



UADY
FACULTAD DE
QUÍMICA

CLONACIÓN DEL GEN *NIK1* DE *Mycosphaerella*
fijiensis EN EL VECTOR pPICZA Y LA
TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS DE *Pichia pastoris*

TESIS

PRESENTADA POR

YASMIN ABRIL SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

EN OPCIÓN AL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2010

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
I.1. Plantaciones bananeras	3
I.1.1. Problemas fitosanitarios en las plantaciones bananeras	4
I.2. <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	4
I.2.1. Infección y Sintomatología	5
I.2.2. Estrategias de control	6
I.3. Patogénesis de los hongos	7
I.4. Transducción de señales de la interacción planta-patógeno por medio de fosforilación de proteínas	8
I.5. Sistema de dos componentes	8
I.5.1. Papel que desempeñan los sistemas de dos componentes	10
I.5.2. Sensor cinasa	12
I.5.3. Regulador de respuesta	12
I.6. Tipo de cinasas de histidina encontradas en diversas especies	13
II. OBJETIVOS	16
II.1. Objetivo general	16
II.2. Objetivos particulares	16
II.3. Hipótesis	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
III.1. Diseño experimental	18
III.2. Materiales	19
III.2.1. Material biológico	19

III.3. Metodología	19
III.3.1. Cultivo en medio PDB	19
III.3.2. Extracción de RNA total de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	19
III.3.3. Análisis de integridad del RNA en geles desnaturalizantes de agarosa	20
III.3.4. Obtención del cDNA total de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .	21
Tratamiento de RNA con DNAsa.	21
Síntesis de cDNA de cadena sencilla.	21
Amplificación del cDNA de cadena sencilla por PCR.	22
III.3.5. Amplificación del cDNA de <i>NIK1</i> a partir de la síntesis de cDNA de cadena sencilla.	22
III.3.6. Purificación de la banda de DNA del gen <i>NIK1</i>	24
III.3.7. Inserción del gen <i>NIK1</i> en el vector pGEM-T	25
III.3.8. Transformación en células <i>E.coli</i> y Plaqueo	25
III.3.9. Verificación de las células transformantes por la reacción de PCR de larga distancia	25
III.3.10. Purificación del DNA plasmídico de las células transformantes	27
III.3.11. Secuenciación de DNA y análisis de secuencias	27
III.3.12. Inserción del gen <i>NIK1</i> en el vector de expresión pPICZA	29
III.3.13. Transformación y Plaqueo	30
III.3.14. Purificación de los plásmidos pPICZA a partir de las células transformantes.	31

III.3.15. Verificación del inserto digiriendo el plásmido pPICZA con las enzimas <i>Apal</i> y <i>KpnI</i> .	31
III.3.16. Verificación del inserto en el plásmido pPICZA con los iniciadores AOX1	32
III.3.17. Extracción del DNA de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .	33
III.3.18. Análisis de Southern blot	34
Marcaje de la sonda	34
Separación de DNA en gel de 0.8% de agarosa	34
Transferencia	35
Hibridación	36
Inmunodetección.	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	37
IV.1. Extracción de RNA de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	37
IV.2. Amplificación del gen <i>NIK1</i> de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	38
IV.3. Verificación del gen <i>NIK1</i> insertado en el vector pGEM-T	39
IV.4. Análisis de secuencia obtenida del gen <i>NIK1</i> y alineamiento con otros genes homólogos	40
IV.5. Inserción del gen <i>NIK1</i> en el vector pPICZA y purificación de los plásmidos recombinantes	43
IV.6. Verificación de los plásmidos transformantes con los iniciadores AOX1 y con las enzimas <i>Apal</i> y <i>KpnI</i>	44
IV.7. Análisis de Southern blot.	45
V. CONCLUSIONES	47
ANEXOS	48
Anexo I	49
Anexo II	52
Anexo III	53
REFERENCIAS	57

RESUMEN

Los bananos constituyen una importante fuente de alimento para mucha gente en el mundo. Las plantaciones bananeras se ven afectadas frecuentemente por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, causante de la enfermedad denominada Sigatoka negra, misma que afecta el rendimiento y la calidad del fruto. El hongo se encuentra ampliamente distribuido en casi todas las regiones productoras del mundo; provocando grandes pérdidas económicas. El control de *Mycosphaerella fijiensis* está centrado en la aplicación de fungicidas, sin embargo, estos constituyen una amenaza para la salud, dañando al medio ambiente, además de que el patógeno ha desarrollado resistencia, aumentando con ello los costos del control.

Una alternativa es la búsqueda de genes involucrados en la virulencia de *Mycosphaerella fijiensis* con el fin de poder controlar la enfermedad. En este trabajo se obtuvo el gen *NIK1*, el parece estar involucrado en la virulencia de este hongo. Este gen fue clonado en el vector pGEM-T (Promega) y secuenciado. La disponibilidad de esta secuencia permitió realizar análisis *in silico* y se determinó que codifica a una cinasa de histidina de dos componentes; esta proteína tiene un peso molecular de 185.8 kDa y contiene 1707 aminoácidos. Se realizó análisis de Southern blot y se determinó que el genoma de *Mycosphaerella fijiensis* contiene un solo gen *NIK1*. No obstante es necesario realizar futuras investigaciones para determinar si este gen le confiere virulencia al hongo de *Mycosphaerella fijiensis*.