

CONTENIDO

Declaración I	i
Declaración II	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	iv
Tabla de contenido	v
Lista de cuadros	viii
Lista de figuras	ix
Resumen	xi
I. INTRODUCCION	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 <i>Mycosphaerella fijiensis</i> : agente causal de la enfermedad foliar conocida como Sigatoka negra que afecta al cultivo de plátano	4
2.2 Taxonomía de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	5
2.3 Ciclo de vida de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	6
2.4 Síntomas de la enfermedad	11
2.5 Control de la enfermedad	13
2.6 Genes involucrados en la patogénesis de hongos fitopatógenos	15
2.7 Generalidades de cinasas de histidina de dos componentes	17
2.8 Cinasas de histidina de dos componentes en hongos filamentosos	21

III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos	27
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1 Material biológico	29
6.2 Amplificación de secuencias tipo NIK 1 mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	29
6.3 Electroforesis y purificación de los productos de PCR	30
6.4 Ligación del producto de PCR en el plásmido pGEM-T easy	32
6.5 Transformación genética de la bacteria <i>Escherichia coli</i> cepa DH10B mediante el método de choque térmico y detección de plásmidos recombinantes	33
6.6 Aislamiento de los plásmidos recombinantes	36
6.7 Digestión del plásmido con la enzima de restricción EcoR I y secuenciación del inserto de interés	37
6.8 Alineamiento de secuencias y traducción <i>in silico</i>	38
6.9 Búsqueda de secuencias similares en el banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica utilizando el programa BLASTP	38
VII. RESULTADOS	39
7.1 Aislamiento de ADN genómico de <i>M. fijiensis</i> y amplificación por PCR de un fragmento de ADN del tamaño esperado	39
7.2 Purificación del producto de PCR y clonación en el plásmido pGEM-T easy	41
7.3 Verificación de los plásmidos recombinantes y obtención de la secuencia del producto de PCR	42

7.4 Traducción <i>in silico</i> y búsqueda de secuencias similares en un banco de genes	45
VIII. DISCUSIÓN	49
IX. CONCLUSIONES	55
X. PERSPECTIVAS	56
XI. ABREVIATURAS	58
XII. GLOSARIO	59
XIII. BIBLIOGRAFIA	62

RESUMEN

La Sigatoka negra, enfermedad causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, es el principal problema del cultivo de plátano. Esta enfermedad destruye las hojas de plátano y ocasiona una maduración precoz del fruto. El control de esta enfermedad en plantaciones comerciales depende de un intenso uso de fungicidas. Dicho control es costoso e inaccesible para pequeños productores, además los fungicidas utilizados contaminan el medio ambiente y ponen en riesgo la salud de las personas que trabajan en las plantaciones. Poco es lo que se conoce de los mecanismos moleculares que le permiten a *M. fijiensis* infectar las hojas de genotipos susceptibles de plátano. En los últimos años varios genes involucrados en el desarrollo y patogénesis de hongos que atacan plantas han sido aislados y caracterizados. El conocimiento generado en dichos estudios ha permitido entender mejor la forma en que ciertos patógenos pueden eludir con éxito los sistemas de defensa de la planta y ocasionar la enfermedad. Este conocimiento ha permitido también proponer estrategias de control enfocadas a interferir con las proteínas de estos genes. Los genes de cinasas de histidina de dos componentes tipo NIK1 de hongos, son candidatos interesantes que podrían ser utilizados como blancos moleculares para interferir con sus productos, ya que están involucrados en procesos fisiológicos básicos (desarrollo, patogénesis y estrés osmótico) de varias especies de hongos. En base a lo anterior, en el presente trabajo se planteó como objetivo aislar y caracterizar la estructura de una secuencia parcial tipo NIK1 de *M. fijiensis*. Para lograr esto

se utilizó la estrategia de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el fin de amplificar un producto de PCR del tamaño esperado utilizando ADN genómico de *M. fijiensis* como plantilla. El producto de PCR obtenido fue purificado y ligado al plásmido de clonación pGEM-T easy. La reacción de ligación se utilizó para transformar a la bacteria *Escherichia coli* cepa DH10B. Las colonias de bacterias con plásmidos recombinantes fueron seleccionadas y los plásmidos recombinantes fueron purificados. Tres plásmidos que presentaron el inserto de interés fueron secuenciados. Los resultados de la secuenciación mostraron que las tres secuencias fueron idénticas. Una de las secuencias nombrada como HK7 se eligió para continuar con el análisis. Con la finalidad de determinar a que familia de proteínas podría pertenecer la secuencia HK7, ésta fue traducida *in silico* y la secuencia deducida de aminoácidos comparada con las secuencias depositadas en el banco de genes NCBI. Los resultados de la búsqueda sugirieron que la secuencia HK7 de *M. fijiensis* pertenece a la familia de cinasas de histidina de dos componentes. Estos resultados fueron prometedores y permitirán continuar con experimentos dirigidos al aislamiento del ADN complementario de una secuencia tipo NIK1 de *M. fijiensis*.