

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN TIPO *NIK1* EN EL HONGO *Mycosphaerella fijiensis*, AGENTE CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA EN PLÁTANO.

Blanco-Dionisio, G²., Islas-Flores, I²., Canto-Canche, B¹., Rodríguez-García, C¹., James-Kay, A¹., Castillo-Castro, E¹., Peraza-Echeverría, L¹., Tzec-Simá, M¹., Brito-Argáez L.², Grijalva-Arango, R¹. y Peraza-Echeverría, S¹.
Unidad de Biotecnología¹, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas², Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.. Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo, C.P 97200. Tel. (52)999 9813914, Fax. (52) 999 9813900, e-mail: santype@cicy.mx

El hongo *Mycosphaerella fijiensis* es el agente causal de la enfermedad foliar de plátano conocida como Sigatoka negra, la cual constituye el problema fitosanitario más serio que afecta a las regiones productoras de este cultivo en el mundo. En México el combate de esta enfermedad depende del uso de fungicidas, cuya aplicación extensiva e intensiva ha resultado en cuantiosas pérdidas económicas para los productores, contaminación ambiental, problemas de salud para los trabajadores que laboran en las plantaciones y ha estimulado la aparición de cepas resistentes de este hongo. La investigación dirigida a elucidar tanto los genes como los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de *M. fijiensis* podría conducir eventualmente a desarrollar estrategias más efectivas y de menor costo para el control de este hongo.

El gen *NIK1* del hongo filamentoso *Neurospora crassa* codifica para una cinasa de histidina de dos componentes que se encuentra involucrada en la osmorregulación, desarrollo de la hifa y en la sensibilidad a ciertos fungicidas (Alex et al., 1996). Varios homólogos de este gen han sido clonados de diferentes especies de hongos patógenos del hombre y de plantas (Catlett et al. 2003). En el hongo *Candida albicans* que ataca al hombre se logró clonar al gene *CaNIK1*, el cual, además de tener las mismas funciones del gen *NIK1* de *N. crassa*, también está involucrado en aspectos de virulencia (Yamada-Okabe et al., 1999). Recientemente, otros homólogos de *NIK1* como *Dic1* y *AbNIK1*, clonados de los hongos fitopatógenos *Cochliobolus heterostrophus* (Yoshimi et al., 2004) y *Alternaria brassicicola* (Avenot et al., 2005) respectivamente, han mostrado tener una función similar a la del gen *NIK1*, lo que sugiere que tanto la estructura como la función de este gen se encuentran conservados evolutivamente en diferentes especies de hongos patógenos. La función del gen *NIK1* en aspectos fundamentales de la biología de hongos fitopatógenos lo hace un candidato interesante para aplicar estrategias de control cuyo objetivo sea interferir con la proteína de este gen.

En este trabajo se presentan los avances de la clonación de un homólogo del gen *NIK1* en *M. fijiensis* utilizando una estrategia de PCR degenerada. Como primer paso para la clonación de este gen, se utilizó la secuencia completa del ADNc de *NIK1* de *N. crassa* para realizar una búsqueda de secuencia homólogas en el banco de genes NCBI utilizando el programa BLASTX. Varias secuencias de proteínas homólogas a *NIK1* fueron obtenidas, las cuales fueron utilizadas para realizar un alineamiento tipo CLUSTALX, el cual se utilizó para diseñar oligonucleótidos degenerados a partir de regiones altamente conservadas de la proteína. Se evaluaron varias combinaciones de oligonucleótidos en experimentos de PCR utilizando ADN genómico como plantilla. Solamente la combinación de

oligonucleótidos que se anclan en los motivos H y N del dominio de cinasa de histidina produjo un amplicón del tamaño esperado (~400 pb). Este fragmento fue clonado en el vector pGEM-T easy (Promega) y cuatro clones fueron secuenciados. Las secuencias fueron editadas con el programa EDIT del paquete bioinformático LASERGEN y se determinó que las cuatro secuencias fueron 100% idénticas. La secuencia de *M. fijiensis* que se eligió para el análisis bioinformático fue nombrada como HK7, la cual fue utilizada para rastrear el banco de genes NCBI con el programa BLASTX. La secuencia más similar fue un homólogo de cinasa de histidina de dos componentes del hongo *Cochliobolus heterostrophus* que mostró un porcentaje de identidad alto (71 %). El resto de las secuencias también fueron cinasas de histidina de dos componentes, lo que indica que se aisló de manera exitosa una secuencia que pertenece a la familia de proteínas de NIK1 y que los oligonucleótidos degenerados evaluados son útiles para amplificar secuencias de este tipo en *M. fijiensis*. En estos momentos se está realizando la secuenciación de otros clones con la finalidad de continuar con el análisis bioinformático y se planea utilizar la tecnología de RACE para aislar el ADNc. La disponibilidad de esta secuencia permitirá realizar el análisis funcional de este gen en la patogénesis de *M. fijiensis*.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero otorgado por el CONACYT (proyecto 45788-Z).

Bibliografía

Alex, L.A., Borkovich, K.A. and M.I. Simon (1996). Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 93: 3416-3421.

Avenot, H., Simoneau, P., Iacomi-Vasilescu, B. and N. Bataille-Simoneau (2005). Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene *AbNIK1* from *Alternaria brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrrole resistance. *Current Genetics* 47: 234-243.

Catlett, N.L., Yoder, O.C. and B.G. Turgeon (2003). Whole-genome análisis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryotic Cell* 2: 1151-1161.

Yamada-Okabe, T., Mio, T., Ono, N., Kashima, Y., Matsui, M., Arisawa, M. and H. Yamada-Okabe (1999). Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* 181: 7243-7247.

Yoshimi, A., Tsuda, M. and C. Tanaka (2004). Cloning and characterization of the histidine kinase gene *Dic1* from *Cochliobolus heterostrophus* that confers dicarboximide resistance and osmotic adaptation. *Molecular Genetics and Genomics* 271: 228-236.