hill, AE. Osbourn and LM. Peña-Rodríguez (2010) *Phytoanticipins from banana (Musa acuminata cv. Grande Naine) plants, with antifungal activity against Mycosphaerella fijiensis, the causal agent of black Sigatoka*. European Journal Plant Pathology, 126:459-463
- Davidson, AL. and PC. Maloney (2007). *ABC transporters: how small machines do a big job*. Trends Microbiology, 15(10):448-455.
- Del Sorbo, G., H Schoonbeek and MA. De Waard (2000) *Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides*. Fungal Genetics, Biol. 30:1-15
- De Waard, M., A. Andrade, K. Hayashi, H. Schoonbeek, I. Stergiopoulos, and L. Zwiars (2006) *Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence*. Pest Management Science, 62:195-207
- Ernst, R., D. Kueppers, C. Klein, T. Schwarzmueller, K. Kuchler and Schmitt L (2008) *A mutation of the loop H selective affect rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5*. Proceeding National Academic Science, USA 105:5026-5074
- Fahleson, J, M. Nakyanzi, P. Okori, S. Seal, L. Kenyon and C. Dixelius (2009). *Genetic analysis of Mycosphaerella fijiensis in the Ugandan lake Victoria region*. Plant Pathology, 58:888-897
- Farlow, A., E. Meduri and C. Schlötterer (2011) *DNA double-strand break repair and the evolution of intron density*. Trends Genetics, 27(1):1-5
- Fleibner, A, C. Sopalla, and K-M. Weltring (2002). *An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of Gibberella pulicaris to phytoalexins and virulence on potato tubers*. Molecular Plant-Microbe Interaction, 15(2):102-108.
- Fouré, E (1985) *Black leaf streak disease of bananas and plantains (Mycosphaerella fijiensis Morelet). Study of the symptoms and stages of the disease in Gabon*. IRFACIRAD, Paris.

- Goodwin, SB., LD. Dunkle and VL. Zismann (2001). *Phylogenetic analysis of Cercospora and Mycosphaerella based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA*. Journal Phytopathology, 91:648–658.
- Gottesman, MM., T. Fojo and SE. Bates (2002). *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. Nature Reviews Cancer, 2:48-58.
- Guan, W., H. Jiang, X. Guo, E. Mancera, L. Xu, et al. (2010). *Antagonistic changes in sensitivity to antifungal drugs by mutations of an Important ABC transporter gene in a fungal pathogen*. PLoS ONE, 5(6):e11309. doi:10.1371/journal.pone.0011309
- Gupta, A. and BB. Chattoo (2008). *Functional analysis of a novel ABC transporter ABC4 from Magnaporthe grisea*. FEMS Microbiology Letters, 278:22-28
- Haque, A., V. Rai, BS. Bahal, S. Shukla, AA. Lattif, G. Mukhopadhyay and R. Prasad (2007). *Allelic variants of ABC drug transporter Cdr1p in clinical isolates of Candida albicans*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 352:491–497
- Haugen, P., HJ. Runge and D. Bhattacharya (2004). *Long-term evolution of the fungal nuclear small subunit rRNA group I introns*. RNA Journal 10:1084-1096
- Higgins, C (1992) *ABC transporter: From microorganism to man*. Annual Review Cell Biology, 8:67-113
- Igarashi, Y., KF. Aoki, H. Mamitsuka, K-I. Kuma and M. Kanehisa (2004). *The evolutionary repertoires of the eukaryotic-type ABC transporters in terms of the phylogeny of ATP-binding domains in eukaryotes and prokaryotes*. Molecular Biology and Evolution, 21:2149-2160
- Islas-Flores, I., L. Peraza-Echeverría, B. Canto-Canché, and C. Rodríguez-García (2006). *Extraction of high-quality melanin free RNA from Mycosphaerella fijiensis for cDNA preparation*. Molecular Biotechnology, 34(1):45-50
- Jie, X., F. Lifang, Y. Dongxia, F. Chengjie and M. Wei (2010). *Genome-wide identification and evolution of ATP-binding cassette transporters in the ciliate Tetrahymena thermophila: a case of functional divergence in a multigenes family*. BMC Evolution Biology, 10: 330, doi:10.1186/1471-2148-10-330
- Johanson, A (1997). *Detection of Sigatoka leaf spot pathogens of banana by the polymerase chain reaction*. Nat Resources Institute, Chatham UK pp 38.

- Jones, PM and AM. George (2004). *The ABC transporter structure and mechanisms: perspectives on recent research*. Cellular and Molecular Life Science, 61:682-699.
- Kenneth, L., and C. Higgins (2007). *Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control*. European Journal of Physiology, 453:555-567.
- Kovalchuk, A. and AJ. Driessen (2010). *Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters*. BMC Genomics, 11(177):1-21.
- Kuo, D., K. Tan, G. Zinman, T. Ravasi, Z. Bar-Joseph and T. Ideker. (2010). *Evolutionary divergence in the fungal response to fluconazole revealed by soft clustering*. Genome Biology, 11:R77.
- Kretschner, M., M. Leroch, A. Mosbach, A-S. Walker, S. Fillinger, D. Mernke, H-J. Schoonbeek, J-M. Pradier, P. Leroux, M De Ward and M. Hahn (2009) *Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus Botrytis cinerea*. PLoS Pathogens, 5(12):e1000696; Doi:10.371/journal.ppar.1000696
- Laleh, ZN., A. Reza, V. Mostafa and M. Saeid (2008). *Cloning and sequencing of ABC transporter ATP binding protein encoding gene from Streptomyces minoensis*. Biotechnology, 7(2):182-187
- Lazzaro, A., M. Corominas, C. Martí, C. Flors, R. Izquierdo, TA. Grillo, JG. Luis and S. Nonell (2004). *Light- and singlet oxygen-mediated antifungal activity of phenylphenalenone phytoalexins*. Photochemicals and Photobiological Sciences, 3:706-710
- Lupski JR (2007). *An evolution revolution provides further revelation*. BioEssays. 29:1182-1184
- Mourichon, X, D. Peter and M. Zapater (1987). *Inoculation experimentale of Mycosphaerella fijiensis sur de jeunes plantules de bananiers issues de culture in vitro*. Fruits 42 (2):195-198
- Nielsen, CB., B. Friedman, B. Birren, CB. Burge and JE. Galagan (2004). *Patterns of intron gain and loss in fungi*. PLoS Biology, 2(12):e422
- Nikaido H (2009). *Multidrug resistance in bacteria*. Annual Review of Biochemistry, 78:119-146.
- Orozco SM, RJ. Orozco, ZO. Pérez, G. Manzo, J. Farfas, and W. Da Silva (2008). *Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos*. Tropical Plant Pathology, 33(3):189-196
- Piehler, A., M. Hellum, J. Wenzel, E. Kaminski, KB. Foss, P. Kierulf and K. Wolfgang (2008). *The human ABC transporter pseudogene family:*

- evidence for transcription and gene pseudogene interference. *BMC Genomics* 9:165-178.
- Preeti, S., N. Akhtar, and R. Prasad (2006) *Chimeras of the ABC drug transporter Cdr1p reveal functional indispensability of transmembrane domains and nucleotide-binding domains, but transmembrane segment 12 is replaceable with the corresponding homologous region of the non-drug transporter Cdr3p.* *Microbiology* 152:1559-1573
- Rai, V, M. Gaur, S. Shukla, S. Shukla, SV. Ambudkar, SS. Komath and R. Prasad (2006). *Conserved Asp327 of Walker B motif in the N-terminal nucleotide binding domain (NBD-1) of Cdr1p of Candida albicans has acquired a new role in ATP hydrolysis.* *Biochemistry*, 45(49):14726–14739
- Romero, RA, and T. Sutton (1998) *Characterization on Benomyl resistance in Mycosphaerella fijiensis cause of black Sigatoka of banana in Costa Rica.* *Plant Disease*, 82(8):931-934
- Schoonbeek, H., G. Del Sorbo and MA. De Waard (2001). *The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of Botrytis cinerea to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil.* *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 14(4):562-571
- Seret, M-L., JF.Diffels, A. Goffeau and PV. Baret (2009) *Combined phylogeny and neighborhood analysis of the evolution of the ABC transporters conferring multiple drug resistance in hemiascomycete yeasts.* *BMC Genomics*, 10(1):459
- Sierotzki, H., S Parisi, U. Steinfeld, I. Tenzer, S. Poirey and Gisi U (2000). *Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of Mycosphaerella fijiensis field isolates.* *Pest Management Science*, 56:833-841
- Skov, J., M Lemmens and H. Giese (2004) *Role of a Fusarium culmorum ABC transporter (FcABC1) during infection of wheat and barley.* *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64:245–254.
- Stefanato, FL, E. Abou-Mansour, A. Buchala, M. Kretschmer, A. Mosbach, M. Hahn, CG. Bochet, JP. Métraux and HJ Schoonbeek (2009). *The ABC transporter BcatrB from Botrytis cinerea exports camalexin and is a virulence factor on Arabidopsis thaliana.* *Plant Journal*, 58(3):499-510.
- Stergiopoulos I, L. Zwiars, and M. De Waard (2002). *Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporter of the ATP-binding cassette an major facilitator superfamily.* *European Journal of Physiology*, 108:719-734.

- Stergiopoulos, I., L-H. Zwiers, and M. De Waard (2003). *The ABC Transporter MgAtr4 is a virulence factor of Mycosphaerella graminicola that affects colonization of substomatal cavities in wheat leaves*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 16(8):689-698.
- Sturm, A., P. Cunningham, P. Cunningham, and M. Dean (2009). *The ABC transporter gene family of Daphnia pulex*. *BMC Genomics*, 10:170-188
- Szakacs, G., JK Paterson, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM (2006). *Targeting multidrug resistance in cancer*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5:219-234.
- Tamura, K., Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution*. 24:1596-1599.
- Theiss, S., M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof, N. Agabian, J. Hacker and GA. Kohler. (2002). *Functional analysis of a vacuolar ABC transporter in wild-type Candida albicans reveals its involvement in virulence*. *Molecular Microbiology*, 43:571-584.
- Urban, M., T. Bhargava and JE. Hamer (1999). *An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease*. *EMBO Journal*, 18(3):512-521.
- Vásquez LE, F. Guzmán, M. Patarroyo, and R. Arango (2009) *In Vitro evaluation of antimicrobial peptides against Mycosphaerella fijiensis Morelet and their interaction with some chemical fungicides*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 62(2):5063-5069.
- Walker, JE, M. Sarsate, J. Runswick, and NJ. Gay (1982) *Distantly related sequences in the alpha and betha subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and common nucleotide binding fold*. *EMBO Journal*. 269:32592-32597.
- Zhang, L-Y, Yang Y-F, Niu D-K (2010). *Evaluation of models of the mechanism underlying intron loss and gain in Aspergillus fungi*. *Journal of Molecular Evolution*, DOI: 10.1007/s00239-010-9391-6.
- Zwiers, L-H, Roohparvar R, De Waard MA (2007) *MgAtr7, a new type of ABC transporter from Mycosphaerella graminicola involved in iron homeostasis*. *Fungal Genetics and Biology*, 44:853-863.
- Zwiers, L-H, I. Stergiopoulos, MM. Gielkens, SD. Goodall and MA De Waard (2003). *ABC transporters of the wheat pathogen Mycosphaerella graminicola function as protectants against biotic and xenobiotic toxic compounds*. *Molecular Genetics and Genomics*, 269:499-507.

Capítulo III

Expresión de la proteína MFATR4

3.1. SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

En 1969 Kouchi Ogata describió la capacidad de ciertas levaduras para utilizar metanol como única fuente de carbono y energía. Se conocen cuatro géneros de levaduras metilotróficas: *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, y *Torulopsis* (Tani *et al.*, 1978).

A principios de los años 70 la compañía Phillips Petroleum desarrolló procesos de cultivo de levaduras a elevadas densidades celulares con el fin de producir proteína unicelular (SCP) a partir de metanol, producto residual de la industria petrolera. El descubrimiento de las levaduras metilotróficas fue de gran interés debido a que estos microorganismos poseen características que los favorecen respecto a las bacterias metilotróficas. Las células de levadura tienen un tamaño mayor, lo que facilita su recuperación, un menor contenido de ácidos nucleicos, son ricas en vitaminas, lípidos, carbohidratos y en aminoácidos esenciales como lisina, metionina y triptófano. Además, el medio de cultivo en que la levadura crece tiene un pH de 3 a 5, lo cual ayuda a prevenir la contaminación del cultivo (Phillips Petroleum, 1986).

En 1981 Patel y colaboradores demostraron que suspensiones celulares de *Hansenula polymorpha*, *C. boidinii*, *Pichia* sp. y *Torulopsis* sp., crecidas en metanol poseían la capacidad de oxidar alcoholes secundarios a metilcetonas. En *Pichia* sp. se descubrió una alcohol deshidrogenasa secundaria asociada a NAD⁺; esta enzima es capaz de catalizar la oxidación de alcoholes secundarios en presencia de NAD⁺ y reducir las metilcetonas en presencia de NADH, sin afectar los alcoholes primarios. Sin embargo, la principal aplicación biotecnológica de las levaduras metilotróficas es su capacidad para actuar como células hospedadoras de proteínas heterólogas. Una de las razones más comunes para expresar de forma heteróloga a una proteína es la necesidad de obtener una gran cantidad de dicha proteína para su caracterización estructural y enzimática (Cregg *et al.*, 1988).

El primer sistema utilizado para expresar proteínas fue *Escherichia coli*, aunque este sistema tiene algunas limitaciones, causadas principalmente por su inhabilidad para llevar a cabo modificaciones post-traduccionales

como la glucosilación. Otro sistema de expresión heteróloga es la levadura *S. cerevisiae*, usada como una alternativa a *E. coli*, debido a su capacidad para llevar a cabo modificaciones postraduccionales en las proteínas. Una desventaja inicial de dicho sistema es que no cuenta con un promotor inducible cuya expresión sea elevada después de la inducción. Existen otros sistemas de expresión en eucariotas, tal es el caso de los baculovirus y las células de mamífero, aunque la infraestructura y los costos del mantenimiento de ambos sistemas es elevado (Córdoba *et al.*, 2003).

3.1.1 METABOLISMO DEL METANOL EN LEVADURAS METILOTRÓFICAS

La oxidación completa del metanol a CO_2 y H_2O en microorganismos metilotróficos tiene dos vías: la vía disimilitoria (de generación de energía) y la vía asimilatoria (de biosíntesis de material celular) (Figura 3.1). La oxidación del metanol ocurre dentro de los peroxisomas. En dichos orgánulos se encuentran algunas de las enzimas y metabolitos involucrados en el proceso de oxidación del etanol como la enzima alcohol oxidasa y la catalasa. Durante el crecimiento en presencia de metanol, los peroxisomas pueden llegar a ocupar el 90% del volumen celular (Veenhuis *et al.*, 1983). La vía disimilitoria, comienza con la salida del formaldehído del interior del peroxisoma; este compuesto es oxidado hasta ácido fórmico y dióxido de carbono, obteniéndose energía en forma de NADH (Ferrer *et al.*, 2000). En la vía asimilatoria se generan triosas a partir del formaldehído inicial; el balance neto de esta vía es la formación de un mol de triosas (Dihidroxiacetona o DHA y Gliceraldehído monofosfato o GAP) por cada tres moles de formaldehído y tres moles de ATP (Goodman *et al.*, 1985).

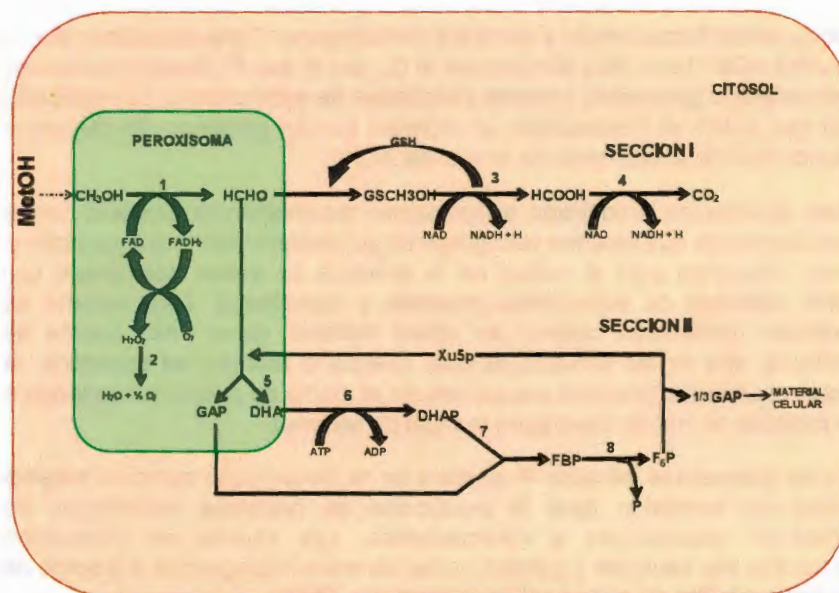


Figura 3.1. Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas. Sección I: vía disimilatoria y Sección II: vía asimilatoria. MetOH: metanol, HCHO: formaldehído, GS-CH₂OH: S-formilglutation, HCOOH: formiato, CO₂: dióxido de carbono, GAP: gliceraldehído monofosfato, DHA: dihidroxiacetona, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, FBP₂: fructosa-6-bisfosfato, F₆P: fructosa-6-fosfato, Xu5P: xilulosa-5-monofosfato.

3.1.2 VENTAJAS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN *Pichia pastoris*

Pichia pastoris es una levadura perteneciente al Phylum *Ascomycota*, de la familia *Saccharomycetaceae*, orden *Saccharomycetes* (Cereghino et al., 2002). *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas recombinantes ofrece varias ventajas, entre las que destacan el procesamiento de proteínas: plegamiento y modificaciones postraduccionales.

Esta levadura es capaz de crecer en metanol como única fuente de carbono; el primer paso en el metabolismo del metanol se realiza en los peroxisomas e inicia cuando el metanol es oxidado en presencia de oxígeno molecular por la enzima alcohol oxidasa que es codificada por el gen *AOX1*,

produciendo formaldehído y peróxido de hidrógeno. Cabe mencionar que la enzima AOX1 tiene baja afinidad por el O₂, por lo que *P. pastoris* compensa este aspecto generando grandes cantidades de esta enzima. La regulación del gen AOX1 es mediada por un represor que en presencia de glucosa o etanol reprime la expresión de la enzima AOX1.

Este sistema de producción de proteínas recombinantes presenta varias características que resultan ventajosas en su mantenimiento; por ejemplo, el costo requerido para el cultivo de la levadura es menor comparado con otros sistemas de eucariontes (insectos y mamíferos). Este sistema es inducido únicamente cuando se utiliza metanol como única fuente de carbono; otra de las ventajas es que, cuando la proteína es secretada, la mayor parte de la proteína recuperada en el medio de cultivo corresponde a la proteína de interés (Invitrogen manual de usuario).

En las últimas tres décadas *P. pastoris* se ha consolidado como un sistema eficaz de expresión para la producción de proteínas heterólogas de diferentes propiedades y características. Los niveles de producción obtenidos son variables y pueden oscilar de entre microgramos a gramos de proteína por litro de cultivo celular (Cereghino, 2002).

3.1.3 PROMOTOR AOX EN *P. pastoris*: ASPECTOS DE SU REGULACIÓN

La enzima alcohol oxidasa es la responsable de las primeras reacciones de oxidación del metanol en *P. pastoris* y su síntesis está regulada por el promotor PAOX1, utilizado por excelencia en la expresión de proteínas heterólogas en dicha especie; no obstante, existen dos genes responsables de la síntesis de la enzima, los genes alcohol oxidasa 1 (AOX1) y alcohol oxidasa 2 (AOX2) (Cregg *et al.*, 1993)

La secuencia de nucleótidos codificante de estas alcohol oxidasas son homólogas en un 92%. La proteína codificada por cada uno de los genes AOX tienen una homología del 95% en cuanto a composición de aminoácidos y un 97% respecto a su actividad específica (Koutz *et al.*, 1989).

Los genes AOX1 y AOX2 en *P. pastoris* están regulados a nivel transcripcional de forma similar; no obstante el nivel de transcripción que alcanzan entre ellos es muy diferente. El gen AOX1 es responsable de la síntesis del 90% de la alcohol oxidasa generada en la célula, mientras que el transcrito del gen AOX2 corresponde al 10% restante. Estas diferencias

se deben a regiones no homólogas entre ambos genes, las cuales están localizadas fuera de la región codificante en los 5'UTR y 3'UTR (Cregg *et al.*, 1988).

La elevada tasa de transcripción del gen *AOX1* es una de las dos principales características por la que este promotor es ampliamente utilizado para la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. Otra de las razones para su utilización es su estricta regulación.

El sistema de regulación de la transcripción del gen *AOX1* está sometido a dos tipos de mecanismos, un sistema de represión/desrepresión por catabolito y uno de inducción específica por sustrato (Metanol) (Tschopp *et al.*, 1987). En *P. pastoris* las condiciones de desrepresión no son suficientes para que se dé una transcripción significativa del gen *AOX1*, sino que se requiere de la presencia del sustrato inductor, es decir, condiciones en las que la fuente de carbono represora (glucosa o glicerol) se han agotado por completo. Los niveles del ARNm del gen *AOX1* cuando las células están en presencia de glucosa corresponden al 2%, comparado con el 5% del ARNm cuando las células están en presencia de metanol (Cregg *et al.*, 1993).

3.1.4 VECTORES DE EXPRESIÓN Y CEPAS COMERCIALES DE *P. pastoris*

El paquete comercial de *P. pastoris* (Invitrogen) ofrece vectores de expresión integrativos, estos incluyen zonas homólogas al genoma de *P. pastoris*, con el propósito de dirigir la recombinación en sitios específicos dentro del cromosoma. Entre los sitios cromosómicos empleados para la recombinación integrativa está el locus *HIS4* (Histidinol deshidrogenasa); su uso está limitado a cepas de *P. pastoris* auxotróficas para el aminoácido histidina. Otro de los sitios utilizados para la recombinación homóloga está localizada sobre la región 3' del gen *AOX1*, lo que permite dirigir la inserción a este locus.

La estructura general de los vectores de expresión de *P. pastoris* se componen de un promotor de transcripción, un sitio múltiple de clonación, una región de terminación que está precedida por una etiqueta de histidina y una etiqueta anti-myc, el gen *SH-BLE* como marcador de selección, que codifica para una proteína que le confiere resistencia contra el antibiótico zeocina. En el cuadro 4 se describen diversos vectores comerciales disponibles para la expresión en *P. pastoris*.

Cuadro 4. Vectores comerciales utilizados para la expresión heteróloga en *Pichia pastoris*.

Vector	Promotor	Marcador de selección	Tipo de expresión	Características de su utilización
pAO815	PAOX1	His4	I	Generación de múltiples copias
pHIL-D2	PAOX1	His4	I	Sustitución del gen AOX1
pPIC3K	PAOX1	His4-kan	I	MCS, selección de multicopias con resistencia a G418
pPICZ	PAOX1	ble	I	MCS, selección de multicopias por resistencia a zeocina, his y myc tags
pHWO10	PGAP	His4	I	Promotor constitutivo PGAP
pGAPZ	PGAP	ble	I	PGAP, MCS, resistencia a zeocina, his y myc tags
pHIL-S1	PAOX1	His4	S	Señal de secreción PH01
pPIC9K	PAOX1	His4-Kan	S	Señal de secreción α -MF. Selección de multicopias por resistencia a G418.
pPICZ α	PAOX1	ble	S	Señal de secreción α -MF. Resistencia a zeocina. His y myc tags.
pGAPZ α	PGAP	ble	S	PGAP, Señal de secreción α -MF. Resistencia a zeocina. His y myc tags.

PAOX1; promotor AOX1, PGAP; promotor Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa; I integrativo, S; secretada, ble; gen de resistencia a la zeocina, Kan^r; gen de resistencia al compuesto GS418, His4; gen Histidinol deshidrogenasa, MCS; sitio múltiple de clonación.

Existen cepas comerciales de *P. pastoris* con los fenotipos Mut+/s (cepas que metabolizan el metanol) y mut- (cepas incapaces de metabolizar el metanol) en la que los genes AOX se han removido. Todas las cepas comerciales de *P. pastoris* derivan de la NRRL-Y11430 (Northern Regional Research Laboratoris, Peoria, LR) (Higgins *et al.*, 1998). En el cuadro 5 se enlistan las cepas comerciales y sus características.

Cuadro 5. Cepas comerciales de *Pichia pastoris*.

Cepa	Genotipo	Fenotipo
GS115	His4	Mut+ his-
X-33	Wt (Gs115 revertida)	Mut+ his-
KM71	Aox1:SARG4 his4 arg4	Mut+ his-
MC1003	Aox1:SARG4 aox2:phis4 his4 arg4	Mut+ his-
SMD1168	Pep4 his4	Mut+ His- proteasa-
SMD1165	Prb1 his4	Mut+ His- proteasa-
SMD1163	Pep4 prb1 his4	Mut+ His- proteasa-

Nota: Mut+; crecimiento en metanol, his-; histidina, proteasa- sin actividad de proteasa.

Las cepas X-33, GS115 y KM71 son las más ampliamente utilizadas para la expresión de proteínas heterólogas. En los cultivos de alta densidad celular, la lisis de la biomasa libera proteasas vacuolares al medio de cultivo que pueden degradar las proteínas expresadas y secretadas por *P. pastoris*. El gen PEP4, codifica para la proteinasa A, el gen PRB1 codifica para la proteinasa B, por tanto la eliminación de ambos genes disminuye la actividad proteolítica de las cepas SMD 1168, 1165, 1163 (Higgins *et al.*, 1998). En el cuadro 6 se muestra un listado de proteínas expresadas en *P. pastoris*.

Cuadro 6. Lista de proteínas expresadas en *P. pastoris*, vector de expresión (integrativo I ó de secreción S) y la cantidad de proteína obtenida, de acuerdo a diferentes reportes.

Origen de la proteína	Proteína	Vector utilizado	Cantidad de proteína obtenida
Bacterias	β -galactosidasa de <i>E. coli</i>	I	$2.0 \times 10^{-3} \mu\text{g/L}^{-1}$
	Fragmento C de la toxina del tétanos de <i>Clostridium tetani</i>	I	12 g/L^{-1}
Hongos	Fitasa de <i>Aspergillus nidulans</i>	S	65 g/L^{-1}
	Lipasa 1 de <i>Candida rugosa</i>	S	$150 \mu\text{g/L}^{-1}$
	Invertasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S	2.5 g/L^{-1}
	Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	S	9.3 mg/L^{-1}
Plantas	NADH reductasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	I	$18 \mu\text{g/L}^{-1}$
	α -galactosidasa del grano de café	S	400 mg/L^{-1}
Humanos	Factor de la necrosis tumoral	I	400 mg/L^{-1}
	α -amilasa pancreática	S	10 g/L^{-1}
	Factor de crecimiento de tipo de insulina	S	600 mg/L^{-1}
	Caspasa tipo 3	I	$1 \mu\text{g/L}^{-1}$
	Antígeno carcinoembriogénico	S	20 mg/L^{-1}

3.1.5 EXPRESIÓN HETERÓLOGA DEL TRANSPORTADOR *MfAtr4* DE *Mycosphaerella fijiensis*

Dadas las ventajas que ofrece el sistema de *P. pastoris*, y de la importancia de los transportadores ABC en el mecanismo de resistencia a fungicidas y en la patogenicidad de hongos fitopatógenos; se planteó realizar la expresión heteróloga del transportador *MfAtr4* (de *M. fijiensis*) en *P. pastoris*. En este capítulo se aborda la amplificación del ORF de *MfAtr4*, así como el diseño del vector pPICZA-RORFABC4, la transformación de *P. pastoris* y obtención de la proteína MFATR4 recombinante.

La obtención de cantidades importantes de proteína MFATR4 recombinante es fundamental para continuar con los estudios bioquímicos de dicha proteína como: el transporte (fungicidas, micotoxinas, metabolitos secundarios de plantas etc), afinidad por el sustrato e inhibición del transporte entre otros.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 MEDIOS DE CULTIVO

Medio YPDS: Extracto de levadura al 1%, dextrosa 2% y peptona 2%, 1M sorbitol.

Medio YPD: Extracto de levadura al 1%, dextrosa 2% y peptona 2%.

Medio YNB con sulfato de amonio: Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 0.17%, dextrosa al 2% y sulfato de amonio al 0.5%.

Medio YNB sin aminoácidos: Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 0.17%, dextrosa al 2% y sin sulfato de amonio.

Medio LB (Luria-Bertani) bajo en NaCl: Bacto-triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 0.5%

MGYH: 1.34% YNB, 1% Glicerol, 4×10^{-5} % biotina, ± 0.004 % histidina.

MMH: 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotina, 0.5% metanol.

BMGH: 100 mM fosfato de potasio, pH 6; 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotina, 1% de glicerol o 0.5% metanol.

Cepas empleadas

Para la amplificación del gen *MfAtr4* se utilizó el ADN extraído de la cepa C1233 de *M. fijiensis*. Para la transformación de *P. pastoris* se emplearon las cepas GS115 y KM71.

3.2.2 EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc DE *Mycosphaerella fijiensis*

Se maceró 0.25 g de micelio de *M. fijiensis* en un mortero en presencia de N₂ líquido, hasta obtener un polvo fino. Al polvo se le agregó 1 mL de trizol (Invitrogen) y se homogenizó. La mezcla se dejó reposar 5 min. a temperatura ambiente, se le agregó 0.2 mL de cloroformo y se centrifugó a 12000 g durante 5 min. a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo, se le adicionó 0.5 mL de isopropanol y se incubó 15 min a temperatura ambiente. El tubo Eppendorf se centrifugó a 12000 g durante 15 min., se recuperó el precipitado y se lavó con etanol al 75%. Se centrifugó a 7500 g 5 min., se removió el excedente de etanol y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 30 µL de agua estéril tratada con DEPC (Diethyl pirocarbonato). La cuantificación del ARN se realizó en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 260 nm; la integridad del ARN se analizó en un gel desnaturalizante de 1.2% de agarosa, conteniendo 2.2 M de formaldehído. El ARN total se trató con DNasa. Brevemente, 1-5 µg de ARN total se incubó con 1µL de amortiguador de DNasa (10X), 1 µL de DNasa (1U/µL), 0.25µL de inhibidor de RNasas (Invitrogen) y H₂O. La mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 1 µL de EDTA (25mM), incubando la muestra 10 min a 65°C.

3.2.3 SÍNTESIS DE ADNc CON EL KIT GENERACER

El ARN obtenido en las extracciones previas fue utilizado para la síntesis de ADNc utilizando el paquete comercial GeneRacer.

La desfosforilación del ARN se realizó de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor (Invitrogen). Los componentes se mezclaron cuidadosamente y se incubó 1 hora a 50° C; al concluir la incubación, la reacción se transfirió a hielo. El ARN fue precipitado y se centrifugó a 12000 g a 4°C por 20 min. La pastilla se lavó con 500 µL etanol al 70%, se centrifugó 14000 g durante 2 min. a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar 2-3 min. a temperatura ambiente y se resuspendió en 7 µL de agua tratada con DEPC.

La remoción de la caperuza del ARN desfosforilado se realizó de acuerdo al protocolo del proveedor. Los componentes de la reacción se mezclaron cuidadosamente y se incubó 1 hora a 50° C; al concluir la incubación el tubo se transfirió a hielo. El ARN fue precipitado y centrifugado, la pastilla se lavó con 500 μ L etanol al 70%, se centrifugó a 14000 g 2 min., a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar 2-3 min. a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió en 7 μ L de agua tratada con DEPC.

Ligación del adaptador oligo 5 Race al ARN. El ARN desfosforilado y sin caperuza se agregó a una prealícuota del oligo RNA (adaptador) liofilizado (0.25 μ g), se mezcló varias veces, se le dio un pulso de centrifuga y se incubó a 65°C por 5 min. para relajar la estructura del ARN. Se incubó 2 min., en hielo y se le adicionó el amortiguador de la ligasa, ATP, RNasa out y T4 ARN Ligasa. La reacción se mezcló y se incubó 1 hora a 50°C. El ARN se precipitó y centrifugó a 14000 g, la pastilla se lavó con 500 μ L etanol al 70%, se centrifugó a 14000 g, 2 min., a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar 2-3 min., a temperatura ambiente y se resuspendió en 10 μ L de agua tratada con DEPC.

3.2.4 SÍNTESIS DE ADNc-RACE

A partir del ARNm acoplado al adaptador 5-Race, se tomó una alícuota y se utilizó para la síntesis del ADNc de cadena sencilla y se le adicionó 1 μ L de oligo dT (provisto con el Kit GeneRacer) y 1 μ L de dNTP's (50 mM). La mezcla se incubó 5 min. a 65° C y 1 min. en hielo. Posteriormente se le adicionó el amortiguador de síntesis de la primera cadena del ADN (5X), DTT (0.1M), RNasa out y transcriptasa reversa (RT III). La reacción se incubó 1 hora a 50°C y se inactivó a 70°C durante 15 min. El ADNc sintetizado fue utilizado como templado para la síntesis de la segunda cadena a través del termociclador.

3.2.5 AMPLIFICACIÓN DEL MARCO DE LECTURA COMPLETO (ORF) DEL GEN *MfAtr4*

A partir del genoma de *M. fijiensis* se obtuvo la secuencia predicha del marco de lectura abierto correspondiente al gen *MfAtr4*, utilizando dicha secuencia como molde. Se diseñaron oligonucleótidos específicos sobre los extremos, con el fin de amplificar por PCR el ORF del *MfAtr4*. Para evaluar la funcionalidad de los oligonucleótidos se usó el ADNg de *M. fijiensis* como templado. De acuerdo a la predicción *in silico*, el ORF del *MfAtr4* es de

4.977 kb. En la figura 3.2 se esquematizan los oligonucleótidos diseñados para amplificar el ORF completo del gen *MfAtr4*.

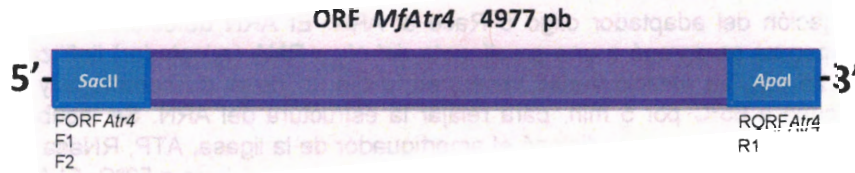


Figura 3.2. Esquematización que indica la posición de los oligonucleótidos en el ORF (4.977 kb) del gen *MfAtr4* predicho. Los oligonucleótidos en Forward FORFAtr4, F1 y F2 están localizados en el extremo 5' y el oligonucleótido en posición Reverso RORFAtr4 y R1 están diseñados sobre el extremo 3'.

3.2.6 DISEÑO DE UN HIBRIDO CORRESPONDIENTE AL ORF DEL GEN *MfAtr4*

Uno de los problemas de la PCR convencional es la pobre eficiencia para amplificar genes de gran tamaño, a partir de ADNc. Dado que en el presente trabajo se enfrentó a esta problemática, como alternativa se generó un ORF híbrido, originado de la fusión de fragmentos del gen de interés obtenidos a partir de ADN genómico y ADN complementario. El proceso se describe a continuación; con el programa WEBCUTTER se realizó un análisis *in silico* de la secuencia genómica del gen *MfAtr4*.

El análisis de restricción permitió seleccionar el sitio único de corte de la enzima *BspE*I ubicada a 2500 pb del sitio del codón de inicio localizado antes del intrón único de este gen. Paralelamente se seleccionó un sitio de corte único del vector de clonación pGEM-T, localizado corriente abajo de la secuencia de interés, en este caso *Bst*XI. Enseguida se procedió a la restricción con las enzimas *BspE*I y *Bst*XI del fragmento de 5 kb (correspondiente a *MfAtr4* obtenido a partir de ADNg), y previamente clonado en el vector pGEM-T Easy; en paralelo se digirió con las mismas enzimas un fragmento de 3.2 kb correspondiente a *MfAtr4* obtenido a partir de ADNc, clonado en el vector pGEM-T Easy. Los fragmentos de interés

liberados con estas enzimas de restricción se ligaron usando la enzima T4 ligasa y se transformaron células competentes *E. coli* JM109.

3.2.7 CLONACIÓN DEL ORF DE *MfAtr4* EN EL VECTOR pGEM-T Easy

El ORF se ligó en el vector pGEM-T Easy, siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, se mezclaron 5 μ L de amortiguador de ligación (2X), 1 μ L de vector pGEM-T Easy (50 ng), 2 μ L de producto de PCR purificado (100 ng) y 2 μ L de agua. La reacción se dejó ligando toda la noche a 4°C. Con el producto de la ligación se transformaron químicamente células competentes TOP10 de *E. coli*. Se adicionaron 4 μ L de la reacción de ligación a una alícuota (50 μ L) de las células, se incubó 30 min en hielo y seguidamente las células se sometieron a choque térmico a 42° C por 30 seg. Inmediatamente se le adicionó 250 μ L de medio de cultivo SOC (Bacto tryptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM y KCl 2.5 mM) y se incubó 60 min. a 37° C en agitación (200 rpm). Posteriormente se plaquearon en cajas Petri conteniendo medio LB adicionado con 50 μ g/mL de Kanamicina y 50 μ L de Xgal (20 μ g/mL). Las clonas blancas se analizaron por PCR en colonia. Las clonas positivas conteniendo el inserto de interés se crecieron en medio LB y se extrajeron los plásmidos.

3.2.8 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pPICZA E INSERCIÓN EN *E. coli*

La preparación del vector pPICZA (Invitrogen) se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Brevemente, se preparó una alícuota de 1 μ g/ μ L de vector. Se tomó 2 μ L de la alícuota para transformar células competentes de *E. coli* TOP10; las células transformadas se seleccionaron con el antibiótico zeocina. Las clonas positivas se analizaron por PCR en colonia, utilizando un conjunto de oligonucleótidos específicos del vector PICZA. Las clonas positivas se crecieron en medio LB adicionado con zeocina.

3.2.9 INSERCIÓN DEL ORF DE *MfAtr4* EN EL VECTOR pPICZA

El vector PICZA (Fig. 3.3) se digirió en el sitio múltiple de clonación con las enzimas *SacI* y *Apal*. Asimismo el ORF de *MfAtr4*, se liberó del vector P-GEM mediante restricción con las enzimas *SacI* y *Apal*. La ligación se

realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Con el producto ligado se transformaron células competentes de *E. coli* JM109. Las clonas positivas se evaluaron por PCR con oligonucleótidos específicos de *MfAtr4* y por patrón de restricción con las enzimas *SacII* y *Apal*.

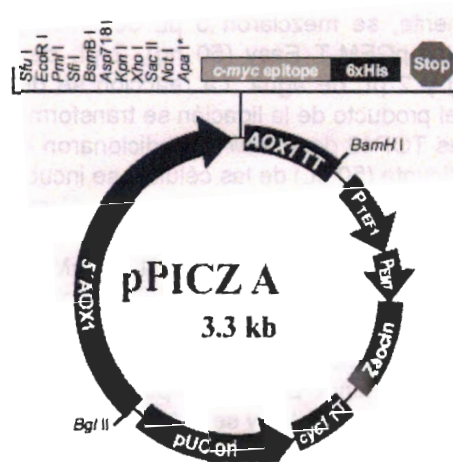


Figura 3.3. Mapa del vector pPICZA. El vector contiene el sitio de clonación múltiple, el epítipo c-myc, la etiqueta 6xHis, el codón de paro (Stop), el promotor 5'AOX1, el terminador AOX1TT y el marcador de selección contra la zeocina (INVITROGEN).

3.2.10 TRANSFORMACIÓN DE *Pichia pastoris* CON EL CASSETTE pPICZA-MFATR4

La levadura se cultivó en 10 mL de medio YPD toda la noche. Se tomó 20 μ L del cultivo y se inoculó a 100 mL de medio YPD, se incubó a 30 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 1.5 a 600 nm. Las células se centrifugaron y finalmente se resuspendieron en 1 M de sorbitol a una densidad de 10^{10} células/mL. Se tomó 80 μ L de células y se mezcló con 1000 ng del ADN recombinante. Las células se electroporaron y recuperaron con 1 mL de sorbitol 1 M. Las células se sembraron en cajas de YNBS/agar adicionado con zeocina (100 μ g/mL) y se dejaron crecer a 30°C durante 2 a 4 días.

3.2.11 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MFATR4 RECOMBINANTE

En 25 mL de medio MGYH se inoculó una colonia de *P. pastoris* conteniendo el inserto pPICZA-MFATR4, se incubó a 30°C, a 200 rpm y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 2 a 600nm.

Las células se centrifugaron 5 minutos a 5000 g a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante, la pastilla celular se resuspendió en el medio MMH a una densidad óptica de 1.0 a 600 nm. Se adicionó 5% de metanol cada 24 h y se incubó a 30°C. Se colectó 1 mL de cultivo celular cada 12 h, durante un periodo de 96 h. El paquete celular se utilizó para la extracción de proteínas totales.

3.2.12 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA MFATR4 RECOMBINANTE

Las células colectadas se centrifugaron a 4000 g durante 1 min a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante; la pastilla celular se lavó con 200 μ L de amortiguador BB (Breaking Buffer), se centrifugó nuevamente a 4000 rpm durante 1 min, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 μ L del amortiguador BB. A la suspensión se le adicionó un volumen igual de perlas de vidrio de 0.5 mm. Las células se agitaron 8 veces en un vortex durante 30 segundos. Las células se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C. El sobrenadante conteniendo la proteína soluble se transfirió a un tubo nuevo. Para la extracción de las proteínas membranales a la pastilla se le adicionó 60 μ L del amortiguador BB con 1% de Tritón X100. Las proteínas solubles e insolubles se cuantificaron por el método de Bradford y Peterson.

3.2.13 ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE EN GELES DE SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

El análisis de la proteína recombinante se realizó en geles desnaturizantes de 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE). El gel se cargó con 25 microgramos de la proteína por carril; la electroforesis se desarrolló a 100 V durante 2:30 h. El gel se tiñó con azul de Coomassie. De forma paralela otro gel (desarrollado en idénticas condiciones) fue transferido toda la noche a 25 V, 4°C a una membrana PVDF, para la detección de la proteína por Western Blot. La inmunodetección se realizó empleando el anticuerpo anti-myc

conjugado a peroxidasa, la detección positiva se realizó por quimioluminiscencia y se reveló en una película Kodak.

3.2.14 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS DEL GEN *MfAtr4*

Usando como sonda *in silico* la secuencia del gen *MfAtr4* obtenida experimentalmente, se realizó un análisis BlastX en el genoma de *M. fijiensis*. La secuencia que dio homología (98%) ya había sido anotada por el Dr. Lute Zwieter, quien la describió como *MfAtr4*. La secuencia se descargó de la base de datos del genoma de *M. fijiensis* para realizar los análisis bioinformáticos. Se empleó software de acceso público. La predicción de la secuencia proteica se realizó con el programa DNALC Sequence Utilities (Sequence Translator/ORF Finder). Se realizó también análisis BlastX sobre la base de datos de secuencias de hongos depositados en el GeneBank, del NCBI.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 AMPLIFICACIÓN DE *MfAtr4* A PARTIR DE ADN_g y ADN_c de *M. fijiensis*.

La amplificación del gen *MfAtr4* se realizó a través de la técnica de PCR de larga distancia; para ello se utilizaron diversos pares de oligonucleótidos tales como: F1-R1, F2-R1, F3-R1, FORF*Atr4*-RORF*Atr4* y F2ORF*Atr4*-RORF*Atr4*. En el ADN genómico de *Mycosphaerella fijiensis* cepa C1233 dichos oligonucleótidos amplifican un tamaño de 5029 pb, mientras que en el ADN complementario amplifican un tamaño de 4977 pb. Esta diferencia de tamaño se debe a que la secuencia genómica del *MfAtr4* contiene un intrón de 52 pb localizada a 2800 pb corriente abajo del extremo 5' del gen.

Después de varios intentos se logró la amplificación del gen *MfAtr4*. En la figura 3.4 A se muestra el fragmento de 5029 pb obtenido de la PCR de larga distancia, amplificado con los oligonucleótidos F1-R1 y F2-R1. Dicho producto fue clonado en el vector pGEM®-T Easy y secuenciado. La amplificación del ORF del gen *MfAtr4* utilizando como templado ADN_c de cadena sencilla (previamente sintetizado con el paquete comercial GeneRacer) y las parejas de oligonucleótidos F1-R1, y F2-R1, se presenta en la figura 3.4 B. En este caso los resultados fueron infructuosos, pues no

se amplificó el producto de tamaño esperado (4977 pb). Solo se amplificaron productos menores a 3000 pb. La PCR de larga distancia se repitió varias ocasiones, variando las condiciones en la transcripción reversa; no obstante, los resultados fueron similares.

Dado los resultados negativos en los intentos de amplificación del ORF del gen *MfAtr4* a partir del ADNc, se procedió a verificar que el transcrito estuviera íntegro. Para ello se realizaron dos ensayos de PCR para confirmar la presencia de los extremos 5' y 3' del *MfAtr4* en el ADNc sintetizado con el kit Gene Racer (templado usado para la obtención del ORF completo). El primer experimento consistió en amplificar el extremo 5' de *MfAtr4* en el ADNc total; para ello se realizó una reacción de PCR, utilizando los oligonucleótidos F1 ubicado en el codón de inicio y como reverso *MfAtr4*S, localizado a 540 pb corriente abajo del codón de inicio, el tamaño del producto esperado con dichos oligonucleótidos fue de 569 pb (Fig 3.5 A). Este fragmento se amplificó a partir del ADNc y se clonó en el vector TOPO-TA; dos de las clonas positivas se secuenciaron. El segundo experimento que se realizó fue para confirmar la presencia de la región 3' del gen *MfAtr4* en el ADNc total. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos MF en sentido, y R1 como Reverso. El tamaño del fragmento amplificado con dichos oligonucleótidos es de 1025 pb (Fig. 3.5 B). El fragmento de 1025 pb se clonó en el vector TOPO-TA, dos clonas conteniendo el inserto de 1025 pb fueron secuenciadas. La secuenciación de los fragmentos de 569 pb y 1025 pb y el alineamiento de estas secuencias con la secuencia del gen confirmó que ambos fragmentos corresponden a los extremos 5' y 3' del gen *MfAtr4* respectivamente. Por lo tanto el ORF del *MfAtr4* está representado en el ADNc sintetizado. Debido a ello se procedió a amplificar un fragmento de 3200 pb del extremo 3', utilizando la técnica de PCR anidada con los oligonucleótidos FRaceABC4-RUnivRacer y FnestedABC4-RUnivnested; en la figura 3.6 puede observarse el producto amplificado, de 3110 pb. Dicho fragmento fue inicialmente clonado en el vector TOPO XL; sin embargo, el análisis de digestión con la enzima *EcoRI* sobre los plásmidos positivos liberaba un fragmento de únicamente 500 pb, el cual al ser secuenciado y analizado por BlastX mostró 100% de identidad con el extremo 3' del gen *MfAtr4*. Finalmente, el fragmento de 3200 pb se clonó en el vector, pGEM®-T Easy.

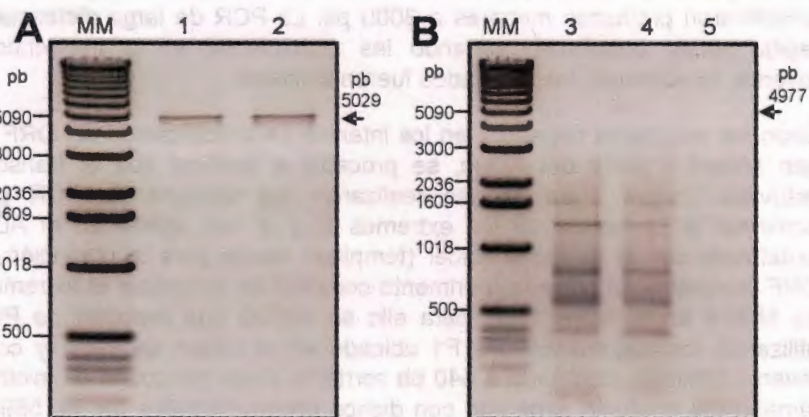


Figura 3.4. Análisis en gels de 1% de agarosa de los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos F1-R1 y F2-R1 para amplificar el ORF de MfAtr4. A) MM; marcador molecular, 1, 2 productos de ADN obtenidos a partir de ADNg con los iniciadores F1-R1, F2-R1. B) carriles 3 y 4, productos obtenidos a partir de ADNc con los iniciadores F1-R1 y F2-R1. La flecha a la derecha del panel A indica el tamaño del producto amplificado del ADNg y la flecha a la derecha del panel B indica el lugar donde se espera el producto a obtenerse en el ADNc, aunque no se observa el amplicón en este caso.

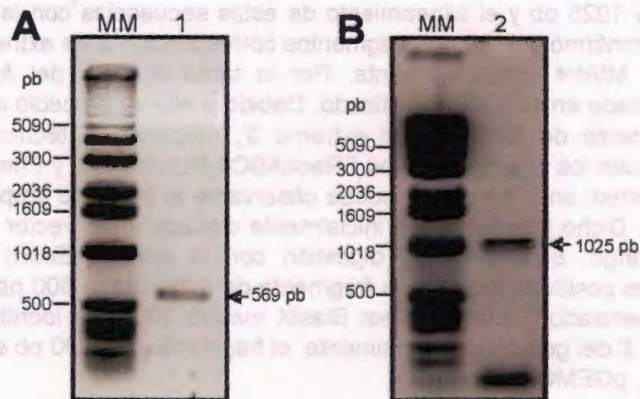
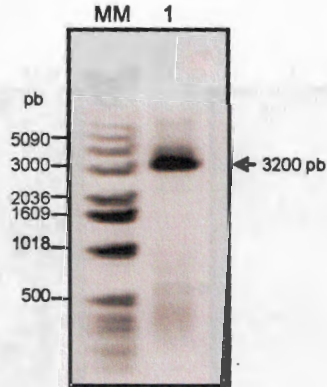


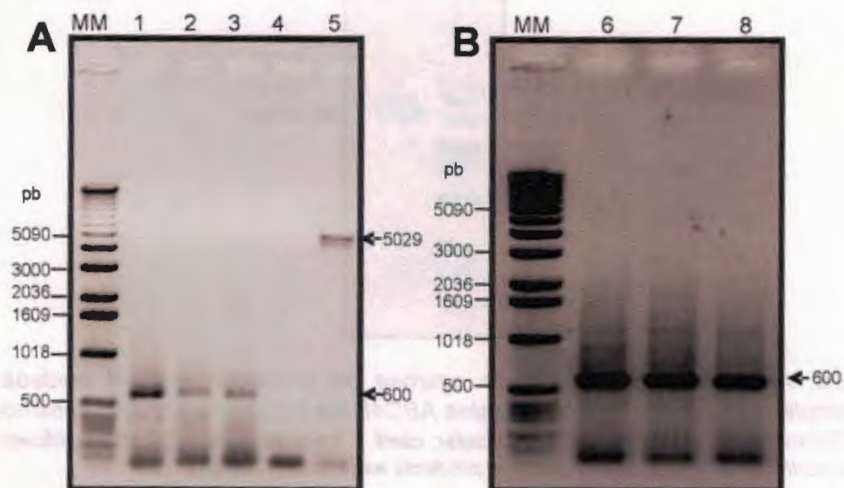
Figura 3.5. Análisis en gels de 1% de agarosa de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos F1-R5Sil y FMF-R1 para confirmar la presencia de los extremos 5' y 3' del transcrito MfAtr4 en el ADNc sintetizado por GeneRacer. A) Carril 1; producto de PCR correspondiente al fragmento de 569 pb utilizando los oligonucleótidos F1-R5Sil. B) Carril 2; amplificación del fragmento de 1025 pb utilizando los primer FMF y R. Las flechas indican los productos de 569 y 1025 pb esperados. MM, marcador molecular.



3.6. Análisis en gel de 1% de agarosa del producto de PCR anidada, amplificado con los oligonucleótidos ABC4Race3-RUnivrace y ABC4nested-RUnivnested. MM; marcador molecular, carril 1, fragmento de 3200 pb amplificado a partir de ADNc. La flecha indica el producto esperado (3200 pb).

Otra estrategia que se intentó para la obtención del ORF completo de *MfAtr4* a partir de ADNc fue optimizar las condiciones de PCR de larga distancia, utilizando estabilizadores como DMSO, glicerol, gelatina y BSA. Todos estos compuestos aumentaron el producto amplificado del gen *MfAtr4* sobre el ADN genómico, no obstante el resultado sobre el ADNc no fue el esperado, ya que solo se amplificaron fragmentos menores a 3000 pb. En la figura 3.7; puede observarse que se enriquece un fragmento de 600 pb.

A pesar de que el ORF del transportador *MfAtr4* está íntegro en el ADNc sintetizado, no se logró reamplificar el ORF completo por medio de PCR de larga distancia. Se decidió construir el ORF *MfAtr4* completo diseñando un ORF híbrido.



3.7. Análisis en gels de 1% de agarosa de los productos de PCR de larga distancia adicionados con los coadyuvantes gelatina (0.05%), DMSO (5%) y glicerol (0.5%). A) MM, marcador molecular. Productos de PCR obtenidos a partir de ADNc: Carril 1 (F1-R1), 2 (F2-R1) y 3 (F3-R1), Carril 4 control negativo sin templado, carril 5 control positivo usando ADN genómico. B) MM, marcador molecular, carril 6 (F1-R1), carril 7 (FORFAtr4-ROFRAtr4) y carril 8 (F2ORFAtr4- ROFRAtr4), amplificados a partir de ADNc. La flecha indica el producto de 600 pb enriquecido.

3.3. 2 DISEÑO DEL HÍBRIDO *MfAtr4*

Dado a que a finales del 2007 se contaba con la secuencia del genoma de *M. fijiensis* se decidió comparar mediante análisis *in silico* la secuencia depositada en el portal y la secuencia genómica del gen *MfAtr4* de la cepa C1233 de *M. fijiensis* obtenida en el laboratorio. El análisis mostró un 98% de homología y de identidad. También se observó que la secuencia genómica del *MfAtr4* contiene un intrón localizado a 2800 pb corriente abajo del extremo 5'. Con estos antecedentes y dado el interés de nuestra parte por obtener el ORF completo del *MfAtr4*, con el objetivo de realizar la expresión heteróloga en *P. pastoris*, se decidió diseñar un ORF *MfAtr4* híbrido. El primer paso para el diseño fue el análisis de restricción *in silico* de la secuencia genómica con el programa web cutter. Se procedió a elegir dos sitios de restricción únicos del ADNg (vector pGEM-MfAtr4g; plantilla 1)

y el mismo sitio en el fragmento de 3110 pb amplificado a partir del ADNc (vector pGEM-3110c; plantilla 2). Las enzimas *BspEI* y *BstXI* se utilizaron para realizar los cortes en la plantilla 1 y 2. Esta estrategia fue posible porque la secuenciación de los fragmentos obtenidos del *MfAtr4* a partir del ADNc confirmaron la existencia de un solo intrón y en el lugar predicho en el ADNg.

En la figura 3.8 se esquematiza la ubicación de los sitios de restricción y la inserción del fragmento liberado a partir de la plantilla 1 y 2 (3.8 A y B). También se esquematiza la ligación en la plantilla 1 en los sitios *BspEI* y *BstXI* del fragmento liberado de la plantilla 2 (Fig 3.8 C).

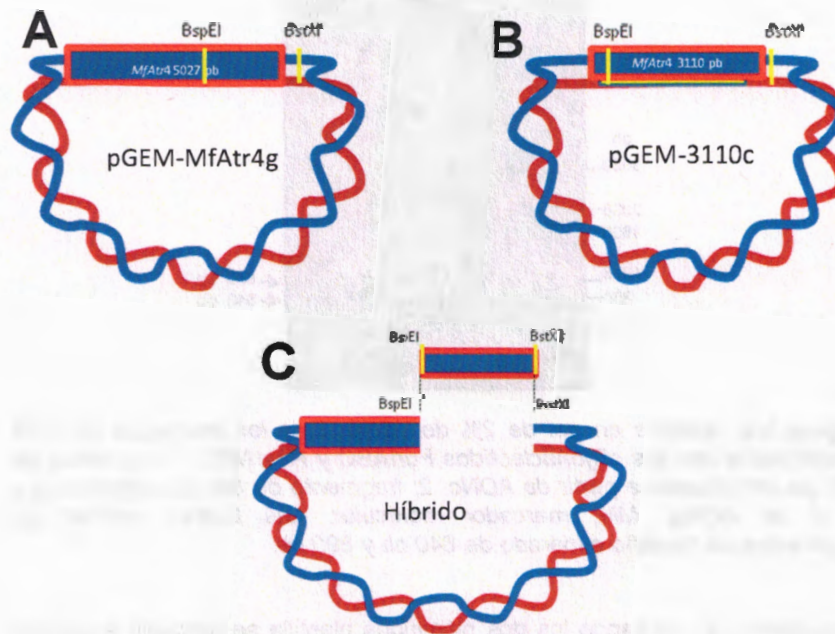


Figura 3.8. Esquemización de los plásmidos pGEM-MfAtr4g y pGEM-3110c. A) El sitio *BspEI* en la plantilla 1 se localiza río arriba del intrón; por lo que la fusión de este fragmento con la región liberada de la plantilla 2 (B), resulta en un híbrido sin intrón, lo que sería un ORF completo obtenido de ADNc. C); Representación esquemática de la ligación del inserto liberado de la plantilla 2 y transferido a la plantilla 1, generando el producto híbrido.

Paralelamente al análisis *in silico* para el diseño del híbrido, se realizó un análisis de PCR usando como templado ambos plásmidos, esto con el fin de observar la diferencia de tamaño debido al intrón contenido en el ADN genómico. Para ello se usó el conjunto de oligonucleótidos ForIABC y RevIABC diseñados sobre regiones flanqueantes del intrón. En la figura 3.9 puede observarse la diferencia de migración de los productos amplificados a partir de dichos plásmido. El resultado electroforético muestra una diferencia de migración en el ADN genómico (890 pb) y el DNAc (840 pb), congruente con el tamaño esperado.

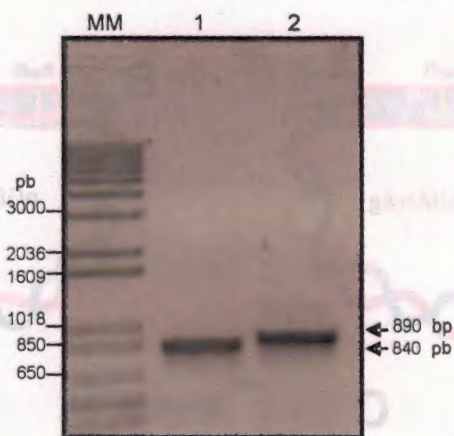


Figura 3.9. Análisis en gel de 2% de agarosa de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos ForIABC y RevIABC. 1, fragmento de 840 pb amplificado a partir de ADNc, 2; fragmento de 890 pb amplificado a partir de ADNg, MM, marcador molecular. Las flechas indican los fragmentos de tamaño esperado de 840 pb y 890 pb.

Seguidamente, utilizando los dos plásmidos plantilla se procedió a realizar la doble digestión con las enzimas *Bsp*EI y *Bst*XI. En la figura 3.10, puede observarse el análisis electroforético resultante de la restricción con las enzimas *Bsp*EI y *Bst*XI en las plantillas 1 y 2. El corte con dichas enzimas en la plantilla 1 o vector pGEM-MfAtr4g generó 2 fragmentos: uno de 5815 pb y otro de 2227 pb (contiene el intrón). Paralelamente la restricción del vector pGEM-3110c generó 2 fragmentos de 2377 pb y 3748 pb respectivamente. El fragmento de 5815 pb se utilizó como ADN receptor y se le ligó el fragmento liberado de 2377 pb correspondiente al extremo 3' del ORF del gen *MfAtr4*.

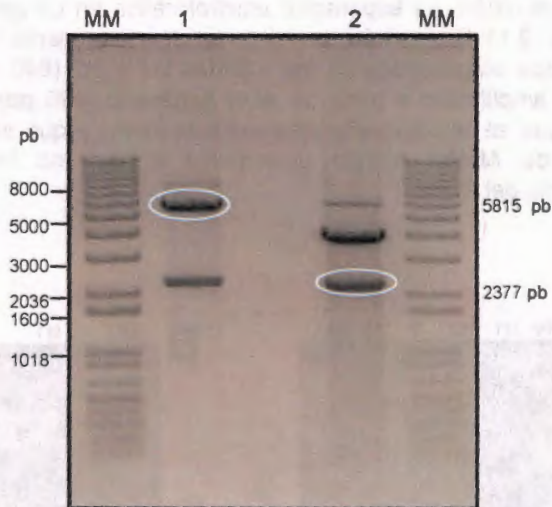


Figura 3.10. Análisis en gel de 0.8% de agarosa de los productos de restricción con las enzimas *BspEI* y *BstXI*. Se encierran en círculos blancos los fragmentos ligados en la construcción del ORF híbrido del *MfAtr4*. 1; fragmento de 5815 pb liberado del vector *pGEM-MfAtr4g*, 2; fragmento de 2377 pb liberado del vector *pGEM-3110c*. MM, marcador molecular.

Con el producto de ligación híbrido se transformaron células competentes JM109 de *E. coli*. En la transformación solo se obtuvieron ocho clones de los cuales cinco fueron híbridos positivos.

Se seleccionaron dos clones híbridos denominados H1 y H2 y se secuenciaron. Posteriormente se realizó la amplificación del ORF del *MfAtr4* por PCR de larga distancia usando los oligonucleótidos FORF_{Atr4}-RORF_{Atr4}, usando como templado los híbridos 1, 2 y el ADN_g como control. El análisis electrofóretico de los productos de PCR no permite distinguir la diferencia entre el fragmento de 4977 pb amplificado a partir de los híbridos H1 y H2, respecto al producto de 5029 pb amplificado a partir del ADN genómico (Fig. 3.11 A). Esto puede ser debido a que la diferencia de 52 pb es muy pequeña y no es observable en fragmentos de gran tamaño como los analizados. Para corroborar la eliminación del intrón en los híbridos se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos ForIABC y RevIABC que

flanquean al intrón. La separación electroforética en un gel de agarosa de 1.5 % (Fig. 3.11 B) mostró que existe un desplazamiento de migración de los productos amplificados de los híbridos H1 y H2 (840 pb), respecto al fragmento amplificado a partir de ADN genómico (890 pb). Este resultado confirmó que se removió eficientemente el intrón y que se tiene un ORF completo de *MfAtr4* híbrido equivalente al que se hubiera obtenido directamente del ADNc.

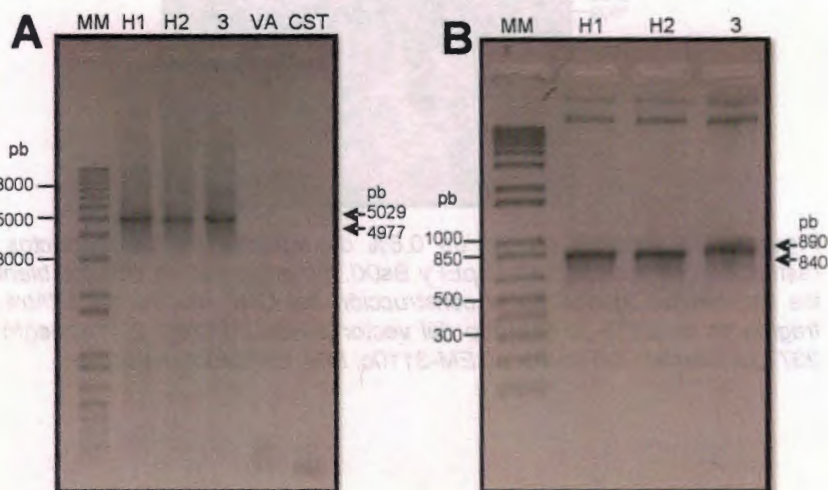


Figura 3.11. Análisis en gels de 0.8% y 1.5 % de agarosa de los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos FORFAtr4-RORFAtr4 y ForIABC y RevIABC, respectivamente. A) PCR de larga distancia con los oligonucleótidos FORFAtr4-RORFAtr4 usando *MfAtr4* híbrido y ADN genómico como templado. B) productos de 840 y 890 pb amplificado con los oligonucleótidos ForIABC y RevIABC, usando *MfAtr4* híbrido y ADN genómico como templado. H1, híbrido 1, H2, híbrido 2, carril 3; ADN genómico, carril VA: vector vacío, carril CST: control sin templado.

3.3.3 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pPICZA-MFATR4 PARA LA EXPRESIÓN EN *P. pastoris*

Para la generación del constructo pPICZA-MFATR4, se creció la bacteria conteniendo el vector pPICZA, en medio LB líquido y se extrajo el ADN plasmídico. Se digirió doblemente 1 µg de ADN plasmídico con las enzimas *SacI* y *Apal*. Paralelamente el ADN híbrido se digirió con las enzimas *SacI* y *Apal*; la doble digestión liberó el producto correspondiente al *MfAtr4* híbrido. En la figura 3.12 se muestra el análisis electroforético de la digestión del vector pPICZA y del híbrido 1. El fragmento correspondiente al ORF de *MfAtr4* se ligó en el vector pPICZA previamente digerido y se transformaron células competentes JM109 de *E. coli*. Las transformantes fueron analizadas por PCR de larga distancia, usando los oligonucleotidos AOX5F-AOX3R. Solo una clona fue positiva para el constructo pPICZA-MFATR4; dicha clona se denominó C20 (Fig.3.13).

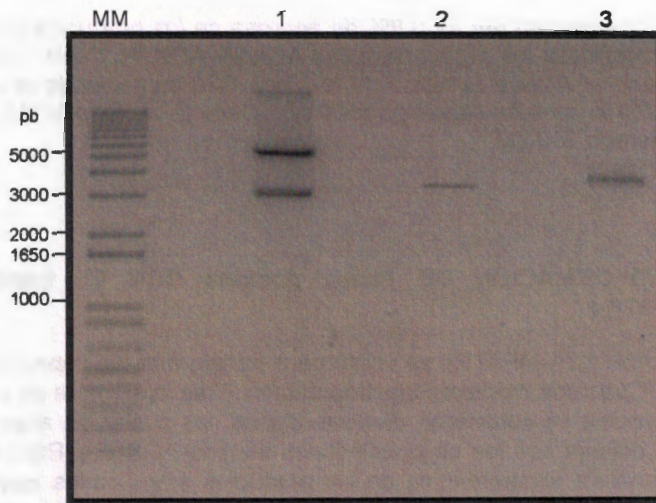


Figura 3.12. Análisis en gel de 0.8% de agarosa de los productos de restricción con las enzimas *SacI* y *Apal*. Carril 1; Híbrido 1; carril 2, vector pPICZA digerido; carril 3, vector pPICZA sin digerir. MM; marcador molecular.

LA CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pPICZA-MFATR4 PARA LA EXPRESIÓN EN *P. pastoris*

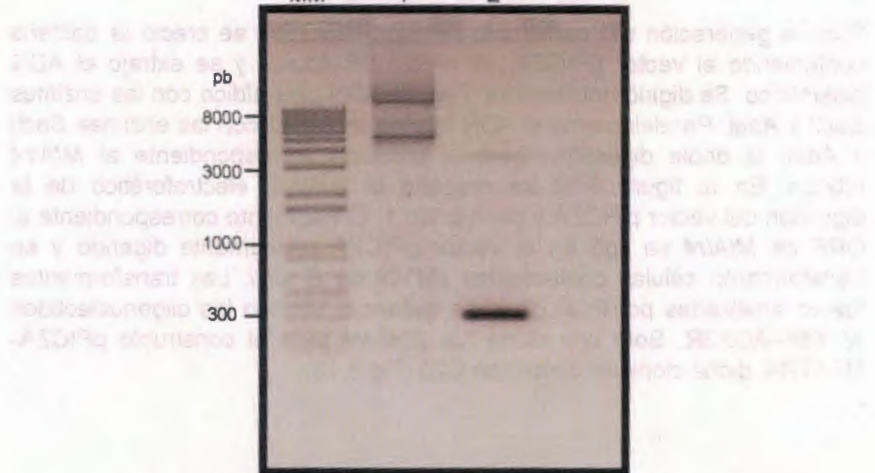


Figura 3.13. Análisis en gel de 0.8% de agarosa de los productos de PCR de larga distancia con los oligonucleótidos AOX5F–AOX3R. Carril 1; se usó como templado el ADN plásmidico de la clona C20 conteniendo el vector pPICZA-MFATR4 (tamaño esperado 5300 pb). Carril 2; vector pPICZA vacío (tamaño esperado 300 pb).

3.3.4 TRANSFORMACIÓN DE *Pichia pastoris* CON EL CASSETE pPICZA-MFATR4

El constructo pPICZA-MFATR4 se utilizó para transformar las cepas GS115 y KM71 de *P. pastoris* mediante electroporación. Tras la siembra en placas de YPDS+Zeocina se obtuvieron diversas clonas, los cuales se analizaron por PCR en colonia con los oligonucleótidos sentido AOX5F y R5sil como reverso. El análisis electrofóretico de los productos amplificados muestran que en las 7 clonas analizadas se observa el producto de 600 pb correspondiente al fragmento de interés. No obstante al utilizar estas para amplificar el ORF completo, por PCR de larga distancia no se logró la amplificación del gen *MfAtr4* completo. Por lo que dichas clonas, fueron consideradas como falsos positivos (Fig.3.14).

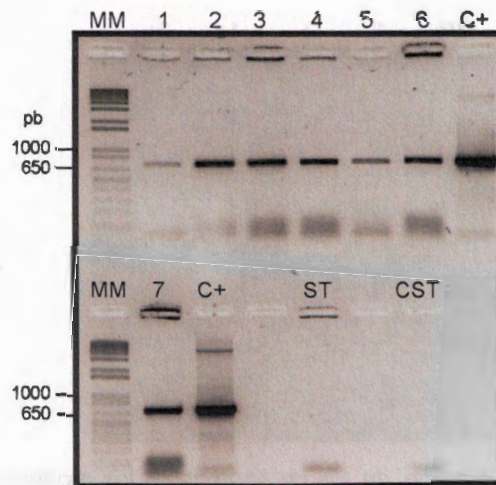


Figura 3.14. Análisis en gel de 1% de agarosa de los productos de 850 pb amplificados por PCR con los oligonucleótidos sentido AOX5' y reverso R5sil. Carril:1-7 transformantes de *P. pastoris*, carril ST: *P. pastoris* sin transformar, carril: C+, control positivo (vector pPICZA-MFATR4), Carril CST; control sin templado. MM. Marcador molecular.

En una segunda transformación de *P. pastoris* se obtuvo una sola clona, la cual se analizó por PCR en colonia para amplificar el extremo 5' con los oligonucleótidos FAOX5'-RABC2 (2.7 kb) y el extremo 3' con los oligonucleótidos F1025-RAOX3' (1.02 kb). El análisis electrofóretico mostró los fragmentos de 2.7 kb y 1.2 kb esperados, correspondientes a los extremos 5' y 3'. (Fig. 3.15). Como control positivo se usó el plásmido pPICZA-MFATR4.

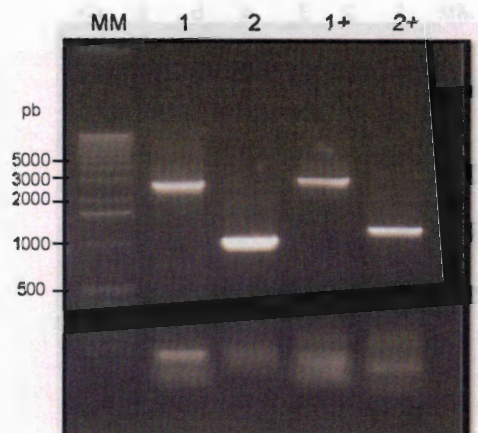


Figura 3.15. Análisis en gel de 1% de agarosa de los productos de 2700 y 1025 pb amplificados por PCR en colonia a partir de *P. pastoris* transformada con el vector pPICZA-MFATR4. Carril 1 y 2; *P. pastoris* transformada con el vector pPICZA-MFATR4. Carriles 1+ y 2+ vector pPICZA-MFATR4 (control positivo).

La presunta transformante de *P. pastoris* fue cultivada y se le extrajo el ADNg (Fig. 3.16). El ADNg se utilizó para amplificar el gen *MfAtr4* completo por medio de la PCR de larga distancia con los oligonucleótidos AOX5-RORF_{Atr4} (5050 pb), y con los oligonucleótidos FORF_{Atr4}-RAOX3 (5050 pb). En la figura 3.17 se muestra el perfil electrofórico de los productos obtenidos con la PCR de larga distancia. Puede observarse que se amplifican los productos de 5050 pb correspondientes al ORF del gen *MfAtr4* y un fragmento del promotor 5'AOX1 ó terminador 3'AOX1. Como control positivo se utilizó el plásmido pPICZA-MFATR4 y como control negativo se utilizó la levadura *P. pastoris* sin transformar (Fig. 3.17 A y B). Se obtuvieron tres transformantes de *P. pastoris* positivas con la región codificante completa del *MfAtr4*.

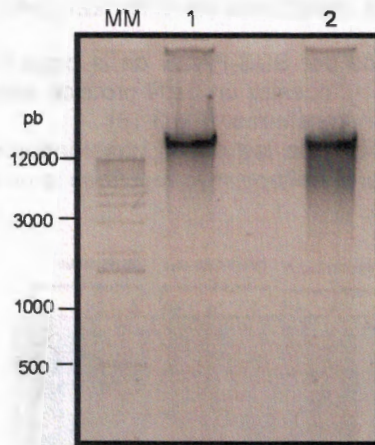
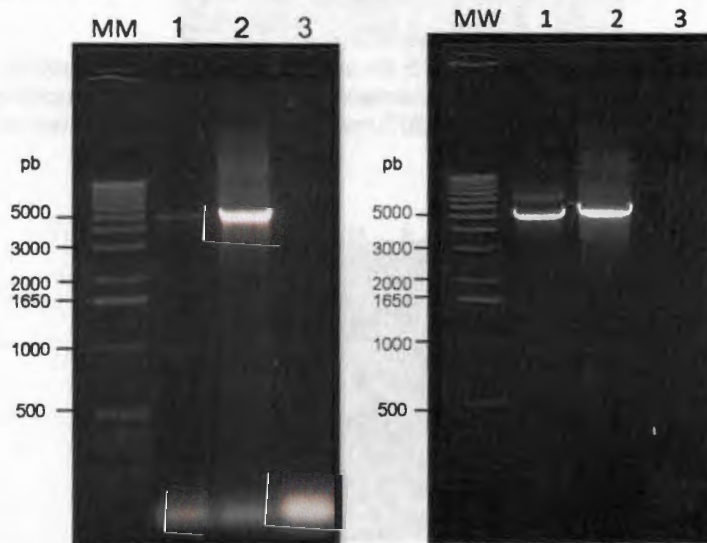


Figura 3.16. Análisis en gel de 1% de agarosa del ADN genómico de la levadura *Pichia pastoris*. 1, ADN genómico de *P. pastoris* transformada con el vector *pPICZA-MFATR4* y 2, ADNg de *P. pastoris* sin transformar.



3.17. Análisis en gels de 1% de agarosa de los productos amplificados por PCR de larga distancia con los oligonucleótidos AOX5F- RORFAt4 (A) y FORFAt4-AOX3R (B). Carril 1; ADNg de *P. pastoris* transformada con el vector *pPICZA-MFATR4*. Carril 2; control positivo (vector *pPICZA-MFATR4*) y carril 3; ADNg de *P. pastoris* sin transformar.

3.3.5 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MFATR4 RECOMBINANTE

La proteína total analizada por SDS-PAGE de la cepa GS115C20 tratada con metanol (0, 24 y 48 h) muestra un perfil proteico similar al tratamiento sin metanol y al control sin transformar (Fig.3.18).

El análisis por Western blot de las cepas transformantes mostró que el anticuerpo dirigido contra el epítipo myc reconoce a una proteína de alto peso molecular (Fig.3.19).

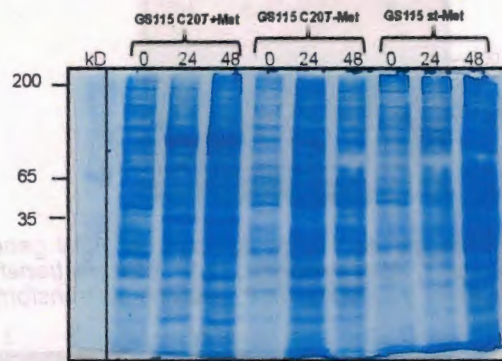


Figura 3.18. Análisis en SDS-PAGE de la proteína total de *P. pastoris*. Se analizó el perfil proteico de la transformante GS115C20T+met; inducida con metanol 0, 24 y 48 h y GS115C20T-met; sin metanol. Como control se utilizó la cepa silvestre GS115.

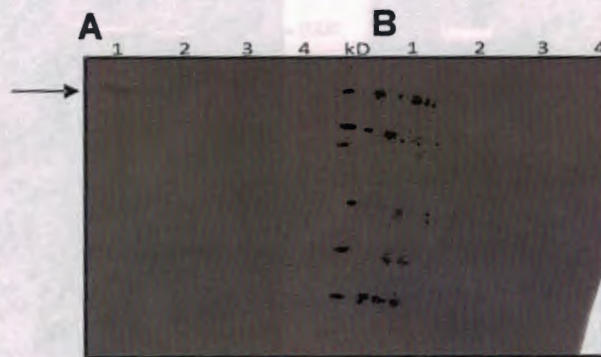


Figura 3.19. Inmunodetección de la proteína recombinante MFATR4. A) transformantes inducidas con metanol y B) transformantes sin metanol. 1; transformante GS115C20T, 2; transformante GS115MG, 3, transformante KM71MG, 4; cepa silvestre. La flecha indica la proteína MFATR4. kD; marcador de peso molecular.

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 AMPLIFICACIÓN DEL ORF DEL TRANSPORTADOR *MfAtr4*

El primer paso para la expresión heteróloga es la obtención del gen de interés. En este trabajo se aborda el transportador ABC denominado *MfAtr4* (ORF 4977pb). Para la amplificación del gen *MfAtr4* se utilizó la estrategia de PCR de larga distancia. Sin embargo, obtener el gen *MfAtr4* completo fue difícil debido a que es un gen de gran tamaño. De hecho, la obtención del ORF completo de *MfAtr4* a partir de ADNc no se consiguió (Fig 3.4 B). En contraste, usando el ADN genómico como templado, el gen completo de *MfAtr4* (5027 pb) se amplificó de manera relativamente sencilla (Fig. 3.4 A). Se sabe que para la amplificación de transcritos de gran tamaño es importante la integridad del ADNc templado, así como la optimización de la PCR de larga distancia (Schwers *et al.*, 2000 and Jensen *et al.*, 2010).

Para la optimización de la PCR de larga distancia se han usado aditivos como betaina, dimetilsulfóxido (DMSO), formamida, Tween 20, Laureth 12, Tritón X-100, polietilenglicol (PEG), glicerol, albúmina bovina, entre otros (Frackman *et al.*, 1998). Dichos compuestos optimizan la reacción de PCR cuando el ADN templado posee regiones ricas en GC, mismas que ocasionan la formación de estructuras secundarias en su estructura (Rees *et al.*, 1993). En este estudio se realizaron ensayos usando gelatina, DMSO y glicerol para la amplificación a partir de ADNc; sin embargo, los resultados no fueron los deseados. Otra estrategia que se siguió fue emplear diferentes polimerasas tales como: la Taq polimerasa (Invitrogen), Taq platinum (Invitrogen) y la Gotaq (Promega). No obstante, los resultados de amplificación no fueron exitosos. Es posible que los resultados negativos sean por la presencia de iones divalentes como el Mg^{2+} , que pudiesen promover el corte del ADN templado a altas temperaturas. Otro punto importante es la dificultad de la desnaturalización de moléculas de ADN muy grandes (Jensen *et al.*, 2010). A pesar que la PCR de larga distancia es una técnica difícil para amplificar fragmentos arriba de 3000 pb, esta herramienta ha sido empleada para amplificar productos génicos de 8500 y 5500 pb en *Aspergillus fumigatus* (Jin *et al.*, 2004).

Dadas las dificultades para amplificar el ORF de *MfAtr4* a partir de ADNc se recurrió a la estrategia de construcción de un ORF híbrido originado a partir de la ligación de un fragmento de ADN genómico y otro fragmento de ADNc. Esta estrategia es una opción a seguir cuando se tienen dificultades para amplificar un fragmento de gran tamaño a partir de ADNc y en particular como en este caso en el que el análisis *in silico* predijo un solo intrón en el gen. Cabe mencionar que es importante tener la secuencia genómica del gen de interés. La secuenciación del genoma de *M. fijiensis* facilitó la realización de esta estrategia, ya que permitió el análisis de restricción *in*

silico del gen completo. En este estudio se logró la amplificación del gen *MfAtr4* a partir del ADN genómico y de un ADN híbrido correspondiente al ORF del gen *MfAtr4* de 4977pb (Fig. 3.11). Dicho ORF híbrido fue secuenciado en su totalidad y el análisis bioinformático muestra que codifica para una proteína de 1658 aminoácidos.

3.4.2 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pPICZA-MFATR4 Y TRANSFORMACIÓN DE *Pichia pastoris*

El ORF híbrido de *MfAtr4* se subclonó en el vector pPICZA y se tiene una clona en *E. coli* denominada C20 que contiene el constructo pPICZA-MFATR4. Diversos estudios donde se ha realizado la transformación de las cepas GS115 y KM71 mencionan que el número de transformantes que contienen el inserto completo es bajo (Cai, 2001). En el presente estudio se obtuvieron diversas transformantes seleccionadas con el antibiótico zeocina. Sin embargo, al analizar los extremos del ORF del gen *MfAtr4*, las presuntas transformantes resultaron ser falsos positivos (Fig. 3.14). Ensayos posteriores de transformación produjeron diversas clonas regenerantes de *P. pastoris* cepa GS115, de las cuales 3 fueron positivas para los extremos 5' y 3' del gen *MfAtr4*. En la figura 3.15 se muestra la electroforesis de la cepa GS115 transformante número 1 conteniendo el gen *MfAtr4*.

En el 2000 Cai expresó heterológamente cuatro transportadores ABC denominados ABCC5, ABCD1, ABCG1 y ABCG2; obtuvo un total de 18 clonas transformantes de la cepa KM71, mientras que con la cepa GS115 de *P. pastoris* la transformación no fue exitosa. En el 2007 Chloupkova y colaboradores expresaron en *P. pastoris* 25 transportadores ABC de humanos, quienes demostraron que los transportadores ABCC3, ABCB6, ABCD1, ABCG1, ABCG4 y ABCG8 se expresan altamente en comparación con los transportadores ABCA1, ABCA4, ABCC10, ABCC11 y ABCC12, los cuales tienen una expresión baja en *Pichia pastoris*, por lo que la expresión proteica en esta levadura es variable.

Las tres transformantes obtenidas fueron inducidas con metanol, para la producción de la proteína recombinante MFATR4. El análisis por Western blot muestra que el anticuerpo anti-myc detecta a una presunta proteína MFATR4 recombinante en las transformantes. Aún falta determinar la cantidad de proteína recombinante MFATR4, que se expresa en cada transformante. Los niveles de producción de proteínas heterólogas bajo el control del promotor PAOX1 en cultivos de elevada densidad celular son variables, y deben de ser optimizados en cada caso (Cregg *et al* 1993). Es importante resaltar que dicho sistema de expresión heteróloga ha sido

empleado para expresar diversas proteínas, entre ellas glucoproteínas, lipasas, xilanasas y transportadores ABC de humanos y de ratón entre otros (Bergeld, 2006; Tanino *et al.*, 2006; Chloupkova *et al.*, 2007).

3.5 CONCLUSIONES

La estrategia del ORF híbrido permitió obtener la región codificante (CDS) del gen *MfAtr4* (4977 pb) el cual se clonó en el vector pPICZA. La secuenciación de dicho CDS mostró una homología de 99% con la secuencia depositada en el portal del genoma de *M. fijiensis*.

Se confirmó que el marco de lectura del gen *MfAtr4* es el correcto en el vector pPICZA.

El ORF del gen *MfAtr4* codifica para una proteína de 1658 aminoácidos, con una identidad del 70% con el transportador *MgAtr4* de *M. graminicola*.

Se cuenta con tres transformantes de *P. pastoris* conteniendo el vector recombinante pPICZA-MFATR4.

3.6 REFERENCIAS

- Bergeld, L. (2006). *Trametes versicolor laccase: random mutagenesis and heterologous expression in Pichia pastoris*. Thesis. Faculty of Technology and Science Department of Chemistry and Biomedical Sciences.
- Cai, J., Genevieve T., Dien L., Hakim M., Rae S., Yanping M. and Philippe G. (2001). *Expression of ATP – Binding Cassette (ABC) transporter proteins in Pichia pastoris*. Poster.
- Cereghino, L., L. Cereghino, C. Ilgen and J.M. Cregg (2002). *Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast Pichia pastoris*. Current Opinion in Biotechnology, 13: 329-332.
- Chloukova, M., Pickert A. Yeuan L., Souza S., Yenphuong T., Trinh M. Connelly M., Dumont M. and Urbatsch L. (2007). *Expression of 25 Human ABC Transporters in the Yeast Pichia pastoris and Characterization of the Purified ABCC3 ATPase Activity*. Biochemistry, 46: 7992-8003.
- Córdoba, R., Néstor A., Encizo N., Poutou R. and Barrera L. (2003). *Pichia pastoris one alternative for human glycoprotein production of therapeutic use fermentation strategies*. Revista Colombiana de Biotecnología, 5 (2): 73:84.
- Cregg, J.M. and K.R. Madden. (1988). *Development of the methylotrophic yeast, Pichia pastoris, as a host system for production of foreign proteins*. Development in Industrial Microbiology, 29: 33-41.
- Cregg, J.M., T.S. Vedvick and W. Rasehke. (1993). *Recent advantages in the expression of foreign genes in Pichia pastoris*. Nature Biotechnology, 2: 905:910
- Frackman, S., G. Kobs, D. Simpson and D. Storts. (1998). *Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR*. Promega Notes. 27 p.
- Ferrer P., C. Valero and C. Sola. (2000). *Production of native and tailor made enzymes for fine chemicals productions In: Kokotos G., Constantinou- Kokotou V. (Eds). Lipases and Lipids: Structure, function and biotechnological applications*. Crete University Press Heraklion, 399-411.
- Goodman, JM. (1985). *Dihydroxyacetone synthase is an abundant constituent of the Methanol-induced peroxisome in Candida Boidinii*. The Journal of Biological Chemistry, 260 (11): 7108-13.

- Higgins, D. R. and J.M. Cregg (1998). *Pichia protocols. Methods in Molecular Biology*. 103 Humana Press.
- Jensen, M., M. Fukushima and R. Davis. (2010). *DMSO and betaine greatly improve amplification of GC rich constructs in De Novo synthesis*. PLOSone, 5(6):e11024.doi:10.1371/journal.pone.001104
- Jin J., K. Lee and B. Wickes (2004). *Simple chemical extraction method for DNA isolation from Aspergillus fumigatus and other Aspergillus species*. Journal of Clinical Microbiology, 42 (9): 4293-4296
- Koutz, P. Davis G. R., Sillman C., Barringer K., J.M. Cregg and G. Thill. (1989). Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. Yeast, 5:167-177.
- Ogata, K., H. Nishikawa and M. Ohsugi. (1969). *A yeast capable of utilizing methanol*. Agricultural and Biological Chemistry, 33: 159-1520.
- Patel, N.R., C.T. Hou, A.I. Laskin and P. Derelanko. (1981). *Microbial production of methylketones: properties of yeast second alcohol dehydrogenase*. Journal of Applied Biochemistry, 3:218-226.
- Schewers, S., A. Ehlich, S. Kobsch, A. Missel and D. Loffert. (2000). QIAGEN News 3:13-16
- Tani, Y., K. Yamada, Y. Sakai and V. Vongsuvalert. (1990). *Biocatalytic and fermentative production of useful chemicals by processes using methylotrophs*. FEMS Microbiology Letters, 87: 285-290
- Tanino, T., F. Hideki and K. Akihiko (2006). *Construction of a Pichia pastoris Cell-Surface Display System Using Flo1p Anchor System*. Biotechnology Progress, 22: 989-993.
- Tschopp J. F., Sverlow G., Kosson R., Craig W. and L. Grinna. (1987). *Expression of the lacZ gene from two methanol regulated promoters in Pichia pastoris*. Nucleic Acids Research, 15: 3859-3876.
- Veenhuis, M., J.P Van Dijken, and W. Harder. (1983). *The significance of peroxisomes in the metabolism of one carbon compounds in yeast*. Advances in Microbial Physiology, 24: 1-78.

Capítulo IV

Construcción del vector pSilent-MfAtr4SA para el silenciamiento del gen *MfAtr4*

4.1 INTRODUCCIÓN

La genómica funcional de hongos ha ido progresando debido en gran medida al desarrollo de herramientas moleculares. Estas permiten tener un mejor entendimiento del mecanismo molecular que los hongos utilizan en sus complejas interacciones. Una de las herramientas empleadas en la genómica funcional es la estrategia del ARN de interferencia. El fenómeno de silenciamiento de genes por ARN de interferencia afecta en forma específica el flujo de la información génica, impidiendo su traducción. Es así como la introducción de un ARN de doble cadena (ARNds) en una célula u organismo inicia una cascada de eventos que culminan con la degradación del ARNm de secuencia homóloga al ARNds introducido (López & Ramdorh, 2006). En consecuencia el ARNds es capaz de interrumpir de manera específica el flujo de información génica después de la transcripción del ADN. Desde su descubrimiento el ARN de interferencia se convirtió en una herramienta poderosa que permite explorar la función de los genes en muchas especies, a través de la inducción del silenciamiento génico postranscripcional y su aplicación ha sido demostrada en muchas especies (Jun *et al.*, 2007).

En hongos filamentosos el fenómeno de silenciamiento también es denominado quelling o supresión y fue descubierto en el hongo *Neurospora crassa* (Cattalanoto *et al.*, 2002). Este descubrimiento ha permitido un gran avance para estudiar el mecanismo molecular en hongos fitopatógenos como *Venturia inaequalis*, *Cladosporium fulvum*, *Magnaporthe oryzae*, entre otros. También abrió nuevas oportunidades no solo para la investigación básica sino también en la búsqueda de desarrollos tecnológicos, como reducir los daños de estos fitopatógenos en los cultivos.

4.1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ARNS PEQUEÑOS Y MECANISMOS DE LOS ARN DE INTERFERENCIA

Los ARN pequeños se clasifican en siARNs (small interfering ARN) y microARNs, ambos son componentes de un mecanismo de regulación de la expresión génica basado en transcritos que funcionan principalmente en eucariontes. Con el descubrimiento de los miARNs, también emergió una nueva y efectiva forma de inhibir la traducción de los ARNs mensajeros en forma rápida y práctica. Dicha técnica consiste en generar un ARN de doble hebra, (dsARN; double-strand ARN) correspondiente a un fragmento del ARNm que se desea interferir (Tang, 2005), por lo que muchos de los trabajos de silenciamiento se realizan para investigar la función de genes codificantes (Tang, 2005).

Aunque el silenciamiento génico presenta diferencias entre animales, hongos y plantas, el proceso y los factores moleculares generales involucrados en estos eventos son básicamente los mismos. El mecanismo de silenciamiento génico involucra el procesamiento del ARN de doble cadena por una ARNasa III llamada Dicer, que corta el ARN de doble cadena en moléculas pequeñas de aproximadamente 21 a 22 nucleótidos llamados siARNs (small interfering ARNs). Los siARNs de doble cadena producidos por Dicer se asocian al complejo RISC (ARN Induced Silencing Complex), activándose la actividad de helicasa y mediante la cual se separa las dos hebras del siARN; solo la hebra antisentido se mantiene asociada al complejo (Hammond *et al.*, 2001, Cattalanotto *et al.*, 2002, Tang, 2005; Murata *et al.*, 2007). En el complejo RISC se encuentra una proteína llamada Argonauta (Ago) cuya función es utilizar la cadena antisentido de estos ARNs para reconocer las secuencias complementarias en el ARNm blanco, provocando su degradación o impidiendo su traducción. Si la complementariedad no es perfecta, RISC queda asociado al mensajero y se atenúa la traducción. Pero si la homología es perfecta, RISC actúa como ribonucleasa y degrada al ARNm (Vaucheret, 2006).

4.1.2 VECTORES DE EXPRESIÓN DE SILENCIAMIENTO shARN

La producción de shARN (small hairpin ARN) con vectores de ADN es una de las metodologías empleadas para la aplicación del ARNi. Los shARN, ofrecen ventajas con respecto a otros sistemas, tal como es su estabilidad y su bajo costo (Jun *et al.*, 2007). Los shARN son producto del procesamiento de ARN de cadena larga, que se diseñan y se sintetizan en el laboratorio y se introducen en la célula de forma artificial. En los ARN de cadena larga,

las regiones complementarias están espaciadas por una pequeña región no complementaria que ocasiona que las regiones complementarias se plieguen sobre sí mismas formando una horquilla o asa corta, de una manera análoga al micro ARN natural (Taxman *et al.*, 2006). La horquilla es reconocida y procesada por la maquinaria del ARN de interferencia que convierte los shARN en los correspondientes siARN. En el apareamiento de bases pueden aparecer burbujas de nucleótidos, que junto con las estructuras de horquilla, son importantes para el reconocimiento de los miRNAs por las enzimas celulares y para potenciar la capacidad de esos ARNs para silenciar genes (Taxman *et al.*, 2006; McIntyre *et al.*, 2006).

4.1.3 EL VECTOR pSILENT-1

Nakayashiki y colaboradores (2005), construyeron 3 vectores distintos para silenciamiento de genes fúngicos; utilizaron diferentes espaciadores en cada uno de los vectores (cutinasa, gen Gus y proteína de unión a quitina). Al vector de expresión pBSTRP-PT, el cual contiene el promotor PtrpC y el terminador TtrpC de *Aspergillus nidulans*, se le insertó el cassette de higromicina como agente de selección, originando el vector pBSTRP-PT-H, también denominado pSilent. Una derivación de este vector dio origen al vector pSilent-1, el cual se construyó insertando fragmentos amplificados del intrón de la cutinasa de *M. oryza* y una región que contiene múltiples sitios de clonación.

El sitio de clonación 5' tiene sitios únicos de restricción para *XhoI*, *SnaBI* y *HindIII*, mientras que el sitio 3' tiene sitios de restricción para *BglII*, *SphI*, *StuI*, *KpnI* y *ApaI*. En la figura 4.1 A; se esquematiza el mapa de las diferentes partes que integran al vector pSilent-1; la figura 4.1 B corresponde a la secuencia de nucleótidos que rodea los sitios múltiples de clonación ("polilinker").

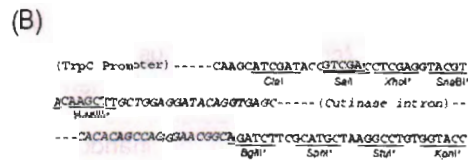
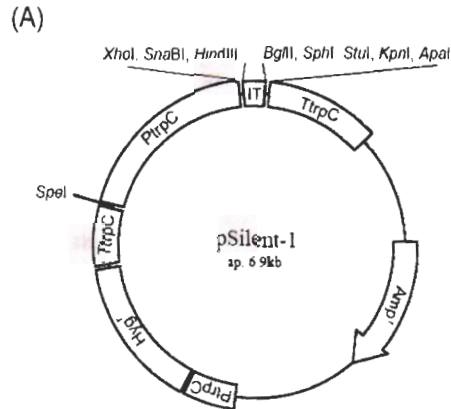


Figura 4.1. Esquematación del vector pSilent-1 y sus diferentes componentes. A) El vector pSilent-1 contiene el gen de resistencia a ampicilina (Amp), el gen de resistencia a higromicina (Hyg), un fragmento del intrón del gen de la cutinasa de *M.oryzae* (IT), el promotor PrpC y el terminador TrpC de *A. nidulans*. B) En el panel inferior se indican los sitios múltiples de clonación (Nakayashiki et al., 2005).

4.1.4 EL VECTOR pSILENT-1, HERRAMIENTA MOLECULAR USADA EN HONGOS

El vector pSilent-1 ha sido utilizado para silenciar genes en diversas especies de hongos; por ejemplo, en *Bipolaris oryzae*, un hongo ascomiceto causante de la enfermedad conocida como mancha de la hoja de arroz. El uso de la técnica del ARNi mediante el vector pSilent-1 permitió analizar la función del gen de la policetido sintasa (PKS1) en la síntesis de melanina. Para ello, al vector pSilent se le insertó en posición sentido y antisentido un fragmento de 756 pb del gen PKS1. Con el constructo pSilent/PKS1-2 se transformaron protoplastos de la cepa D9/F6-69 de *B. oryzae*. De diez de las clonas resultantes; dos presentaron un fenotipo gris o negro similar al de

la cepa silvestre y 8 presentaron un color blanco y una reducción en la expresión del gen PKS1, de acuerdo a los resultados del análisis por Northern blot (Moriwaki *et al.*, 2007).

En *Magnaporthe oryzae* se analizó mediante ARNi la función del gen manosa-1-fosfato guanosiltransferasa (MPG1), el cual codifica para una hidrofobina; el análisis se realizó insertando un fragmento de 416 pb del gen en el vector pSilent-1. Se observó que 35 de las transformantes tenían una reducción de hidrofobicidad. Este hecho confirmó que el constructo indujo el silenciamiento del gen MPG1 (Nakayashiki *et al.*, 2005), por lo que la utilidad del vector como herramienta de silenciamiento de las funciones génicas en *M. oryzae* quedó demostrada.

En *Colletotrichum lagenarium*, un ascomiceto hemibiotrófico, también se evaluó la utilidad del vector pSilent-1 para estudiar su genómica funcional. La generación de una doble mutante, mediante la incorporación del gen de la proteína verde fluorescente (eGFP) en el vector peGFP75 y del vector pSilent-1 en el constructo del vector peGFP75; su aplicación en el silenciamiento del gen eGFP generó varias transformantes. Las mutantes obtenidas se clasificaron en cinco tipos, de acuerdo al nivel de la expresión del gen eGFP (Nakayashiki *et al.*, 2005).

El hongo *Microsporium canis* ocasiona micosis en los perros, gatos e incluso puede transmitirse a humanos. En este patógeno varias proteasas han sido identificadas como potenciales factores de virulencia. Para determinar el papel de dichas proteasas en la patogénesis se utilizó la estrategia de silenciamiento mediada por ARNi y se silenciaron 2 genes blanco, uno que codifica para la subtilisina y otra que codifica para la dipeptidil peptidasa. El vector pSilent-1 se utilizó como plataforma para construir los vectores SUB3 y DPPIV. El análisis de las transformantes SUB3 y DPPIV se realizó midiendo la actividad enzimática de las proteasas y evaluando la expresión de los genes por RT-PCR en tiempo real. La actividad enzimática y el nivel de expresión varió en las transformantes; algunas solo presentaron un 5% de actividad con respecto al 100% del control. La inhibición de la actividad enzimática fue más eficiente para la transformantes SUB3 que para la transformantes DPPIV (Vermount *et al.*, 2007).

Otros hongos en los que se ha utilizado el ARNi como una estrategia para estudiar la función de genes de interés son *Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus fumigatus*, *Coprinopsis cinerea*, *Schizophyllum commune*, *Trichoderma harzianum*, *Cladosporium fulvum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium graminearum* y *Venturia inaequalis*, (Moriwaki *et al.*, 2007).

En *Mycosphaerella fijiensis* no existe ningún reporte sobre genes que participen en su patogénesis. En este estudio se propuso como objetivo silenciar al gen *MfAtr4* con el fin de determinar si dicho gen está involucrado en el desarrollo de la enfermedad Sigatoka negra en el banano. Se utilizó el vector pSilent-1 como plataforma para construir el vector pSilent-*MfAtr4SA*, con el cual se está transformando la cepa C1233 de *M. fijiensis*.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó la cepa C1233 de *Mycosphaerella fijiensis*, proporcionada por el grupo de banano de la Unidad de Biotecnología del CICY.

4.2.2 EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc

La extracción de RNA se realizó de acuerdo a como se menciona en el capítulo III apartado 3.2.2, de este trabajo.

4.2.3 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pSILENT-*MfAtr4SA*

Un fragmento de 569 pb denominado arbitrariamente *MfAtr4-S* ubicado a partir del codón ATG se amplificó por PCR a partir de ADNc. Para la amplificación del fragmento sentido se utilizaron los oligonucleótidos denominados *FMfAtr4-S* y *RMfAtr4-S* que incluyen los sitios de restricción *Sna*1 y *Hind*III respectivamente. Para la amplificación del fragmento en antisentido, se utilizaron los oligonucleótidos *FMfAtr4-A* y *RMfAtr4-A* con adaptadores *Ap*1 y *Bg*II (Fig 4.2). Ambos fragmentos se clonaron en el vector TOPO-TA; las clonas se analizaron por PCR en colonia. Se extrajo el ADN plasmídico de 2 clonas positivas y se secuenciaron. Los resultados de las secuencias se alinearon mediante el programa bioinformático antheprot. Los insertos en sentido y antisentido fueron digeridos de los constructos respectivos en el vector TOPO-TA con las enzimas correspondientes y se clonaron en los sitios respectivos del vector pSilent-1.

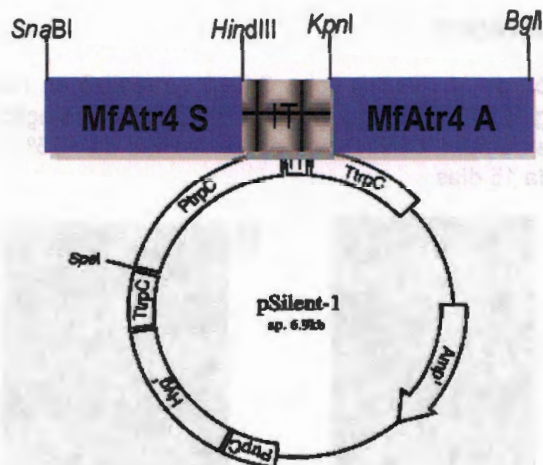


Figura 4.2. Esquema del vector pSilent-MfAtr4SA. Los fragmentos en sentido (MfAtr4 S) y antisentido (MfAtr4 A) se muestran en morado. En gris se muestra al espaciador (IT).

4.2.4 TRANSFORMACIÓN DE *M. fijiensis*

La transformación de *M. fijiensis* se realizó de acuerdo a Balint-Kurti y Churchill, 2001. Para ello se produjeron protoplastos a partir de la cepa C1233 y se incubó con 10 mg del plásmido de interés en presencia de 40% de PEG (4000 MW). La mezcla se incubó en hielo y se continuó como describen los autores, usando higromicina B como agente selector. Las colonias que crecieron en presencia del selector se transfieren a medio V8 adicionado con higromicina B.

4.3 RESULTADOS

La propagación de *M. fijiensis* cepa C1233 se realizó en medio de cultivo líquido V8 (Fig. 4.3 A) y V8-agar (Fig.4.3 B). El cultivo se agitó a 120 rpm, la temperatura en ambas condiciones de cultivo fue de ~25°C. El micelio se subcultivó cada 15 días.

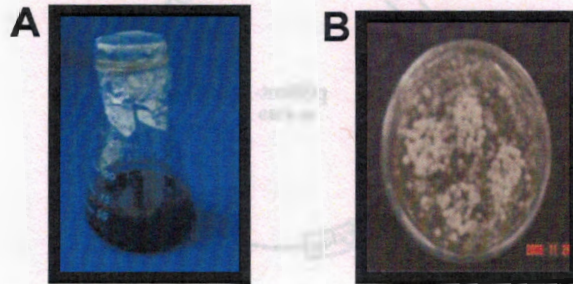


Figura 4.3. Aspecto general de cultivos in vitro de *M. fijiensis* cepa C1233. A) cultivo de micelio en matraz con medio V8 líquido. B) cultivo de micelio en medio V8/agar.

4.3.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL A PARTIR DE MICELIO DE *M. fijiensis*

La integridad del ARN extraído del micelio de *M. fijiensis* se verificó en geles desnaturalizantes de agarosa 1.2%. Se determinó que el ARN obtenido fue adecuado, dado que pueden observarse las subunidades 28S, 18S y 5S (Fig. 4.4).

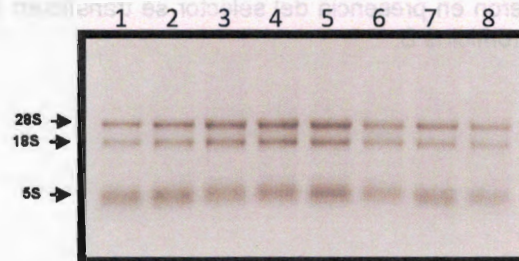


Figura 4.4. Fraccionamiento electroforético del ARN total de *M. fijiensis* en geles desnaturalizantes de 1.2% de agarosa. Los carriles 1 a 8 corresponden a la misma muestra. Las flechas indican las subunidades 28S, 18S y 5S.

4.3.2 CLONACIÓN DEL FRAGMENTO *MfAtr4-S* (569 pb) EN EL VECTOR pSILENT-1

El ORF del gen *MfAtr4* tiene una longitud de 4977 nucleótidos. El fragmento de 569 pb denominado *MfAtr4-S*, seleccionado como región blanco para el silenciamiento se localiza desde el codón ATG hasta 569 pb corriente abajo (Fig. 4.5).

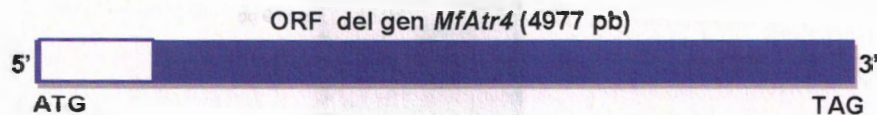


Figura 4.5. Esquema del ORF del gen *MfAtr4*. El morado indica la región codificante del gen *MfAtr4*, en blanco se indica el fragmento de 569 pb (*MfAtr4-S* y A) que se seleccionó para el silenciamiento.

El fragmento *MfAtr4-S* se amplificó a partir de ADNc (Fig. 4.6), se purificó y clonó en el vector TOPO-TA. El vector TOPO-TA 569S, conteniendo el inserto *MfAtr4-S* se utilizó para transformar células competentes TOP10 de *E. coli*. Las clonas positivas se analizaron por PCR en colonia utilizando los oligonucleótidos específicos de *MfAtr4-S*. Las clonas seleccionadas se secuenciaron; la secuencia de nucleótidos del fragmento *MfAtr4-S* (569 pb) presentó un 99% de homología con la secuencia correspondiente al gen *MfAtr4* depositado en el portal del genoma de *M. fijiensis*.



Figura 4.6. Análisis en gel de 1% de agarosa del fragmento de 569 pb amplificado por PCR utilizando ADNc como templado. 1; fragmento de 569 pb amplificado a partir de ADNc. MM, marcador molecular.

A partir de las clonas positivas se extrajo el ADN plasmídico y se liberó el fragmento *MfAtr4-S* de 569 pb con las enzimas correspondientes (Fig. 4.7); dicho fragmento se purificó y se ligó en el vector pSilent-1. Dicha ligación dio origen al vector pSilent-*MfAtr4S*. Con dicho constructo se transformaron células competentes JM109 de *E. coli*. Tres clonas transformantes se analizaron por PCR en colonia; el análisis electroforético mostró que una transformante contenía al vector pSilent-*MfAtr4S*.

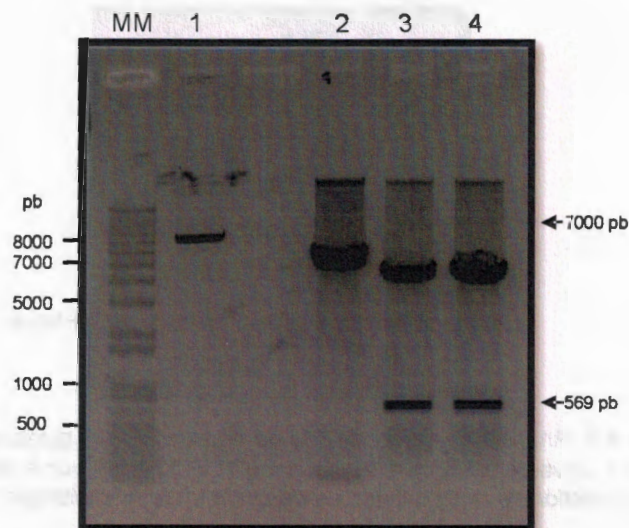


Figura 4.7. Análisis en gel de 1% de agarosa de los productos de restricción liberados del vector *pSilent-1* (1) y el *TOPO-TA 569S* conteniendo el inserto *MfAtr4S* (2, 3 y 4). La digestión se realizó como se describe en la metodología.

4.3.3 CLONACIÓN DEL FRAGMENTO *MfAtr4-A* EN ANTISENTIDO (569 pb) EN EL VECTOR *pSilent-MfAtr4S*

El fragmento de 569 pb fue amplificado con los oligonucleótidos *FMfAtr4-A* y *RMfAtr4-A* y ADNc como templado. El fragmento de 569 pb fue clonado en el vector *TOPO-TA*. Una clona positiva fue digerida con las enzimas indicadas (Fig. 4.2), el producto liberado se clonó en el vector *pSilent-S*, el cual había sido digerido de manera simultánea con las mismas enzimas en la región de clonación múltiple 3' (Fig. 4.8). La ligación del fragmento de 569 pb en la región 3' dio origen al vector *pSilent-MfAtr4SA*. Con este vector se transformaron células competentes JM109 de *E. coli*.

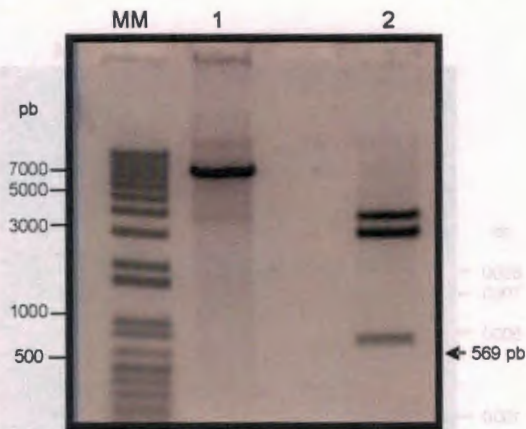


Figura 4.8. Análisis en gels de 1% de agarosa de la digestión del vector *pSilent-1*. 1) vector *pSilent-1*, 2) plásmido *TOPOTA569* con el inserto de 569 pb. La digestión se realizó como se describe en la metodología.

La restricción de las clonas transformantes con la enzima *KpnI*, la cual bordea los insertos, produjo la liberación de un producto de 1.3 kb (Fig. 4.9), correspondiente a los dos insertos y al intrón del vector *pSilent-1*, confirmando que se logró el constructo de silenciamiento *pSilent-MfAtr4SA*. Asimismo, se secuenció el cassette *MfAtr4SA* para comprobar la correcta inserción de los fragmentos de interés.

Con el vector *pSilent-MfAtr4SA* se está transformando la cepa C1233 de *Mycosphaerella fijiensis*, esto con el fin de analizar la función del transportador *MfAtr4* en dicho organismo.

4.3.4 TRANSFORMACIÓN DE *M. fijiensis*

En la figura 4.10, se muestran que los protoplastos no crecen en el medio de recuperación con higromicina (A). Cuando los protoplastos (-vector,) se cultivan en medio de recuperación, sin higromicina B; estos se recuperan favorablemente, lo que indica que los protoplastos son viables (B). Previo a la construcción del vector *pSilent-MfAtr4SA* se han hecho ensayos de transformación usando el plásmido *pAN7.1*. Cuando los protoplastos son sometidos al proceso de transformación con el vector *pAN7.1*, y son

plaqueados sobre el medio de recuperación adicionado con higromicina B, estos no han sido capaces de crecer.

Cabe mencionar que se han logrado protoplastos viables, pero aún falta la transformación de la cepa C1233, por lo que el protocolo de transformación se tiene que estandarizar, para realizar la transformación con el vector pSilent-MfAtr4SA.

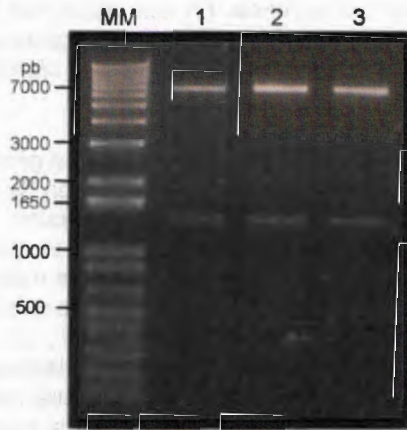


Figura 4.9. Análisis en gel de 1% de agarosa de los productos de restricción con la enzima KpnI del vector pSilent-MfAtr4SA. Carril 1-3, clonas positivas con el inserto de 569 en posición sentido y antisentido, MM marcador molecular.

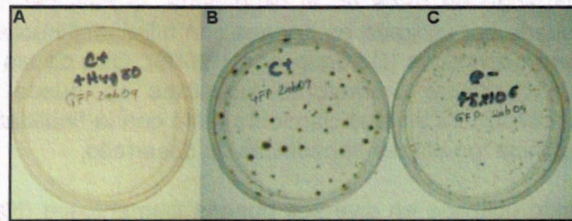


Figura 4. 10. Transformación de la cepa C1233 de *M. fijiensis*. En el panel A; se muestra que los protoplastos (-vector) no crecen en medio adicionado con higromicina B. En el panel B; los protoplastos crecen en el medio sin higromicina B. en el panel C, se muestra que los protoplastos (+vector) no logran crecer en presencia de higromicina B.

4.4 DISCUSIÓN

La participación de los transportadores ABC en la patogénesis se ha descrito en hongos tales como *A. nidulans*, *B. cinerea*, *C. albicans*, *F. culmorum*, *G. pulicaris*, *M. grisea* y *M. graminicola*. Los estudios y análisis realizados han permitido demostrar que algunos transportadores ABC tienen un papel importante como factores de virulencia y son necesarios para que el patógeno desarrolle la infección. Hasta hoy en *M. fijiensis* no se ha descrito ningún factor de virulencia. En este trabajo se han realizado las construcciones moleculares con las cuales se analizará la función del transportador *MfAtr4*, el cual es el ortólogo de *MgAtr4*, transportador involucrado en la virulencia de *M. graminicola*.

Existen diversas metodologías para estudiar la función génica, tal es el caso del ARNi y la recombinación homóloga. La interrupción de genes en hongos por recombinación homóloga "locus específica" ocurre con frecuencias bajas, mientras las integraciones ectópicas en el genoma son más frecuentes. Tal hecho ha sido descrito en *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* y *Sordaria macrospora*, en donde se encontró que la recombinación homóloga fue entre 0.1 y 5% (Nakayashiki *et al.*, 2005). Otro de los inconvenientes que presenta esta metodología es el tiempo y el alto nivel de capacitación técnica requerido. Otro detalle es que para silenciar un gen por esta vía, se requiere al menos 1 kb de secuencia nucleotídica para la interrupción del gen de interés. Este hecho no es una limitante en nuestro caso, pero sí cuando no se dispone de la secuencia completa del gen de interés. En contraste, para el silenciamiento por ARNi el número requerido de nucleótidos con homología con el gen blanco es de menos de 132 pb. Una ventaja del ARNi, es que es "locus independiente" debido a la presencia de una señal actuando en *trans* en el citoplasma, lo cual permite que este mecanismo pueda ser utilizado en hongos con hifas multinucleares, incluso en hongos heterocarióticos (De Jong *et al.*, 2006). Otra de las ventajas del ARNi es que mediante promotores inducibles se puede controlar la expresión del constructo de silenciamiento, esto con la finalidad de estudiar la expresión génica en etapas específicas de desarrollo.

El ARNi ha sido utilizado en diversos hongos filamentosos (Nakayashiki *et al.*, 2005). En los hongos, el control de la expresión génica es variable en cada una de las transformantes, y las funciones de los genes se pueden estudiar sólo con las cepas preseleccionadas. Varios investigadores han utilizado sistemas de vectores que poseen genes reporteros como el GFP, con el fin de que las cepas transformantes puedan ser identificadas fenotípicamente o por microscopía (Viegas *et al.*, 2004).

El silenciamiento del gen *MfAtr4* se realizará mediante ARNi, utilizando el vector pSilent-1. Recientemente se demostró que el vector pSilent-1 induce un silenciamiento génico eficiente en *M. oryzae*, *B. oryzae* y *C. lagenarium*; aunque cabe mencionar que la eficiencia puede variar de acuerdo a la cepa que se esté estudiando (Nakayashaki *et al.*, 2005).

La amplificación por PCR y la clonación de los insertos de 569 pb *MfAtr4-S* y *MfAtr4-A* en vectores comerciales se llevó a cabo sin ninguna dificultad (Fig. 4.7 y 4.8). Este primer paso de clonación facilitó preparar los insertos para su integración en el constructo.

Paralelamente a la restricción de los fragmentos *MfAtr4-S* y *MfAtr4-A* del vector TOPO-TA, el vector pSilent-1 también se preparó para insertar primero el fragmento *MfAtr4-S* y luego el *MfAtr4-A*, originando el constructo pSilent-*MfAtr4SA*.

Una de las ventajas del pSilent-1 es que tiene un espaciador (intrón cutinasa) el cual permite formar el asa, pero también presuntamente facilita la inserción del fragmento de interés mediante dos clonaciones sucesivas, primero en el extremo 5' y posteriormente en el extremo 3' del sitio de clonación múltiple. Este paso aunque parece sencillo no lo es, pues el número de clonas con el inserto de interés fue bajo; este hecho ya ha sido reportado en otros trabajos (Nguyen *et al.*, 2008). En este trabajo solo se obtuvieron 3 clonas con el cassette de silenciamiento completo (confirmadas por análisis de PCR, restricción y secuenciación). Actualmente con el cassette pSilent-*MfAtr4SA* se está realizando la transformación de la cepa C1233 de *M. fijiensis*. Aunque se han realizado varios intentos de transformación aún no se ha logrado la regeneración de transformantes que contengan el constructo de silenciamiento.

El grupo de la Dra. Churchill ha reportado la transformación de *M. fijiensis* mediante PEG/protoplastos (Balint-Kurti *et al.*, 2001) y vía *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT, transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*) (Donzelli & Churchill, 2003). No obstante aunque el grupo de trabajo ha ensayado dichos protocolos todavía no se ha logrado la transformación de la cepa C1233 de *M. fijiensis* con el vector pSilent-*MfAtr4SA*. Muchos factores pueden estar afectando la transformación de la cepa C1233, entre estos pueden considerarse: la cepa que se está utilizando, el periodo de cultivo, la edad del cultivo, la temperatura de crecimiento del hongo, la concentración de PEG4000, CaCl₂. (Wei *et al.*, 2010). Uno de los retos que se tiene, es la optimización de un protocolo eficiente y reproducible de transformación de la cepa C1233 de *M. fijiensis*, para llevar a cabo los estudios funcionales de interés.

4.5 CONCLUSIONES

Se generó la construcción del vector de silenciamiento pSilent-MfAtr4SA.

La transformación de la cepa C1233 de *M. fijiensis* con el constructo de silenciamiento no ha sido concluida. Al momento se ha logrado estandarizar la producción de protoplastos viables.

4.6 REFERENCIAS

- Cattalanotto, C., G. Azzali, G. Macino and C. Cogoni (2002). *Involvement of small RNAs and role of the qde genes in the gene silencing pathway in Neurospora*. Genes and Development, 16: 790-795.
- De Jong, J., H. Deelstra, H. Wösten and L. Lugones (2006). *RNA-mediated gene silencing in monokaryons and dikaryons of Schizophyllum commune*. Applied and Environmental Microbiology, 72:1267-1269.
- Donzelli, G. and A. Churchill (2003). *Agrobacterium tumefaciens mediated transformation Mycosphaerella fijiensis, the black Sigatoka pathogen of bananas*. Fungal genetics Newsletter, 52 (Suppl), abstract 35.
- Hammond, S., A.Caudy and G. Hannon (2001). *Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA*. Nature Reviews Genetics, 2(2):110-119.
- Jun, F., M. Huang, Y. Yuan-Chang and L. Yi-Ping (2007). *A strategy for constructing and verifying short hairpin RNA expression vectors*. New Methods and Technologies, 3 (1): 248-253.
- Balint-Kurti, J., G. May and A. Churchill (2001). *Development of a transformation system for Mycosphaerella pathogen of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions*. FEMS Microbiology Letters, 195: 9-15.
- López, L. y Ramdohr L. (2006). *Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2006: Descubrimiento del RNA de interferencia*. Revista Chilena de Pediatría, 77 (6): 553-556.
- McIntyre, G. and G. Fanning (2006). *Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors*. BMC. Biotechnology, 6 (1): 1-8.

- Moriwaki, A., U. Makoto, A. Sakae and K. Junichi (2007). *RNA-mediated gene silencing in the phytopathogenic fungus Bipolaris oryzae*. FEMS Microbiology letters, 269 (1): 85-89.
- Murata, T., N. Kadotani, Y. Yamaguchi, M. Shigeyuki and H. Nakayashaki (2007). *siRNA-dependent and -independent post-transcriptional cosuppression of the LTR-retrotransposon MAGGY in the phytopathogenic fungus Magnaporthe oryzae*. Nucleic Acids Research, 35:5987-5994.
- Nakayashaki, H., H. Shugo, B. Nguyen, N. Kadotani, Y. Tosa and S. Mayama (2005). *RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi*. Fungal Genetics and Biology, 42(4): 275-83.
- Nguyen, Q., K. Naoki, K. Seiji, T. Yukio, M. Shigeyuki and H. Nakayashiki (2008). *Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, Magnaporthe oryzae, using a high-throughput RNA-silencing system*. Molecular Microbiology, 68 (6): 1348-1365.
- Tang, G. (2005). *siRNA and miRNA: an insight into RISCs*. Trends in Biochemical Science, 30 (2):106-113.
- Taxman, D., L. Livingstone, J. Zhang, J. Brian, A. Heather, K. Williams, J. D-Lich and W. Reed (2006). *Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors*. BMC Biotechnology, 6:7.
- Vaucheret, H. (2006) *Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms*. Genes and Development, 20 (7): 759-771.
- Vermout, S., J. Tabart, A. Baldo, M. Monod, B. Losson and B. Mignon (2007). *RNA silencing in the dermatophyte Microsporum canis*. FEMS Microbiology Letters, 275 (1): 38-45.
- Viegas, SC., P. Fernández, M. Amblar, CM. Arriano and P. López (2004). *Development and an inducible system to control and easily monitor gene expression in Lactococcus lactis*. Plasmid, 51: 256-264.
- Wei, Y., X. Zhou, L. Lu, J. Lu, W. Zinan, G. Yu, L. Hu, J. Lin, X. Sun and T. Kexuan (2010). *An efficient transformation system of taxol producing endophytic fungus EFY-21 (Ozonium sp.)*. African Journal of Biotechnology, 9(12): 1726-1733.



Capítulo V

Sensibilidad de la cepa C1233 de *Mycosphaerella fijiensis* a los fungicidas clorotalonil, benomil y mancozeb

5.1 INTRODUCCIÓN

La estructura genética de poblaciones de *M. fijiensis* ha sido estudiada en aislados del hongo colectados en Filipinas, Papua Nueva Guinea, África, América Latina e Islas del Pacífico. Las poblaciones de este hongo mantienen un alto grado de diversidad genética, comparado con las poblaciones de otros patógenos (Carlier *et al.*, 1996). Diversos aislados provenientes de Honduras, Costa Rica, Panamá, Jamaica, República Dominicana, Cuba y Colombia fueron caracterizados mediante microsatélites y RFLP o polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, encontrándose el mayor índice de diversidad en los aislados de Honduras y Costa Rica (Rivas-Platero *et al.*, 2002). La importancia del estudio de poblaciones de *M. fijiensis* radica en que la información que se obtiene es importante en la implementación de estrategias para su control. Entre las diversas formas de control que se utilizan se encuentra el control genético, el control cultural y el control biológico, no obstante, la forma más eficiente es el control químico.

Las prácticas culturales están dirigidas a reducir la fuente de inóculo del patógeno y forman parte de un programa de manejo integrado de la enfermedad. Asimismo es recomendable el establecimiento de un buen sistema de drenaje, para reducir los niveles de humedad del suelo y microclima dentro de la población para evitar la propagación del inóculo. Por otro lado, el deshoje fitosanitario reduce la fuente interna del inóculo dentro de la plantación. Cuando la infección es solo en parte de la hoja se recomienda eliminar la parte afectada, pero cuando la infección está generalizada es conveniente sacrificar toda la hoja (Corrales & Marín, 1992). Actualmente otro método de control utilizado son moléculas inductoras de resistencia como el ácido acil-benzolar (Patifo, 2001).

La Sigatoka negra se favorece por la alta susceptibilidad de los principales clones de bananos utilizados en plantaciones comerciales para la exportación (Enano Gigante, Valery, etc.) característica asociada a su homogeneidad genética, lo que dificulta sustancialmente el manejo de la enfermedad. La resistencia genética es una de las mejores alternativas para su control, no obstante que la obtención de clones resistentes a la Sigatoka

negra con características de rendimiento, calidad de fruto aceptables y con características agronómicas deseables es difícil y lento (Guzmán & Romero, 1997).

5.1.2 MÉTODOS DE CONTROL QUÍMICO

El control químico de la Sigatoka negra se realiza mediante la aplicación de fungicidas protectantes y sistémicos.

Los fungicidas de contacto tienen como función básica la prevención de la enfermedad. Cuando la planta es tratada con el protectante, las moléculas no entran a su interior, lo que hace que el hongo al ponerse en contacto con el ingrediente activo del fungicida no se desarrolle y que por lo tanto no penetre en las células del tejido foliar (Guzmán, 2002, Pérez, 2006). Al no penetrar los tejidos foliares, su actividad sobre el patógeno es principalmente por inhibición de la germinación y del crecimiento del tubo germinativo de las esporas que se depositan sobre la superficie foliar tratada previamente con el protectante, así como sobre la formación de conidios al contaminar los conidiofóros o mediante redistribución del ingrediente activo, mismo que ocurre por el agua del rocío o la lluvia que se deposita en la lámina foliar (Pérez, 2006).

Los fungicidas protectantes son recomendados cuando la infección es baja, generalmente en épocas de sequía, ya que tienen la desventaja de ser lavados con la lluvia. El modo de acción de estos fungicidas no es específico. Dentro del grupo de fungicidas protectantes se encuentran el clorotalonil y los ditiocarbamatos como el mancozeb (Marín & Romero, 1992).

El maneb y mancozeb han sido utilizados ampliamente para el control de la Sigatoka negra. Estos fungicidas reaccionan de forma inespecífica con grupos tiol (SH) causando un bloqueo de la respiración y de otros procesos metabólicos. En la actualidad existen diferentes formulaciones del mancozeb, que permiten realizar tratamientos con emulsiones de aceite y agua o directamente en aceite. También se pueden utilizar solos o como parte de mezclas de fungicidas sistémicos, para reducir la presión de poblaciones tolerantes a los fungicidas (Hermanto *et al.*, 2010)

El mecanismo de acción del clorotalonil está relacionado con la reacción del glutatión coenzima A, 2-mercaptoetanol y otros compuestos que forman derivados del azufre. Debido a ello el contenido de SH de la célula se reduce significativamente, lo que resulta en una inhibición de todas las

reacciones dependientes de los grupos tiol. El glutatión es un componente importante del metabolismo celular y se ve afectado rápidamente con el clorotalonil, este último con un modo de acción inespecífico y multisitio. Existe la formulación Bravo 500 SC que presenta una fuerte resistencia al lavado por la lluvia y el rocío. Este fungicida inhibe la germinación de los conidios. La aparición de poblaciones con sensibilidad reducida a los benzimidazoles y triazoles en los últimos años ha determinado un incremento del uso de clorotalonil (Guzmán, 2002).

Por otra parte, los fungicidas sistémicos tienen la capacidad de penetrar los tejidos y de ser movilizados a otras partes de la planta. Su modo de acción es específico e incluyen a los benzimidazoles, los triazoles y las estrobilurinas.

El uso de ingredientes activos que penetran las barreras estructurales naturales de la planta, así como su incorporación en el apoplasto y su translocación hacia puntos de mayor transpiración, permitió una mejora importante para el control de *M. fijiensis*. Debido a que este tipo de fungicidas tienen una mejor distribución y protección en la planta tratada, evitando el acceso del hongo. La absorción y translocación de los ingredientes activos de los fungicidas sistémicos, y por tanto de sus propiedades antifúngicas dependen en gran medida del balance entre la lipofilia y solubilidad en agua. La lipofilia permite la penetración a nivel de las capas cerosas y la cutícula de la hoja mientras que la translocación sistémica está determinada por la solubilidad en agua. Mientras más alta es la lipofilia, más reducida es la translocación en el interior de la planta (Marín *et al.*, 2003).

Los benzimidazoles se han utilizado desde los años setenta en el control de la Sigatoka negra; el benomil se aplica en emulsión aceite-agua o solo aceite. Presenta una excelente actividad sistémica y terapéutica, además muestra una fuerte inhibición de la formación de cuerpos fructíferos. El benomil bloquea la formación de microtúbulos al unirse selectivamente con la β -tubulina fúngica, e impide el acoplamiento de los dímeros de α y β tubulinas. La β -tubulina es de vital importancia para la formación del huso acromático, por tanto el benomil es un inhibidor de la mitosis (Gangawane, 1997).

El modo de acción de los triazoles es a través de la inhibición de una monooxigenasa, la cual cataliza la reacción de desmetilación en C-14 en la biosíntesis del ergosterol. Los llamados inhibidores de la desmetilación o DMI's (DMI de sus siglas en inglés Demethylation inhibitors) inhiben el proceso de metilación (Marín & Romero, 1992, Guzmán, 2002). En el año

1987 el propiconazol fue el primer fungicida DMI registrado para uso en el plátano en América Central, debido a su alta eficacia para controlar la Sigatoka negra. Otros triazoles utilizados en banano son el fusilazol, fenbuconazol, tebuconazol, hexaconazol y ciproconazol. Existen diferencias en la eficacia de estos componentes y en su movimiento dentro de la hoja. Los de mayor actividad sistémica se mueven rápidamente hacia el borde de la hoja, así permiten la acumulación de dosis subletales alrededor del nervio de la hoja y la aparición de un patrón de lesiones típicos en ambos lados de las hojas. El fenbuconazol y difenoconazol son esencialmente translaminares y no se observan estos patrones de daños alrededor de la nervadura central. Todos inhiben la síntesis *de Novo* del ergosterol en la célula fúngica, al bloquear la citocromo P450 esterol C14 demetilasa. Los fungicidas inhibidores de la biosíntesis del ergosterol son la base de los programas de combate de la Sigatoka negra en la mayoría de los países con incidencia de la enfermedad. Los fungicidas más utilizados de este grupo son el propiconazol y el bibertanol (Guzmán & Romero, 1997).

Los fungicidas sistémicos del grupo de las estrobilurinas son compuestos naturales producidos por ciertas especies de hongos que descomponen la madera. La estrobilurina A y B son metabolitos fúngicos secundarios aislados del hongo *Strobilurus tenacellus* (De Lange *et al.*, 1993). Estos compuestos impiden la respiración mitocondrial bloqueando el transporte de electrones en el complejo citocromo bc1, inhibiendo la síntesis de ATP (Clough *et al.*, 1994). En 1996 la azoxystrobina (Bankit) fue la primera estrobilurina registrada para el uso en plátano en América Central (Guzmán & Romero, 1997; Guzmán, 2002).

Los fungicidas sistémicos locales son un grupo intermedio de fungicidas, los cuales penetran en las hojas pero no se translocan al resto de la planta. El tridemorph (Calixin) es el único fungicida utilizado en banano que se incluye en este grupo. Pertenece al grupo de las morfolininas, cuyo modo de acción inhibe la biosíntesis del ergosterol (EBI's) un componente importante de la membrana de los hongos. Su acción la lleva interfiriendo con la esterol Δ 8-7 isomerasa y en la esterol Δ 14 reductasa (Pérez, 2006).

5.1.4 RESISTENCIA A FUNGICIDAS

La adquisición de resistencia a un determinado fungicida es en parte el resultado de modificaciones en la constitución genética de una población de hongos. Estas modificaciones que permiten el desarrollo de la resistencia están referidas al aumento de la frecuencia de un determinado gen o grupo

de genes dentro de los individuos de una población. Estos genes que codifican la expresión de mecanismos de resistencia se han encontrado siempre dentro de las poblaciones naturales, pero como gen de baja frecuencia no representa generalmente ninguna ventaja evolutiva. Debido a la presión de selección ejercida por la molécula del fungicida, su frecuencia aumenta en la población y lo convierte en un factor de resistencia a dicho compuesto (Marín *et al.*, 2003, Orozco-Santos *et al.*, 2008).

Entre los diferentes mecanismos de resistencia a fungicidas se encuentran: alteraciones en el sitio blanco que reducen su sensibilidad al producto, modificaciones en la vía metabólica para evitar que el compuesto llegue a su sitio de acción, desactivación metabólica del fungicida, excreción del fungicida (Brent, 1995). El mecanismo de resistencia más común es la modificación genética del sitio de acción del fungicida. Esta modificación es generada por un cambio en la secuencia genética codificadora de la enzima o proteína que constituye el sitio de acción en el hongo. De acuerdo a este criterio los fungicidas pueden tener un sitio de acción múltiple (ejemplo carbamatos) o sitio específicos (ejemplo triazoles) (Gangawane, 1997).

Si la modificación se selecciona se convierte en un carácter heredable. Teniendo en cuenta el origen de los mecanismos de resistencia a los fungicidas, es importante hacer énfasis en el hecho de que el impacto poblacional es diferente cuando el mecanismo de resistencia se basa en un solo gen respecto al caso en que varios genes son blancos del fungicida y son responsables de pequeños efectos aditivos que confieren resistencia.

En el primer caso la población pasa súbitamente de una condición sensible a una condición resistente, mientras en el segundo la transición de la población de un estado sensible a resistente es gradual. Esto explica porque la probabilidad de que se produzca una mutación en un solo gen es más alta que las mutaciones en dos o más genes a la vez. Un ejemplo de ello es la mutación del aminoácido 198 del gen de la β -tubulina, cuya modificación resulta en un organismo resistente al benomil (Cañas *et al.*, 2006). La aparición de la resistencia es provocado muchas veces por el uso excesivo de fungicidas comerciales durante años, lo que conlleva a la generación de poblaciones de patógenos resistentes.

5.1.5 RESISTENCIA A FUNGICIDAS EL CASO DE *Mycosphaerella fijiensis*

En el año 2010 el Comité de acción para resistencia a fungicidas (FRAC) actualizó sus recomendaciones para la aplicación de cada clase de fungicidas. Asimismo, indicó que la resistencia de *M. fijiensis* a estrobilurinas ya es un problema para países como Colombia, Costa Rica, Guatemala y Panamá.

Respecto a los inhibidores de demetilación como el bibertanol, difenoconazol, epoxiconazol, fenbuconazol, myclobutanil, propiconazol, tebuconazol, tetraconazol y triadimenol, se observaron cambios de sensibilidad de *M. fijiensis* a dichos compuestos entre los años 2007 y 2009. Estos cambios fueron bajos para Ecuador, moderados para Honduras, Colombia y Guatemala y altos para Costa Rica. En el grupo de las aminas espiroxamina, fenpropimorph y tridemorph, la sensibilidad de *M. fijiensis* a estos compuestos es alta y no ha cambiado en los últimos 2 años. La resistencia de *M. fijiensis* a los fungicidas inhibidores del citocromo bc1 ó QoIs (de sus siglas en inglés Quinone Outside Inhibitors) como: pyraclostrobin, trifloxystrobin y azoxystrobin, se ha reportado en Ecuador, Belice, Colombia, Guatemala, Costa Rica. No obstante en Filipinas las cepas de *M. fijiensis* muestran alta sensibilidad a los QoI. Por otra parte en Costa Rica se ha reportado una reducción en sensibilidad a guanidinas y a inhibidores de la succinato deshidrogenasa o SDHI (de sus siglas en inglés Succinate dehydrogenase inhibitors) ya que las cepas se hacen resistentes a estos compuestos (www.frac.info.frac/work/work_bana.html y Churchill, 2010).

La resistencia a compuestos como el benomil y carbendazim thiophanato es alta. El benomil afecta a nivel de la β -tubulina, los cambios en un solo aminoácido en la β -tubulina determina la pérdida de sensibilidad al ingrediente activo en diferentes especies de hongos (Cañas *et al.*, 2006; Churchill, 2010).

En el caso de México, existen pocos reportes de la resistencia de *M. fijiensis* hacia los fungicidas de contacto y sistémicos utilizados. Dichos reportes mencionan que existe una creciente resistencia en México de *M. fijiensis* hacia los fungicidas utilizados para su control. En este trabajo se caracterizo la cepa C1233 de *M. fijiensis*, en términos de su sensibilidad y/o resistencia hacia los fungicidas clorotalonil, mancozeb y benomil, tres fungicidas de uso común en las plantaciones de plátano en México. Por otro lado, para determinar si la sensibilidad y/o resistencia de la cepa C1233 esta mediada por transportadores ABC en *M. fijiensis*, se realizó un análisis de expresión

mediante RT-PCR de 5 transportadores ABC denominados *MfAtr1*, *MfAtr2*, *MfAtr3*, *MfAtr4* y *MfAtr5*.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 CEPA Y MEDIOS DE CULTIVO

La cepa C1233 se creció en medio V8/agar (Jugo V8, carbonato de calcio y 2 % de agar), en medio V8/líquido clarificado (medio V8 filtrado con una gasa).

5.2.2 ENSAYO DE FUNGICIDAS EN MEDIO V8/AGAR

Para evaluar la resistencia o sensibilidad de la cepa C1233 a los fungicidas mancozeb, clorotalonil benomil y a una infusión de hoja de banano, el hongo fue crecido inicialmente en matraces conteniendo 200 mL de medio V8 líquido, en agitación a 180 rpm durante 9 días. El micelio colectado fue desagregado en fragmentos miceliales de 0.7 mm. Los fragmentos miceliales a una concentración de 3.0×10^5 /mL fueron adicionados al medio V8/agar. Seguidamente 20 mL de medio V8/agar fue vaciado a cajas Petri. El fungicida fue adicionado en pocetas a concentraciones de 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; como control se utilizó agua estéril. Las cajas se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente. El experimento se realizó por triplicado.

5.2.3 ENSAYO DE FUNGICIDAS EN MEDIO V8/LÍQUIDO

El micelio colectado fue desagregado en fragmentos miceliales de 0.7 mm. Los fragmentos miceliales a una concentración de 3.0×10^5 /mL fueron adicionados al medio V8 líquido clarificado. Seguidamente se colocó en 30 mL de medio V8 y se le adicionó diferentes concentraciones de los fungicidas mancozeb (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), clorotalonil (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y benomil (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); el control fue agua estéril. El micelio se dejó crecer en un orbitador a 180 rpm. Los muestreos se realizaron en los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15. Seguidamente el micelio se utilizó para evaluar la cantidad de peso fresco-seco y para la extracción de ARN. El experimento se realizó por triplicado.

5.2.4 EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE ADNc

La extracción de ARN y síntesis de ADNc, se realizó como se describe en el capítulo III, apartado 3.2.2, de este trabajo.

5.2.5 AMPLIFICACIÓN DE 5 TRANSPORTADORES ABC POR PCR CONVENCIONAL

La amplificación de los transportadores ABC se realizó por PCR convencional usando los pares de oligonucleótidos: 1; *MfAtr1F-MfAtr1R*, 2; *MfAtr2F-MfAtr2R*, 3; *MfAtr3F-MfAtr3R*, 4; *MfAtr4-MfAtr4R*, 5; *MfAtr5F-MfAtr5R*. Como control se amplificó un fragmento del gen de la β -tubulina de *M. fijiensis* con los oligonucleótidos TUBF-TUBR. El programa de PCR utilizado para todos los genes fue 94°C 4 min, 94°C 30 seg, 60°C 30 seg, 72°C 40 seg. (25 ciclos), 72°C 10 min.

Los productos amplificados fueron analizados en geles de 1.5% de agarosa, teñidos con bromuro de etidio, y visualizados en un fotodocumentador de imágenes (Quantity one).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 ENSAYO DE FUNGICIDAS EN MEDIO V8/AGAR

El ensayo de fungicidas en medio sólido se evaluó como la inhibición del crecimiento micelial en diferentes concentraciones (1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$) de los fungicidas clorotalonil, mancozeb y benomil. El resultado mostró que la cepa C1233 de *M. fijiensis* es sensible a benomil (72 μg de ingrediente activo, i.a), resistente a clorotalonil (75 μg de i.a.) y mancozeb (50 μg de i.a.). Respecto a la infusión de la hoja de banano no se observó inhibición del hongo; como control se utilizó agua estéril. En las figuras 5.1 y 5.2 se muestran los resultados de crecimiento e inhibición con dichos fungicidas evaluados a los 6 y 25 días posteriores a la aplicación de dichos compuestos.

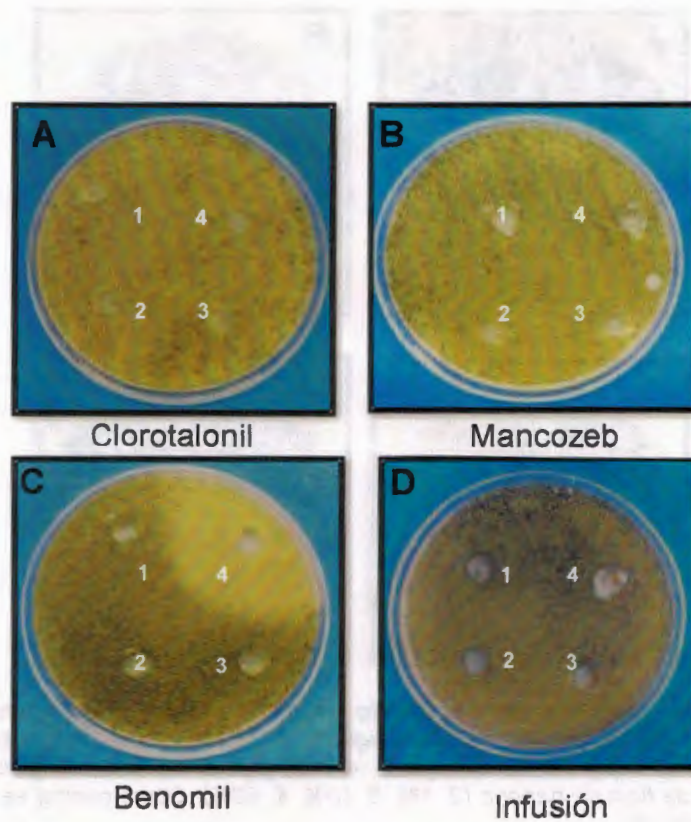


Figura 5.1. Inhibición del crecimiento de la cepa C1233 de *M. fijiensis* 6 días después de la aplicación del fungicida. A) clorotalonil, B) mancozeb, C) benomil. 2; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada fungicida. D) infusión de hoja de banano (2; 1%, 3, 10%, 4; 50%). Como control se utilizó H_2O estéril (1).

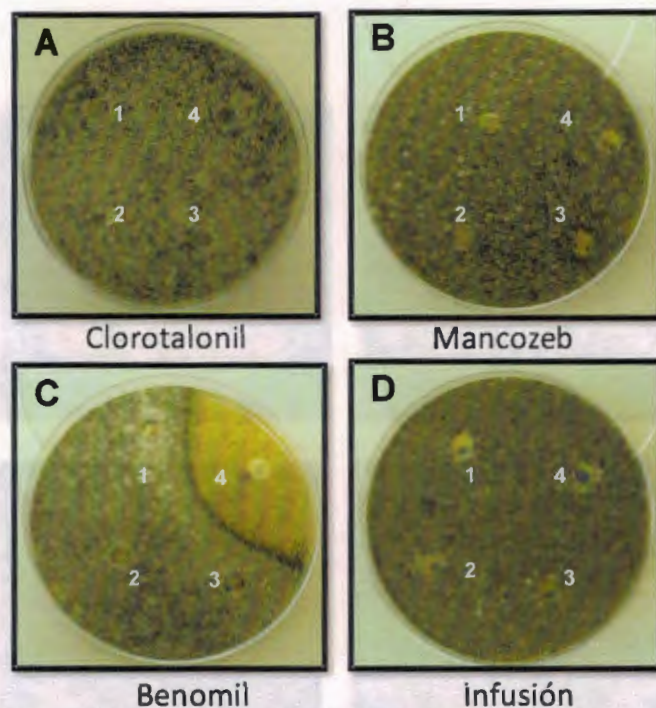


Figura 5.2. Inhibición del crecimiento de la cepa C1233 de *M. fijiensis* 26 días después de la aplicación del fungicida. A) clorotalonil, B) mancozeb, C) benomil. 2; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada fungicida. D) infusión de hoja de banano (2; 1%, 3, 10%, 4; 50%). Como control se utilizó H_2O estéril (1).

5.3.2 SENSIBILIDAD DE LA CEPA C1233 A BENOMIL

La cepa C1233 de *M. fijiensis* fue sometida a diferentes concentraciones de benomil (10, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En la concentración de 10 μg (7.2 μg de i.a) no se observó inhibición del crecimiento del micelio; el crecimiento fue similar al control (agua estéril), mientras que en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observaron diferentes tamaños de halos de inhibición (Fig. 5.3); la IC_{50} fue de 50.7 μg . En la figura 5.4 se observa que 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de benomil inhiben el crecimiento del micelio al 100%, mientras que a 80, 60, 40 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de benomil se obtiene un porcentaje de inhibición del 88%, 77%, 55% y 22%, respectivamente.

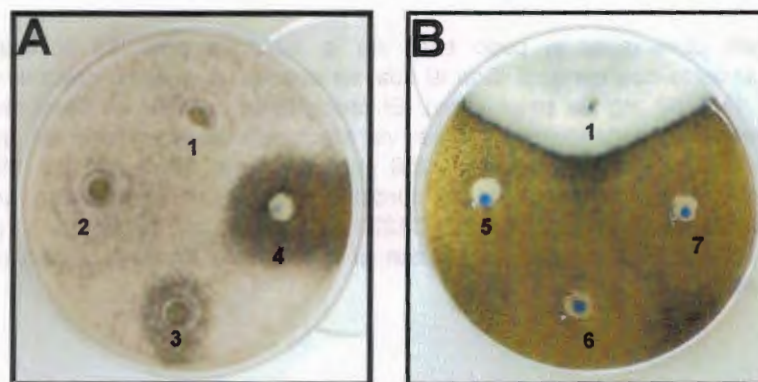


Figura 5.3. *Inhibición del crecimiento de M. fijiensis con benomil. A) diferentes concentraciones de benomil. 1 agua, 2; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4; 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, B) 5, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6; 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 7; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.*

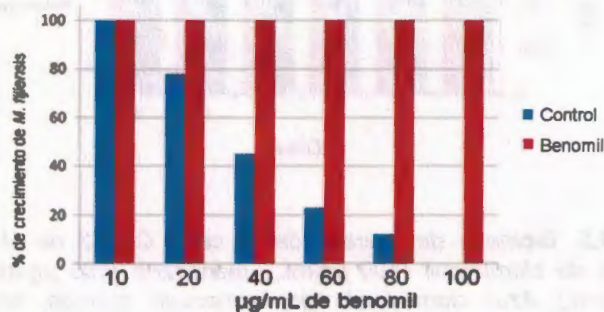


Figura 5.4. *Gráfico del porcentaje de crecimiento del micelio de la cepa C1233 de M. fijiensis en presencia de diferentes concentraciones de benomil en relación al control sin fungicida. En rojo se muestra el control y en azul el tratamiento con benomil.*

5.3.3 CRECIMIENTO DEL MICELIO EN MEDIO LÍQUIDO EN PRESENCIA DE LOS FUNGICIDAS CLOROTALONIL, MANCOZEB Y BENOMIL

El crecimiento micelial de la cepa C1233 se vio afectado por la concentración de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (9.3 μg de i.a) de benomil. En la figura 5.5

puede observarse el peso seco de la biomasa obtenida al final del tratamiento con benomil. Con el cual se obtuvo un máximo crecimiento al día 15 (150 mg de peso seco). El crecimiento micelial en presencia de clorotalonil y mancozeb, no se ve afectado, alcanzándose en ambos tratamientos un máximo de 250 mg de peso seco al día 15, un comportamiento similar al del control. Estos datos demuestran que el crecimiento micelial de la cepa C1233 es inhibido por el benomil y que el clorotalonil y mancozeb no afectan el crecimiento micelial *in vitro* de *M. fijiensis*.

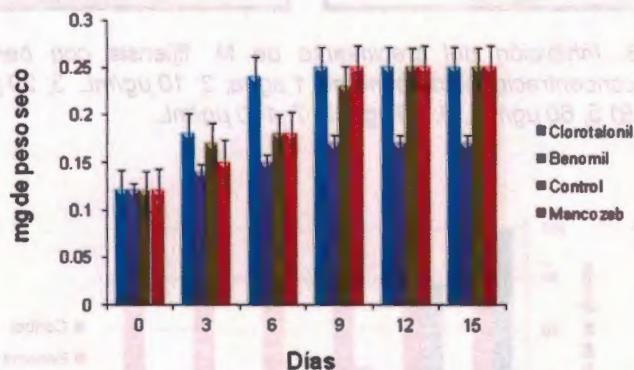


Figura 5.5. Biomasa del micelio de la cepa C1233 de *M. fijiensis* en presencia de clorotalonil (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mancozeb (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y benomil (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Azul: clorotalonil, rojo; mancozeb, morado, benomil y café control agua esteril.

5.3.4 EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES ABC, *MfAtr1*, *MfAtr2*, *MfAtr3*, *MfAtr4* Y *MfAtr5* EN PRESENCIA DE LOS FUNGICIDAS CLOROTALONIL, MANCOZEB Y BENOMIL

Los transportadores ABC tienen múltiples funciones, participan en la protección contra compuestos de defensa de la planta, transportan sustratos de diferentes familias químicas; la importancia de este hecho radica en la adaptación o resistencia del hongo a varios fungicidas. En este trabajo la cepa C1233 de *M. fijiensis* fue expuesta a tres distintos fungicidas: dos de contacto [clorotalonil (100 µg/mL) y mancozeb (100 µg/mL)] y un fungicida sistémico, [benomil (12.5 µg/mL)]. Además se realizaron ensayos de RT-PCR para determinar si la expresión de los transportadores *MfAtr1*, *MfAtr2*, *MfAtr3*, *MfAtr4* y *MfAtr5* de la cepa C1233 se modifican en presencia de dichos fungicidas.

El resultado de la expresión de los transportadores ABC en presencia de 100 µg/mL de clorotalonil, mostró que hay una ligera inducción de la expresión del transportador *MfAtr1* a partir del día 0, y alcanza su máximo al día 3 y se mantiene hasta el día 15 (Fig. 5.6 A). En presencia de mancozeb, el *MfAtr1* mostró una débil inducción en los días 3, 6, 9, 12 y 15 (Fig. 5.6 A). En presencia de benomil se observó un incremento gradual del transportador *MfAtr1* desde el día 0 hasta el día 15, aunque en términos generales la expresión de *MfAtr1* fue baja (Fig. 5.6 A).

La expresión del transportador *MfAtr2* en presencia del clorotalonil y benomil se vio incrementada desde el día 0 hasta el día 15 respecto al control (sin fungicida). La expresión de este transportador se inhibió en presencia del mancozeb (Fig. 5.6 B).

En el caso del transportador *MfAtr3* se observó un ligero incremento en su expresión en el día 6, 9, 12 y 15 en presencia de clorotalonil. En contraste, con el mancozeb a partir del día 3 se observó un decremento en su expresión, mientras que en presencia de benomil la expresión se inhibió (Fig. 5.6 C).

La expresión del transportador *MfAtr4* se indujo en presencia del clorotalonil y dicha expresión se redujo en presencia de benomil y mancozeb, respecto al control (Fig. 5.6 D). El transportador *MfAtr5* no mostró expresión en ninguna de las condiciones analizadas.

En resumen existe una baja expresión de los transportadores *MfAtr3* y *MfAtr1* en presencia de clorotalonil comparado con los transportadores *MfAtr2* y *MfAtr4*, los cuales se expresan de forma abundante. Como control de carga se utilizó el gen de la β-tubulina. La expresión de los

transportadores ABC en presencia del benomil, un fungicida sistémico es variable; dado que la expresión del transportador *MfAtr2* se incrementó. Por el contrario, la expresión de los transportadores *MfAtr1*, *MfAtr3* y *MfAtr4* disminuyó en presencia de benomil. El mancozeb abate la expresión de los transportadores *MfAtr2* y *MfAtr4*, con respecto a la expresión observada en el control. Los resultados obtenidos sugieren que los diferentes niveles de expresión y la activación de los transportadores *MfAtr1*, *MfAtr2*, *MfAtr3* y *MfAtr4*, pudieran estar protegiendo a la cepa C1233 de *M. fijiensis* contra la acumulación y toxicidad de los fungicidas utilizados en el ensayo.

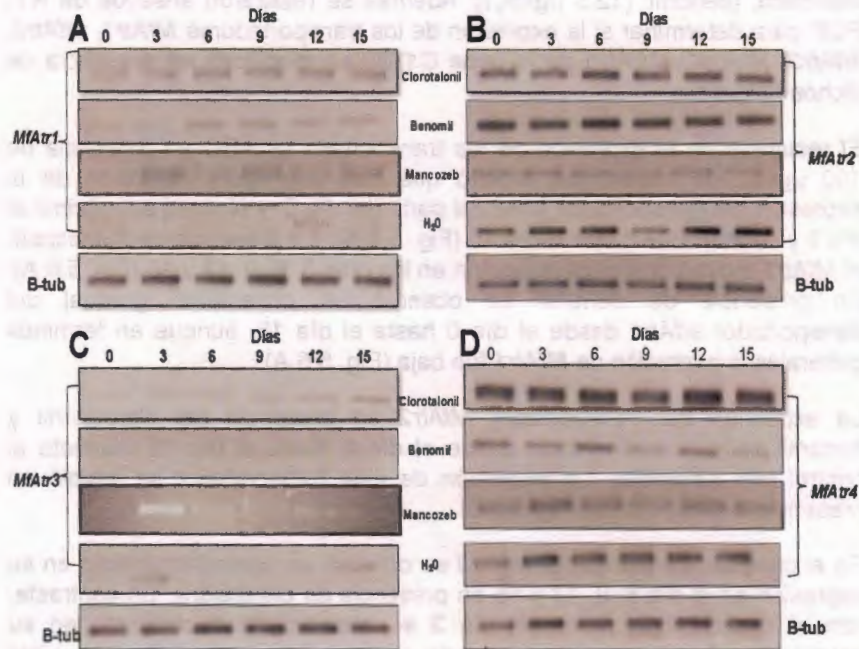


Figura 5.6. Expresión de los transportadores ABC en presencia de los fungicidas clorotalonil (100 $\mu\text{g/mL}$), mancozeb (100 $\mu\text{g/mL}$) y benomil (12.5 $\mu\text{g/mL}$). La expresión de los transportadores se evaluó en los 0, 3, 6, 9, 12 y 15 días después del tratamiento. A) expresión del transportador *MfAtr1* B) *MfAtr2*, C) *MfAtr3* y D) *MfAtr4* en presencia de diferentes fungicidas. Como control de expresión se utilizó el gen de la tubulina ($\beta\text{-tub}$).

5.4 DISCUSIÓN

5.4.1. RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN HONGOS PATÓGENOS

El uso de agroquímicos se ha convertido en una importante herramienta para el manejo y control de las enfermedades fúngicas. Esta forma de control presenta varios problemas: es de resaltar la contaminación del manto freático, el uso inapropiado de los compuestos y el desarrollo de resistencia de muchos patógenos hacia los fungicidas (Gangawane, 1997).

La aparición de cepas resistentes a fungicidas ha sido reportada en diversas especies como *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. En este caso los hongos fueron tratados con diferentes concentraciones de los fungicidas Benzomyl 500, Rhizolex-T y Homai WP en condiciones de laboratorio. Se evaluó la inhibición del crecimiento en ambos hongos. El resultado mostró un mayor porcentaje (32.78%) de crecimiento en la concentración de 1500 ppm del fungicida Benzomyl 500, mientras que a 3500 ppm *R. solani* creció un 24.44%. Estos resultados mostraron que existe diferencia en el crecimiento de *F. oxysporum* y *R. solani*. Además se determinó que *F. oxysporum* presenta una mayor resistencia a benzomyl 500 y Rhizolex-T, mientras que *R. solani* solo es resistente a benzomyl 500. Sin embargo ambos hongos son susceptibles al fungicida Homai WP (Rubio-Reque *et al.*, 2008).

En el 2004 Gutiérrez y colaboradores, analizaron la resistencia a benomil y tiabendazol de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporoides* obtenidos de fruto de mango cv Haden, afectados por antracnosis en regiones productoras de Veracruz, Guerrero, Michoacán, Sinaloa y Chiapas, México. Los fungicidas benomil y tiabendazol se adicionaron al medio de cultivo PDA/agar en concentraciones de 0.1, 1, 5, 10, 50, 100, 200 y 400 ppm para evaluar su efecto sobre el crecimiento micelial y la germinación de conidios. La mayoría de los aislamientos presentaron un crecimiento micelial menor a 0.5 mm en la concentración de 50 ppm para ambos fungicidas. En los aislados Ver1, Sin y Mich estos presentaron una CL₅₀ mayor a 20 ppm en benomil y tiabendazol, considerándose como resistentes. Chia presentó una CL₅₀ menor, a 6 ppm, para ambos fungicidas, considerándose como cepas susceptibles. Ambos fungicidas no inhibieron la germinación de los conidios *in vitro*, no obstante, ocasionaron deformación en los tubos germinativos.

En el caso del hongo *Venturia inaequalis*, con el fin de determinar los niveles de resistencia del hongo al fungicida benomil se analizaron hojas y

frutos de manzano con síntomas de roña del manzano, en 16 huertas bajo sistema de producción convencional en el estado de Coahuila, México. Se observó resistencia del hongo solo en siete huertos; en cinco de ellos la población resistente fue baja (3 al 4%) mientras que en las otras dos la resistencia fue alta (72 al 85%). Con base a la IC_{50} que osciló entre 0.12 y 408.6 ppm entre diferentes cepas. Por lo tanto, *V. inaequalis* en dicha región manzanera está compuesta por individuos susceptibles y resistentes y es heterogénea con respecto a los niveles de resistencia al benomil (Hernández- Castillo *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se determinó que la cepa C1233 de *M. fijiensis* (Veracruz, México) cultivada *in vitro* presenta resistencia micelial al clorotalonil y mancozeb y mediana resistencia a benomil (Fig. 5.1).

En Honduras la resistencia de *M. fijiensis* al benomil se reportó desde 1977, después de tres años consecutivos de uso de este fungicida. Estudios realizados en Costa Rica mostraron que existe una alta frecuencia de aislados de *M. fijiensis* resistentes al benomil, dicha resistencia es el resultado de mutaciones en los codones 198 y 200 (Calvo & Romero, 1996).

En Colombia se realizó una caracterización de 10 cepas de *M. fijiensis* resistentes al benomil; se encontró que dichas cepas tienen tres niveles de resistencia, basado en la cantidad de benomil que el hongo es capaz de soportar. Se habla de susceptibilidad si el hongo es incapaz de crecer a concentraciones de 0, 1, 5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de benomil, medianamente resistente si crece a concentraciones arriba de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y resistentes si crece a concentraciones arriba de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la figura 5.2 puede observarse que a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de i.a de benomil hay una inhibición total del crecimiento micelial, mientras que a concentraciones de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la cepa C1233 es capaz de crecer. Este resultado coincide con lo reportado por Cañas *et al.*, 2006, quien demostró que las cepas de *M. fijiensis* (Colombia) son capaces de crecer a concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pero no a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de benomil. Por lo que de acuerdo a los parámetros establecidos por este autor, la cepa C1233 de *M. fijiensis* se comporta como un hongo medianamente resistente al benomil.

El grado de resistencia o susceptibilidad es variable en las cepas de *M. fijiensis*, tal como se ha demostrado en Colombia. Dicha variación es provocada por la presión de selección que se ejerce sobre *M. fijiensis* al exponerlo de forma continua al fungicida benomil. Debe considerarse que la resistencia al benomil es un factor que influye en las dificultades para controlar eficazmente a la Sigatoka negra (Calvo & Romero, 1996).

La resistencia total a benomil está asociada a un cambio polimórfico de un solo nucleótido en un fragmento del gen de la β -tubulina en el codón 198 (GAG en vez de GCG) (Cañas *et al.*, 2006). En el caso de la cepa C1233 ésta mantiene el codón GAG, lo que explica porque *M. fijiensis* se inhibe a concentraciones de 50 μ g de benomil.

5.4.2 EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES ABC, *MfAtr1*, *MfAtr2*, *MfAtr3*, *MfAtr4* Y *MfAtr5* EN PRESENCIA DE LOS FUNGICIDAS CLOROTALONIL, MANCOZEB Y BENOMIL

Una de las funciones más importantes de los transportadores ABC fúngicos es proveer protección contra compuestos tóxicos. En el presente estudio se analizó el nivel de expresión de 5 transportadores ABC del hongo *M. fijiensis*; *MfAtr1*, *MfAtr2*, *MfAtr3*, *MfAtr4* y *MfAtr5*, en presencia de clorotalonil, mancozeb y benomil. Se encontraron diferentes niveles de expresión en los diferentes transportadores estudiados, pero se determinó que los transportadores *MfAtr2* y *MfAtr4* se expresan fuertemente en presencia de clorotalonil, mientras que en presencia de mancozeb la expresión se abate. Estos resultados son similares a los reportados por Zwiers *et al.*, 2003 y Waard *et al.*, 2006 quienes estudiaron los transportadores *MgAtr1*, *MgAtr2*, *MgAtr3*, *MgAtr4* y *MgAtr5* de *M. graminicola*; encontraron que dichos transportadores ABC muestran distintos niveles de expresión cuando son tratados con diferentes compuestos tóxicos, incluso ante tóxicos no relacionados a fungicidas como son antibióticos y alcaloides.

En *M. graminicola* los transportadores *MgAtr1* y *MgAtr2* se expresan fuertemente en presencia de ciproconazol, propiconazol, tebuconazol, ergosterol y reducen la sensibilidad a dichos compuestos. En *M. graminicola* el transportador *MgAtr4* tiene un mayor nivel de expresión en presencia del epoxiconazol, no obstante también se expresa en presencia de ciproconazol, propiconazol, tebuconazol, rodamina G, ergosterol, cicloheximida, lo que sugiere que este transportador le confiere protección al patógeno contra dichos compuestos. Cabe mencionar que *MgAtr4* es el único transportador que ha sido relacionado con la virulencia de ese patógeno (Stergiopoulos *et al.*, 2003).

El transportador *MgAtr5* se expresó únicamente en presencia de berberina y campotecina, dos metabolitos secundarios de plantas. Esto sugiere que el transportador *MgAtr5* le provee protección al patógeno contra compuestos de defensa de la planta, y se sugiere una posible función de este

transportador durante la patogénesis mediante la excreción de dichos compuestos (De waard *et al.*, 2006). Esta propuesta en *M. fijiensis* es congruente con el hecho de que no se observa la expresión del transportador *MfAtr5* en presencia del clorotalonil, mancozeb y benomil. Probablemente el transportador *MfAtr5* tenga un rango limitado de sustratos o esté involucrado exclusivamente en la secreción de metabolitos secundarios de la planta.

Todos los transportadores ABC analizados en este estudio y los reportados por De Waard *et al.*, (2006), tienen diferencias en los niveles de expresión, lo cual probablemente se relacione en su afinidad hacia los sustratos. Se sabe que múltiples transportadores ABC pueden contribuir a la reducción de la sensibilidad hacia los compuestos antifúngicos, lo que explica porque varios transportadores ABC responden simultáneamente y aumentan su expresión. La activación de dichos transportadores actúa como una vía de protección a través de la excreción de compuestos fungitóxicos o fitotóxicos (Zwier *et al.*, 2003). En 2007 Gupta & Chattoo demostraron que una deleición en el transportador ABC4 de *Magnaporthe grisea* genera una mutante sensible a compuestos antifúngicos y fitoalexinas. El análisis por PCR en tiempo real de la expresión del gen ABC4 en la cepa silvestre y mutante mostró que en la cepa silvestre existe una expresión basal del gen ABC4 y que dicha expresión se incrementa cuando la cepa es expuesta a diversos antifúngicos; en contraste, la expresión del gen ABC4 fue nula en la cepa mutante, lo que confirma el papel de ese transportador en la resistencia a compuestos tóxicos.

La expresión de los transportadores ABC es un factor importante como estrategia de sobrevivencia de los hongos ante compuestos tóxicos. Los diferentes niveles de expresión encontrados en los transportadores ABC *MfAtr1*, *MfAtr2*, *MfAtr3* y *MfAtr4* en *M. fijiensis* apoya el hecho de que pudieran contribuir a la resistencia a fungicidas. La participación de los transportadores ABC en la excreción de fungicidas afecta negativamente al cultivo de banano, ya que dificulta el control del agente causal de la enfermedad.

5.5 CONCLUSIONES

La cepa C1233 de *M. fijiensis* es medianamente resistente al fungicida sistémico benomil, ya que es capaz de crecer a cantidades arriba de 10 µg/mL.

La cepa C1233 es resistente a los fungicidas protectantes clorotalonil y mancozeb, dado que crece a concentraciones de 50 y 75 µg de ingrediente activo respectivamente.

El nivel de expresión de los transportadores *MfAtr1*, *MfAtr2*, *MfAtr3* y *MfAtr4* es afectado por la presencia de los fungidas clorotalonil, mancozeb y benomil. Con base en los niveles de expresión observados, los transportadores *MfAtr2* y *MfAtr4*, pueden jugar papeles importantes en la resistencia al clorotalonil. El transportador *MfAtr2* podría estar participando en la exclusión del benomil. Sin embargo la cepa C1233 no logra ser resistente únicamente con esta probable exclusión. Por ser un fungicida sistémico, con blanco uni-sitio, es posible que resulte tóxico a concentraciones intracelulares menores que los fungidas de contacto con blancos multi-sitio. Sin embargo dichas concentraciones no se alcanzan si hay mecanismos alternos de detoxificación de los fungidas.

Cabe mencionar que esta es la primera exploración de la participación de los transportadores ABC de *M. fijiensis* en la resistencia a benomil. La cepa C1233 de *M. fijiensis* no contiene la mutación reportada por Cañas *et al.* (2006) en el gen de la β-tubulina, por lo que este sería un mecanismo nuevo para la resistencia al benomil en este patógeno.

5.6 REFERENCIAS

- Brent, K. (1995). *Fungicide resistance in crops pathogens: how can it be managed?* St Raphael, Norton Lane. United Kingdom. 48.
- Cañas, G., L. Patiño, E. Rodriguez and R. Arango. (2006). *Molecular characterization of benomil resistant isolated of Mycosphaerella fijiensis, collected in Colombia.* Journal of Pathology. 154: 403-409.
- Calvo, C. y R. Romero (1996). *Distribución y dinámica de la sensibilidad de Mycosphaerella fijiensis, a los fungicidas propiconazole, tridemorph en banano.* X congreso nacional agronómico y de recursos naturales. Fitopatología. San José Costa Rica.

- Carlier, J., M. Lebrun, M.F. Zapater, C. Dubois and X. Mourichon. (1996). *Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungi *Mycosphaerella fijiensis**. *Molecular Ecology* 5: 499-510.
- Corrales, O. y D. Marín (1992). *Modificación al sistema de preaviso biológico para el combate de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) para banano y plátano en Costa Rica*. CORBANA, 16(37): 26-28.
- Churchill, A. (2010). *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.
- Clough, J.M., D.A. Evans, P.J. De-Fraire, T. Fraser, C. Godfre and D. Youle (1994). *Role of natural products in pesticide discovery: the beta-methoxyacrylate fungicides*. ACS symposium series, 551: 37-53.
- De lange, L., F.Breinholt, R. Nielsen, and R. Nielsen (1993). *Microbial fungicides the natural choice*. *Pesticide Science*, 39: 155-160
- De Waard, M., A. Andrade, K. Hayashi, H. Schoonbeek, I. Stergiopoulos and L. Zwiars. (2006). *Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence*. *Pest Management Science*, 62: 195-207.
- Gangawane, L.V. (1997) *Management of fungicide resistance in plant pathogens*. *Indian phytopathology*, 50 (3) 305-315.
- Gupta, A. and B. Chatoo (2007). *Functional analysis of a novel transporter ABC4 from *Magnaporthe grisea**. *FEMS Microbiology, Letters* 278: 22-28.
- Gutiérrez, J., O. Gutiérrez, D. Nieto, D. Téliz, Z. Mejía y F. Delgadillo (2004). *Manejo integrado de la antracnosis (*Colletotrichum gloesporoides* Penz) del mango (*Mangifera indica*) durante la postcosecha*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(3): 395-402.
- Guzmán, M. y R. Romero (1997). *Comparación de los fungicidas azoxistrobina, propiconazole y difeconazole en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano (*Musa AAA*)*. CORBANA 22(47): 49-59: 395-402.
- Guzmán, M. (2002). *Situación de la Sigatoka negra en Costa Rica y opciones para el manejo de la enfermedad*. *Memorias ACORBAT*, Cartagena de Indias, Colombia 27 de octubre – 2 de Noviembre 18-191 p.
- Hermanto, C., O. Opina and M. Natural (2010). *Assessment of fungicide resistance of a population of *Mycosphaerella* spp on señor banana*

- variety (*Sucrier group*). *Tree and forestry science and biotechnology*, 4: 80-90.
- Hernandez-Castillo F., A. Berlanga, E. Guerrero y Sánchez A. (2002). *Determinación de la roña del manzano Venturia inaequalis al benomilo, en Arteaga, Coahuila, México*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20 (01): 40-44.
- Marín, DH. And R. Romero (1992). *El combate de la Sigatoka negra*. Boletín número 4. Departamento de Investigaciones, Corporación Bananera Nacional, Costa Rica. 21 p.
- Marín, DH., R. Romero, M. Guzmán and TB. Sutton. (2003). *Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation*. *Plant disease*, 87 (3): 208-222.
- Orozco-Santos, M., M. Orozco-Romero, O. Pérez, G. Manzo, J. Farías y M. Da Silva (2008). *Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos*. *Tropical Plant Pathology*, 33(3): 189-196.
- Patiño, LF., (2001). *Efecto de una fuente de energía, tres inductores de resistencia y un sustrato foliar sobre la Sigatoka negra en banano*. Tesis Maestría. Orton-Catie, Turrialba, Costa Rica. 91
- Perez, V. (2006). *Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra en bananos: estado actual y perspectivas*. *Fitosanidad*, 10 (1):56-72.
- Rivas, G., MF. Zapater and J. Carlier (2002). *Genética de poblaciones de Mycosphaerella fijiensis en el trópico americano*. En Memorias Reunión Internacional Acobat 27 de octubre al 2 de noviembre. Cartagena, Colombia p173-174
- Rubio-Reque, G., F. Baltodano, L. Abanto, J. Wilson and M. Muñoz (2008). *In vitro resistance of Rhizoctonia solani and Fusarium oxysporum to the fungicides benzomil 500, rhizolex-T and homai-WP*. *REDBIOL*, 28 (2): 1-12.
- Stergiopoulos, I., L. Zwiér and M. De Waard (2003). *The ABC Transporter MgAtr4 is a virulence factor of Mycosphaerella graminicola that affects colonization of substomatal cavities in wheat leaves*. *Molecular Plant Mycrobe Interaction*, 16(8): 689-698.
- Zwiér, L., I. Stergiopoulos, G. Gielkens, S. Goodwall and M. De Waard (2003). *ABC transporter of the wheat pathogen Mycosphaerella graminicola function as protectants against biotic and xenobiotic compounds*. *Molecular genetics genome*, 269: 499-507.

Capítulo VI

DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

6.1 TRANSPORTADOR *MfAtr4*

Los transportadores ABC son proteínas integrales de membrana que transportan una amplia variedad de compuestos a través de la membrana. La distribución de los transportadores ABC en la naturaleza comprende desde las *Archaea* hasta el hombre. El número de transportadores ABC en hongos es variable; en *S. cerevisiae* se han encontrado alrededor de 30 transportadores ABC, en *C. albicans* 28, *C. glabrata* 18, *A. fumigatus* 49, *C. neoformans* 54 (Loftus *et al.*, 2005). En el genoma de *M. graminicola* existen 59 entradas para transportadores ABC y en el genoma de *M. fijiensis* se encuentran 59 entradas. A partir del ADNg y ADNc de *M. fijiensis* se amplificó y clonó el transportador ABC denominado *MfAtr4* el cual tiene un tamaño de 4977 pb y codifica para una única proteína de 1658 aa. *MfAtr4* tiene una homología del 73% con el transportador ABC denominado *MgAtr4* de *M. graminicola*. A pesar de la alta homología en las regiones conservadas, una diferencia entre estos dos transportadores es la presencia de un intrón de 52 pb en el transportador *MfAtr4*, en contraste el transportador *MgAtr4* carece de intrones (Zwiers *et al.*, 2003).

La unidad funcional de los transportadores ABC consiste de un dominio citoplásmico de unión a ATP llamado NBD involucrado en la unión e hidrólisis del ATP, asociado a un dominio transmembranal también llamado TMD. El número de dominios NBD y TMD varía de acuerdo al tipo de proteína ABC, pudiéndose encontrar al menos 3 tipos de arreglos: NBD-TMD-NBD-TMD (subfamilia PDR), TMD-NBD-TMD-NBD (subfamilia MDR) y NBD-TMD (Lamping *et al.*, 2010). El transportador *MfAtr4* pertenece a la subfamilia PDR debido al arreglo NBD-TMD-NBD-TMD presente en la proteína (Fig. 6.1). Mediante programas bioinformáticos se ha deducido la secuencia proteica y la topología de la proteína MFATR4.

A pesar de que en los hongos existen numerosos transportadores ABC estas proteínas han sido poco estudiadas en estos organismos. Los transportadores ABC son de importancia clínica por lo que en humanos se les ha dado una mayor relevancia. No obstante, es poco lo que se conoce acerca del mecanismo de transporte. En el caso particular de hongos los NBD's de todos los transportadores ABC, independientemente de su origen

y naturaleza del sustrato que transportan están altamente conservados. Análisis bioquímicos y estructurales muestran que en el dominio NBD1 se localiza un residuo de lisina conservado en el motivo Walker A (GRPGSGKST); este motivo sirve de unión al fosfato gama y beta del ribonucleótido. Además tiene un papel importante en la hidrólisis del ATP (Lamping *et al.*, 2010).

Interesantemente aunque el NBD1 del transportador *MfAtr4* tiene conservados los motivos Walker A (GRPGSGCST), el aminoácido lisina es sustituido por una cisteína. No obstante, en el dominio NBD2 del motivo Walker A (GTSGAGKTT) del transportador *MfAtr4* se conserva el aminoácido lisina. La sustitución de la lisina por cisteína del motivo Walker A en el NBD1 parece ser una característica única del motivo Walker A de transportadores ABC en hongos (Saini *et al.*, 2005).

Otra variación de aminoácidos conservados se da en la firma ABC de los dos dominios NBD's; en el NBD1 se observa la secuencia VSGGQ mientras que en el NBD2 la firma es LNVEG, esta divergencia en los aminoácidos de los dos dominios NBD's genera una asimetría en el transportador *MfAtr4*. Esta asimetría ha sido reportada en otros transportadores ABC fúngicos (por ejemplo CaCdr1p) y es una característica de los transportadores ABC agrupados dentro de la familia PDR (Lamping *et al.*, 2010).

En el transportador CaCdr1p de *C. albicans* se analizó la función de los residuos cisteína (Walker A1) y lisina (Walker A2); mediante mutaciones puntuales se intercambiaron los 2 residuos de aminoácidos (Cys193K y K901C). El análisis de las mutantes mostró que la cisteína (Cys193) del motivo Walker A del dominio NBD1 es crítico para la hidrólisis del ATP y que su sustitución por el aminoácido lisina (Cys193K), genera mutantes con mayor sensibilidad a drogas comparada con las mutantes K901C, las cuales solo presentan una susceptibilidad parcial a ciertas drogas. Estos resultados demuestran que los 2 dominios responden asimétricamente a la sustitución de los residuos conservados en sus respectivos motivos Walker A. La asimetría funcional encontrada en el CaCdr1p demuestra que los NBD's no son idénticos y que no son intercambiables (Saini *et al.*, 2005). Por lo tanto no se descarta que la asimetría encontrada en el transportador *MfAtr4*, tenga importancia en la hidrólisis del ATP y en la resistencia a compuestos fungitóxicos.

Los dominios TMD's constan de 6 hélices cada una y atraviesan varias veces la membrana plasmática; esta región es la más divergente de los transportadores ABC y es la que determina la especificidad hacia el sustrato. La unión de los 2 TMD's forma un canal que permite la translocación del sustrato a través de la membrana (Hollenstein *et al.*, 2007; Dawson *et al.*, 2007). El número de hélices transmembranales es variable y depende de la masa y la naturaleza química del sustrato que translocan (Saurin *et al.*, 1999; Dawson *et al.*, 2007).

Los estudios estructural y funcional de segmentos transmembranales del transportador CaCdr1p muestran que los sitios de unión al sustrato se encuentran dispersos a lo largo de la proteína y sugieren que más de un aminoácido de las diferentes hélices participan en la unión del sustrato y la extrusión. Estudios de mutaciones puntuales; demostraron que los residuos de aminoácidos en TMS6, TMS11, TMS12, NBD1 y NBD2 son importantes para la localización superficial, la unión e hidrólisis del ATP y el transporte del sustrato (Saini *et al.*, 2005). En el transportador Cdrp1 se analizó el TMS11 por medio de un escaneo de alaninas sustituyendo los 23 aminoácidos de dicha hélice por alaninas, el resultado mostró que siete residuos fueron críticos para determinar la especificidad del sustrato. En contraste, el escaneo de alaninas del TMS5 mostró que los 21 aminoácidos son importantes para el transporte del sustrato y la especificidad.

Dentro de los dominios TMD's se encuentran pequeñas asas o loop's conocidas como EL (de sus siglas en inglés Extracellular loops). La longitud de cada asa es variable y de acuerdo a su orientación hacia el citoplasma se dividen en IL o EL (loop intracelular o extracelular). Estas asas tienen importancia en el reconocimiento del sustrato, tal como se demostró en el transportador Pdr5p de *S. cerevisiae* (Lamping *et al.*, 2010).

En el caso del transportador *MfAtr4* consta de 12 segmentos transmembranales (Cuadro 7). Se desconoce la función de los segmentos transmembranales. Aunque es posible que estén involucrados en el reconocimiento específico del sustrato, como en el caso del transportador CaCdr1p, en el que los segmentos transmembranales son importantes en el reconocimiento y especificidad hacia el sustrato. En la figura 6.1A se muestra un esquema típico del transportador ABC tipo PDR de hongos y en la figura 6.1 B, se muestra el esquema del transportador *MfAtr4*.

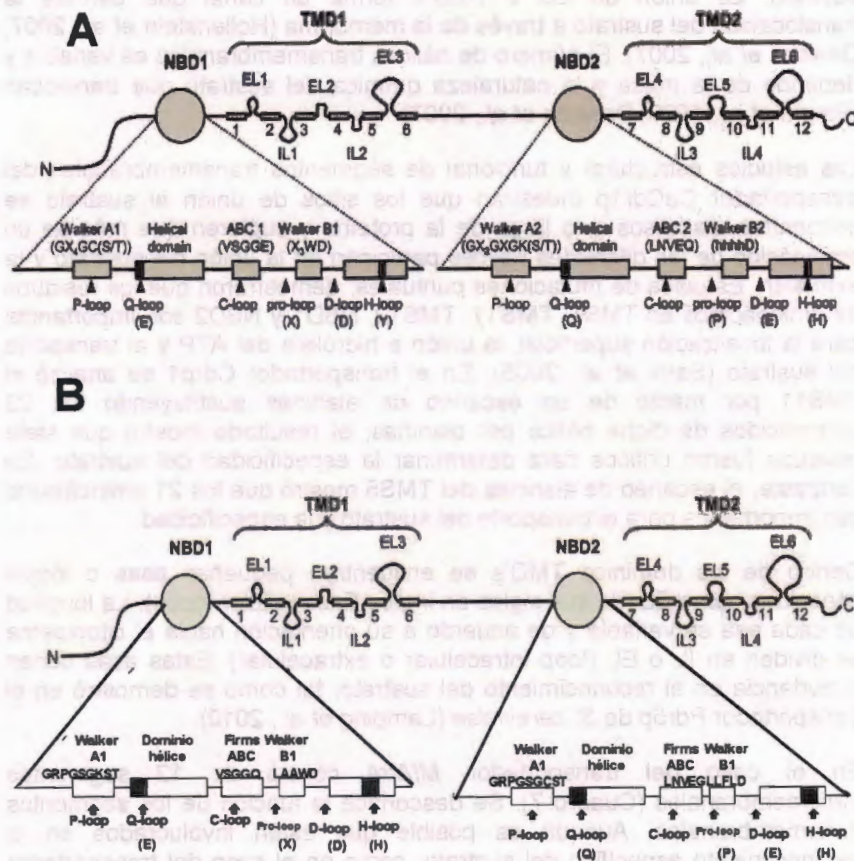


Figura 6.1. Esquema de un transportador ABC tipo PDR en hongos. A) transportador tipo PDR clásico en hongos y B) diagrama del transportador MFATR4 de *M. fijiensis*. Se observan los dominios NBD'S y las secuencias de los motivos Walker A, B, firma ABC, loop Q, C, D H y pro-loop. Asimismo se señalan los TMD'S (segmentos transmembranales y loop extracelulares (EL1-6) e intracelulares (IL1-4)).

Cuadro 7. Secuencia de aminoácidos de los 12 TMS del transportador MFATR4.

No. de regiones transmembranales	N-terminal	Secuencia de aminoácidos de las regiones transmembranales	C-terminal	Tipo de estructura	Longitud
1	614	STFTPIISNIIMALIGSVFYQT	636	SECUNDARIA	23
2	647	GATLFFAILLNALAAISEINSLY	669	PRIMARIA	23
3	693	GIVLDVPLKFAMAVAFNITLYFL	715	SECUNDARIA	23
4	726	FLFFLINFTAMFVMTAIFRTMAA	748	PRIMARIA	23
5	758	ALSGVLVLAIVYTGFPVKYM	780	PRIMARIA	23
6	860	RNFGILLALFLAFMAIFVAVE	881	PRIMARIA	22
7	1276	PSYLAKMVLSGASGLFIGFSFY	1298	SECUNDARIA	23
8	1310	IVYALFMVTTVFSTIVQQIMPLF	1332	SECUNDARIA	23
9	1352	VAFLIAQIVVEIPYQIIAGLIVY	1374	PRIMARIA	23
10	1391	QGLVLLLCVFLIYASTFAHMCI	1413	PRIMARIA	23
11	1421	TAGAVETFLFAMSLIFNGVMQAP	1443	SECUNDARIA	23
12	1544	FGLMWAVYVAFNIGAVVLYFFR	1566	PRIMARIA	23

Nota: 1-12 número de TMS, N terminal, inicio del segmento transmembranal, C-terminal, final del segmento transmembranal. Longitud, número de aa que componen el segmento transmembranal. Tipo de estructura: primaria o secundaria.

6.2 HOMOLOGÍA Y FUNCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES ABC

Estudios filogenéticos han demostrado que existe cierta conservación entre los dominios de unión a ATP (NBDs) presentes en los organismos eucariontes y los dominios de unión a ATP de los organismos procariontes (Seret *et al.*, 2009). El nivel de homología ha dado pie a la hipótesis de que los dominios NBD de los transportadores ABC de animales, hongos y plantas provienen de un ancestro común, el cual probablemente tuvo su origen en las bacterias (Anjard *et al.*, 2002). Posterior a su transferencia a los organismos superiores, los dominios NBD de los transportadores ABC se vieron sujetos a eventos de multiplicación/delección, como resultado de las presiones de selección a la que están sujetos los organismos. Esta propuesta se sustenta en el hecho de que actualmente en los procariontes los transportadores ABC constan de dos o más polipéptidos y requieren dimerizarse para ser funcionales. En contraste, en los eucariontes, los transportadores ABC son generalmente codificados como un solo polipéptido funcional (Anjard *et al.*, 2002). El hecho anterior establece que aunque los NBD's comparten el mismo origen evolutivo y mecanismos de transporte, todo indica que a lo largo de la evolución los dominios NBD's se

han acoplado al evento catalítico de distintas subfamilias de transportadores hasta dar origen a lo que hoy conocemos como los transportadores ABC.

Los estudios acerca de los transportadores ABC realizados en *S. cerevisiae*, *Candida albicans* y *Aspergillus nidulans*, han sido fundamentales para entender la función de estas proteínas, particularmente en la adquisición de la resistencia a diferentes drogas y medicamentos (Sukla *et al.*, 2003; De Waard *et al.*, 2006). Por ejemplo los transportadores ABC de los hongos patógenos de humanos como *C. albicans* y *Aspergillus nidulans* son motivo de creciente atención debido a su función en la resistencia a medicamentos de uso clínico. En el caso de hongos fitopatógenos se han identificado numerosos transportadores ABC y su función ha sido relacionada con el transporte de compuestos tóxicos (Sukla *et al.*, 2003, De Waard *et al.*, 2006).

Debido al interés por entender cómo es que los transportadores ABC participan en la patogenicidad/virulencia de los fitopatógenos, se realizaron alineamientos tipo Blast y se comparó la secuencia de los transportadores ABC1, BcAtrb, GpABC1, FcABC1, MgAtr4 y seis transportadores hipotéticos de *Giberella zeae* (accesiones EAA72194, EAA70810, EAA76260, EAA78585, EAA67787 y EAA77558). El análisis demostró que entre los transportadores existen diferentes niveles de homología, por ejemplo, la proteína FcABC1 tiene 98% de homología con una proteína hipotética de *Giberella zeae* (Accesión EAA72194) y 91% y 63% con las proteínas GpABC1 y ABC1 de *Magnaporthe grisea*, respectivamente. La mayor divergencia de FcABC1 (homología menor o igual al 50%) se registró con los transportadores MgAtr4 y BcAtrB (Skov *et al.*, 2004). En el caso del transportador MfAtr4 este mantiene una homología de 73% con el transportador MgAtr4. Estos datos parecen contradictorios dado que se debería esperar que los transportadores ABC involucrados en virulencia mantuvieran una elevada conservación entre ellos y aún más entre los transportadores MgAtr4 y MfAtr4, dado que ambos transportadores pertenecen a especies ubicadas en el mismo género. Sin embargo; hasta el momento, no existe evidencia filogenética que establezca que los transportadores asociados a virulencia deban agruparse en un solo clado. De igual manera, hasta el día de hoy no se ha determinado una diferencia estructural o filogenética que permita distinguir a los transportadores ABC involucrados en virulencia con respecto de otros transportadores ABC de hongos. Una posibilidad para establecer tales diferencias pudiera basarse en estudios cristalográficos de asociación sustrato-ligando.

6.3 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pPICZA-MFATR4 Y TRANSFORMACIÓN DE *Pichia pastoris* CEPA GS115

Debido al interés por caracterizar la proteína producto del gen *MfAtr4*, se diseñó el constructo pPICZA-MFATR4, con el fin de expresarlo de manera heteróloga en el sistema de *P. pastoris*.

La transformación de *P. pastoris* resultó en solo tres transformantes con el constructo pPICZA-MFATR4. Dicho resultado no es raro, dado que se ha descrito que la cepa GS115 de *P. pastoris*, es una cepa que una vez que se somete al proceso de transformación regenera un bajo número de transformantes positivas (Cai *et al.*, 2001).

Experimentos de expresión de los transportadores ABCC5, ABCD1, ABCG1 y ABCG2 en las cepas GS115 y KM71, dieron como resultado la recuperación de 18 transformantes positivas con la cepa KM71; en contraste la cepa GS115 no produjo transformantes, este hecho sugiere que la cepa GS115 tiene características que dificultan su transformación genética (Cai *et al.*, 2001). La expresión de las proteínas heterólogas también se sujetan a la regulación de la cepa receptora del constructo de expresión y por dicha razón la expresión proteica en *P. pastoris* es variable, la comparación de expresión de diferentes genes en la cepa KM71 mostró que 25 transportadores ABC de humanos presentan diferentes niveles de expresión (Chloupkova *et al.*, 2007).

Se ha descrito que los niveles de producción de proteínas heterólogas expresadas bajo el control del promotor PAOX1, son variables y deben de ser optimizados en cada caso (Cregg *et al.* 1993). En el año 2000 eran más de 400 tipos de proteínas heterólogas expresadas con éxito en este sistema (Cereghino *et al.*, 2002). Este número ha incrementado durante los últimos años (Solá *et al.*, 2007).

En el presente estudio se indujeron las cepas transformadas de *P. pastoris* con 5% de metanol; la expresión de la proteína recombinante se monitoreo cada 24 horas. A las muestras colectadas se les extrajo la proteína total y se analizó por electroforesis en geles SDS-PAGE. El análisis por Western blot mostró que el anticuerpo anti-myc reconoce una proteína de alto peso molecular. Falta determinar la cantidad de proteína MFATR4 producida por mL de cultivo celular. La cantidad de proteína producida puede variar dependiendo del tipo de proteína expresada y puede oscilar desde unos pocos microgramos hasta varios gramos por litro (Cereghino *et al.*, 2002).

Se ha descrito que ciertos transportadores ABC de hongos patógenos están involucrados en transporte de factores de virulencia o micotoxinas producidos por el hongo (Keller *et al.*, 2005; Coleman *et al.*, 2009); entre los que se mencionan la penicilina G, la gliotoxina, aflatoxina, lovastatina, las

toxinas hospedero-específicas y no específicas como la T-toxina, victorina, botridial, AF toxinas y cercosporina. Se sabe que son compuestos que juegan un papel importante durante la patogénesis (Walton, 1996; Scherffl *et al.*, 2004).

En el caso particular del transportador *AtrD* de *A. nidulans*, se ha demostrado que la mutación de dicho transportador se ve afectado en la exclusión de la penicilina, lo que sugiere que *atrD* está involucrado en la exclusión de este compuesto.

Los transportadores ABC además de transportar metabolitos secundarios producidos en el organismo que los contiene, también transportan (para excluir) compuestos de defensa de la planta (fitoalexinas, fitoanticipinas). Por ejemplo el transportador *ABC1* de *M. grisea* se induce en presencia de fitoalexinas de arroz (Urban *et al.*, 1999). Mientras que el transportador *BcatrB* de *B. cinerea* le confiere al patógeno tolerancia al resveratrol (Schoonbeck *et al.*, 2001), y el transportador de *G. pulicaris*, *Gpabc1* le confiere tolerancia contra la rishitina y lubimina (Fleibner *et al.*, 2002).

En el caso del banano, este produce fitoalexinas (Lazzaro *et al.*, 2004) y anticipinas (Cruz-Cruz *et al.*, 2010), no existe evidencia de que algún transportador tipo ABC de *M. fijiensis* esté involucrado en la extrusión de dichos compuestos. Por otro lado, *M. fijiensis* produce metabolitos secundarios como la fijiensina, 2-4-8 trihidroxitetralona, juglona, 4-hidroxitalona, ácido 3-carboxi-3-hidroxinámico y el ácido isocracínico. Se desconoce si algún o algunos transportador (es) de *M. fijiensis* están involucrados en el transporte de dichos metabolitos (Churchill, 2010), por lo que el uso de un sistema de expresión heterólogo como *P. pastoris* es una herramienta importante que facilitará la caracterización bioquímica del transportador MFATR4 (transporte, tipo de sustrato, afinidad por sustratos, inhibición, inhibidores etc.).

6.4 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pSILENT-*MfAtr4SA*

Estudios de funcionalidad de los transportadores ABC; *ABC1*, *BcAtrb*, *GpABC1*, *FcABC1* y *MgAtr4* han evidenciado que estas proteínas se han especializado en la virulencia o patogenicidad de hongos tales como *B. cinerea*, *F. culmorum*, *G. pulicaris*, *M. grisea* y *M. graminicola*. Mutaciones en los transportadores arriba mencionados ocasionan una disminución en la capacidad infectiva de los organismos portadores. No obstante, en dichos estudios no se considera el hecho de que la patogénesis sea un evento determinado únicamente por el transportador ABC, sino que pueden existir otros elementos de regulación génica o químicos (metabolitos secundarios) que contribuyan a dicho fenómeno.

Con la finalidad de determinar si el transportador *MfAtr4* participa en la virulencia de *M. fijiensis* se propuso el silenciamiento génico, como una herramienta para el estudio funcional de dicho gen. Para ello se elaboró el constructo pSilent-*MfAtr4SA* (Fig. 4.2).

Existen estudios de transformación genética de *M. fijiensis*; Balint-Kurti *et al.* (2001), desarrollaron el primer sistema de transformación de este hongo mediante el método de PEG/protoplastos. Para dicha transformación se utilizó un plásmido que contiene al gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) y el gen *hph*, que le confiere resistencia a la higromicina B. El uso de vectores que expresan la proteína GFP fue importante para determinar el proceso infectivo del patógeno sobre cultivares susceptibles de banano. Fue de esta manera que se pudo observar que *M. fijiensis* tiene un crecimiento epifítico sobre la hoja de banano, seguidamente forma una estructura denominada estomatopodio antes de penetrar los estomas y de diseminarse en la cavidad subestomática de la hoja.

Otro sistema de transformación aplicado en *M. fijiensis* es mediante la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Donzelli & Churchill., 2003).

Un sistema reciente para realizar el silenciamiento génico en hongos es la inserción del vector pSilent-1, un vector diseñado y construido para facilitar el silenciamiento génico mediante ARN interferente. Su utilidad se ha demostrado en hongos tales como: en *B. oryzae* en donde se silenció el gen de la policétido sintasa (PKS1) (Moriwaki *et al.*, 2007). En *M. oryzae* se silenció el gen MPG1, que codifica para una hidrófobina (Nakayashiki *et al.*, 2005). Mientras que en *C. lagenarium*, se realizó una doble transformación, insertando primero el gen de la proteína verde fluorescente (eGFP), seguidamente en una segunda transformación, el gen eGFP fue silenciado (Nakayashiki *et al.*, 2005). En *M. canis* se silenciaron 2 genes blanco, uno que codifica para la subtilisina (SUB3) y la dipeptidil peptidasa (DDPIV) (Vermount *et al.*, 2007).

En el grupo de trabajo se está realizando el proceso de transformación de la cepa C1233 de *M. fijiensis* con el vector pSilent-*MfAtr4SA*. El análisis funcional permitirá determinar si el transportador *MfAtr4* participa en la patogenicidad de *M. fijiensis*. El proceso de transformación *M. fijiensis* ha sido reportado por el grupo de la Dra. Churchill. No obstante, la transformación es un proceso complejo y se necesita optimizar para poder transformar la cepa C1233 con el vector pSilent-*MfAtr4SA*.

6.5 EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR *MfAtr4* DURANTE EL PROCESO INFECTIVO DEL BANANO Y EN PRESENCIA DE FUNGICIDAS

Los análisis de expresión del transportador *MfAtr4* en muestras colectadas en campo mostraron que el transportador se expresa durante las etapas de pizca, estría, raya y mancha pero no durante la mancha con halo clorótico. Asimismo se observó que la expresión decrece en el estadio de mancha. Este decremento en la expresión pudiera deberse a que el patógeno ya ha colonizado exitosamente al hospedero y ya no necesita de la participación activa del transportador *MfAtr4* para causar la patogénesis (Fig. 2.6).

Aún no se sabe si *MfAtr4* participa transportando algún metabolito secundario involucrado en su patogénesis. En el transportador *MgAtr4* presunto ortólogo de *MfAtr4* se ha demostrado que tiene un papel importante en la patogénesis de *M. graminicola* sobre plantas de trigo (Stergiopoulos *et al.*, 2003). Mutantes en el transportador *MgAtr4* muestran una reducida virulencia y capacidad de colonizar a las hojas de trigo, comparada con la cepa silvestre (Stergiopoulos *et al.*, 2003).

En *M. grisea* se ha demostrado que los transportadores ABC1 y ABC4 están involucrados ambos en la patogénesis sobre plantas de arroz (Urban *et al.*, 1999; Gupta & Chatoo, 2007), por lo que no puede descartarse que en *M. fijiensis* más de un transportador ABC esté involucrado en la patogénesis sobre *Musa* sp.

Los transportadores ABC, son versátiles pues además de tener una función en la virulencia también le proveen protección al hongo contra compuestos tóxicos como fungicidas. En el presente trabajo se evaluó la expresión de los 5 transportadores ABC tipo PDR (*MfAtr1-5*) de *M. fijiensis* en presencia de 3 fungicidas (clorotalonil, mancozeb y benomil). El resultado mostró que los 4 de los transportadores responden diferencialmente a la presencia de los fungicidas.

Los transportadores *MfAtr4* y *MfAtr2* son los que se expresan de forma más abundante en presencia de clorotalonil, por lo que podrían estar excretando de manera activa este compuesto de la célula fúngica (Fig. 5.6 B y D.). En el caso del transportador *MfAtr1* y *MfAtr3* (Fig. 5.6 A y C), su nivel de expresión se ve reducido respecto al transportador *MfAtr4* y *MfAtr2*, mientras que no se observa expresión del transportador *MfAtr5*.

En presencia del benomil se observa un aumento en la expresión del transportador *MfAtr2*, mientras que la expresión de los transportadores *MfAtr1*, 3 y 4 se reduce (Fig. 5.6), lo que probablemente indique que estos últimos transportadores no están involucrados activamente en la excreción del benomil.

En presencia de Mancozeb se detectó una reducción de la expresión de los transportadores *MfAtr1*, 2, 3 y 4; este hecho puede deberse a que los

transportadores no presentan afinidad hacia el mancozeb y por tanto no lo excretan. Los transportadores ABC tuvieron una expresión variable dependiendo del sustrato. En el caso de los transportadores *MgAtr1-5*, cuando se someten a un tratamiento con azoles, antibióticos y eugenol (compuesto producido por las plantas), se ha visto que más de un transportador puede estar participando en la exclusión de uno o más compuestos, por ejemplo el transportador *MgAtr1* participa en el transporte de azoles, antibióticos y metabolitos secundarios de la planta. Los transportadores *MgAtr4* y 2 solo se expresan en presencia de los azoles, mientras que el transportador *MgAtr5* solo se expresa en presencia del eugenol, un metabolito secundario (De Waard *et al.*, 2006).

En *B. cinerea* el tratamiento con fungicidas incrementa el nivel de expresión de los transportadores *BcatrF*, *BcatrH*, *BcatrI*, *BcatrB* entre otros. Análisis de expresión de mutantes en el transportador *BcatrB* mostró que la disrupción génica genera mutantes hipersensibles a resveratrol, fenpiconil, fludioxonil (Schoonbeck *et al.*, 2001).

Estudios de funcionalidad mediante delección del transportador *AtrD* de *Aspergillus nidulans*, generó mutantes hipersensibles a la cicloheximida y valinomicina, lo que sugiere que el transportador *AtrD* le provee al hongo protección contra dichos compuestos (Andrade *et al.*, 2000).

En *G. pulicaris* el transportador *GpABC1* le confiere al hongo resistencia contra la rishitina y lubimina, mientras que en *Penicillium digitatum* el transportador *PMR1* le confiere resistencia a fungicidas inhibidores de la desmetilación (Nakaune *et al.*, 2002).

Cabe mencionar que no solo los transportadores ABC están involucrados en virulencia o en la extrusión de metabolitos secundarios, antibióticos o fungicidas. Otros transportadores que podrían estar participando son los transportadores de la familia MFS (de las siglas en inglés Major Facilitador Superfamily) y que se ha visto que también están involucradas en el transporte de un diverso rango de moléculas (Coleman *et al.*, 2009).

Una de las limitantes para tener una mejor comprensión acerca de la importancia de los transportadores ABC involucrados en fitopatogenicidad es el reducido número de estudios que existen en dicha área. No obstante, también representa un área de oportunidad, debido a la alta demanda de productos que permitan un mejor control de los microorganismos que inciden sobre los cultivos de importancia agronómica. El desarrollo de investigación en los transportadores ABC de fitopatógenos, particularmente de aquellos involucrados en la fitopatogenicidad, pudiera conducir a la síntesis o descubrimiento de nuevos productos (fungitóxicos) o de blancos potenciales en las proteínas transportadoras, en cuyo caso representarían alternativas de control de fitopatógenos.

6.6. PERSPECTIVAS

La transformación de la cepa C1233 con el constructo pSilent-*MfAtr4*SA es uno de los retos a cumplir para que se pueda continuar con el estudio de exploración de la participación del transportador *MfAtr4* en la virulencia de *M. fijiensis* sobre el banano. Con la transformante silenciada en el transportador *MfAtr4*, se podrían hacer los ensayos *in vitro* de infección sobre banano.

La expresión heteróloga de la proteína MFATR4 es necesaria para realizar los análisis bioquímicos de transporte. Se espera que esta actividad se pueda realizar una vez que se obtenga una cantidad importante del polipéptido recombinante purificado.

El conocimiento de la secuencia y estructura del transportador MFATR4 abre la posibilidad de estudiar mediante mutaciones puntuales cuál es la función de los dominios NBD durante el transporte. Además, por esta técnica es posible determinar cuál es la función de cada uno de los aminoácidos contenidos dentro de los segmentos transmembranales durante el reconocimiento del sustrato. Por otro lado, de confirmarse la participación de *MfAtr4* en la patogénesis, el estudio de la proteína MFATR4 recombinante podría ser utilizado como un blanco para el diseño de nuevos fungicidas que ayuden a controlar la enfermedad ocasionada por *M. fijiensis*.

6.7 REFERENCIAS

- Andrade, A., J. Van-Nistelrooy, R. Peery, P. Skatrud and M. De Waard (2000). *The role of ABC transporters from Aspergillus nidulans in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production*. Molecular and General Genetics, 263: 966-977.
- Anjard, C., the Dictyostelium sequencing consortium and F. William (2002). *Evolutionary analysis of ABC transporter of Dictyostelium discoideum*, Journal Molecular Evolution, 48:22-41.
- Balint-Kurti, P., G.D. May and A. Churchill (2001). *Development of a transformation system for Mycosphaerella pathogens of banana: a tool for study of host/pathogen interaction*. FEMS Microbiology Letters, 195, 9-15.
- Cai, J., T. Genevieve, L. Dien, M. Hakim, S. Rae, M. Yanping and G. Philippe (2001). *Expression of ATP-Binding Cassette (ABC) transporter proteins in Pichia pastoris*. Poster.
- Chloupkova, M., A. Pickert, L. Yeuan, S. Souza, T. Yenphuong, M. Trinh M. Connelly, M. Dumont and L. Urbatsch (2007). *Expression of 25 Human ABC Transporters in the Yeast Pichia pastoris and characterization of the Purified ABCC3 ATPase Activity*. Biochemistry, 46: 7992-8003.
- Cereghino, L., L. Cereghino, C. Ilgen and J.M. Cregg (2002). *Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast Pichia pastoris*. Current Opinion in Biotechnology, 13: 329-332.
- Churchill, A. (2010). *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: 307-328.
- Coleman, J. and E. Mylonakis (2009). *"Efflux in fungi: la piece de resistance"*. PLoS Pathogens, 5 (6): 1-7.
- Cruz-Cruz, CA, G. Ramírez-Tec, K. García-Sosa, F. Escalante-Erosa, L. Hill, AE. Osbourn and LM. Peña-Rodríguez (2010) *Phytoanticipins from banana (Musa acuminata cv. Grande Naine) plants, with antifungal activity against Mycosphaerella fijiensis, the causal agent of black Sigatoka*. European Journal Plant Pathology, 126:459-463.
- Dawson, R., K. Hollenstein and K. Locher (2007). *"Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporter suggest a common mechanism"*. Molecular Microbiology, 65 (2): 250-257.

- De Waard, M., Andrade A., Hayashi K., Schoonbeek H., Stergiospoulos I. and Z. Lute (2006). *Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence*. Review Pest Management Science, 62: 195-207.
- Donzelli, BG. and A. Churchill (2003). *Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of Mycosphaerella fijiensis, the black Sigatoka pathogen of bananas*. Fungal genetics Newsl. Abstract 35.
- Fleibner, A., C. Sopalla, and K-M. Weltring (2002). *An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of Gibberella pulicaris to phytoalexins and virulence on potato tubers*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 15 (2): 102-108.
- Gupta, A. and B. Chatoos (2007). *Functional analysis of a novel transporter ABC4 from Magnaporthe grisea*. FEMS Microbiology Letters, 278: 22-28.
- Hollenstein, C., D.C. Frei, and K. Locher (2007). *"Protein structure of an ABC transporter in complex with its binding"*. Nature, 446 (7132): 213-216.
- Howlett, BJ. (2006). *Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi*. Current Opinion Plant Biology, 9: 371-375.
- Keller, NP, G. Turner and JW Bennett (2005). *Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics*. Nature Review Microbiology, 3: 937-947.
- Lamping, E., V. Philippe Baret, A R. Holmes, B. Monk, A. Goffeau, and R. Cannon (2010). *Fungal PDR transporter: phylogeny , topology, motifs and function*. Fungal genetics and Biology, 47(2): 127-142.
- Lazzaro, A., M. Corominas, C. Martí, C. Flors, R. Izquierdo, TA. Grillo, JG. Luis and S. Nonell (2004). *Light- and singlet oxygen-mediated antifungal activity of phenylphenalenone phytoalexins*. Photochemicals and Photobiological Sciences, 3:706-710.
- Loftus, B J., E. Fung, P. Roncaglia, D. Rowley, P. Amedeo, D. Bruno, J. Vamathevan, M. Miranda, J. Anderson, J. Fraser, J. Allen, I. Bosdet, M. Brent, R. Chiu, T. Doering, M. Donlin, C. D'Souza, D. Fox, V. Grinberg, Jianmin Fu, Marilyn Fukushima, Brian J. Haas, James C. Huang, G. Janbon, S. Jones, H. Koo, M. Krzywinski, J. Kwon-Chung, K. Lengeler, R. Maiti, M.. Marra, R. Marra, C. Mathewson, T. Mitchell, M. Pertea, F. Riggs, S. Salzberg, J. Schein, A. Shvartsbeyn, H. Shin, M. Shumway, C. Specht, B. Suh, A. Tenney, T. Utterback, B. Wickes, J. Wortman, N. Wye, J. Kronstad, J. Lodge, J. Heitman, R. Davis, C.

- Fraser and R. Hyman (2005). *The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen Cryptococcus neoformans*. Science, 307(5713):1321–1324.
- Moriwaki, A., U. Makoto, A. Sakae and K. Junichi (2007). *RNA-mediated gene silencing in the phytopathogenic fungus Bipolaris oryzae*. FEMS Microbiology letters, 269 (1): 85-89.
- Nakayashiki, H., H. Shugo , B. Nguyen, N. Kadotani, Y. Tosa and S. Mayama (2005). *RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi*. Fungal Genetics and Biology, 42(4): 275-83.
- Nakaune, R. , H. Hamamoto, J. Imada, K. Akutsu and T. Hibi (2002). *A novel ABC transporter gene, PMR5, is involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus Penicillium digitatum*. Molecular Genetics and Genomics, 267 (2):179-185.
- Saini, P, T. Prasad, NA. Gaur, S. Shukla, Jha S, et al. (2005). *Alanine scanning of transmembrane helix 11 of Cdr1p ABC antifungal efflux pump of Candida albicans: identification of amino acid residues critical for drug efflux*. Journal Antimicrobial Chemotherapy, 56(1):77–86.
- Saurin, W., M. Hofnung, and E. Dassa (1999). "Getting In or Out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) transporters". Journal of Molecular Evolution, 48, 22-41.
- Scherttl, M., Bignell E., Kragl C., Joechl C. and T. Rogers (2004). *Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential fo Aspergillus fumigatus virulence*. Journal Experimental Medicals, 200: 1213-1219.
- Schoonbeek, H., G. Del Sorbo and M. A De Waard (2001). "The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of Botrytis cinerea to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil". Molecular Plant-Microbe Interactions, 14, (4), 562-571.
- Seret, M., J. F. Diffels, A. Goffeau and P. Baret (2009). "Combined phylogeny and neighborhood analysis of the evolution of the ABC transporters conferring multiple drug resistance in hemiascomycete yeasts", BMC Genomics, 10:459.
- Skov, J., M. Lemmens and H. Giese (2004). "Role of a Fusarium culmorum ABC transporter (FcABC1) during infection of wheat and barley". Physiological and Molecular Plant Pathology, 64, 245–254.

- Sola, A., P. Jouhten, H. Maaheimo, F. Sánchez-Fernando, T. Szyperski, and P. Ferrer (2007). *Metabolic flux profiling of Pichia pastoris grown on glycerol-7methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilutions rates*. Microbiology, 153: 281-290.
- Stergiopoulos, I., L. Zwier and M. De Waard (2003), "*The ABC Transporter MgAtr4 is a virulence factor of Mycosphaerella graminicola that affects colonization of substomatal cavities in wheat leaves*", Molecular Plant-Microbe Interactions, 16 (8): 689-698.
- Sukla, S., P. Saini, S., Ambudkar S. and R. Prasad (2003). "*Functional characterization of Candida albicans ABC transporter cdr1p*", Eukaryotic Cell, 2: 1136-1375.
- Urban, M., T. Bhargava and J. E. Hamer (1999). *An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease*. Embo Journal, 18(3): 512-521.
- Vermout, S., J. Tabart, A. Baldo, M. Monod, B. Losson and B. Mignon (2007). *RNA silencing in the dermatophyte Microsporum canis*. FEMS Microbiology Letters, 275 (1): 38-45.
- Walton, JD. (1996). *Host- selective toxins: agents of compatibility*. Plant cell, 8: 1723-1733.
- Zwier, L., I. Stergiopoulos, G. Gielkens, S. Goodwa!! and M. De Waard (2003). *ABC transporter of the wheat pathogen Mycosphaerella graminicola function as protectants against biotic and xenobiotic compounds*. Molecular genetics and genomics, 269: 499-507.

17/11/19

17/11/19

17/11/19

17/11/19

17/11/19

17/11/19

17/11/19

17/11/19