



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA DEL HONGO
***Conidiobolus coronatus* Y SU RELACIÓN**
ENDOSIMBIÓTICA CON LA BACTERIA *Pseudomonas* sp.

CAROLINA PÉREZ MARTÍNEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

La presente tesis titulada: VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA DEL HONGO *Conidiobolus coronatus* Y SU RELACIÓN ENDOSIMBIÓTICA CON LA BACTERIA *Pseudomonas* sp realizada por la alumna CAROLINA PÉREZ MARTÍNEZ, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR


CONSEJERO: DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ ROSAS


ASESOR: DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS


ASESOR: DRA. REYNA ROJAS MARTÍNEZ


ASESOR: DR. GABRIEL OTERO COLINA


ASESORA: DRA. ERIKA M. ESTRADA CAMARENA

Dedicatorias

A Julio

Por atreverte a tomar un horrible café conmigo, por ser mi mayor apoyo y por todas las formas en que me expresas tu amor. Te quiero mucho.

A mis padres: Vicente y Maria.

Soy muy afortunada de haber llegado a su familia, gracias por creer en mí, por su amor y apoyo. Así como ustedes a mí, yo también los quiero mucho.

A mis hermanos: Ana, Vicente y Belem.

Por los momentos de felicidad que hemos compartido... y los no tan felices. Gracias

A mis sobrinos: Mayo, Lupita, Richard, Diana, Neri y Nestor.

Quiero que esto que hago sirva de ejemplo y ayude a que todos sus sueños se cumplan.

A mis amigos y compañeros: Magali, Marlene (GPS), Awii, Jimy, Isra, Janet, Gaby, Verito, Jhony, Isha, Chelita, El Sr. Director, Peter, Dany, Bruno, Luis.

Por ser estrellitas muy especiales en mi vida y compartirme un poco de su brillo.

A mis maestros Norma y Nacho

Por su guía y amor.

Ah! Y al animalito que vive en casa...

Gracias también.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para poder realizar mis estudios de Doctorado.

Al Colegio de Postgraduados, por brindarme la oportunidad de alcanzar un logro académico más en mi formación académica.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo económico para la realización de esta tesis.

Al Instituto de Biotecnología (IBT) y al Centro de Ciencias Genómicas (CCG) de la UNAM, por permitirme el acceso a sus instalaciones para la realización de la segunda etapa de este trabajo (Capítulo 3).

Dr. Pablo Vinuesa (CCG), al Dr. Luis Cárdenas Torres (IBT) y al M.C Bernardo Sachman Ruiz (CCG) por abrirme las puertas en sus laboratorios, por la guía, por sus aportaciones y el apoyo económico para la realización segunda etapa de este trabajo (Capítulo 3)

A todos los miembros de mi consejo, por su apoyo y formación.

Agradezco a la Ing. Iobana Alanís-Martínez, por su gran paciencia, guía y amistad, para la realización del la primera etapa de este trabajo (Capitulo 1)

Al Dr. Ariel Guzmán-Franco y a la Dra. Obdulia León Segura por que siempre se dieron un espacio para ayudarme y aclarar mis dudas.

Al MC. Jorge Valdez por la ayuda en la toma y edición de fotos.

A mi amigo David A. Gutiérrez Castillo, por los dibujos que realizó para este trabajo.

A cada uno de los profesores que fueron parte de mi formación en el colegio de Postgraduados.

Al Dr. Arthur A. Callaghan y Dr. Richard A. Humber por el envío de aislamientos de *C. coronatus* usados en el presente estudio.

Agradecimiento a las LPI 13: Comunidades Rurales Agrarias, Ejidos y Conocimiento Local.

A mis compañeros del laboratorio de Patología de Insectos: Gaby, Jorge, Santo, Román, Nico, Fabian, Victor, Ale, Erika, Beto, de forma especial a Lupita y Jhony por su gran apoyo y por aclararme tantas dudas.

A Rebeca, Martota, Palemón, Fernandillo, Daniel Nieto, Esteban Leyva, Cristian Nava, Ausencio, Juliño, Isra, Talina, Ruth, Alejandro Estrada, Imelda, Roñis, Nuvia, por los momentos gratos que vivimos y por su apoyo.

A todo el personal académico, administrativo del Colegio de Postgraduados. Y a todas aquellas personas con las que conviví y que de una forma u otra ayudaron a que este trabajo se realizara.

Evitemos la muerte en suaves cuotas, recordando siempre que estar vivo exige un esfuerzo mucho mayor que el simple hecho de respirar (*Pablo Neruda*).

Contenido

Contenido	i
Índice de figuras	iv
Índice de cuadros	v
Resumen general	1
Overview	2
Introducción general	3
Capítulo 1	
Revisión de literatura	6
<i>Conidiobolus coronatus</i>	6
Descripción	6
Ciclo de vida	7
Daño en humanos	10
Estudios moleculares	11
Marcadores moleculares	12
RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico o random amplification of polymorphic DNA)	13
ITS (espaciador interno transcrito o internal transcriber spacer)	14
SSR (secuencias simples repetidas o simple sequence repeat)	17
Endosimbiosis	19
Definición de simbiosis	19
Significado biológico de la simbiosis	19
Definición de endosimbiosis	20
Relación simbiótica (endosimbiosis) entre hongos y bacterias	21
<i>Pseudomonas</i>	23
Identificación bacteriana por secuenciación ARNr 16S	24
Características del gen ARNr 16S	25
Bibliografía	27

Capítulo 2

Variación genética de aislamientos de <i>Conidiobolus coronatus</i> de diferentes hospedantes	32
R e s u m e n	32
A b s t r a c t	33
Introducción	34
Materiales y métodos	35
Aislamientos	35
Extracción de ADN	36
Amplificación polimórfica al azar del ADN (RAPD)	39
Amplificación de SSR (secuencias simples repetidas)	39
Amplificación y secuenciación de la región ITS del ARN ribosomal	40
Análisis de datos	41
Microsatélites SSR y RAPD	41
ITS	41
Resultados	43
Análisis RAPD y SSR	43
Análisis ITS	44
Discusión	48
Bibliografía	52

Capítulo 3

Endosimbiosis del hongo <i>Conidiobolus coronatus</i> y la bacteria <i>Pseudomonas</i> sp	57
R e s u m e n	57
A b s t r a c t	58
Introducción	59
Materiales y métodos	60
Aislamientos y condiciones de cultivo	60
Extracción de ADN	61
PCR y secuenciación	62
Análisis filogenético	64

Microscopía láser confocal	64
Resultados	65
Secuenciación	65
Microscopía láser confocal	68
Discusión	68
Bibliografía	76
Discusión general	81
Conclusiones generales	91
Glosario	92

Índice de figuras

Figura 1.1. <i>C. coronatus</i>	8
Figura 1.2. Esquema de las estructuras presentes en el ciclo de vida de <i>C. coronatus</i>	9
Figura 1.3. Partes de una región ITS	16
Figura 1.4. El operón ribosómico	26
Figura 2.1. Productos de PCR con los iniciadores universales ITS 4 y 5	37
Figura 2.2. Alineamiento múltiple de secuencias parciales ITS 1, ITS 2 y 5.8	42
Figura 2.2. Continuación	43
Figura 2.3. Productos de PCR amplificados con iniciadores RAPD	45
Figura 2.4. Dendrograma de agrupamiento de aislamientos de <i>C. coronatus</i> obtenidos a partir de los polimorfismos de RAPD y SSR	46
Figura 2.5. Árbol filogenético consenso obtenido con secuencias completas de ITS 1, 5.8 e ITS 2 usando análisis NJ	47
Figura 3.1. Productos de PCR amplificados con los iniciadores universales 16S	66
Figura 3.2. Árbol filogenético basado en secuencias del gen 16SrARN del endosimbionte <i>Pseudomonas</i> sp y representantes del género <i>Pseudomonas</i>	67
Figura 3.3. Fotografía microscópica tomada con microscopía láser confocal de fluorescencia, evidenciando la presencia de la bacteria endosimbiótica <i>Pseudomonas</i> sp dentro del citosol del hongo <i>C. coronatus</i>	74
Figura 3.4. Fotografía microscópica tomada con microscopía láser confocal de fluorescencia, evidenciando la presencia de la bacteria endosimbiótica <i>Pseudomonas</i> sp dentro del citosol del hongo <i>C. coronatus</i>	75

Índice de cuadros

Cuadro 1.1. Asociaciones hongo-bacteria y sus características biológicas	22
Cuadro 2.1. Aislamientos usados en el análisis RAPD, SSR e ITS	38
Cuadro 2.2. Secuencia de los iniciadores RAPD y SSR y fragmentos amplificados	40
Cuadro 3.1. Aislamientos de <i>Conidiobolus coronatus</i> y <i>Zoophthora phalloides</i> (testigo negativo)	62

Resumen general

El hongo *Conidiobolus coronatus* es un saprófito facultativo, patógeno de muchas especies de insectos e incluso está reportado como causante de micosis subcutánea en humanos, aunque los reportes de esto último son poco comunes y se restringen a regiones con climas tropicales y de alta humedad. En la presente investigación se analiza la variación genética de aislamientos de *C. coronatus* de diferentes hospedantes (incluyendo al humano) y se corrobora la presencia de una bacteria endosimbiótica en dicho hongo. Mediante las técnicas RAPD, SSR y secuenciación de ITS 1 y 2 y región 5.8, se obtuvo variación intraespecífica y una clara distancia genética entre aislamientos obtenidos de humanos y otras fuentes (insectos y suelo). Para corroborar la endosimbiosis, se realizaron clonaciones a partir del metagenoma de *C. coronatus* seguido de un análisis molecular del gen 16S rARN y un análisis morfológico al micelio y esporas con microscopía láser confocal mediante fluorescencia para distinguir la presencia de la bacteria en los diferentes aislamientos de *C. coronatus*. Los resultados muestran que existe una endosimbiosis entre el hongo *C. coronatus* y una bacteria que pertenece al género *Pseudomonas*. Este trabajo es el primer reporte sobre diversidad genética entre aislamientos de *C. coronatus* provenientes de diferentes hospedantes (insecto, suelo y lesiones humanas) y zonas geográficas, a la vez que es también el primer reporte de una endosimbiosis en la que está involucrado un hongo entomoforal y una bacteria del género *Pseudomonas*.

Palabras clave: análisis filogenético, clonación, endosimbiosis, Entomoftorales, microscopía láser confocal, multihospedero, polimorfismo, variación intraespecífica.

Overview

The fungi *Conidiobolus coronatus* is a facultative saprophytic, pathogen for many insect species, and it is even reported as causing of subcutaneous mycosis in human, although the occurrence of this is rather seldom and restricted to tropical climate and high humidity regions. After analyzing the genetic variation of *C. coronatus* isolates taken from different hosts (human included), the existence of an endosymbiotic bacterium within such fungi has been corroborated. Through the RAPD, SSR and ITS 1, 2 and 5.8 region sequenciation techniques, intraespecific variation and a clear genetic distance between isolates taken from human and other sources (insects and soil) has been determined. In order to corroborate the endosymbiosis, clonings from *C. coronatus* metagenome were carried out, followed by 16S rARN gen molecular analysis and a morphologic analysis of mycelium and spores of *C. Coronatus* with confocal laser microscopy through fluorescence. Results show an endosymbiosis between the fungi *C. coronatus* and a bacterium, belonging to *Pseudomonas* genus, does exist. This research is the first report about genetic diversity between *C. coronatus* isolates taken from different hosts (insects, soil and human wounds) and geographic zones. At the same time, this is also the very first report of an endosymbiosis in which an entomophthoral fungi and a bacterium from genus *Pseudomonas* are involved.

Key words: phylogenetic analysis, cloning, endosymbiosis, Entomophthorales, confocal lasser microscopy, multihost, polimorphism, intraespecific variation.

Introducción general

Conidiobolus coronatus es un hongo que pertenece a la familia Entomophthoraceae (Humber 1989); es un saprófito facultativo y patógeno de muchas especies de insectos, incluidas en diferentes órdenes tales como: Hemípteros, Coleópteros, Lepidópteros y Dípteros (Freimoser et al. 2003). Existen datos adicionales de insectos atacados por *C. coronatus* como el trabajo de Papierok (1993), quien lo aisló de *Aphis parietariae* Theobald (Hemiptera: Aphididae), *Forda* sp (Hemiptera: Aphididae), *Mesoponera* sp (Hymenoptera: Formicidae), *Hanseniella unguiculata* (Hansen) (Symphyla: Scutigerellidae), *Ceutorhynchus napi* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), *Tribolium destructor* Uyttenboogart (Coleoptera: Tenebrionidae); Prasertphon (1963), por su parte, logró aislarlo de *Therioaphis maculata* (Buckton) (Hemiptera: Aphididae), mientras que Wieloch et al. (2004) lo obtuvieron de *Dendrolaelaps* sp (Acari: Digamasellidae). El modo de acción de *C. coronatus* ha motivado que algunos investigadores realicen pruebas para usarlo en el control de insectos de importancia económica; por mencionar solo unos ejemplos se tiene los estudios realizados por Sajap et al. (1997), quienes realizaron ensayos con *C. coronatus* sobre termitas (*Coptotermes curvignathus*, Isoptera: Rhinotermitidae) en los cuales usaron diferentes dosis de esporas determinadas por tiempos de exposición y lograron mortalidades de hasta 100% después de 12 horas de haber aplicado el hongo; Hartmann & Wasti (1974) realizaron un estudio muy similar sobre *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) y también obtuvieron 100% de mortalidad cuando las larvas permanecieron expuestas al hongo por 20 min o más.

Para el caso de México, el primer reporte de *C. coronatus* fue en Tamaulipas; existe registro de un proyecto dirigido por la Dirección General de Sanidad Vegetal, donde aislaron a *C. coronatus* de la mosca pinta (*Aenolamia postica*) (Hemiptera: Cercopidae) la cual atacaba pastizales en dicho estado (Guzmán & Alcozer 1972). Después, en 1985 fue reportado sobre *Aenolamia albofasciata* y un Acrididae; de hecho en esa época era considerado como un hongo con gran potencial para el control biológico de estos insectos (Reumadiere & Latgé 1985).

Sin embargo, *C. coronatus* está reportado como causante de micosis subcutánea en humanos (rinoentomofotoromicosis) debido a que invade la parte superficial del tracto

respiratorio, la mucosa nasal y paranasal (Segura *et al.* 1981; Valle *et al.* 2001). Aún cuando se trata de un hongo cosmopolita, el reporte de daño en humanos es poco frecuente y éste se restringe a regiones con climas tropicales y con alta humedad, lo que sugiere que el organismo no es muy virulento para humanos y/o que existe algún factor hasta ahora desconocido que juega un papel importante en el mecanismo de infección en humanos (Ribes *et al.* 2000; Wieloch *et al.* 2004).

Considerando la información generada hasta el momento sobre *C. coronatus*, los objetivos de la presente investigación fueron: 1) analizar la variación genética de aislamientos de *C. coronatus* de diferentes hospedantes (Capítulo 2) y 2) corroborar la presencia de una bacteria endosimbiótica en el hongo *C. coronatus* (Capítulo 3).

El primer objetivo se planteó a raíz de la detección de un brote epizootico de *C. coronatus* sobre moscas de la especie *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae), la cual es considerada la principal plaga del champiñón (O'Connor & Keil 2005). El brote se localizó en la planta de producción de champiñones (*Agaricus bisporus*) llamada Hongos Rioxal, ubicada en Veracruz, México. El proceso de producción de champiñones incluye una etapa de incubación y otra de fructificación que se llevan a cabo en naves cerradas, dentro de las cuales se puede alcanzar temperaturas de hasta 30°C y una humedad relativa de 90% (Vedder 1996); en las naves, *C. coronatus* permanece sobre dípteros infectados, lo que ocasiona que los trabajadores convivan con ellos por periodos prolongados. Esto implica que se encuentran en contacto con las esporas del hongo, sin embargo, es conveniente resaltar que aún bajo estas condiciones de exposición al supuesto patógeno, no existen reportes de rinoentomofotoromicosis en las plantas de producción de champiñón. De estas observaciones nace la pregunta ¿existe variabilidad genética y especialización entre los aislamientos de *C. coronatus*? Para responder esta cuestión y cumplir con este objetivo, se usaron 11 aislamientos provenientes de diferentes hospedantes (incluyendo al humano); se emplearon las técnicas RAPD, SSR y secuenciación de ITS 1 y 2 y región 5.8 (intrones ubicados entre los genes rADN 28S y 18S).

El segundo objetivo se planteó cuando se detectó la primera incidencia de una supuesta endosimbiosis al realizar diluciones previas a una inoculación del hongo en ratones, con lo cual se pretendía observar el efecto patogénico de cuatro aislamientos de *C. coronatus* (tres de insectos y

uno de humano) en una infección experimental murina. Tras repetidos intentos (sin éxito) para eliminar la bacteria que hasta ese momento era considerada como un contaminante, nació la hipótesis de la presencia de una endosimbiosis. Para corroborarla, se realizaron pruebas con clonaciones a partir del metagenoma de *C. coronatus*, seguido de un análisis molecular del gen 16S rARN y un análisis morfológico con microscopía láser confocal.

Capítulo 1

Revisión de literatura

Conidiobolus coronatus

Descripción

El orden Entomoftorales pertenece al reino Fungi, subdivisión Zygomycota, clase Zygomycetes, familia Entomophthoraceae (Humber 1989) y un integrante de esta familia es *Conidiobolus coronatus*. En dicho orden se encuentran los patógenos de insectos más comunes y virulentos, los cuales provocan reducciones significativas en las poblaciones de insectos y por lo mismo, son usados como agentes de control biológico (Freimoser *et al.* 2003).

El hongo *C. coronatus* es un saprófito facultativo y es también un patógeno de muchas especies de insectos. Se ha encontrado sobre madera en proceso de degradación, hojarasca, suelo (Papierok *et al.* 1993) y como patógeno de mamíferos, incluyendo al hombre. Es considerado como el más básico y menos especializado de todos los Entomoftorales. No hay evidencia de especificidad de hospedantes y ha sido aislado de Hemípteros, Coleópteros, Lepidópteros y Dípteros (Freimoser *et al.* 2003); así mismo, se ha observado como un patógeno de incidencia natural sobre colémbolos (Dromph *et al.* 2001). Se tienen evidencias que este hongo ataca a las especies *Sitobion avenae* y *Metopolophium dirhodum* (Feng *et al.* 1991); es conocido como patógeno oportunista, puede contaminar secundariamente a un invertebrado muerto por micosis u otras causas (Papierok *et al.* 1993). *C. coronatus*, como un gran número de Entomoftorales, produce toxinas que afectan a los insectos, lo que se comprobó en un estudio realizado por Hartmann & Wasti (1974), quienes observaron toxinas capaces de afectar a Lepidópteros. En un estudio realizado por Papierok *et al.* (1993) se observó que larvas de *Galleria mellonella* infectadas por *C. coronatus* disminuyeron su capacidad anticoagulante, presentaron hemorragias en los puntos donde se realizó la inyección, tomaron un color negro y murieron. *C. coronatus* tiene un

crecimiento rápido que le permite invadir completamente al hospedante, aprovechándolo por completo antes de que los competidores lleguen a él (Freimoser *et al.* 2003).

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *C. coronatus* es representado por diversas etapas, entre las cuales hay diferentes tipos de conidios (Figura 1.1 y 1.2). Los conidios primarios pueden transformarse en secundarios, terciarios y hasta quaternarios; esto depende del ambiente y de la naturaleza del medio nutritivo (Prasertphon 1963).

Una colonia de *C. coronatus* desarrollada sobre medio PDA a 21°C puede alcanzar un diámetro de 40-50 mm en tres días (Figura 1.1); dicha colonia tiene una apariencia vellosa; al envejecer adquiere un color oscuro (café pálido) con apariencia polvosa. Al inicio es de apariencia plana y después adquiere una superficie rugosa. Los conidióforos son de 9.5 a 25 X 31 a 210 µm. El tamaño de los conidios primarios se encuentra entre 50.5 a 53 x 38 a 40 µm. Las papilas son muy protuberantes y alargadas, sin contenido citoplasmático, con una punta redondeada que mide 5 a 13 x 3 a 14 µm (Keller 1987). No se producen microconidios o se producen sólo de conidios primarios cuando son depositados sobre agar/agua. Las esporas vellosas sólo se producen en condiciones completamente secas, para ello, la pared conidial de una espora primaria se engrosa y toda o parte de la papila es cortada por la pared engrosada al mismo tiempo que los apéndices se desarrollan; el engrosamiento de la pared conidial y la alteración de la forma del conidio pueden presentarse sin desarrollar los apéndices vellosos. Keller (1987) señala que el tamaño de las esporas vellosas es de 30.5 a 31.5 µm; los conidios secundarios son parecidos a los primarios. *C. coronatus* no produce zigoesporas (Inglod, 1992) y hasta donde se sabe es la única especie que produce esporas vellosas. Algunos aislamientos de *C. coronatus* producen clamidiosporas de forma abundante, aunque la mayoría de los aislamientos las producen en raras ocasiones. Las clamidiosporas se forman mediante el redondeo de segmentos hifales individuales y no se ha observado ninguna evidencia de conjugación. Poseen una pared gruesa y un contenido celular relativamente homogéneo (King, 1983).

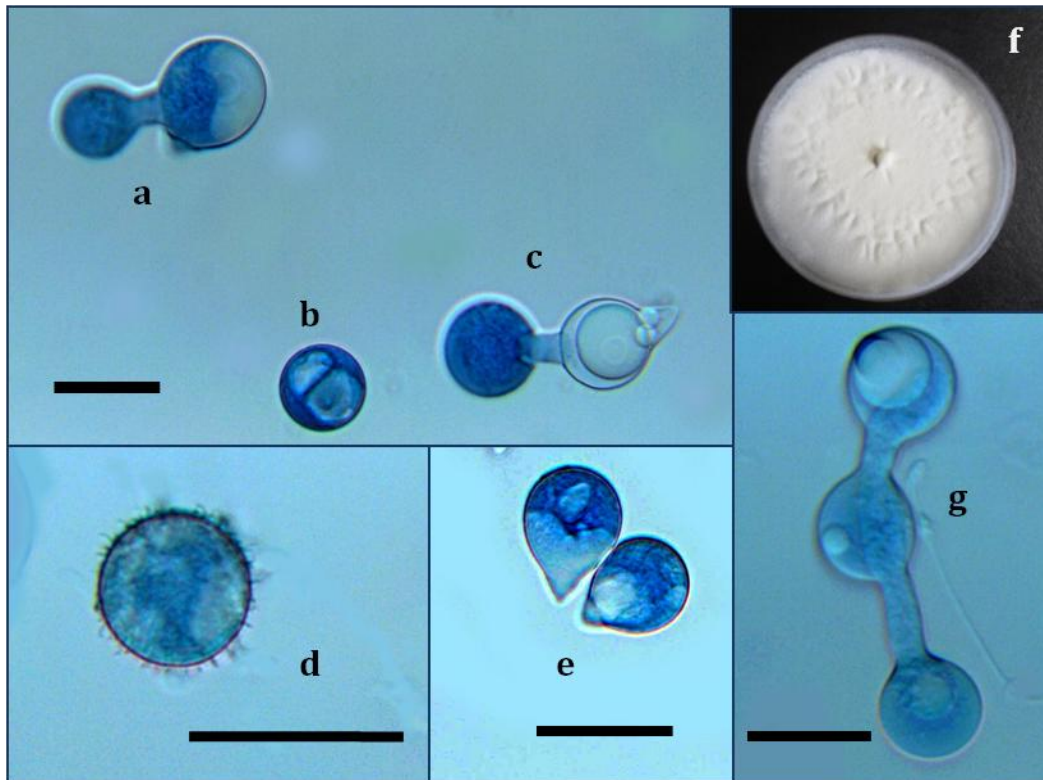


Figura 1.1. *C. coronatus*. a) Fotografía microscópica de la formación de un conidio secundario; b) Fotografía microscópica de un conidio primario; c) Fotografía microscópica de un conidio secundario en proceso de descarga; d) Fotografía microscópica de un conidio vellosos; e) Fotografía microscópica de conidios primarios con papilas; f) Caja Petri con desarrollo en medio ADS, al incubarse a 21°C por tres días; g) Fotografía microscópica de la formación de un conidio terciario a partir de un conidio primario. En todos los casos la barra representa 50 μm .

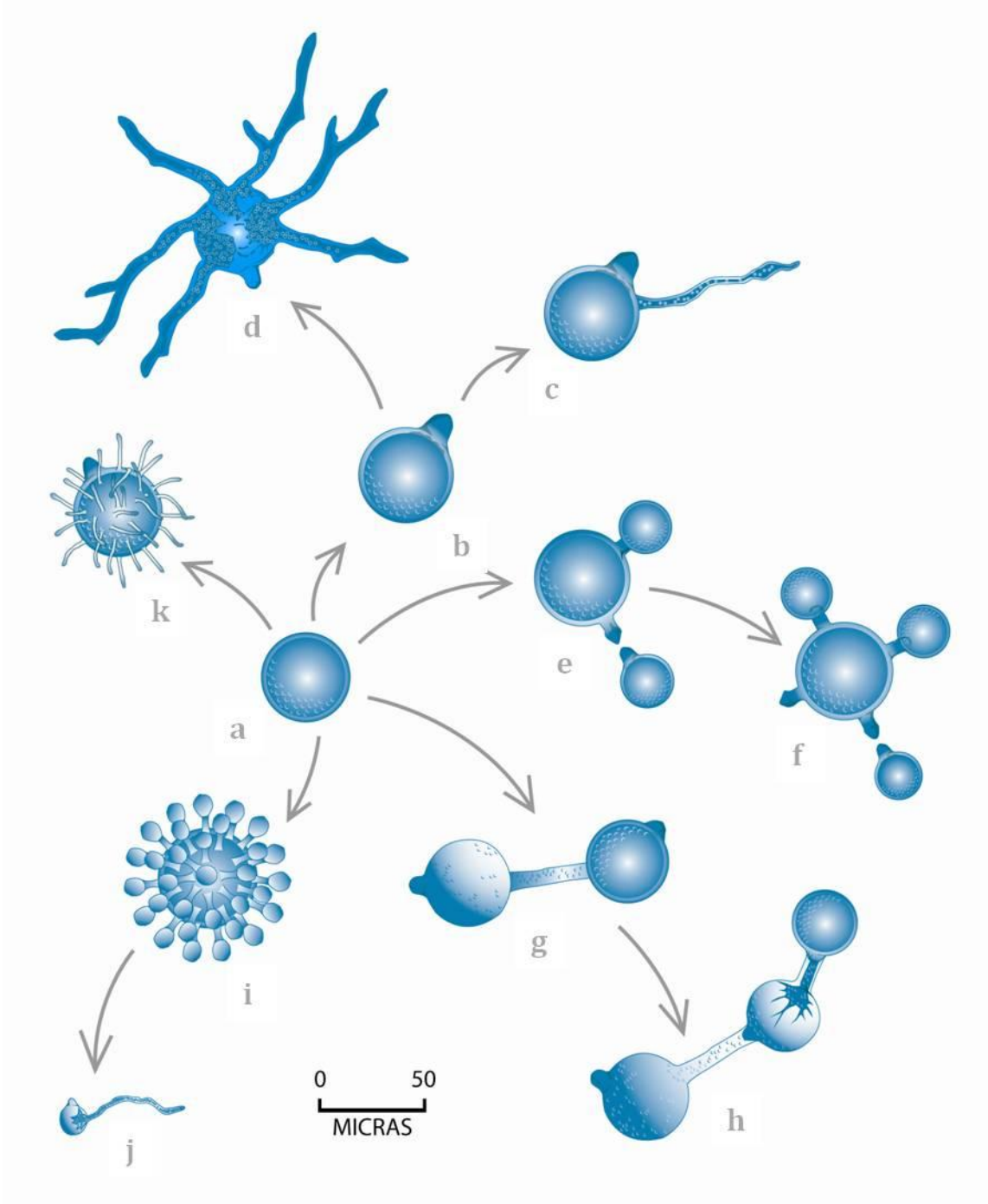


Figura 1.2. Esquema de las estructuras presentes en el ciclo de vida de *C. coronatus*. a) Conidio primario; b) Conidio primario con papila; c) Germinación de conidio primario; d) Conidio primario con seis tubos germinativos; e) Conidio primario produciendo 2 conidios secundarios; f) Conidio primario produciendo tres conidios secundarios; g) Conidio secundario; h) Formación de un conidio terciario; i) Microconidios; j) Microconidio germinado; k) Conidio veloso. Dibujo elaborado por David A. Gutierrez Castillo.

Daño en humanos

Algunos Entomoftorales son capaces de producir micosis subcutánea y mucocutánea en humanos. Los patógenos de este orden incluyen especies de *Basidiobolus* y *Conidiobolus* (Valle *et al.* 2001). *Basidiobolus haptosporus*, *C. coronatus* y *C. incongruus* son las únicas especies de Entomoftorales que causan enfermedades en los humanos (King 1983). *C. coronatus* produce rinoentomoftoromicosis, la cual es una micosis crónica que afecta la superficie del tracto respiratorio, puede afectar la mucosa nasal y paranasal e incluso extenderse a la piel de la nariz, labio superior y área fronto-glabelar, y causa una distorsión prominente en la cara del paciente afectado (Valle *et al.* 2001). Externamente se manifiesta como nódulos o como un engrosamiento difuso de la piel en el dorso de la nariz. La estructura ósea no es afectada por *C. coronatus*.

La rinoentomoftoromicosis se presenta principalmente en regiones tropicales con alta humedad (Valle *et al.* 2001) y con mayor frecuencia ataca a hombres; aproximadamente 60% de los casos citados ocurrieron en personas de entre 20 y 29 años de edad (Segura *et al.* 1981). Según Ribes *et al.* (2000), la proporción es de 8:1 entre hombres y mujeres y la mayoría de los casos se han citado en campesinos o personas que trabajan al aire libre (Voigt *et al.* 1999). *C. coronatus* es capaz de infectar a personas tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidas. Clark (1968) afirma que la baja virulencia de *Conidiobolus* sp se debe a la historia clínica de cada paciente; menciona el caso de un paciente que tuvo contacto con *C. coronatus* durante 20 años antes de presentar síntomas. Otros pacientes de áreas rurales presentan síntomas parcialmente y por ello no buscan atención médica.

El paciente presenta síntomas de una sinusitis crónica que comienza como hinchazón de las cavidades nasales inferiores y se extiende a casi todos los tejidos y estructuras adyacentes. La infección se extiende a tejidos faciales, subcutáneos y paranasales e incluso llega a afectar la faringe y la laringe causando obstrucción. Sin embargo, la infección generalmente no se extiende a los hemisferios cerebrales. El yoduro de potasio, co-trimoxazol, la anfotericina B, el ketoconazol, el itraconazol y las combinaciones de estos medicamentos se han utilizado con diversos grados de éxito y en muchos casos estas combinaciones han logrado erradicar el problema. También se ha observado que en algunos casos, la infección de *Conidiobolus* se cura espontáneamente y los tratamientos quirúrgicos curan a algunos pacientes. La cirugía también se puede requerir para

quitar nódulos y para reconstruir los daños, aunque la cirugía no siempre es la solución ya que puede reaparecer la enfermedad (Ribes *et al.* 2000; Valle *et al.* 2001).

El modo de la transmisión de *C. coronatus* no se ha establecido pero probablemente se da por la inhalación de las esporas, las que luego se implantan en la mucosa nasal o por un trauma de menor importancia tal como la picadura de un insecto (Ribes *et al.* 2000). Segura *et al.* (1981) concuerdan con lo anterior y agregan que las heridas hechas accidentalmente pueden convertirse en vías a través de las cuales el hongo obtiene acceso a la submucosa. La extensa distribución de *C. coronatus* y los pocos casos de rinoentomofotoromicosis citados hacen suponer que no todos los aislamientos de este hongo son patógenos para el humano y para animales superiores o que dicha patogenicidad es muy baja (Valle *et al.* 2001).

Estudios moleculares

Los estudios realizados a nivel molecular con *C. coronatus* son los siguientes: estudio de marcadores minisatelitales en seis variantes de patogenicidad sobre larvas de *G. mellonella*; en dicha prueba encontraron variación en su genotipo entre las colonias analizadas, resultando que, a mayor patogenicidad, mayor número de bandas (Wieloch *et al.* 2004). Tymon *et al.* (2004) realizaron estudios de variabilidad genética en diferentes especies de *Entomophthorales* incluyendo *C. obscurus* (cuatro aislamientos) y *Conidiobolus* sp (un aislamiento); usando PCR de regiones ITS y análisis de restricción, encontraron variación intraespecífica; la amplificación de la región ITS completa produjo tamaños de 1400 -1700 bp, aunque no obtuvieron secuencias para confirmar la variación.

Marcadores moleculares

Un marcador de ADN (ácido desoxirribonucleico) o marcador molecular, es un punto de referencia en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen. Diversas técnicas de biología molecular se encuentran disponibles para detectar variabilidad en la secuencia de ADN en determinada región del genoma del organismo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN y las hibridaciones son algunas de las prácticas que permiten obtener un número ilimitado de marcadores moleculares y cubrir la totalidad del genoma de un organismo, así como conocer la información genética que los organismos portan; funcionan como señaladores de diferentes regiones del ADN; son ampliamente utilizados en genética humana, vegetal, animal y microbiana; ayudan a evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre dos individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo (Picca *et al.* 2004; Valadez & Günter 2000).

Con los marcadores moleculares se pueden visualizar diferencias tangibles entre secuencias homólogas del ADN de un organismo. Estas diferencias resultan de cambios o arreglos entre los pares de bases que conforman este tipo de molécula, tales como translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones homólogas. Este tipo de marcadores detecta diferencias a nivel de ADN y tiene ventajas de ser dominante o codominante, de desarrollarse de forma estable y no está sujeto al medio ambiente en el que se desarrolla el organismo en estudio. Dichas características los hacen más útiles comparados con los análisis a nivel morfológico o de proteínas. Una cualidad muy atractiva de estas técnicas es que a la vez que se tiene un marcador apropiado se pueden hacer evaluaciones con material en cualquier estado de desarrollo de un organismo (Valadez & Günter 2000; Valadez *et al.* 2001).

La técnica más importante para la identificación de polimorfismos es la PCR (reacción en cadena de la polimerasa o polymerase chain reaction), la cual es el resultado de la amplificación de una secuencia de ADN en particular, que se logra con la ayuda oligonucleótidos, iniciadores o “primers”, una enzima ADN polimerasa termoestable una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un amortiguador apropiado y un termociclador (Valadez &

Günter 2000). La PCR es seguida de una separación electroforética de los fragmentos amplificados y la detección de bandas polimórficas gracias a la tinción con bromuro de etidio (Karp *et al.* 1996).

RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico o random amplification of polymorphic DNA)

La técnica RAPD se realiza con la ayuda de la reacción de PCR. El segmento de ADN a amplificar está compuesto por dos hebras (a y b); la secuencia de uno de los oligonucleótidos hibrida en uno de los extremos del segmento y es complementaria a la hebra a; el segundo oligonucleótido hibrida en el otro extremo del segmento y es complementario a la hebra b. Para que exista amplificación del fragmento es imprescindible que ambos oligonucleótidos hibriden en secuencias complementarias presentes en las hebras del ADN en estudio. La presencia de mutaciones en el sitio de hibridación de cualquiera de los oligonucleótidos impide la amplificación del fragmento (Picca *et al.* 2004).

La técnica RAPD se basa en la amplificación de ADN geonómico con iniciadores de secuencias arbitrarias de nucleótidos. Ha sido la técnica más usada en la PCR. Los oligonucleótidos iniciadores se diseñan sin tener en cuenta información de la secuencia genómica de la especie a analizar. Estos iniciadores o primers no contienen secuencias repetidas inversas internas (autocomplementarias) y se pegan en sitios distintos del genoma siempre y cuando existan sitios blancos para ello (Valadez & Günter 2000).

Normalmente se usa un sólo iniciador de 10 nucleótidos de longitud (más corto que el de una PCR común) que hibrida al azar con el ADN en estudio y está diseñado para que contenga un alto contenido en G+C (50-70 %) (Castrillo & Humber 2009). Si se usaran iniciadores de mayor longitud, la probabilidad de encontrar mayor complementariedad disminuiría y el número de fragmentos encontrados podría afectarse (Valadez *et al.* 2001). La secuencia del oligonucleótido es aleatoria, al igual que los sitios de hibridación, por lo que la secuencia amplificada es desconocida. El polimorfismo que se observa entre distintos individuos consiste en la presencia o ausencia de fragmentos de ADN amplificado. El número de fragmentos amplificados varía entre 1 y 10 pb por iniciador; cada fragmento corresponde a un locus donde en algunos individuos hay amplificación y

en otros no la hay; no se puede distinguir el homocigoto del heterocigoto y por lo tanto se detectan como marcadores dominantes (Picca *et al.* 2004).

Los productos se separan en un gel de agarosa con la ayuda de corriente eléctrica, después se tiñen y gracias a estos pasos es posible visualizar el ADN amplificado. Las bandas visualizadas de diferente peso molecular representan diferentes *loci* (Williams *et al.* 1990; Becerra & Paredes 2000; Valadez & Günter 2000). Los RAPD pueden ser de gran utilidad para establecer diferencias intraespecíficas (Valadez *et al.* 2001); también representan gran potencial en el mapeo de genes, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica y en el estudio de la variación genética en poblaciones altamente emparentadas. Es un punto de partida relativamente sencillo y económico para emprender estudios de mayor amplitud (Becerra & Paredes 2000; Valadez & Günter 2000).

Una desventaja de la técnica RAPD es la poca reproducibilidad que se puede tener con ella; si ésta se quiere mantener, es necesario optimizar las concentraciones de ADN, MgCl₂, los iniciadores y los dNTPs, así como la clase y fuente de ADN polimerasa y el uso del termociclador, ya que cualquier cambio en la polimerasa o el termociclador puede afectar los patrones de bandeo; cuando éstos no sean reproducibles, aún cuando se tomen en cuenta las precauciones necesarias, no pueden ser publicados (Valadez & Günter 2000).

La técnica RAPD ha sido usada para asociar patrones específicos e índices de patogenicidad mediante comparación del número y tamaño de fragmentos generados entre individuos usando secuencias sencillas de iniciadores (Hodge *et al.* 1995; Soll, 2000).

ITS (espaciador interno transcrito o internal transcriber spacer)

Los genes del ADN ribosomal (rADN) en los organismos eucariontes generalmente existen como elementos en bloques repetidos. Cada unidad repetida se compone de secuencias altamente conservadas de una longitud cercana a 6 Kb, que contiene además una pequeña región espaciadora altamente variable (ITS por sus siglas en inglés) utilizada para estudios filogenéticos y taxonómicos. Los módulos repetidos de rADN pueden ocurrir en uno o varios cromosomas y el número de copias varían de acuerdo al genoma. La ocurrencia de estas múltiples copias de rADN

abre la posibilidad de mayores regiones polimórficas intraespecíficas (Avisé 1994). Pese a que los ITS se encuentran en todos los organismos eucariotas, éstos se han estudiado más ampliamente en hongos; al respecto, White *et al.* (1990) diseñaron y describieron iniciadores específicos para amplificar las regiones ITS 1 y 2 y se han diseñado iniciadores universales que amplifican estas zonas genéticamente conservadas y con ello se establece el nivel de diversidad.

Parte del genoma nuclear en hongos y otros eucariontes es el rADN que codifica para el componente del ARN ribosomal (rARN); los genes rADN aparecen repetidamente en forma de tándem (dispuestas en forma seriada) entre 100 y 200 copias; cada unidad genética de rADN tiene una copia del 28S, 18S y 5.8 del rARN y a su vez están separados por una región ITS (1 y 2) (Figura 1.3) (Farooq & Azam 2002). La región entre cada unidad genética es el espaciador intergenético no transcrito (IGS) el cual comúnmente contiene el rARN 5S transcrito separadamente. Las regiones 18S, 5.8S y 28S están más conservadas en comparación con las regiones ITS e IGS y por ello son utilizadas para estudiar relaciones en los niveles superiores de jerarquía taxonómica. En contraste, la variabilidad en las regiones ITS e IGS ha sido usada para reconocimientos de especies en un mismo género y de subespecies en una población respectivamente. Dado que las regiones 18S y 28S son muy conservadas entre organismos con parentesco lejano y sus secuencias han sido determinadas de diferentes eucariontes, los iniciadores complementarios para las secciones de esas regiones son usados para amplificar y obtener las regiones polimórficas ITS e IGS para análisis (White *et al.* 1990; Castrillo & Humber 2009; Farooq & Azam 2002).

La región ITS es particularmente usada para estudios de caracterización molecular de hongos por cuatro principales razones (White *et al.* 1990):

- a. Es relativamente pequeña (500-800 pb) y puede ser fácilmente amplificada por PCR usando pares de iniciadores universales que son complementarios a las regiones conservadas con los genes rARN.
- b. La naturaleza de multicopia del rADN repite con facilidad marcadores de la región ITS para amplificar por PCR el tamaño de muestra de ADN diluido o altamente degradado.
- c. La región ITS puede ser altamente variable entre especies morfológicamente distintas, lo que permite que los ITS generados por restricción de RFLP (polimorfismos en la longitud de

los fragmentos de restricción o restriction fragment length polymorphism) puedan ser usados para estimar distancias genéticas y proveer caracteres de sistemática y análisis poligénicos.

- d. La generación por PCR de ITS específicos por especie puede ser utilizada fácilmente sin la necesidad de producir una biblioteca cromosómica e investigar si tiene secuencias de regiones ITS para desarrollar pruebas específicas a especies, porque las secuencias ocurren en múltiples copias y tienden a ser similares y variar entre especies de hongos.

Los fragmentos amplificados son analizados ya sea directamente en geles de agarosa, cortados con endonucleasas de restricción (los fragmentos resultantes se corren en geles de agarosa, análisis de restricción de rADN amplificado, ARDRA por sus siglas en inglés) o secuenciado para diferenciación a nivel de los pares de bases. Los polimorfismos ITS e IGS han sido usados para observar la diversidad intra e interespecífica en hongos y para desarrollar iniciadores específicos para una especie (Castrillo & Humber 2009). Los ITS han sido usados con mucho éxito en el análisis filogenético de hongos (Bruns *et al.* 1991) y también pueden ser usados para detectar polimorfismos entre diferentes aislamientos de una misma especie.

Pese a que es una técnica muy usada, no existe mucha información sobre los principios de uso de los ITS. Como ya se mencionó, la técnica puede ser realizada como un simple procedimiento de PCR amplificando la región ITS o bien complementando con secuenciación, la cual es la determinación precisa de los nucleótidos presentes en una muestra de ADN. La secuenciación es uno de los caminos más seguros para detectar incluso pequeñas diferencias en la región ITS (Guzmán *et al.* 2008). Regiones codificadoras y no codificadoras pueden ser secuenciadas para resolver cuestiones taxonómicas (Castrillo & Humber 2009). Los ITS solamente proporcionan información de la región del gen del ADN ribosomal (rADN) (Hsiang & Wu. 2000).

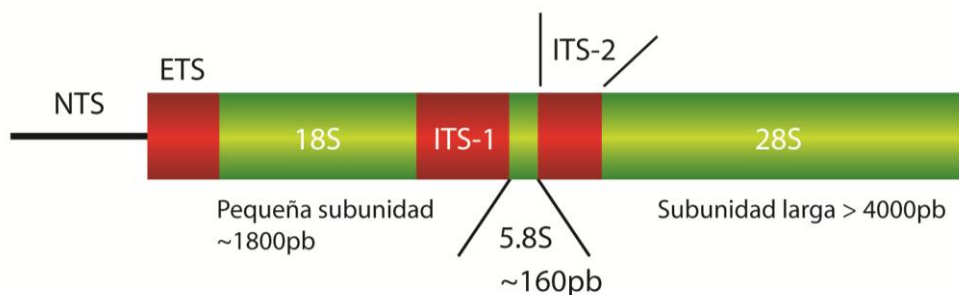


Figura 1.3. Partes de una región ITS. Dibujo elaborado por David A. Gutierrez Castillo

SSR (secuencias simples repetidas o simple sequence repeat)

También conocidos como microsatélites, los SSR consisten en secuencias de ADN cortas de 2-10 pares de bases repetidas y dispuestas en tándem a lo largo del genoma repitiendo mono-, di-, tri-, tetra- y penta-nucleótidos (Mittal & Dubey 2009). Un locus satelital típicamente varía en longitud entre cinco y 40 repeticiones aunque cadenas más largas de repeticiones son posibles (Selkoe & Toonen 2006). Estas secuencias se han encontrado en la mayoría de los organismos eucariotas estudiados, lo que permite la obtención de patrones de bandeo individuales y específicos para cada organismo cuando se analiza su genoma. Son secuencias muy variables en el número de las unidades que las integran, lo cual las hace útiles para la búsqueda de polimorfismos. La técnica SSR incluye iniciadores de secuencias complementarias a microsatélites específicos. Los productos obtenidos después de la reacción se usan para la diferenciación entre individuos (Valadez & Günter 2000).

Los SSR fueron identificados por primera vez en genomas de humanos y pese a que no se han reportado funciones claras para estas secuencias en los organismos, se les ha atribuido un papel importante en el proceso de evolución (Aranguren-Méndez *et al.* 2005). Los microsatélites ofrecen la ventaja de que son abundantes y están distribuidos en el genoma, con lo cual se puede detectar una mayor variación en regiones específicas para un locus particular y obtener huellas de diferente longitud (DNA fingerprints). Existen dos tipos de microsatélites MP-PCR (Microsatellite iniciador-PCR), donde se utilizan iniciadores como (GACA)₄ y (GATA)₄ y AMP-PCR (Anchored Microsatellite iniciador-PCR), que es una variante de la MP-PCR y además de los iniciadores de microsatélites, requieren de una o dos bases nitrogenadas denominadas anclas, lo que los hace más específicos que los MP-PCR; además de seleccionar una región que corresponde al microsatélite, se deben complementar con las bases adicionales, provocando que la especificidad de los seleccionados aumente de acuerdo al número de bases que conformen el ancla (Valadez *et al.* 2001).

Los microsatélites son muy atractivos para los genetistas, pues combinan varias ventajas como son su codominancia, multialelismo y su alta heterocigocidad (Mittal & Dubey 2009). El alto nivel de polimorfismo que detectan permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Además de ser altamente polimórficos, los microsatélites requieren

cantidades mínimas de ADN, equivalentes a las que se usan en RAPD. Las condiciones de amplificación y de reacción son especie-específicas y la variación en el largo de los productos amplificados mediante PCR es función del número de unidades repetidas. En general, los resultados de la amplificación de microsatélites ha demostrado ser más variable que las isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD (Becerra & Paredes 2000). Para su amplificación se usan iniciadores encontrados en las regiones laterales de locus SSR específicos; estos iniciadores permiten la amplificación del locus microsatelital completo. Los productos de PCR resultantes pueden variar en tamaño dependiendo del número de unidades de ADN repetidas en el o los alelo(s) microsatelital(es) presente(s) y pueden ser usados para detectar los altos niveles de longitud polimórfica existente como resultado de la variación en el número de unidades repetidas tándem cortas; estos productos de PCR amplificados son separados en geles de agarosa y visualizados en un transiluminador con luz ultravioleta (Mittal & Dubey 2009). Un dato importante de los SSR es que se puede usar ADN conservado por mucho tiempo o degradado por el hecho de que los SSR son cortos en longitud; además, el hecho de realizar las pruebas con iniciadores específicos para una especie resulta una ventaja cuando se trabaja con muestras contaminadas o bien con organismos simbioses. (Selkoe & Toonen 2006).

Los microsatélites pueden aplicarse en análisis genéticos, mapeo genético y etiquetado de genes, estudios filogenéticos, etiquetado de secuencias microsatelitales y marcadores microsatelitales de cloroplastos (Mittal & Dubey 2009). Así como los RAPD, la técnica SSR permite amplificar de forma aleatoria aquellas zonas en las que los iniciadores hibridan con el ADN molde a lo largo de todo el genoma de un individuo (Loxdale & Lushai, 1998; Soll 2000).

Endosimbiosis

Definición de simbiosis

La definición de simbiosis comprende dos aspectos, aunque ninguna es completamente aceptada: 1. Es una asociación y 2. Simbiosis es un mutualismo persistente (Douglas 2010).

El término simbiosis fue acuñado 1879 por Heinrich Anton de Bary, un micólogo alemán; él definió la simbiosis como “la vida en conjunto entre organismos diferentes”. En este sentido estricto, simbiosis incluye todos los tipos de relaciones biológicas entre especies (mutualismo, parasitismo, comensalismo, amensalismo) (Grube & Berg 2009). La definición de simbiosis actualmente aceptada es “una asociación entre diferentes especies en la cual todos los organismos participantes tienen un beneficio”. Los miembros de la asociación deben estar en contacto permanente para que se considere que es una simbiosis (Moran 2006; Douglas 2010).

Significado biológico de la simbiosis

La simbiosis es biológicamente importante porque está distribuida y domina la biota de muchos hábitats (Douglas 2010). Según Woyke *et al.* (2006), la simbiosis tiene un papel importante en la evolución y la diversidad de organismos eucarióticos. Es curioso como recientemente ha habido un reconocimiento emergente de que la mayoría de los organismos eucarióticos están asociados íntimamente a una comunidad compleja de microorganismos benéficos esenciales para su desarrollo e interacciones con el ambiente. Este renacimiento en la investigación sobre la simbiosis está relacionado con el desarrollo de técnicas en biología molecular, que permiten su estudio aun cuando no se tenga el cultivo de los microorganismos simbiotes. Los análisis metagenómicos son la fuente principal para esta evaluación de la organización de una comunidad microbiana natural así como su metabolismo. Las simbiosis han generado nuevas características en las especies y la importancia de esto radica en que son producto de una transferencia lateral que se lleva a cabo entre organismos de taxones diferentes. El hecho de que adquieran una nueva característica implica que tendrán una nueva función. La

simbiosis es fuente de nuevas capacidades metabólicas, protección de antagonistas y de movimiento. Un ejemplo es la degradación de celulosa por bacterias protistas en algunos insectos (Douglas 2010).

La simbiosis propicia el éxito ecológico de plantas y animales, ya que algunos de ellos viven en una relación específica y co-evolutiva con microorganismos (bacterias y protistas) y dichas asociaciones tienen un impacto profundo en la evolución del taxón y a veces en todo el ecosistema. Su hábitat es extenso y abundante. La depredación, la competencia y la escasez de alimento han provocado que los organismos formen alianzas para aumentar las aptitudes y el éxito ecológico y que dicha alianza se mantenga no depende de que el factor negativo permanezca (por ejemplo carencia de alimento). El beneficio obtenido varía dependiendo de la naturaleza de los participantes y de las condiciones ambientales. En su mayoría, las asociaciones se dan sólo cuando todos los integrantes son beneficiados (Douglas 2010; Moran 2006).

Los organismos involucrados en una simbiosis pueden estar suficientemente fusionados de forma tal que no puedan vivir separados o que no sea posible reconocerlos como unidades individuales. La simbiosis varía en los mecanismos para lograr y mantener la asociación, en la función del microorganismo, en la biología de hospedero, en la historia evolutiva de la relación y en las características genómicas del microorganismo. Algunas simbiosis son estables y restringen la evolución del linaje del hospedero. Otras son dinámicas, con genomas simbiotes que actúan como portales para importar nuevos genes que modifican la ecología del hospedero; por lo tanto la simbiosis puede ser obligada por el hospedero, por el simbiote por ambos o por ninguno (Moran 2006).

Definición de endosimbiosis

La endosimbiosis es un tipo específico de simbiosis en la que un integrante (comúnmente un microorganismo) vive dentro de un hospedero y representa el contacto más íntimo entre organismos que interactúan; ejemplo de endosimbiontes son las mitocondrias y cloroplastos, que extendieron su hábitat para sobrevivir (Wernegreen 2004). Existen dos rutas para la adquisición lateral de características nuevas, ya sea por transferencia horizontal de genes o bien, por simbiosis. Cuando un organismo completo es adquirido por simbiosis (endosimbiosis), las

características obtenidas pueden ser genética y bioquímicamente más complejas que las adquiridas por la transferencia horizontal de genes (Douglas 2010).

La endosimbiosis ha sido poco estudiada, debido a que los organismos son difíciles de manejar a nivel laboratorio dado que en muchos casos necesitan de su simbiote o del hospedero para desarrollarse puesto que son dependientes obligados de otras especies. La biología molecular ha sido pieza clave en el proceso del estudio de la simbiosis (Douglas 2010).

Relación simbiótica (endosimbiosis) entre hongos y bacterias

La investigación de interacciones hongo-bacteria es un campo nuevo que aplica las herramientas de la ecología microbiana moderna (Bonilla-Rosso *et al.* 2008) Los estudios se habían centrado previamente en la micorrizósfera, pero desde la década anterior, el estudio de bacterias en nichos fúngicos se ha evaluado más (Grube & Berg 2009).

Los endosimbiontes bacterianos raramente se encuentran en hongos. Las excepciones de estos reportes se presentan en el Cuadro 1.1 (Lumini *et al.* 2006). Los efectos de estos endosimbiontes bacterianos sobre la biología de sus anfitriones fúngicos se entienden relativamente bien, sin embargo, la evolución de las bacterias no se ha explorado completamente (Bianciotto *et al.* 2003). Según Grube & Berg (2009), las asociaciones simbióticas están distribuidas en los Basidiomycota, Glomeromycota y Zygomycota pero raramente se pueden localizar en los Ascomycota.

Otros estudios han revelado que bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa* interactúan y parasitan las hifas, pero no la forma de levadura del hongo patógeno de humanos *Candida albicans*. Esta interacción hongo-bacteria también involucra una conversación, sin embargo, es en una sola dirección, (además de que dicha interacción es extracelular) el hongo percibe y responde a las moléculas sensibles de lactona homoserina bacterial y esta inhibe la diferenciación de las hifas (Valdivia & Heitman 2007).

Cuadro 1.1. Asociaciones hongo-bacteria y sus características biológicas. Tomado de Lumini *et al.* (2006).

Asociaciones Hongo-Bacteria					
Características	<i>Gigaspora margarita</i> /Ca. G. gigasporarum	<i>Rhizopus microsporus</i> / <i>Burkholderia</i> sp	<i>Rhizopus microsporus</i> / <i>Burkholderia</i> sp	<i>Laccaria bicolor</i> / <i>Paenibacillus</i> sp	<i>Tuber borchii</i> / CFB
Hongo asociado	Glomeromycota	Zygomycota	Glomeromycota	Basidiomycota	Ascomycota
Aislamiento del hongo	BEG34	BEG34	BEG34	S238N	ATCC 96540
Estructura del hongo donde se localiza la bacteria	Micelio, esporas y células auxiliares	Micelio	Esporas	Micelio	Micelio, Ascocarpos
Bacteria asociada	β -proteobacteria	β -proteobacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteria	Bacteroidetes
Estatus de la bacteria					
Vida libre	No	nd	Si	nd	Nd
Cultivable	No	Si	Si	Si	No
Tipo de asociación	Permanente	Cíclico	Cíclico	nd	nd
Habilidades metabólicas de la asociación	nd	Producción de Rizoxina	Mayor actividad fotosintética, reducción de acetileno (Fijación de N ₂ ?)	nd	nd

nd: no determinado

CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

Ca. G: *gigasporarum*, *Candidatus Glomeribacter gigasporarum*

Pseudomonas

Las especies del género *Pseudomonas* son organismos ubicuos, bacterias gram negativas que se encuadran dentro del grupo Y de las proteobacterias, caracterizado por una elevada versatilidad metabólica, que utilizan una amplia gama de componentes orgánicos y ocupan una importante posición en la biosfera; sus miembros son tanto saprofitos como patógenos de plantas, animales y humanos. El género descrito por Migula en 1894 se ha sometido a revisiones taxonómicas repetidas y las más recientes técnicas de hibridación ADN-ARN han identificado o reconocido cinco grupos de similaridad con base en el rARN; a la fecha sólo el grupo 1 es considerado el verdadero *Pseudomonas*, mientras diferentes designaciones han sido propuestas para los miembros de los otros grupos (Kozo 1995; Scarpellini *et al.* 2004).

Son habitantes de las superficies de suelo, agua y plantas. Muchas *Pseudomonas* viven en una relación de tipo comensalista con las plantas utilizando los nutrientes exudados de las superficies de éstas y sobreviviendo al estrés ambiental ocupando sitios protegidos gracias a la arquitectura de las plantas. Estas especies comensalistas pueden tener efectos profundos sobre las plantas por la supresión de plagas, así como ayudar a mejorar el acceso a nutrientes clave, alterar los procesos fisiológicos o degradar contaminantes ambientales. Las *Pseudomonas* tienen una capacidad excepcional de producir una amplia variedad de metabolitos, incluyendo antibióticos que son tóxicos para los patógenos de las plantas. La producción de antibióticos de *Pseudomonas* asociadas con plantas mejora la aptitud de producir cepas y suprimir patógenos, que de otra forma pondrían en peligro la salud de la planta. Ciertas cepas productoras de antibióticos de *Pseudomonas* funcionan como agentes de control biológico; su capacidad de proteger a las plantas de sus enfermedades las distingue como microorganismos con inmensos efectos en la productividad agrícola (Paulsen *et al.* 2005).

Identificación bacteriana por secuenciación ARNr 16S

Tradicionalmente los organismos fueron clasificados de acuerdo a sus similitudes y diferencias en las características fenotípicas; con respecto a los eucariontes y procariontes, en su momento éstos fueron clasificados en varios reinos, filos, clases, órdenes, familias, géneros y especies. Sin embargo, el objetivo de la clasificación taxonómica por ese método era complicado debido a las variaciones en las características fenotípicas. Hace tres décadas, Carl Woese y colaboradores iniciaron el estudio y secuenciación del gen ARNr 16S en bacterias. Gracias al uso de esas secuencias, un gran número de géneros y especies de bacterias han sido reclasificados e incluso las bacterias no cultivables han podido ser clasificadas ([Woo et al. 2008](#)). La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias ([Rodicio & Mendoza 2004](#)).

El uso de las secuencias del gen ARNr 16S como marcador genético para estudiar la filogenia y taxonomía bacteriana se debe a las siguientes razones ([Patel 2001](#); [Rodicio & Mendoza 2004](#); [Janda & Abbott 2007](#)):

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en casi todas las bacterias actualmente clasificadas y a menudo se encuentra como operones o familias multigenes, por lo que representa una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de tal forma que las variaciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de forma suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr SSU (subunidad pequeña o small subunit) contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar tanto los organismos más alejados como los más próximos.
4. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1500 pb) disminuye las fluctuaciones estadísticas.

5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Debido a que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos extensas y que están en continuo crecimiento.

Características del gen ARNr 16S

Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1,500 pb, codificado por el gen *rrs* (Figura 1.4), también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). En eucariotas, el ARNr 18S es la macromolécula equivalente. Dado que los ARNr 16S y 18S proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas, el acrónimo ARNr SSU se utiliza para ambos. Los ARNr SSU se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas. El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (Rodicio & Mendoza 2004).

El número de copias del operón ribosómico por genoma bacteriano varía considerablemente, de 1 a 15, siendo relativamente constante a nivel de especie, género e incluso familia. Entre las copias de los ARNr 16S codificadas por un mismo genoma se ha detectado un cierto grado de heterogeneidad (denominada microheterogeneidad). En la mayor parte de los casos, todas las copias del ADNr 16S de un organismo son idénticas o casi idénticas (Marchandin *et al.* 2003; Rodicio & Mendoza 2004).

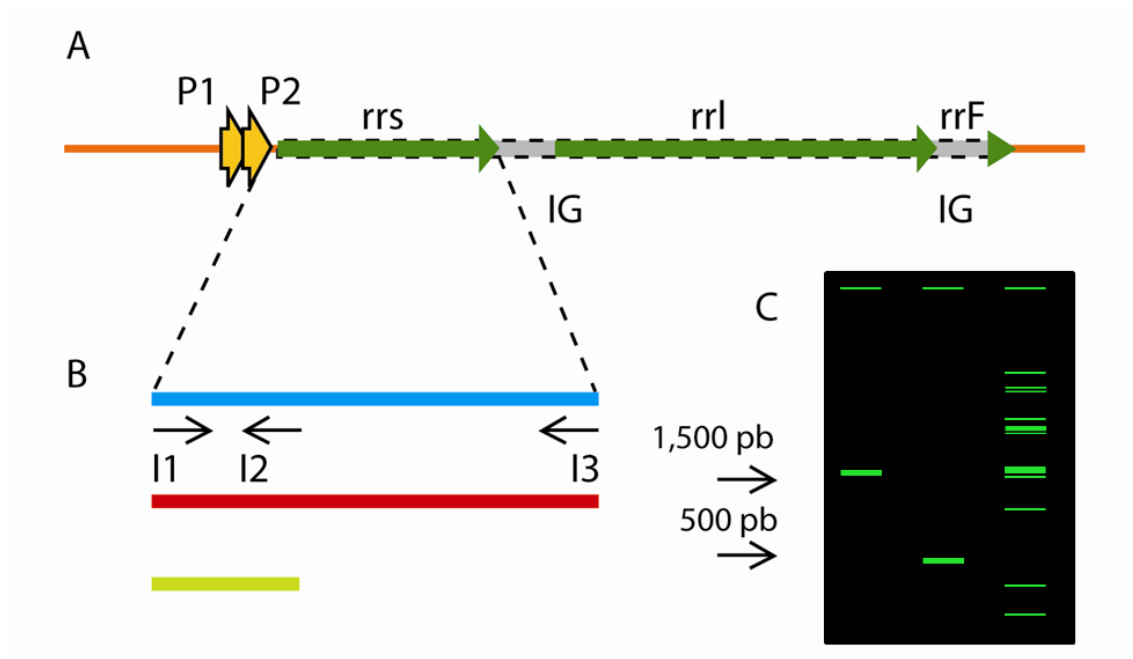


Figura 1.4. El operón ribosómico. A) Representación del operón, se muestran los genes estructurales de los tres tipos de ARNr (*rrs*, *rrl* y *rrf*), los promotores P1 y P2 y las regiones intergénicas (IG). B) Modo de amplificación del gen *rrs* (ADNr 16S). Se indica la posición de los iniciadores I1 (Forward), I2 e I3 (reverse) utilizados para la amplificación (y posterior secuenciación) del gen completo (I1-I3; amplicón de 1,500 pb, aproximadamente) o de un fragmento menor (I1-I2; 500 pb correspondientes al extremo 5' del gen; C) Visualización de ambos fragmentos por electroforesis en gel de agarosa. Tomado de [Rodicio & Mendoza 2004](#). Dibujo elaborado por David A. Gutierrez Castillo.

Bibliografía

- Aranguren-Méndez JJ, Román-Bravo R, Isea W, Villasmil Y & Jordana J**, 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal **13**(1): 30-42.
- Avise JC**, 1994. Molecular markers. Chapman and Hall. New York.
- Becerra VV & Paredes CM**, 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica **60** (3).
- Bianciotto V, Lumini E, Bonfante P & Vandamme P**, 2003. '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. International Journal Systematic and Evolucionary Microbiology **53**:121-124.
- Bonilla-Rosso G, Souza V, Eguiarte LE**, 2008. Metagenómica, Genómica y Ecología Molecular: la Nueva Ecología en el Bicentenario de Darwin. Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México **11** (1): 41-51.
- Bruns TD, White TJ, Taylor JW**. 1991. Fungal molecular systematics. Annual Reviews Ecology System **22**: 525-564.
- Castrillo LA, Humber RA**. 2009. Molecular methods for identification and diagnosis of fungi. In: Stock SP, Vanderberg J, Boemare N (eds), Insect pathogens. Molecular approaches and techniques. CABI. 50 -70.
- Clark BM**, 1968. Epidemiology of phycomycosis, In Systemic mycoses, a Ciba symposium. J.A. Churchill Ltd., London pp 179-192.
- Dromph MK, Eilenberg J & Esbjerg P**, 2001. Natural occurrence of Entomophthoralean fungi pathogenic to collembolans. Journal Invertebrate Pathology **78**:226-231.
- Douglas AE**, 2010. The Symbiotic Habit. Princeton University Press. pp1-23.
- Farooq S & Azam F**, 2002. Molecular Markers in Plant Breeding-I: Concepts and characterization. Pakistan Journal of Biological Sciences **5** (10): 1135-1140, 2002.

- Feng MG, Johnson BJ & Halbert ES**, 1991. Natural control of cereal aphids (Homoptera: Aphididae) by entomopathogenic fungi (Zygomycetes: Entomophthorales) and parasitoids (Hymenoptera: Braconidae and Encyrtidae) on irrigated spring wheat in southwestern Idaho. *Environmental Entomology* **20** (6): 1699-1710.
- Freimoser M F, Screen S, Gang H, St. Leger R**, 2003. EST analysis of genes expressed by the zygomycete pathogen *Conidiobolus coronatus* during growth on insect cuticle. *Microbiology* **149**: 1893-1900.
- Grube M & Berg G**, 2009. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis . *Fungal Biology Review* **23**: 72-85.
- Guzmán G & Alcozer-Gómez**, 1972. Un hongo de importancia biológica en México, *Entomophthora coronata*. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*: **6**:5-7.
- Guzmán FA, Atkins SD, Alderson PG and Pell JK**, 2008. Development of species-specific diagnostic primers for *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii*; two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Mycological Research* **112**: 1227-1240.
- Hartmann GC, Wasti SS**, 1974. Infection of the gypsy moth, *Porthetria dispar* with the entomogenous fungus *Conidiobolus coronatus*. *Entomophaga* **19**:353-360.
- Hodge KT, Sawyer AJ, Humber RA**, 1995. RAPD-PCR for identification of *Zoophthora radicans* isolates in biological control of the potato leafhopper. *Journal of Invertebrate Pathology* **65**: 1-9.
- Hsiang T & Wu C**, 2000. Genetic relationships of pathogenic *Typhula* species assessed by RAPD, ITS-RFLP and ITS sequencing. *Mycological Research* **104**: 16-22.
- Humber RA**, 1989. Synopsis of a revised classification for the Entomophthorales(Zygomycotina). *Mycotaxon* **34** (2): 441-460.
- Inglod CT**, 1992. *Conidiobolus* as a genus to explore. *The Mycologist* **6**: 82-83.
- Janda JM & Abbott SL**, 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology* **45**(9): 2761-2764.
- Karp A, Seberg O & Buiatti M**, 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany* **78**, 143-149.

- Keller S**, 1987. Arthropod-pathogenic Entomophthorales of Switzerland. I *Conidiobolus*, *Entomophaga* and *Entomophthora*. *Sydowia* **40**: 122-167.
- King DS**, 1983. Entomophthorales In: Howard, H.D, Fungi pathogens for humans and animals. Marcel Dekker. Inc. New York pp:61-72.
- Kozo O**, 1995. Comparative ribosomal protein sequence analyses of a phylogenetically defined genus, *Pseudomonas*, and its relatives. *International Journal of Systematic bacteriology* **45** (2): 268–273.
- Lumini E, Ghignone S, Bianciotto V & Bonfante P**, 2006. Endobacteria or bacterial endosymbionts? To be or not to be. *New Phytologist* **170** (2) 205–208.
- Loxdale HD & Lushai G**, 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research* **88**:577–600.
- Marchandin H, Teyssier C, Simeon de Buochberg M, Jean-Pierre H, Carriere C, Jumas-Bilak E**, 2003. Intra-chromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology* **149**: 1493-501.
- Mittal N & Dubey AK**, 2009. Microsatellite marker- a new practice of ADN based markers in molecular genetics. *Pharmacognosy Review* **3**(6): 235-246.
- Moran NA**, 2006. Symbiosis. *Current Biology* **16** (20): R866-R871.
- O’connor, L y Keil, C**. 2005. Mushroom host influence on *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) life cycle. *Journal of Economic Entomology* **98** (2): 342-319.
- Paulsen IT, et al.**, 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology* **23**: 873 – 878.
- Papierok B, Rafanomezantsoa- Randriambololona BN, Ziat N**, 1993. Nouvelles données sur l’écologie et le comportement entomopathogène experimental de 60 l’entomophthorale *Conidiobolus coronatus* (Zygomycetes). *Entomophaga* **38**: 299-312.
- Patel JB**, 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis* **6**: 313–321.
- Picca A, Helguera M, Salomón N & Carrera A**, 2004. Marcadores Moleculares In: Echenique V, Rubinstein C & Mroginski L. *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal*. Ediciones INTA pp 61-68.

- Prasertphon S**, 1963. Conidial formation in *Entomophthora coronata* (Costantin) Kevorkian. *Journal Insect Pathology* **5**: 318-335.
- Reumadiere G & Latgé JP**, 1985. Importancia de los hongos patógenos de insectos (especialmente Afididae y Cercopidae) en Méjico y perspectivas de uso. *Boletín de Servicio de Plagas* **11**:217-225.
- Ribes AJ, Vanover-Sams LC, Baker JD**, 2000. Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews* **13**(2):236-301.
- Rodicio M, Mendoza MC**, 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica* **22**: 238-45.
- Scarpellini M, Franzetti L, Galli A**, 2004. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiology Letters* **236**: 257-260.
- Segura JJ, González K, Berrocal J, Marin J**, 1981. Rhinoentomophthoromycosis report of the first two cases observed in Costa Rica (Central America), and review of the literature. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* **30**(5): 1078-1084.
- Sajap SA, Atim BA, Husin H & Wahab AY**, 1997 Isolation of *Conidiobolus coronatus* (Zygomycetes: Entomophthorales) from soil and its effects on *Coptotermes curvignatus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Sociobiology* **30** (3):257-262.
- Selkoe KA & Toonen RJ**. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, **9**: 615-629.
- Soll RD**, 2000. The ins and outs of ADN fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* **13** (2): 332-370.
- Tymon AM, Shah PA, Pell JK**, 2004. PCR-based molecular discrimination of *Pandora neoaphidis* isolates from related entomopathogenic fungi and development of species-specific diagnostic primers. *Mycological Research* **108**: 419-433.
- Valadez E & Günter K**, 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Mundi Prensa. Pp 41-86.
- Valadez EM, Günter K, Ramser J, Hüttel B, Rublo IA**, 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Revista Fitotecnia Mexicana*, **24**(1):103-120.

- Valdivia RH & Heitman J**, 2007. Endosymbiosis: the evil within. *Current Biology* **17** (11):R408-R410
- Valle ACF, Wanke B, Lazéra MD, Monteiro PCF & Viegas ML**. 2001. Entomophthoromycosis by *Conidiobolus coronatus* report of a case successfully treated with combination of itraconazole and fluconazole. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **43** (4).
- Vedder PJC**, 1996. Cultivo moderno del Champiñón. Mundi Prensa. España. p367
- Voigt K, Cigelnik E, O'Donnell K**, 1999. Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Journal of Clinical Microbiology* **7**:3957-3964.
- Wernegreen JJ**, 2004. Endosymbiosis: Lessons in Conflict Resolution. *PLoS Biology* **2** (3): 307-311.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J**, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.), *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- White MM, James TY, O'Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y, Sugiyama J**, 2006. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia* **98**(6): 872-884.
- Wieloch W, Sacharczuk M, Mieczysława I, Bogu's, Kazimierz J**, 2004. A study for minisatellitic markers of *Conidiobolus coronatus* pathogenicity to *Galleria mellonella* larvae. *Journal Invertebrate Pathology* **85**: 63-69
- Williams KG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalsky JA & Tingey SV**. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**:6531-6533.
- Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY**, 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* **14**: 908-34.
- Woyke et al.**, 2006. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* **443**: 950-955.

Capítulo 2

Variación genética de aislamientos de *Conidiobolus coronatus* de diferentes hospedantes

Resumen

El hongo *Conidiobolus coronatus* es patógeno de insectos, mamíferos (incluyendo humanos), e incluso se ha encontrado en forma saprófita. Existe poca información que permita la identificación adecuada de este patógeno y la diferenciación entre aislamientos provenientes de diferentes hospedantes. Nosotros reportamos por primera vez la diversidad genética entre aislamientos de *C. coronatus* provenientes de diferentes hospedantes (insecto, suelo y lesiones humanas) y zonas geográficas. Los primeros análisis fueron pruebas de RAPD y SSR sobre seis aislamientos de *C. coronatus*. El nivel de polimorfismo detectado con 16 iniciadores evidenció altos niveles de variación intraespecífica entre los aislamientos; además se encontró una relación entre variación genética y hospedante, pero no así para el origen geográfico. El segundo análisis fue secuenciación de la región ITS de 11 aislamientos de *C. coronatus*. El tamaño del producto de la amplificación de la región ITS fue de 690 pb (incluyendo espacios) para todos los aislamientos. Los resultados del análisis RAPD y SSR se reafirmaron con los obtenidos por medio del análisis ITS; se obtuvo variación intraespecífica y una clara distancia genética entre aislamientos obtenidos de humanos y otras fuentes (insectos y suelo).

Palabras clave: Entomofitales, factor de virulencia, multihospedero, polimorfismo, variación intraespecífica.

Abstract

The fungi *Conidiobolus coronatus* is pathogen of insects, mammals (including human being), and it has been found even as a saprophytic, hence its range of hosts is rather wide. Little information for an adequate identification and differentiation between isolates of this pathogen coming from different hosts is available. Our work is the first report on genetic diversity between *C. coronatus* isolates from different hosts (insects, soil, and human wounds) and geographic zones. For our first analysis, we carried out RAPD and SSR tests on six isolates of *C. coronatus*. The level of polymorphism, detected by using 16 primers, made evident high levels of intraespecific variation between *C. coronatus* isolates. Also, we were able to determine a relation between genetic variability and host but not due to their geographical origin. Our second analysis consisted in tests on 11 isolates of *C. coronatus*, using ITS region sequenciation. These tests produced a size of 690 bp (gaps included) from all the isolates. Outcomes from the RAPD and SSR tests were herewith confirmed: intraespecific variation and a clear genetic distance between isolates taken from human beings and other sources (insects and soil) exists.

Key words: Entomophthorales, intraespecific variation, multihost, polymorphism, virulence factor.

Introducción

El hongo *Conidiobolus coronatus* (Zygomycetes: Entomophthoraceae) es un patógeno de insectos de diferentes órdenes: Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Isoptera y Diptera (Hartmann & Wasti 1974; Sajap *et al.* 1997); es saprófito habitante del suelo (Lowe *et al.* 1968; Papierok *et al.* 1993; Freimoiser *et al.* 2003) e incluso se le ha reportado como causante de micosis subcutánea en humanos (rinoentomofotoromicosis); invade la parte superficial del tracto respiratorio, la mucosa nasal y paranasal (Segura *et al.* 1981; Valle *et al.* 2001).

Pese a que *C. coronatus* es cosmopolita, el reporte de daño en humanos es raro. Esto sugiere que el organismo no es muy virulento para humanos y/o que existe algún factor hasta ahora desconocido que juega un papel importante en el mecanismo de infección (Ribes *et al.* 2000; Wieloch *et al.* 2004). Además, existe escasa información sobre *C. coronatus* y muchas incógnitas sobre su actividad patogénica. Por otro lado la rinoentomofotoromicosis es difícil de diagnosticar, aunado a que la identificación morfológica es complicada, por lo que cualquier dato que ayude a identificar la relación *C. coronatus*-hospedante será muy importante (Voigt *et al.* 1999; Viela *et al.* 2010).

Para identificar la variabilidad genética entre aislamientos de organismos colectados de diferentes hospedantes, se requiere el uso de técnicas moleculares (Karp *et al.* 1996) que ayuden a determinar la diversidad a nivel de género y de especie. Para esto se han usado principalmente cuatro técnicas moleculares en hongos: el análisis RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o restriction fragment length polymorphism), ITS (espaciador interno transcrito o internal transcriber spacer), RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico o random amplification of polymorphic DNA) y SSR (secuencias simples repetidas o simple sequence repeat), también llamados microsatélites (Becerra *et al.* 2007; Hsiang & Wu, 2000; Tymon *et al.* 2004). Diversos autores han estudiado la relación entre la variabilidad genética y el origen o la zona geográfica del huésped para Entomophthorales de los géneros *Entomophaga*, *Pandora*, *Zoophthora* y *Entomophthora* mediante RAPD y amplificando las regiones ITS (Hodge *et al.* 1995; Rohel *et al.* 1997; Sierotzki *et al.* 2000; Jensen & Eilenberg 2001; Nielsen *et al.* 2001); sin embargo, para *C. coronatus* no se han realizado estudios similares.

En la planta de producción de champiñones *Agaricus bisporus* Hongos Rioxal, ubicada en Veracruz, México, se detectó un brote epizoótico de *C. coronatus* sobre moscas de la especie *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae), la cual es considerada la principal plaga del champiñón (O'Connor & Keil 2005). El cultivo del champiñón se produce en naves cerradas (Vedder 1996) donde existen dípteros infectados por *C. coronatus* y los trabajadores conviven con ellos por periodos prolongados, lo que implica que se encuentran en contacto con las esporas del hongo, pero es de resaltar que, aún con estas condiciones de exposición al supuesto patógeno, no existen reportes de rinoentomofotoromicosis en plantas de producción champiñón.

Teniendo en cuenta lo anterior, así como los escasos reportes de daño de *C. coronatus* y que éstos se restringen a zonas de humedad y temperatura elevadas (Ribes *et al.* 2000), se consideró importante determinar si existen diferencias entre aislamientos de *C. coronatus* provenientes de diferentes fuentes y/o zonas geográficas, planteando esto como la hipótesis de este estudio, por lo que el objetivo de la presente investigación fue determinar el nivel de diversidad genética entre aislamientos de *C. coronatus* provenientes de humanos y otras fuentes.

Materiales y métodos

Aislamientos

En total se usaron 11 aislamientos de *C. coronatus* (Cuadro 2.1), de los cuales sólo seis fueron analizados con las técnicas RAPD y SSR; posteriormente se tuvo acceso a cinco aislamientos más de otra colección obteniéndose con lo que se obtuvo un total de 11 aislamientos, de éstos se amplificaron las regiones ITS 1 y 2 y región 5.8 (intrones ubicados entre los genes rADN 28S y 18S) para posteriormente realizar un análisis de sus secuencias. Como testigos negativos se usaron un aislamiento de *Zoophthora radicans* y uno de *Cercospora agavicola* (Cuadro 2.1). Los aislamientos se mantuvieron a temperatura ambiente y fueron preservados en agua destilada estéril. Para su desarrollo, fueron inoculados en agar dextrosa Sabouraud (SDA por sus siglas en inglés) a 25°C al igual que *Z. radicans*, mientras que *C. agavicola* fue cultivado en agar-agua 2% a 24°C. Para inducir la esporulación de *C. agavicola* se utilizó agar-agave (40g de hojas de agave hervidas por 10 min y mezcladas con 20 g de agar-agar/L de agua destilada) (Ayala *et al.* 2005).

Extracción de ADN

Se obtuvo micelio liofilizado de los 11 aislamientos de *C. coronatus*, siguiendo el método descrito por Guzmán *et al.* (2004). Se colocaron entre 30 y 40 mg de micelio liofilizado por cada aislamiento en un mortero estéril y frío para macerar la muestra con nitrógeno líquido. El ADN fue extraído mediante el método de CTAB modificado de Ahrens y Seemüller (1992). El macerado de cada aislamiento se colocó en un tubo Eppendorf con 400 µl de solución de lisis (Cloruro de sodio 0.4 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, PVP 1%) y fue mezclado con un vórtex para homogenizar la solución; enseguida se agregaron 50 µl de SDS 20%, 40 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 65°C durante una hora. Después de la incubación se agregaron 600 µl de solución CTAB 3% y se incubó nuevamente durante 45 min a 65°C. Posteriormente se adicionó un volumen de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó 10 min a 14 000 rpm, donde se formaron dos fases; la fase acuosa se colocó en un tubo Eppendorf con un volumen de isopropanol y se incubó a -20°C durante 60 min; al término de este tiempo se centrifugó a 14 000 rpm, 10 min. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla fue resuspendida en 50 µl de agua destilada estéril. La concentración y calidad del ADN fue estimada con un espectrofotómetro Perkin-Elmer® (BIO-10) a una absorbancia de 260 y 280 nm. El ADN se visualizó en un gel de agarosa al 1% en 1X de TBE (Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M) teñido con bromuro de etidio (0.5 µg ml⁻¹ por 10 min) y fotografiado con el fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®); para la extracción del ADN de *C. agavicola* se utilizó un cultivo monoespórico con mismo el método utilizado para los aislamientos de *C. coronatus*. En cuanto a la extracción del ADN de *Z. radicans*, se utilizó el kit UltraClean® Plant ADN Isolation (MO BIO) a partir de micelio y esporas del raspado del cultivo del hongo en cajas Petri.

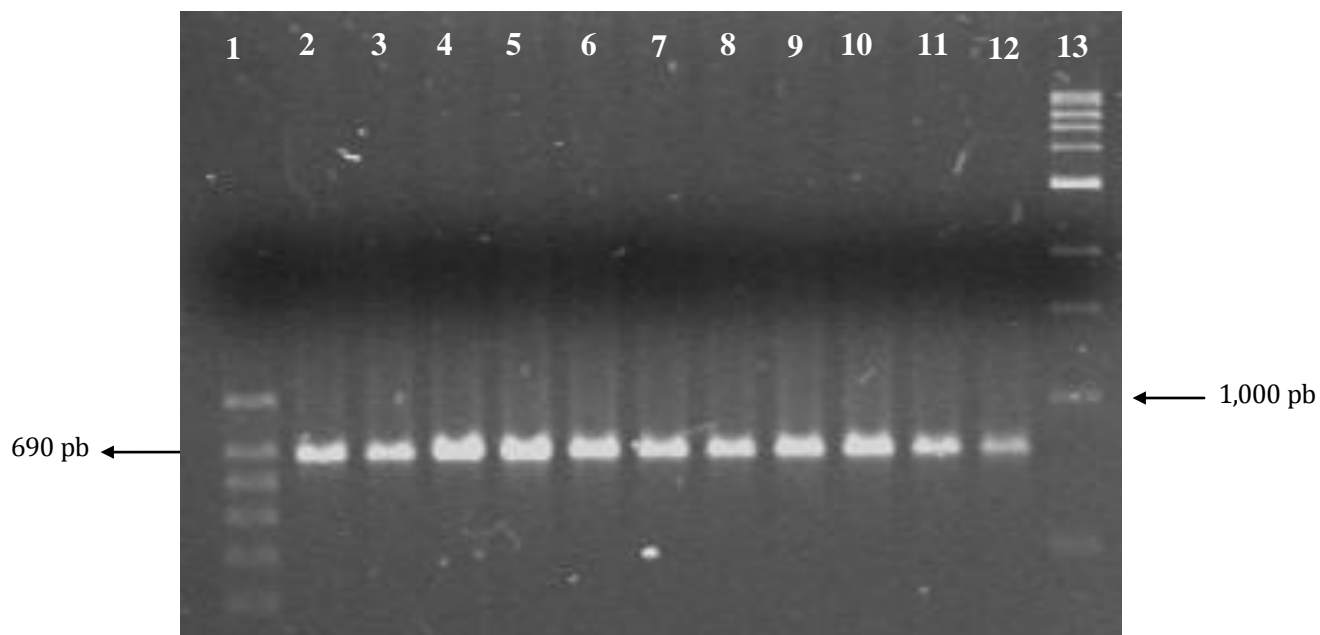


Figura 2.1. Productos de PCR con los iniciadores universales ITS 4 y 5 (White *et al.* 1990), en gel de agarosa al 1%; Carril 1) Marcador de 100 pb; Carril 2) aislamiento Lyco 1; Carril 3) aislamiento Lyco 4; Carril 4) aislamiento Lyco 5; Carril 5) ARSEF 512; Carril 6) ARSEF 1884; Carril 7) ATCC 32865; Carril 8) STAFFS 4:004; Carril 9) STAFFS 15:008; Carril 10) STAFFS 10:027; Carril 11) STAFFS 1:037; Carril 12) STAFFS 04:427; Carril 13) Marcador 1kb.

Cuadro 2.1. Aislamientos usados en el análisis RAPD, SSR e ITS.

Especie	Código Aislamiento	Hospedante	Sitio de Colección	No. Acceso NCBI (sólo región ITS)
<i>C. coronatus</i>	Lyco 1	<i>Lycoriella ingenua</i> (Diptera: Sciaridae) ^{a,b,c}	México, Planta Hongos Riojal	HQ602772
<i>C. coronatus</i>	Lyco 4	<i>Lycoriella ingenua</i> (Diptera: Sciaridae) ^{a,b,c}	México, Planta Hongos Riojal	HQ602773
<i>C. coronatus</i>	Lyco 5	<i>Lycoriella ingenua</i> (Diptera: Sciaridae) ^{a,b,c}	México, Planta Hongos Riojal	HQ602774
<i>C. coronatus</i>	ARSEF 512	<i>Nilaparvata lugens</i> (Hemiptera: Delphacidae) ^{a,b,c}	Malasia	HQ602775
<i>C. coronatus</i>	ARSEF 1884	<i>Mocis latipes</i> (Lepidoptera: Noctuidae) ^{a,b,c}	Brasil	HQ602776
<i>C. coronatus</i>	ATCC 32865	Humano ^{a,b,c}	Greer, USA	HQ602777
<i>C. coronatus</i>	STAFFS 4:004	Muestra de suelo de una plantación de pino ^{b,c}	Reino Unido	HQ602778
<i>C. coronatus</i>	STAFFS 15:008	Muestra de suelo de las orillas de un área de pastoreo ^{b,c}	Reino Unido	HQ602779
<i>C. coronatus</i>	STAFFS 10:027	Muestra de suelos de plantación de hoja ancha ^{b,c}	Reino Unido	HQ602780
<i>C. coronatus</i>	STAFFS 1:037	Muestra de suelos de una plantación de pino alerce (<i>Larix</i> sp) ^{b,c}	Reino Unido	HQ602781
<i>C. coronatus</i>	STAFFS 04:427	Muestra de suelos de una plantación de pino alerce (<i>Larix</i> sp) ^{b,c}	Reino Unido	HQ602782
<i>C. coronatus</i>	VPCI-126P	Humano ^{b,d}	India (Norte)	FN421422
<i>C. coronatus</i>	P1	Insecto ^{b,d}	Hungría	AJ345094
<i>C. coronatus</i>	AFTOL-ID 137	No fue aislado de humano ^{b,d}	Suecia	AY997041
<i>Rhizopus microsporus</i>	31994	----- ^{b,d}	Taiwán	AF115720
<i>Pandora neoaphidis</i>	ARSEF 835	<i>Hyperomyzus lactucae</i> (Hemiptera: Aphididae) ^{b,d}	Australia	AF543209
<i>Zoopthora radicans</i>	Z	<i>Plutella xylostella</i> (Lepidoptera: Yponomeutidae) ^a	México	-----
<i>Cercospora agavicola</i>	V28	<i>Agave tequilana</i> (Asparagales: Agavaceae) ^a	México	-----

^a Aislamientos usados en el análisis RAPD y SSR; ^b Aislamientos usados en el análisis ITS. ^c Las secuencias de estos aislamientos fueron obtenidas en este estudio; ^d Las secuencias de estos aislamientos fueron obtenidas del NCBI.

ARSEF: aislamientos provenientes de la colección USDA-ARSEF, USA; **ATCC 32865:** aislamiento proveniente de la colección American Type Culture Collection, Maryland, USA. Los aislamientos **Lyco** fueron colectados de la planta de champiñones Riojal en Las Vigas de Ramírez, Ver. México; **STAFFS:** aislamientos enviados por el Dr. Arthur A. Callaghan de la Universidad Staffordshire, College Road, UK.

Amplificación polimórfica al azar del ADN (RAPD)

Para las pruebas RAPD, SSR e ITS se hicieron tres repeticiones; la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador 580BR 09275 (My Cyclyer™ Thermal cyclyer BIO-RAD); se usaron tubos Eppendorf de 0.5 ml y el volumen final de la mezcla por reacción fue de 25 µl.

En esta prueba se utilizaron seis aislamientos de *C. coronatus* (Cuadro 2.1); el volumen final contenía 4 µl de ADN (80 ng/µl), buffer 10x, cloruro de magnesio 3 mM, 2.5 mM de cada dNTP (GENE CHOICE), 1.5 U de Taq polimerasa (BIOGENICA) y 2 µl de cada iniciador (10 pmol). Los iniciadores utilizados fueron 03 y 18 de la serie A de Operon Technology® y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10,11, 13, 15 y 17 de la serie B de Invitrogen (Cuadro 2.2). El programa de amplificación fue de un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 1 min, seguido de 38 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, hibridación a 35°C por 30 seg, y extensión a 72°C por 1.5 min, seguido de una extensión final a 72°C durante 5 min.

Una vez finalizada la corrida se visualizó en un gel de agarosa al 1% en 1X de TBE (Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M) teñido con bromuro de etidio (0.5 µg ml⁻¹ por 10 min) y analizado con el fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®).

Amplificación de SSR (secuencias simples repetidas)

Se usaron seis aislamientos de *C. coronatus* (Cuadro 2.1); el volumen final por reacción contenía 1 µl de ADN (80 ng/µl), buffer 10 x, cloruro de magnesio 3 mM, 200 µM de cada dNTP (GENE CHOICE), 1.5 U de Taq polimerasa (BIOGENICA), 3µl de cada iniciador (30 pmol/µl). Los iniciadores utilizados fueron (GACA)₄ y ASSR-35 (Cuadro 2.2). Para cada iniciador se utilizó un programa de amplificación. En el caso de (GACA)₄ consistió en un ciclo de preamplificación a 93°C por 1 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 93°C por 20 seg, hibridación a 48°C por 1 min y extensión a 72°C por 20 seg, seguido de una extensión final a 72°C durante 6 min. En el caso del iniciador ASSR-35 se utilizó un ciclo de preamplificación a 94°C por 9 min, seguido de 46 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 46°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C durante 10 min.

Cuadro 2.2. Secuencia de los iniciadores RAPD y SSR y fragmentos amplificados.

Iniciador	Secuencia (5' → 3')	Número de fragmentos	Fragmentos Polimórficos	Tipo de iniciador
A03	5'-AGTCAGCCAC-3'	10	2 (20%)	RAPD
A18	5'-AGGTGACCGT-3'	8	5 (62.5%)	RAPD
B01	5'-GTT TCG CTC C-3'	7	6 (85.7%)	RAPD
B02	5'-TGA TCC CTG G-3'	5	4 (80%)	RAPD
B03	5'-CAT CCC CCT G-3'	6	4 (66.6%)	RAPD
B04	5' -GGA CTG GAG T-3'	7	5 (71.4%)	RAPD
B05	5'-TGC GCC CTT C-3'	3	3 (100%)	RAPD
B06	5' -TGC TCT GCC C-3'	3	3 (100%)	RAPD
B07	5' -GGT GAC GCA G-3'	6	5 (83.3%)	RAPD
B10	5' -CTG CTG GGA C-3'	3	3 (100%)	RAPD
B11	5'-GTA GAC CCG T-3'	2	2 (100%)	RAPD
B13	5' -TTC CCC CGC T -3'	2	1 (50%)	RAPD
B15	5' -GGA GGG TGT T -3'	8	6 (75%)	RAPD
B17	5' - AGG GAA CGA G -3'	9	8 (88.8%)	RAPD
GACA	(GACA) ₄	6	2 (33.3%)	SSR
ASSR-35	5' - (CT) ₇ TGA -3'	7	1 (14.2%)	SSR

Amplificación y secuenciación de la región ITS del ARN ribosomal

En esta prueba se utilizaron 11 aislamientos de *C. coronatus* (Cuadro 2.1). La región ITS fue amplificada usando el set de iniciadores universales 4 y 5 (White *et al.* 1990). Cada reacción contenía 2 µl de ADN (80 ng/µl), buffer 10x, cloruro de magnesio 2,6 mM, 2,5 mM de cada dNTP (GENE CHOICE), 1.5 U/µl Taq polimerasa, 2 µl de cada iniciador (20 pmol). El programa de amplificación fue de un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, después 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación a 50°C por 1 min, extensión a 60.3°C por 1.5 min y una extensión final a 72°C durante 5 min.

Con el propósito de encontrar diferencias a nivel de nucleótidos entre los aislamientos, los productos de PCR-ITS se enviaron para su limpieza y secuenciación a la empresa Macrogen. La secuenciación se realizó en ambas direcciones 3' y 5' usando los iniciadores universales 4 y 5.

Análisis de datos

Microsatélites SSR y RAPD

La codificación fue representada con el número uno para la presencia de bandas y cero para la ausencia; como medida de disimilaridad genética entre los individuos, se empleó la proporción de diferencias (0 y 1 ó 1 y 0). Para calificar una banda como polimórfica se consideró la presencia o ausencia de ésta y debió ser consistente en tres amplificaciones diferentes. Con dichos resultados se construyó una matriz binaria donde se encontraban los polimorfismos de cada uno de los iniciadores en estudio. A partir de dicha matriz de similitud y el coeficiente de apareamiento simple, se construyó un dendrograma con la ayuda del software computacional NTSYS 2.0 (Rohlf 1996). Con el objeto de obtener un dendrograma de mayor robustez, se realizaron 1000 réplicas Bootstrap con el programa Winboot (Yap & Nelson 1996).

ITS

Las secuencias de ITS fueron editadas y ensambladas con el programa Bioedit (Hall 1999). Los alineamientos múltiples se llevaron a cabo con el programa Mega 3.1: Molecular Evolutionary Genetics (Kumar *et al.* 2004). Adicionalmente a las 11 secuencias de *C. coronatus* obtenidas en este estudio, se utilizaron tres secuencias ITS de *C. coronatus* y dos de otras especies como grupo externo tomadas de NCBI (Cuadro 2.1). Se hizo un análisis de los aislamientos en estudio usando el método Neighbour Joining (NJ) para analizar sus relaciones taxonómicas y agrupación de especies con base en el programa referido. La robustez de los nodos fue estimada por análisis BS con 1 000 réplicas.

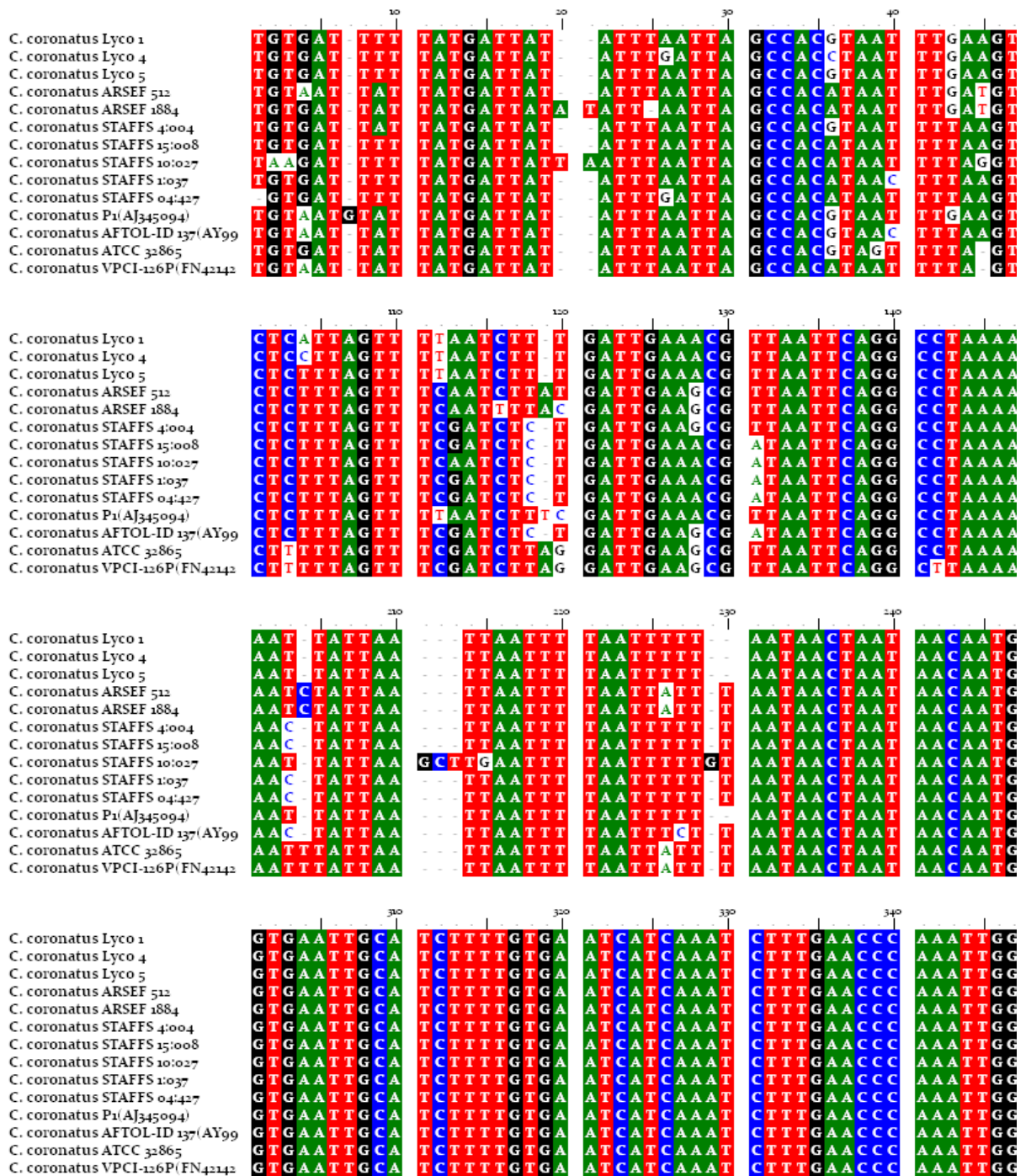


Figura 2.2. Alineamiento múltiple de secuencias parciales ITS 1, ITS 2 y 5.8 con el programa computacional BIOEDIT, de secuencias parciales de la región.

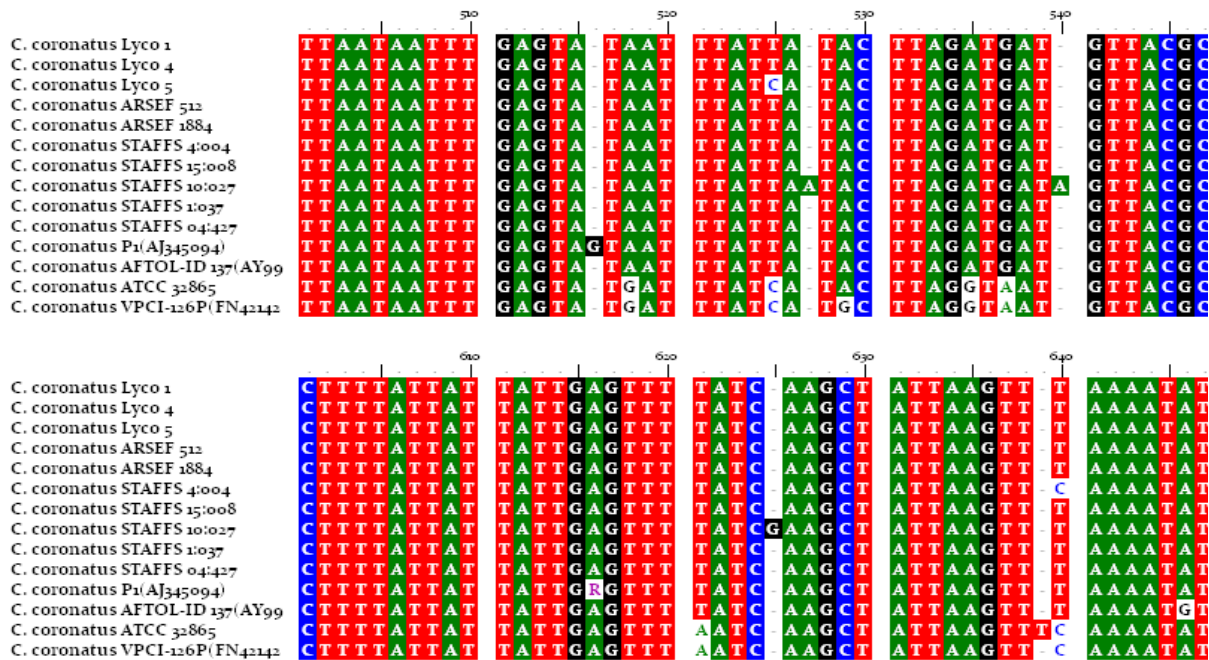


Figura 2.2. Continuación.

Resultados

Análisis RAPD y SSR

En la Figura 2.3 se observan patrones de bandeo obtenidos por la amplificación con los iniciadores B1 y B15, en los cuales se aprecia la diferencia genética entre los aislamientos evaluados procedentes de diferentes hospedantes. El número de bandas polimórficas de cada aislamiento, obtenidas a partir de 12 iniciadores de RAPD y SSR fue el siguiente: Lyco 1 con 1 banda, Lyco 2 con 0 bandas, Lyco 5 con 0 bandas, ARSEF 512 con 10 bandas, ARSEF 1884 con 1 banda, ATCC 32865 con 17 bandas, Z (*Z. radicans*) con 11 bandas y V28 (*C. agavicola*) con 19 bandas.

Posterior al análisis de los patrones de bandeo obtenidos con los 12 iniciadores, se formaron cinco grupos en el dendrograma (Figura 2.4). El grupo 1 está formado por cuatro aislamientos, a su vez organizados en dos subgrupos. Subgrupo 1: Lyco 1 y Lyco 4, obtenidos de *L.*

ingenua colectado en Veracruz, México; subgrupo 2: aislamiento Lyco 5, obtenido de *L. ingenua* y ARSEF 1884 tomado de *Mocis latipes* de Brasil. El grupo 2 incluyó el aislamiento ARSEF 512 de *Nilaparvata lugens* de Malasia. El grupo 3 lo integra el aislamiento Z (*Z. radicans*) de *Plutella xylostella* colectado en Guanajuato, México. En el grupo 4 se encuentra el aislamiento ATCC 32865 tomado de humano en Greer, USA, y en el grupo 5 se ubicó el aislamiento V28 (*C. agavicola*) tomado de *Agave tequilana* (Asparagales: Agavaceae) en México (Cuadro 2.1).

En lo que se refiere a la robustez de los agrupamientos obtenidos, ésta se comprobó con un análisis de 1,000 réplicas con el coeficiente de apareamiento simple. El dendrograma resultante confirmó los grupos presentes en el dendrograma (Figura 2.4). Con esto se corrobora la consistencia de los grupos detectados. Los números presentes en los nodos indican el número de veces, medido en porcentaje, en que la topología de un nodo se repite. El grupo que tuvo mayor porcentaje fue el 1 (99.8%) en contraste con el grupo 2, cuyo valor fue de 55.6% (Figura 2.4).

Análisis ITS

El tamaño del producto de la secuenciación de las regiones completas ITS 1, 5.8 e ITS 2 fue de 690 pb (incluyendo espacios) para todos los aislamientos (Figura 2.1; Figura 2.2). Adicionalmente a las 11 secuencias de *C. coronatus* obtenidas en este estudio, se utilizaron tres secuencias ITS de *C. coronatus* y dos de otras especies como grupo externo tomadas de NCBI (Cuadro 2.1).

El análisis estadístico arrojó la formación de cinco grupos (Figura 2.5), considerando sólo aquellos grupos que tuvieron un valor BS superior a 80%. Existe una clara separación entre los aislamientos usados como grupo externo, los cuales forman el grupo 1 *Pandora neoaphidis* ARSEF 835 y *Rhizopus microsporus* 31994, y los aislamientos de *C. coronatus*. Otra separación importante se da entre los aislamientos de *C. coronatus* provenientes de humanos (grupo 2): ATCC 32865 (Greer, USA) y VPCI-126P (norte de la India) y los que provienen de otra fuente. El grupo 3 contiene a los aislamientos L1, L4 y L5 obtenidos de *L. ingenua* (Veracruz, México); en el grupo 4 se encuentran los aislamientos ARSEF 512 *Nilaparvata lugens* de Malasia y ARSEF 1884 *M. latipes* de Brasil; el grupo 5 incluye a los aislamientos STAFFS 15:008, STAFFS 1:037 y STAFFS 04:427, todos provenientes del Reino Unido.

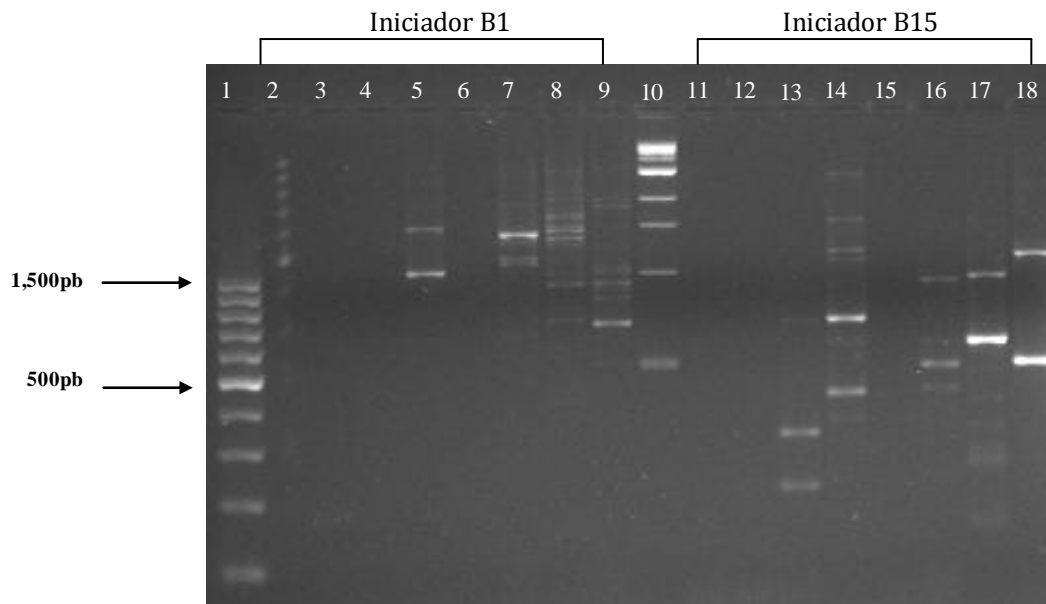


Figura 2.3. Productos de PCR amplificados con iniciadores RAPD de la serie B de Operon B1 y B15 en gel de agarosa al 1%. Carril 1) Marcador de 100 pb; Carril 2) Lyco 1, aislado de *Lycoriella ingenua*; Carril 3) Lyco 4, aislado de *L. ingenua*; Carril 4) Lyco 5, aislado de *L. ingenua*; Carril 5) ARSEF 512, aislado de *Nilaparvata lugens*; Carril 6) ARSEF 1884, aislado de *Mocis latipes*; Carril 7) ATCC 32865, aislado de humano; Carril 8) *Zoophthora radicans*: aislado de *Plutella xylostella* (testigo negativo); Carril 9) *Cercospora agavicola*: aislado de *Agave tequilana* (testigo negativo); Carril 10.- Marcador de 1000 pb; Carril 11) Lyco 1, aislado de *L. ingenua*; Carril 12) Lyco 4, aislado de *L. ingenua*; Carril 13) Lyco 5, aislado de *L. ingenua*; Carril 14) ARSEF 512, aislado de *N. lugens*; Carril 15) ARSEF 1884, aislado de *M. latipes*; Carril 16) ATCC 32865, aislado de humano; Carril 17) *Z. radicans*: aislado de *P. xylostella* (testigo negativo); Carril 18) *C. agavicola*: aislado de *A. tequilana* (testigo negativo).

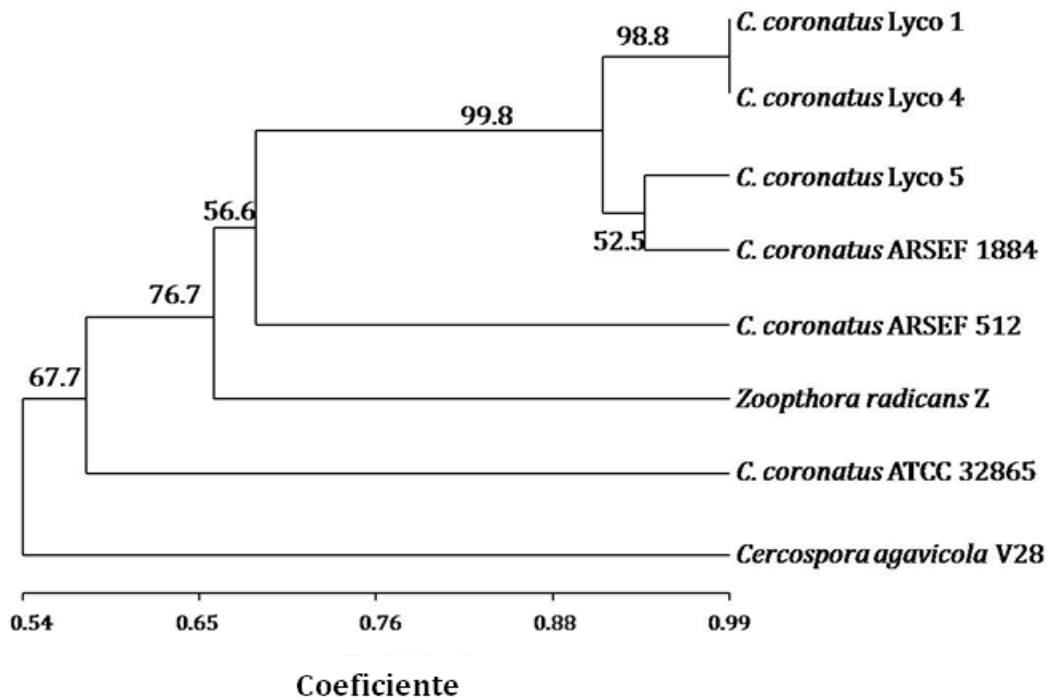


Figura 2.4. Dendrograma de agrupamiento de aislamientos de *C. coronatus* obtenidos a partir de los polimorfismos de RAPD y SSR. Se formaron cinco grupos: 1) *C. coronatus*, Lyco 1, 4 y 5 de *Lycoriella ingenua*, ARSEF 1884 aislado de *Mocis latipes*; 2) ARSEF 512 de *Nilaparvata lugens*; 3) *Z. radicans*: aislado de *Plutella xylostella* (testigo negativo); 4) *C. coronatus*: ATCC 32865 aislado de humano; y 5) *C. agavicola*: aislado de *Agave tequilana* (testigo negativo). El análisis se basó en el coeficiente de similitud simple y el software NTSYS-pc. A la derecha se indican los aislamientos estudiados. Los números en cada punto de los nodos representan los valores "BS".

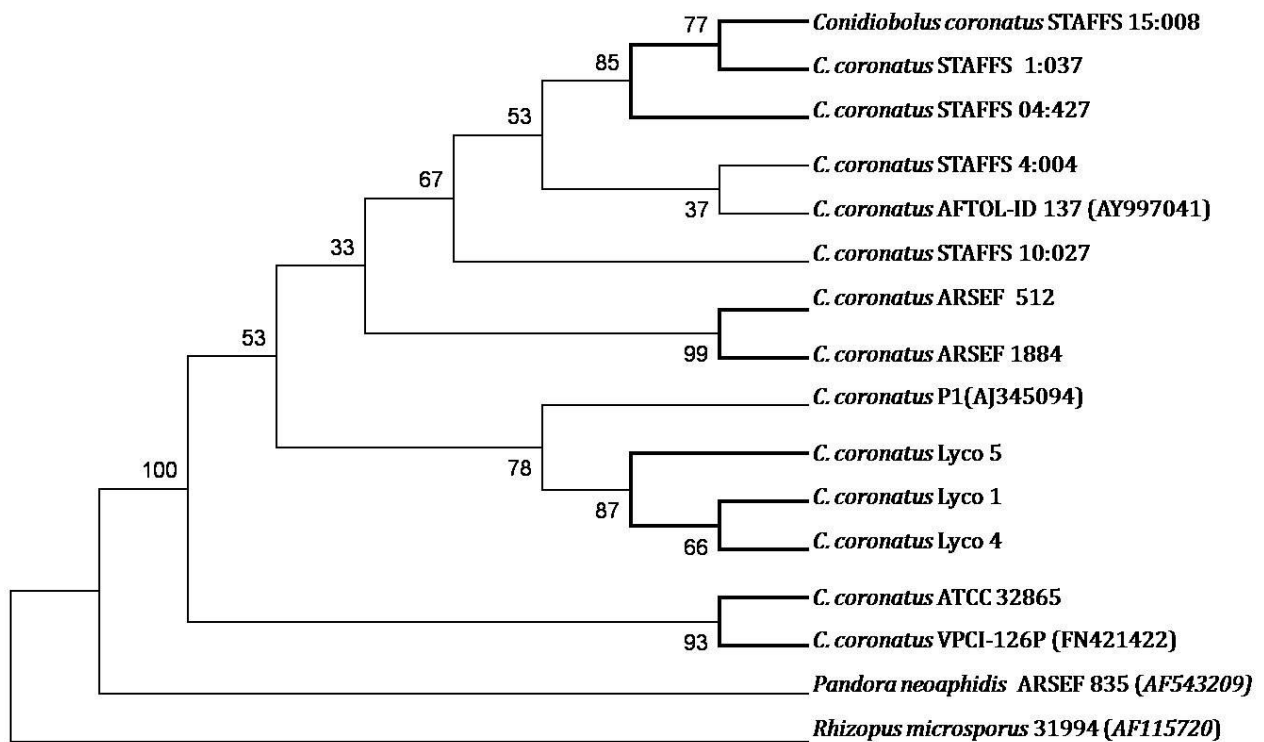


Figura 2.5. Árbol filogenético consenso obtenido con secuencias completas de ITS 1, 5.8 e ITS 2 usando análisis NJ. Los números cercanos a los nodos representan valores BS expresados como porcentaje de 1000 repeticiones. Sólo valores BS superiores a 80% fueron considerados. El número de acceso al NCBI se encuentra entre paréntesis. Las secuencias de los aislamientos de *C. coronatus* STAFFS 4:004, STAFFS 15:008, STAFFS 10:027, STAFFS 1:037, STAFFS 04:427, Lyco1, Lyco2, Lyco5, ARSEF 512, ARSEF 1884, ATCC 32865 fueron obtenidas en este estudio; P1, AFTOL-ID 137 y VPCI-126P fueron tomados del NCBI igual que *P. neoaphidis* ARSEF 835 y *R. microsporus* 31994 usados como grupo externo.

Discusión

Se realizaron pruebas de RAPD y SSR sobre seis aislamientos de *C. coronatus* provenientes de diferentes fuentes y zonas geográficas (Cuadro 2.1). El intervalo de diferentes productos de amplificación obtenidos con los 16 iniciadores de las dos pruebas claramente demostró altos niveles de variación intraespecífica entre aislamientos de *C. coronatus* (Cuadro 2.2). Basándonos en los estudios de Hodge *et al.* (1995), Rohel *et al.* (1997) y Nielsen *et al.* (2001), el número total de polimorfismos detectados sugiere que el nivel de variación genética entre aislamientos de *C. coronatus* es amplio. Los análisis RAPD y SSR no revelaron una relación entre variación genética y origen geográfico. Es importante resaltar que de todos los aislamientos de *C. coronatus*, ATCC 32865 presentó el mayor nivel de polimorfismo respecto de los demás y podría atribuirse al hecho de haber sido aislado de lesiones humanas.

Después de obtener los resultados con las técnicas RAPD y SSR, se tuvo acceso a cinco aislamientos más de otra colección y se realizó la secuenciación de la región ITS con 11 aislamientos en total. Se usó el análisis ITS porque de acuerdo con Hsiang & Wu (2000), es una prueba más estable que la técnica RAPD, que está influenciada por componentes y condiciones de PCR. Aunado a esto, Soll (2000) afirma que para que un método sea considerado efectivo, los resultados de éste deben confirmarse al compararlos con al menos un método diferente y en este estudio, los resultados del análisis ITS respaldan los obtenidos con las técnicas RAPD y SSR, al encontrarse la principal separación entre los aislamientos de humanos (ATCC 32865 y VPCI-126P) y los provenientes de otras fuentes (sustentado en un valor BS del 93%), además de que sólo existe relación entre variación genética y hospedante, mientras que el origen geográfico no fue significativo. Similar a este trabajo, Nielsen *et al.* (2001) obtuvieron resultados en los que la variación genética es consistente con las técnicas ITS y RAPD al evaluar aislamientos de *P. neoaphidis*.

En los resultados de esta investigación se observa una clara diferencia a nivel molecular entre aislamientos de *C. coronatus* provenientes de lesiones humanas y otras fuentes. Sumado a esto, existen reportes de estudios no moleculares en los que se ha encontrado esta diferenciación;

caso concreto es que [Hall et al. \(1982\)](#) consideran que la capacidad de desarrollarse a 37°C es un criterio para evaluar el potencial de éste u otros hongos para actuar como patógeno de humanos. Ratificando lo anterior, [Mier et al. \(1980\)](#) trabajaron una cepa que provenía de lesiones humanas que logró desarrollarse a 37°C, mientras que [Papierok et al. \(1993\)](#) estudiaron 10 cepas, nueve de ellas provenientes de insectos de órdenes diversos (Hemípteros, Himenópteros, Coleópteros, Dípteros y un Miriápodo) y una proveniente de lesiones humanas; de todas ellas, sólo dos lograron crecer a 37°C: la de origen humano y la aislada del miriápodo *Hanseniella unguiculata*.

Durante el desarrollo de éste estudio, se observó otro aspecto que sustenta las diferencias entre los 11 aislamientos: ATCC 32865 tardó casi cuatro días más con respecto a los obtenidos de insectos en llenar una caja Petri (datos no presentados), además que su aspecto no es tan rugoso y llega a tener una apariencia algodonosa y tonalidades grisáceas, características que nunca se presentaron en los demás aislamientos evaluados con las técnicas RAPD y SSR. Esto podría atribuirse a que el aislamiento ATCC 32865 fue tomado de lesiones humanas y a la vez sugiere que la fuente del aislamiento podría ser un factor que genera diferencia en las distancias genéticas.

Los estudios referentes a la caracterización molecular de Zygomycetes están enfocados principalmente a micosis en humanos ([Galgóczy 2005](#)). Un ejemplo es la evaluación que hicieron [Chakrabarti et al. \(2003\)](#) mediante ITS-RFLP de *Apophysomyces elegans* y de otros Zygomycetes de importancia clínica; a diferencia de los resultados de este estudio y con este método no se encontró variación intraespecífica entre aislamientos provenientes de humanos y otra fuente.

Se ha estudiado la variación en los hongos Entomoftorales con RAPD y amplificando las regiones ITS ([Sierotzki et al. 2000](#); [Nielsen et al. 2001](#)). Algunos autores han reportado relación entre la variación genética y el hospedante ([Fargues et al. 2002](#); [Morton et al. 2003](#)). También se han encontrado regiones muy conservadas en los ITS al analizar otros hongos ([Tymon et al. 2004](#); [Guzmán et al. 2008](#)). A pesar de que [O'Donnell \(2000\)](#) afirma que los estudios de las secuencias parciales (28S) de rADN, así como la región ITS, no son eficientes para evaluar la variación genética en el complejo de *Fusarium*, en este trabajo la amplificación de la región ITS fue exitosa. Esta discrepancia podría atribuirse a que en ese estudio se utilizó una especie distinta a la de este trabajo. Sin embargo, es importante mencionar que para *C. coronatus* no existe investigación previa sobre la relación entre variación genética y hospedante/origen geográfico, y los resultados

obtenidos en esta investigación muestran una clara distancia genética entre aislamientos provenientes de humanos y otras fuentes (insectos, suelo).

Existen diversos estudios del complejo de especies de *Fusarium*, que aunque no pertenece a los Zygomycetes, comparte con *C. coronatus* la característica de tener una amplia gama de hospederos dentro de los cuales se encuentra el humano; en el estudio de [Ortoneda et al. \(2004\)](#) se evaluaron los factores de virulencia de *F. oxysporum* y se descubrió que un aislamiento proveniente de tomate fue capaz de atacar a plantas de tomate y a ratones; a partir de esto se le ha reconocido como un modelo de patogénesis multihospedero. Esta afirmación puede ser la razón que en trabajos del complejo *Fusarium* no se encontrara variación intraespecífica en aislamientos provenientes de diferentes fuentes, como en el de [O'Donnell et al. \(2004\)](#), que investigaron la relación genética de un grupo de aislamientos de *F. oxysporum* provenientes de lesiones humanas, muestras ambientales y muestras tomadas de plantas y no encontraron diferencia entre ellos. Estos resultados confirman lo reportado por [Anaissie et al. \(2001\)](#), quienes encontraron posibles marcadores con la técnica RAPD que permitían diferenciar entre aislamientos provenientes de humanos y muestras ambientales; sin embargo, los resultados no fueron reproducibles por lo que se descartaron y aún cuando se usaron pruebas alternativas (IR-PCR y RFLP), no fue posible determinar ni diferencias ni similitudes consistentes entre todos los aislamientos evaluados. En el estudio de [Zhang et al. \(2006\)](#) se evaluaron 471 aislamientos de *F. solani* para identificar cuáles cepas están relacionadas con infecciones humanas; los aislamientos evaluados incluyeron muestras tomadas de humanos, suelo, animales, muestras de hospitales (aire) y plantas y sin embargo, en los cuatro grupos obtenidos estuvieron presentes los aislamientos tomados de lesiones humanas, a pesar de haber trabajado con un gran número de muestras.

Los resultados de los estudios sobre el complejo *Fusarium* nos ayudan a comprender los obtenidos en el presente trabajo, porque a diferencia de ellos, sí se encontró variación intraespecífica entre aislamientos tomados de diversas fuentes. Esto es consistente con los resultados de [López-Martínez et al. \(1978\)](#), quienes realizaron pruebas en ratones, hámsters y cobayos con una cepa de *C. coronatus* tomado de *Aenolamia postica*; en todos los mamíferos hubo una invasión inicial que desapareció 15 días después de la inoculación, lo que indica que el hongo no fue capaz de establecerse e invadir a los mamíferos. Esto es clara evidencia de ausencia de

patogenicidad. Así entonces, es de suponer que *C. coronatus* no es un hongo con patogénesis multihospedero.

Cada microorganismo tiene un conjunto de características que funcionan como factores de virulencia en sus hospederos; sin embargo, se desconoce hasta qué punto son condicionantes de los mecanismos de infección en diferentes grupos de hospederos, como es el caso de humanos, plantas e insectos. Una causa de este desconocimiento es la ausencia de modelos que permitan un análisis de la virulencia en los diferentes grupos de hospederos (Casadevall 2006). Considerando los reportes como patógeno de insectos, humanos y saprófito y haciendo uso de los resultados de esta investigación, que muestran una evidente variación intraespecífica entre aislamientos obtenidos de humanos, insectos y otras fuentes, consideramos que *C. coronatus* podría servir como modelo para evaluar mecanismos de virulencia fúngica que lo hacen específico para cada uno de estos grupos de organismos. De esta forma, se podría realizar una separación genética de aquello que determina la virulencia del hongo durante la patogénesis de un insecto o un mamífero (humano).

Los resultados del presente estudio revelan que las técnicas RAPD, SSR e ITS son una herramienta adecuada para identificar diferencias intraespecíficas en *C. coronatus* relacionadas con el hospedero. Además, los resultados aquí presentados podrían ayudar a generar una herramienta para el mejor entendimiento de la epidemiología de la rinoentomofotoromicosis, con lo que el diagnóstico sería más efectivo y por tanto, su control también, como lo hicieron Viela *et al.* (2010) con *C. lampragues* al utilizar técnicas moleculares como herramienta para la identificación de aislamientos; su estudio filogenético separa dos grupos hermanos bien fundamentados en el género *Conidiobolus*. Con los resultados de este trabajo se podrían diseñar iniciadores con las secuencias ITS considerando las diferencias en las secuencias entre los provenientes de humanos y otras fuentes (Galgóczy 2005).

Bibliografía

- Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH, Francesconi A, Kasai M, Müller FM, Lozano-Chiu M, Summerbell RC, Dignani MC, Chanock SJ, & Walsh TJ**, 2001. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clinical infection diseases* **33**:1871–1878.
- Ahrens U & Seemüller E**, 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S RNA gene. *Phytopathology* **82**: 828-832.
- Ayala EV, Yañez MMJ, Braun U, Groenewald JZ, Crous WP**, 2005. *Cercospora agavicola* —a new foliar pathogen of *Agave tequilana* var. *azul* from Mexico. *Mycotaxon* **93**: 115-121.
- Becerra VV, Paredes CM, Rojo MC, France IA**, 2007. RAPD e ITS variación molecular en poblaciones chilenas de *Beauveria bassiana*. *Agricultura Técnica* **67** (2):115-125.
- Chakrabarti A, Ghosh A, Prasad GS, David JK, Gupta S, Das A, Sakhuja V, Panda NK, Singh SK, Das S, Chakrabarti T**, 2003. *Apophysomyces elegans*: an emerging zygomycete in India. *Journal of Clinical Microbiology* **41**:783-788.
- Casadevall A**, 2006. Cards of virulence and the global virulome for humans. *Microbe* **1**: 359–364.
- Fargues J, Bon MC, Manguin S, Couteaudier Y**, 2002. Genetic variability among *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from various geographical and host insect origins based on the rDNA-ITS regions. *Mycological Research* **106**: 1066–1074.
- Freimoser Florian M., Steven Screen, Gang Hu and Raymond St. Leger**. 2003. EST analysis of genes expressed by the zygomycete pathogen *Conidiobolus coronatus* during growth on insect cuticle. *Microbiology* **149**: 1893–1900
- Galgóczy L**, 2005. Molecular characterization of opportunistic pathogenic zygomycetes. *Acta Biologica Szegediensis* **49**(3-4):1-7.
- Guzmán FA, Atkins SD, Alderson PG and Pell JK**, 2004. Development of species-specific diagnostic primers for *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii*; two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Mycological Research* **112**: 1227-1240.

- Guzmán FA, Atkins SD, Alderson PG and Pell JK**, 2008. Development of species-specific diagnostic primers for *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii*; two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Mycological Research* **112**: 1227-1240.
- Hsiang T & Wu C**, 2000. Genetic relationships of pathogenic *Typhula* species assessed by RAPD, ITS-RFLP and ITS sequencing. *Mycological Research* **104**: 16-22.
- Hall RA, Zimmermann G, Vey A**, 1982. Guidelines for the registration of entomogenous fungi as insecticides. *Entomophaga* **27**(2):121-127.
- Hall TA**, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hartmann GC, Wasti SS**, 1974. Infection of the gypsy moth, *Porthetria dispar* with the entomogenous fungus *Conidiobolus coronatus*. *Entomophaga* **19**:353-360.
- Hodge KT, Sawyer AJ, Humber RA**, 1995. RAPD-PCR for identification of *Zoophthora radicans* isolates in biological control of the potato leafhopper. *Journal of Invertebrate Pathology* **65**: 1-9.
- Jensen BA, Eilenberg J**, 2001. Genetic variation within the insect-pathogenic genus *Entomophthora* on the *E. muscae* complex, using PCR-RFLP of the ITS II and the LSU rDNA. *Mycological Research* **105** (3):307-312.
- Karp A, Seberg O, Buiatti M**, 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany* **78**: 143-149
- Kumar S, Tamura KM**, 2004. Mega 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**:150-163.
- López-Martínez R, Toriello C, Mier T, Ximénez-García C, Martínez A, Fernández-Diez J**, 1978. Estudio de la patogenicidad de *Conidiobolus coronatus* en animales de experimentación. *Mycopathologia* **66** (1-2):59-65.
- Lowe RE, Rumbaugh RG, Patterson RS**, 1968. *Entomophthora coronata* as a pathogen of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology* **11**: 506-507.
- Mier T, Toriello C, García-Maynez AM, López-Martínez, R**, 1980. Efecto de diferentes factores físicos y nutricionales sobre el crecimiento de dos cepas de *Conidiobolus coronatus*. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*. **14**: 69-79.

- Morton CO, Mauchline TH, Kerry BR, Hirsh PR**, 2003. PCR-based DNA fingerprinting indicates host-related genetic variation in the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research* **107**: 198–205.
- Nielsen C, Sommer C, Eilenberg J, Hansen K, Humber RA**, 2001. Characterization of aphid pathogenic species in the genus *Pandora* by PCR techniques and digital image analysis. *Mycologia* **93**: 864–874.
- O'Connor L & Keil C**, 2005. Mushroom host influence on *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) life cycle. *Journal of Economic Entomology*. **98** (2): 342-319
- O'Donnell, K**, 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*- *Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**:919–938.
- O'Donnell KD, Sutton A., Rinaldi MG, Magnon KC, Cox PA, Revankar SG, Sanche S, Geiser DM, Juba JH, van Burik J-AH, Padhye A, Anaissie JH, Francesconi A, Walsh JT, Robinson SJ**, 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:5109–5120.
- Ortoneda M, Guarro J, Madrid PM. Caracuel Z, Roncero GMI, Mayayo E, Di Pietro A**, 2004. *Fusarium oxysporum* as multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and animals. *Infection and Immunity* **72**:1760–1766.
- Papierok B, Rafanomezantsoa- Randriambololona BN, Ziat N**, 1993. Nouvelles données sur l'écologie et le comportement entomopathogène experimental de 60 l'entomophthorale *Conidiobolus coronatus* (Zygomycetes). *Entomophaga* **38**: 299-312.
- Ribes AJ, Vanover-Sams LC, Baker JD**, 2000. Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews* **13**(2):236-301.
- Rohel E, Couteaudier Y, Papierok B, Cavelier N, Dedryver CA**, 1997. Ribosomal internal transcribed spacer size variation correlated with RAPD-PCR pattern polymorphisms in the entomopathogenic fungus *Erynia neoaphidis* and some closely related species. *Mycological Research* **101**: 573–579.
- Rohlf FJ**, 1996. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0. 45 p. Exeter Software. Setauket, New York, USA.

- Sajap SA, Atim BA, Husin H, Wahab AY**, 1997. Isolation of *Conidiobolus coronatus* (Zygomycetes:Entomophthorales) from soil and its effects on *Coptotermes curvignatus* (Isoptera:Rhinotermitidae). *Sociobiology* **30**(3):257-262.
- Segura JJ, González K, Berrocal J, Marin J**, 1981. Rhinoentomophthoromycosis report of the first two cases observed in Costa Rica (Central America), and review of the literature. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **30**(5): 1078-1084.
- Sierotzki H, Camastral F, Shah PA, Aebi M, Tuor U**, 2000. Biological characteristics of selected *Erynia neoaphidis* isolates. *Mycological Research* **104**: 213–219.
- Soll, RD**, 2000. The Ins and Outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* **13** (2): 332-370.
- Tymon AM, Shah PA, Pell JK**, 2004. PCR-based molecular discrimination of *Pandora neoaphidis* isolates from related entomopathogenic fungi and development of species-specific diagnostic primers. *Mycological Research* **108**: 419–433
- Valle ACF, Wanke B, Lazéra MD, Monteiro PCF, Viegas ML**, 2001. Entomophthoromycosis by *Conidiobolus coronatus* report of a case successfully treated with combination of itraconazole and fluconazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **43**(4).
- Vedder PJC**, 1996. Cultivo moderno del Champiñón. Mundi Prensa. España. P 113-159.
- Vilela Raquel, Silvana M. S. Silva, Franklin Riet-Correa, Eduardo Dominguez & Leonel Mendoza**, 2010. Morphologic and phylogenetic characterization of *Conidiobolus lamprauges* recovered from infected sheep. *Journal of clinical Microbiology*. **48**(2):427–432
- Voigt K, Cigelnik E, & O'Donnell K**, 1999. Phylogeny and PCR identification of clinically important Zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Journal of Clinical Microbiology* **37**:3957–3964.
- Yap IV, Nelson RJ**. 1996, WinBoot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. IRRRI Discussion Paper Series no. 14. International Rice Research Institute, P.O. Box 933, Manila, Philippines.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J**, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ

(eds.), PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.

Wieloch W, Sacharczuk M, Mieczysława I, Boguś, Kazimierz J, 2004. A study for minisatellitic markers of *Conidiobolus coronatus* pathogenicity to *Galleria mellonella* larvae. Journal of Invertebrate Pathology **85**: 63-69

Zhang N, O'Donnell K, Sutton AD, Nalim FA, Summerbell CR, Padhye AA, Geiser MD, 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. Journal of Clinical Microbiology **44**(6): 2186–2190.

Capítulo 3

Endosimbiosis del hongo *Conidiobolus coronatus* y la bacteria *Pseudomonas* sp

Resumen

Tres aislamientos de *Conidiobolus coronatus* (Lyco 1 aislado de un díptero; ARSEF 512 aislado de un hemíptero y ATCC32865 aislado de humano) fueron evaluados para determinar la presencia de una bacteria endosimbiótica, para lo cual se usaron iniciadores universales que amplifican el gen 16S rARN bacterial mediante PCR. Las pruebas consistieron en clonaciones a partir del metagenoma de *C. coronatus*, seguidas de un análisis molecular del gen 16S rARN y un análisis morfológico del micelio y esporas de *C. coronatus* con microscopía láser confocal. Los resultados de la amplificación del gen 16S rARN y de los análisis morfológicos por microscopía láser confocal en los tres aislamientos de *C. coronatus* muestran que existe una endosimbiosis entre el hongo *C. coronatus* y una bacteria. Se logró amplificar y secuenciar el gen 16S rARN completamente, y el árbol filogenético generado por el método neighbor-joining (NJ) revela que la bacteria pertenece al género *Pseudomonas*. Tanto las esporas como el micelio de *C. coronatus* de los tres aislamientos evaluados presentaron desarrollo de la bacteria en el citosol, por lo que con esta prueba se confirmó la endosimbiosis. Este trabajo es el primer reporte de una endosimbiosis en la que está involucrado un hongo entomoforal y una bacteria del género *Pseudomonas*.

Palabras clave: análisis filogenético, interacción, clonación, microscopía láser confocal, simbiosis.

Abstract

Three strains of *Conidiobolus coronatus* (Lyco 1 isolated from a dipteran, ARSEF 512 isolated from a hemipteran and ATCC32865 isolated from human tissue) were analyzed to verify the occurrence of an endosymbiotic bacterium. For such purpose, PCR tests were run with universal primers amplifying the 16S rRNA gene from bacteria. Cloning the metagenome of *C. coronatus* was followed by a molecular analysis of the gen 16S rARN and a morphologic analysis of the mycelium and spores of *C. coronatus* through confocal laser microscopy. Outcomes from these tests provided evidence of the existence of the endosymbiosis between *C. coronatus* and a bacterium. We achieved to amplify and fully sequence the gen 16S rARN, and the phylogenetic tree generated through the method neighbor-joining (NJ) indicated that the bacteria belong to the genus *Pseudomonas*. Both spores and mycelia, of the three strains analyzed, featured growth of the bacteria in their cytosol, which reconfirms the endosymbiosis finding. Thereby, this paper presents the first report of an endosymbiosis involving an entomophthoral fungi and a bacterium from the genus *Pseudomonas*.

Key words: phylogenetic analyses, interaction, cloning, confocal lasser microscopy, symbiosis.

Introducción

Las bacterias forman íntimas asociaciones (simbióticas y endosimbióticas) con una gran variedad de organismos y a menudo de ellas resultan beneficios mutuos. La diversidad de dichas asociaciones, aunada a su importancia clínica y agrícola, han provocado que se conviertan en un tema importante de investigación (Ochman & Moran 2001). La simbiosis entre organismos eucariontes y procariontes permite a ambos desarrollarse en nuevos nichos ambientales, además de tener un papel importante en la evolución y la diversidad de organismos eucariontes (Valdivia & Heitman 2007). La simbiosis bacteriana y su potencial metabólico son esenciales en muchos organismos, debido a que pueden mejorar su capacidad de supervivencia e incluso adquirir o potenciar sus factores de virulencia (Ochman & Moran 2001; Dale & Moran 2006; Woyke *et al.* 2006).

Las asociaciones entre bacterias endocelulares (endosimbióticas) y células eucariotas están ampliamente distribuidas en animales (ej. *Buchnera* y *Wolbachia* sp en insectos), plantas (ej. *Nostoc* sp con *Gunnera*; *Burkholderia* sp con Rubiaceae, *Rhizobium* con leguminosas). También existen asociaciones hongo-bacteria, de las cuales hay escasos reportes; es un campo nuevo que aplica las herramientas de la ecología microbiana moderna (Bonilla-Rosso *et al.* 2008; Zinder & Salyers 2005). Los estudios se habían centrado previamente en la micorrizósfera; ejemplo de ello es lo documentado en especies de *Glomeromycota* en micorrizas arbusculares (AM) (Barbieri *et al.* 2000; Bertaux *et al.* 2005) pero desde la década anterior, los estudios de bacterias en nichos fúngicos se ha evaluado cada vez más, como es el caso de la simbiosis en líquenes (Grube & Berg 2009; Lumini *et al.* 2006), los endosimbiontes β -proteobacteria *Burkholderia endofungorum* y *Burkholderia rhizoxinica* asociados a *Rhizopus microsporus* (Mucormycotina) y utilizando como hospedante a las plantas (Partida-Martínez *et al.* 2007) y *Candidatus glomeribacter* encontrado en varias especies de AM (Bianciotto *et al.* 2003).

La endosimbiosis ha sido poco estudiada, debido a que los organismos involucrados son difíciles de manejar a nivel de laboratorio, dado que son dependientes obligados por lo que necesitan de su simbiote o del hospedero para desarrollarse; en este sentido las técnicas de

biología molecular han sido pieza clave en el proceso del estudio de la endosimbiosis ([Moran 2006](#)).

En este estudio se realizaron pruebas para corroborar la posible endosimbiosis entre el hongo *Conidiobolus coronatus* y una bacteria, de la cual se tuvieron indicios al realizar diluciones previas a una inoculación del hongo en ratones. El hongo *C. coronatus* pertenece al grupo de los Entomoftorales; es patógeno de un gran número de insectos, además de atacar mamíferos (incluyendo humanos) y ser saprófito ([Sajap et al. 1997](#)). Las inoculaciones tenían como objetivo determinar si aislamientos de *C. coronatus* provenientes de insectos y suelo eran capaces de ocasionar alteraciones patológicas en mamíferos (ratones).

Una alternativa molecular para identificar una bacteria asociada a otro organismo es el uso de la PCR usando iniciadores específicos diseñados en la región del gen 16S rARN mediante PCR, la cual difiere del rARN de organismos eucariontes; la comparación de secuencias de los 16S rARN permite establecer la relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariontes, lo que ha tenido una gran trascendencia en la taxonomía bacteriana, pues permite la identificación rápida y precisa de las bacterias ([Partida-Martínez & Hertweck 2005](#); [Rodicio & Mendoza 2004](#)). En este estudio, las pruebas fueron realizadas con clonaciones a partir del metagenoma de *C. coronatus*, seguido de un análisis molecular del gen 16S rARN y un análisis morfológico del micelio de *C. coronatus* con microscopía láser confocal.

Materiales y métodos

Aislamientos y condiciones de cultivo

Se utilizaron tres aislamientos de *C. coronatus* ([Cuadro 3.1](#)) para las pruebas de clonación y amplificación de 16S rARN. Para la prueba de microscopía láser confocal, además de los anteriores se utilizó un aislamiento de *Zoophthora phalloides* como testigo negativo ([Cuadro 3.1](#)). Los aislamientos fueron mantenidos a temperatura ambiente y preservados en agua destilada estéril.

Para su desarrollo fueron inoculados en agar dextrosa Sabouraud (SDA por sus siglas en inglés) a 25°C al igual que *Z. phalloides*.

Extracción de ADN

Se obtuvo micelio liofilizado de los tres aislamientos de *C. coronatus*, siguiendo el método descrito por [Guzmán *et al.* \(2004\)](#). El ADN fue extraído mediante el método de CTAB modificado de [Ahrens & Seemüller \(1992\)](#) para lo cual se colocaron entre 0.03 y 0.04 g de micelio liofilizado por cada aislamiento en un mortero estéril y frío, la muestra se maceró con la ayuda de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el macerado de cada aislamiento se colocó en un tubo Eppendorf con 400 µl de solución de lisis (cloruro de sodio 0.4 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, PVP 1 %) y fue mezclado con un vórtex para homogenizar la solución; enseguida se agregaron 50 µl de SDS 20 %, 40 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 65°C durante una hora. Después de la incubación se agregaron 600 µl de solución CTAB 3 % y se incubó nuevamente durante 45 min a 65°C. Posteriormente se adicionó un volumen de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó 10 min a 14000 rpm, donde se formaron dos fases; la fase acuosa se colocó en un tubo Eppendorf con un volumen de isopropanol y se incubó a -20 °C durante 60 min y al término de este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm, 10 min. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla fue resuspendida en 50 µl de agua destilada estéril. La concentración y calidad del ADN fue estimada con un NanoDrop ND-1000 V3.7 (Thermo Scientific®). Posteriormente el ADN se visualizó en un gel de agarosa al 1% en 1 X de buffer TBE (Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M) teñido con bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹ por 10 min) se fotografió con un fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®).

Cuadro 3.1. Aislamientos de *Conidiobolus coronatus* y *Zoophthora phalloides* (testigo negativo) utilizados en este estudio.

Especie	Código de aislamiento.	Hospedante	Sitio de colección
<i>C. coronatus</i>	Lyco 1	<i>Lycoriella ingenua</i> [Diptera: Sciaridae]	México
<i>C. coronatus</i>	ARSEF 512	<i>Nilaparvata lugens</i> [Hemiptera: Delphacidae]	Malasia
<i>C. coronatus</i>	ATCC 32865	Humano	Greer, USA
<i>Zoophthora phalloides</i>	NW 418	<i>Brevicoryne brassicae</i> (Hemiptera: Aphididae)	Yugoslavia

ARSEF 512: aislado proveniente de la colección USDA-ARSEF, USA; **ATCC 32865:** aislado proveniente de la colección American Type Culture Collection, Maryland, USA; **Lyco 1** colectado de la planta de champiñones Riojal en Las Vigas de Ramírez, Ver. México y ahora se encuentra en la colección **ARSEF** con el código **9940**; **NW 418:** aislado proveniente de la colección de la estación experimental de **Rothamsted, UK**.

PCR y secuenciación

El gen 16S rARN fue amplificado con los iniciadores universales 16S rARN diseñados por Gurtler & Stanisich (1996) a partir de muestras de ADN metagenómico. La PCR se realizó en un termociclador 580BR 09275 (My Cycler™ Thermal cycler BIO-RAD); se usaron tubos Eppendorf de 0.5 ml y el volumen final de la mezcla por reacción fue de 25 µl, que contenía 2 µl de ADN (50 ng/µl), buffer 1x, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs a una concentración de 2 mM, 2 U de taq polimerasa (Biogénica®), 10 pmol del iniciador forward 5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3', 10 pmol del iniciador reverse 5'-TAC GGA TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. La mezcla resultante fue sometida a las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 min, seguida por 30 ciclos de amplificación (94 °C 1 min, 63 °C 1min, 72 °C 1min) y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Una vez finalizada la corrida se visualizó en un gel de agarosa al 1 % en 1 X de buffer

TBE (Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M) teñido con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 10 min) y analizado con el fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®).

Para lograr la purificación del producto del gen 16S cada una de las bandas fue cortada con la ayuda de un bisturí estéril y sometida a un proceso de extracción del gel con el kit "MinElute Gel Extraction" (QIAGEN®) siguiendo las recomendaciones del proveedor para con ello garantizar que sólo se trabajaría con la banda deseada (16S rADN).

Para la construcción del vector de clonación se utilizó el producto de PCR ligado al vector pCRTOP02.1 mediante el uso del kit comercial PCR-TOPO TA Cloning (Invitrogen); para ello, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron $4 \mu\text{L}$ de ADN, $1 \mu\text{L}$ de vector de clonación pCRTOP02.1 y $1 \mu\text{L}$ de buffer de ligación (10x), se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente por toda la noche. Los plásmidos que contenían los amplicones fueron utilizados para realizar la transformación con células competentes de *Escherichia coli*; las células competentes fueron elaboradas siguiendo el método descrito por Sambrook & Russel 2001; una vez descongeladas, se agregaron $2 \mu\text{L}$ de la reacción de ligación (plásmido-amplicón) por tubo de célula competente ($200 \mu\text{L}$); se incubó en hielo por 20 min; después de ese tiempo se sometió a un choque térmico, se colocó la muestra a baño maría a 41°C por 2 min e inmediatamente se regresó a hielo. A las células transformadas se adicionaron $500 \mu\text{L}$ de medio Luria Bertani (LB) y se incubaron por 90 min a 37°C y 130 rpm. Finalmente, $750 \mu\text{L}$ de la mezcla de las células transformadas se colocaron en cajas Petri con medio LB que contenía $50 \mu\text{g/mL}$ de XGal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), $60 \mu\text{g/mL}$ kanamicina y $30 \mu\text{g/mL}$ de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido). Las cajas fueron incubadas por toda la noche de acuerdo a las recomendaciones de Sambrook & Russel (2001).

Las colonias transformadas con el plásmido construido con el ADN de interés se tomaron al azar (colonias blancas y resistentes a ampicilina) y se crecieron en tubos con 5 mL de medio LB que contenía $60 \mu\text{g/mL}$ kanamicina a 37°C y 110 rpm por toda la noche. Las células de *E. coli* fueron colectadas por centrifugación ($14,000 \text{ rpm}$) y sujetas al aislamiento del plásmido siguiendo el protocolo del kit comercial "High Pure Plasmid isolation" (Roche®) para realizar una digestión con la enzima EcoR1 para verificar la presencia y la orientación del inserto. Para comprobar la inserción de ADN se corrió un gel de agarosa 1 % en 1 X de buffer TBE (Tris 0.089 M, ácido bórico

0.089 M, EDTA 0.002 M) teñido con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 10 min) y analizado con el fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®). Estos plásmidos fueron enviados a secuenciar a la compañía MacroGen- Korea. Para cada uno de los aislamientos de *C. coronatus* se hicieron 24 repeticiones.

Análisis filogenético

De las 72 secuencias de los 16S rARN obtenidas para los tres aislamientos se eliminaron aquéllas que no eran de buena calidad, de tal manera que se trabajó con 42 secuencias, de las cuales se eligió una por cada aislamiento evaluado y fueron sometidas al análisis en línea de la secuencia de ADN en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST por sus siglas en inglés) (Altschul *et al.* 1990). Lo anterior tuvo el propósito de determinar una posición filogenética aproximada. 10 secuencias del 16S rARN de la base de datos Ribosomal Database Project (RDP por sus siglas en inglés) reportadas para *Pseudomonas* sp y tres del Genbank fueron alineadas con CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1997) y usadas para construir un árbol filogenético con el algoritmo del programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007), el cual también incluyó tres secuencias consenso (una por cada aislamiento del metagenoma de *C. coronatus* evaluado) producto de las clonaciones del 16S rARN, con el fin de comparar y estimar la exactitud filogenética. Se usaron cuatro secuencias 16S rARN de *Burkholderia* sp como grupo externo. El árbol filogenético sin raíz fue generado por el método neighbor-joining (NJ) (Saitou & Nei 1987), se usó el parámetro Jukes-Cantor y la robustez de los nodos fue estimada por análisis bootstrap con 1000 réplicas.

Microscopía láser confocal

Se evaluó la presencia de la bacteria en los tres aislamientos de *C. coronatus*, tanto en esporas como en micelio; el micelio se obtuvo siguiendo el método descrito por Guzmán *et al.* (2004); se tomaron 300 μl de micelio de *C. coronatus* crecido en medio dextrosa Sabouraud y se colocaron en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL. Las esporas fueron obtenidas de cajas Petri con medio ADS y el hongo *C. coronatus* en proceso de esporulación; las esporas fueron raspadas con una espátula y se colocaron en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL y se resuspendieron en 300 mL

de medio dextrosa Sabouraud. Tanto los tubos Eppendorf con esporas como con micelio fueron centrifugados por 10 seg a 5000 rpm. Se eliminó el sobrenadante cuidando la pastilla y se resuspendió en 700 µl de medio dextrosa Sabouraud. Se agregaron 200 µl de componente A de LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits. Se incubó por 15 min en oscuridad y se observó en un microscopio Metáaser (Zeiss LSM 510) a 480/500 nm. El hongo *Z. phalloides* usado como testigo negativo recibió el mismo tratamiento.

Resultados

Secuenciación

La obtención de datos moleculares por PCR usando ADN metagenómico de *C. coronatus* y marcadores universales del gen 16S rADN revelaron una banda de aproximadamente 1,500 pares de bases para los tres aislamientos evaluados y ésta fue visualizada en un gel de agarosa al 1 %, previo a su clonación. Para descartar la posibilidad de amplificar una banda derivada de contaminantes o que no correspondiera al 16S rADN, se usaron testigos negativos y positivos; de los testigos negativos utilizados ninguno tuvo amplificación (Figura 3.1).

De las secuencias producto de la clonación fueron seleccionadas tres (una por aislamiento) para realizar la búsqueda de secuencias genéticas similares en la base de datos de NCBI, de donde se obtuvo una identidad del 99% en 1509 de 1515 pares de bases con una bacteria no cultivada (número de acceso al Genbank AY958857). El análisis BLAST también mostró una identidad del 99% en 1495 de 1501 pares de bases con *Pseudomonas fluorescens* (aislamiento CCM 2115, número de acceso al Genbank DQ207731) y una identidad del 99% en 1491 de 1497 pares de bases de *Pseudomonas trivialis* (aislamiento Cf2F, número de acceso al Genbank GU391473).

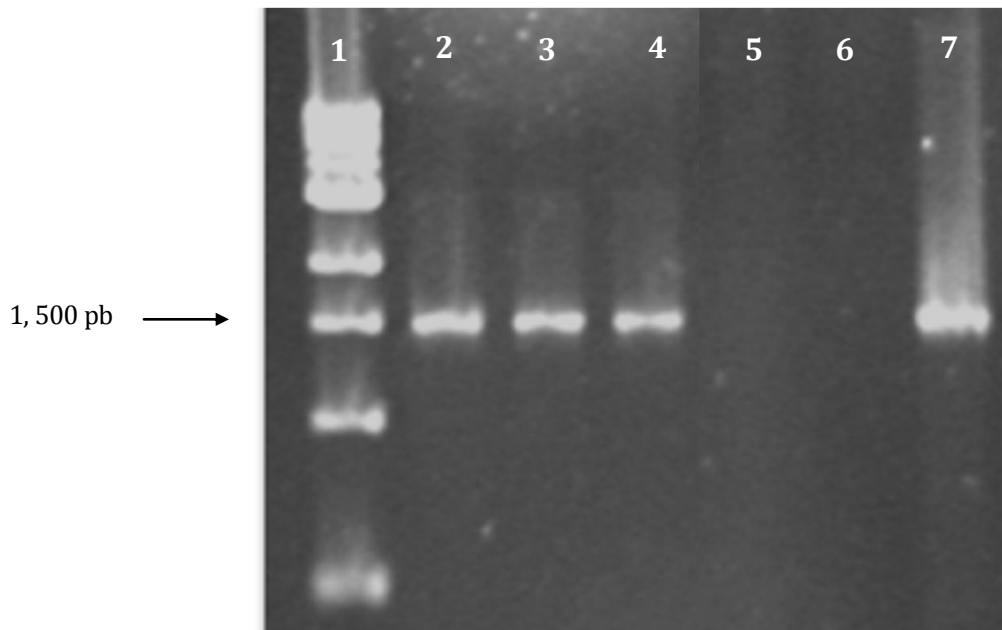


Figura 3.1. Productos de PCR amplificados con los iniciadores universales 16S (Gurtler & Stanisich 1996) para comprobar la presencia de una bacteria en ADN metagenómico de *C. coronatus*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1) Marcador 1kb; Carril 2) Metagenoma *C. coronatus* aislamiento Lyco 1; Carril 3) Metagenoma *C. coronatus* ARSEF 512; Carril 4) Metagenoma *C. coronatus* ATCC 32865; Carril 5) *Beauveria bassiana* testigo negativo; Carril 6) *Metarhizium anisopliae* testigo negativo y Carril 7) *Escherichia coli*, testigo positivo.

Con la finalidad de describir la relación de una bacteria probablemente endosimbiótica, se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético con el método neighbor-joining (NJ) usando secuencias consenso del gen 16S rARN, de cada uno de los tres aislamientos del hongo *C. coronatus* (Cuadro 3.1) y los resultados mostraron que los aislamientos utilizados en este trabajo están filogenéticamente emparentados con una bacteria no cultivada y con *Pseudomonas salomonii* (Figura 3.2). Se logró amplificar el gen completo de 16S rARN (alrededor de 1.5 kb).

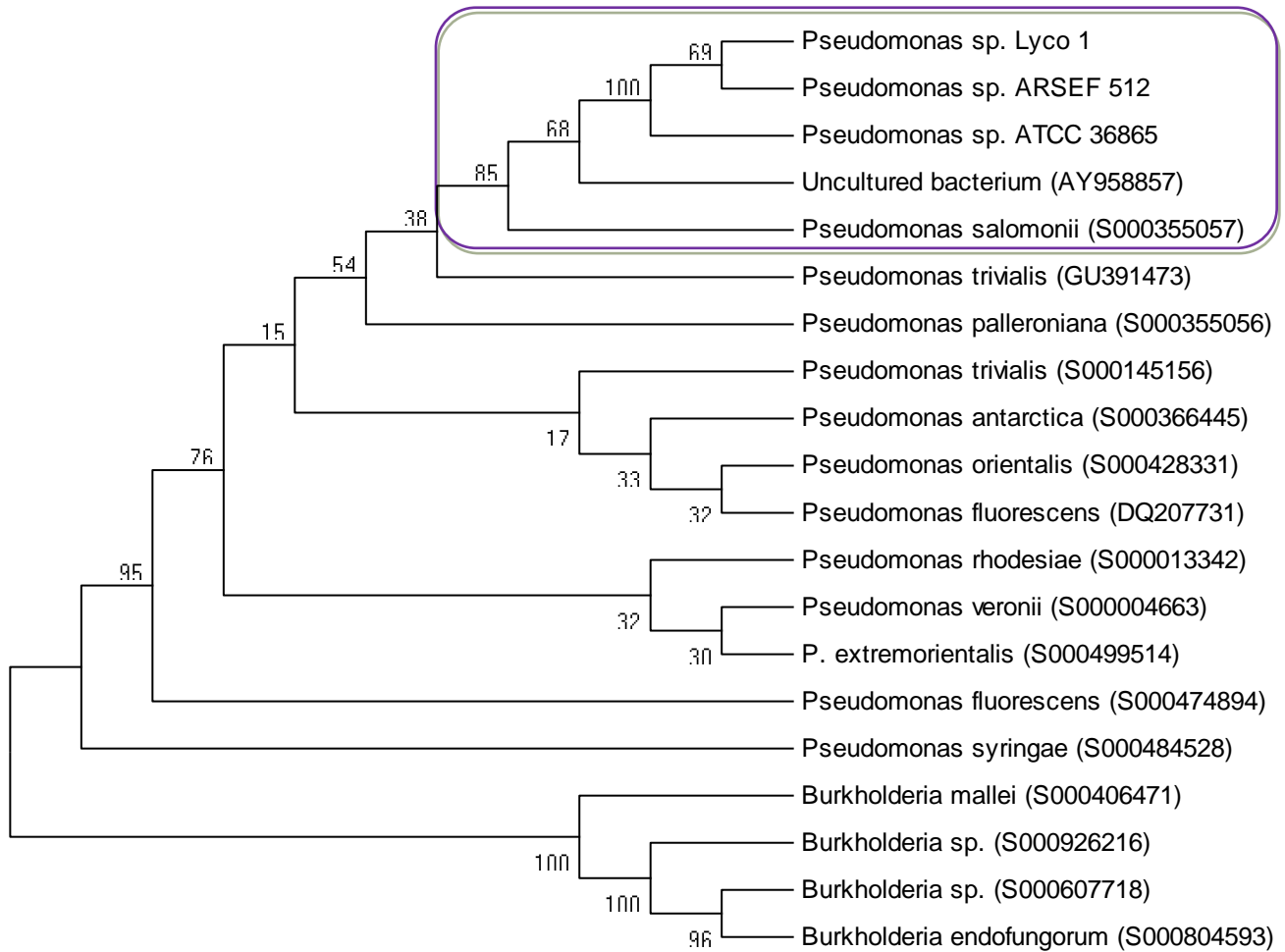


Figura 3.2. Árbol filogenético basado en secuencias del gen 16SrARN del endosimbionte *Pseudomonas* sp y representantes del género *Pseudomonas*, tomados del Ribosomal Databased Proyect (RDP); fue generado por el método neighbor-joining (NJ), se usó el parámetro Jukes-Cantor y la robustez de los nodos fue estimada por análisis bootstrap con 1000 réplicas. El número de acceso al RDP se encuentra entre paréntesis. Como grupo externo se usaron secuencias de género *Burkholderia*. Los números en cada punto de los nodos representan los valores Bootstrap. Los aislamientos del endosimbionte *Pseudomonas* sp están estrechamente emparentados con *P. salomonii*.

Microscopía láser confocal

Los resultados al examinar las muestras de micelio con un microscopio láser confocal demuestran que las bacterias están localizadas en el citosol de *C. coronatus* (Figuras 3.3 y 3.4). El colorante SYTO 9 es específico para bacterias y puede distinguir entre vivas y muertas; se puede observar que el micelio de *C. coronatus* alberga una gran cantidad de bacterias que aparecen como puntos verdes fluorescentes, lo que indica que las bacterias estaban vivas al momento del análisis (Figuras 3.3 y 3.4). Las bacterias también se localizaron en las esporas de *C. coronatus* lo cual indica que las bacterias estaban vivas al momento del análisis (Figura 3.4). La bacteria estuvo presente en los tres aislamientos evaluados tanto en micelio como en esporas. No se detectó la presencia de bacterias en el testigo negativo (Figura 3.4).

Discusión

Los resultados obtenidos de la amplificación del gen 16S rADN y de los análisis morfológicos por microscopía láser confocal en los tres aislamientos de *C. coronatus* (cuadro 3.1) muestran que existe una endosimbiosis entre el hongo *C. coronatus* y una bacteria. Lo anterior es factible, ya que en primera instancia se logró amplificar y secuenciar el gen 16S rADN completo usando primers universales; la comparación con la base de datos del NCBI y el árbol filogenético generado por el método neighbor-joining (NJ) (Saitou & Nei 1987) revelan que la bacteria pertenece al género *Pseudomonas*. Sin embargo, aunque se pudo determinar la existencia de bacterias al confirmar la presencia de gen 16S rADN en el metagenoma de *C. coronatus*, era necesario determinar la localización de las mismas y averiguar si su desarrollo era extracelular o endosimbionte. Para esto, se usó el colorante SYTO 9 (que es específico para bacterias) y se logró reconocer las bacterias vivas en el citosol (Partida-Martinez & Hertweck 2005). Tanto las esporas como el micelio de *C. coronatus* de los tres aislamientos evaluados presentan desarrollo de la bacteria en el citosol, por lo que con esta prueba se confirma la endosimbiosis. Según lo reportado por Lumini *et al.* (2006), para que se pueda aplicar el término endosimbiosis, los organismos involucrados deben estar vivos al momento del análisis, lo cual se cumplió en el presente estudio, puesto que, en primer lugar, el colorante SYTO 9 logra identificar a las bacterias

vivas y, en segundo lugar el método utilizado permitía mantener vivos tanto a la bacteria como el hongo. De hecho, un objetivo de dicho método era reducir el estrés al mínimo tanto de las esporas como del micelio de *C. coronatus* evaluado, lo cual se puede apreciar en las Figuras 3.3 y 3.4. Con el microscopía láser confocal se realizó un video a partir de capturas sucesivas de fotografías (pruebas no mostradas); gracias a ello se pudo demostrar que las bacterias tenían movimiento al interior tanto de esporas como del micelio y que este último tenía crecimiento en la zona apical.

Este trabajo es el primer reporte de una endosimbiosis en la que está involucrado un hongo entomoforal y una bacteria del genero *Pseudomonas*. Desde la primera observación de bacterias en el citoplasma de los hongos en 1980, sólo unos pocos reportes de bacterias endofúngicas (Bonfante 2003; Bianciotto *et al.* 2003; de Boer *et al.* 2005; Artursson *et al.* 2006; Lumini *et al.* 2006) han sido publicados. La endosimbiosis es un evento poco común; Schmitt *et al.* (2008) afirman que hicieron evaluaciones de 300 muestras de hongos pertenecientes a los Zygomycetes por análisis PCR y solamente en unos cuantos aislamientos de *Rhizopus* se determinó la presencia de una bacteria, esto permitió comprender la importancia de los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, en ninguno de los reportes de endosimbiosis hongo-bacteria se había logrado cultivar la bacteria (Van Oevelen *et al.* 2002). La endosimbiosis de reinos cruzados entre el hongo *Rhizopus microsporus* y la bacteria *Burkholderia sp.* (Partida-Martínez & Hertweck 2005) es el primer reporte donde la bacteria pudo ser aislada y esto ha permitido realizar un gran número de estudios que usaremos como parámetro para discutir los resultados de esta investigación.

En primer lugar, Partida-Martínez & Hertweck (2005) descubrieron que la producción de rizoxinas depende del endosimbionte bacterial (*Burkholderia sp.*). En un estudio posterior sobre esta endosimbiosis se descubrió que para la producción de esporas vegetativas en el hongo *Rhizopus* necesita del endosimbionte bacterial. *Rhizopus* sin la bacteria no puede producir esporas, con lo que se asegura su permanencia en la interacción hongo-simbionte. En contraste, el endosimbionte puede sobrevivir al menos *in vitro* sin el hospedante eucarionte (Partida-Martínez *et al.* 2007). Es interesante mencionar que *C. coronatus* es también un Zygomycete y su bacteria endosimbióntica está cercanamente emparentada con *Burkholderia*. La asociación *Rhizopus-Burkholderia* es muy atractiva porque se ha demostrado la función de la bacteria.

Existen otros dos casos poco citados: *Candidatus Glomeribacter gigasporum* encontrado como endosimbionte de micorrizas arbusculares (AM) (Bianciotto *et al.* 2003), que a diferencia de la endosimbiosis entre *Rhizopus* y *Burkholderia*, *Glomeribacter gigasporarum* no depende del huésped (Glomeromycota) para su supervivencia o reproducción y remover la bacteria reduce la proliferación de las hifas. Por otro lado, en la simbiosis entre *G. pyriforme* y *Nostoc punctiforme*, este último provee a la asociación la capacidad (por lo menos potencialmente) de reducir el acetileno y de fijar el nitrógeno atmosférico (Kluge *et al.* 1992).

Según una evaluación molecular realizada por Castrillo & Pawlowska (2009) siguiendo patrones de evolución molecular, la asociaciones endosimbióticas hongo-bacteria no tienen modelos bien definidos, a diferencia de endosimbiosis entre otros organismos. Ocurre a veces que hay diferencias entre las bacterias de vida libre respecto de las endosimbióticas como *G. gigasporarum*- Glomeromycota (Bianciotto *et al.* 2003). En otros casos, las bacterias de vida libre son idénticas a las endosimbióticas, como en *Rhizopus-Burkholderia*, donde Partida-Martínez & Hertweck (2005) pudieron aislar a la bacteria *Burkholderia*; ambos tipos de bacterias tienen requerimientos de medio de cultivo similares y no necesitan de su hospedero para desarrollarse, gracias a lo cual lograron determinar la función de la bacteria. Partida-Martínez *et al.* (2007c) respaldan lo anterior porque encontraron que la bacteria endosimbiótica *Burkholderia* produce la misma cantidad de toxina estando asociada con *Rhizopus* que al ser cultivada sin él. En nuestro caso no logramos aislar la bacteria *Pseudomonas sp.* (resultados no mostrados); se siguió el método descrito por Partida-Martínez & Hertweck (2005) y ésta sólo se desarrollaba en la presencia de *C. coronatus*. Este dato y las diferencias entre aislamientos de *C. coronatus* (Figura 3.2) nos hacen pensar que las bacterias de vida libre son diferentes de las endosimbióticas.

En cuanto al análisis filogenético, los resultados obtenidos no son suficientes para determinar la especie de la bacteria endosimbiótica, o bien, si se trata de más de una especie. Se requiere un estudio polifásico que incluya reasociación ADN-ADN (cepas que comparten una similitud del 70% o más son consideradas una misma especie) y criterios fenotípicos (Rodicio & Mendoza 2004; Partida-Martínez *et al.* 2007 b; Boemare & Tailliez 2009) pues es bien sabido que en bacterias, la secuenciación del ADNr 16S no aportará siempre una identificación definitiva a nivel de especie (Patel 2001) y que en ocasiones, aunque exista una identidad del 99-100% a nivel

de ADNr 16S, al realizar estudios de reasociación ADN-ADN su porcentaje de similitud es inferior al 50 %, lo que los coloca en una especie diferente (Stackebrandt & Goebel 1994). Estas consideraciones nos ayudan a explicar por qué al hacer el BLAST en la base de datos de NCBI de nuestras secuencias del ADNr 16S, teníamos porcentajes de identidad del 99% con una bacteria no cultivada (*Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas trivialis*) y al realizar el árbol filogenético con el método (NJ), los aislamientos utilizados en esta investigación están filogenéticamente emparentados con una bacteria no cultivada y con *P. salomonii* (Figura 3.2), aun cuando se consideraron en el análisis filogenético las secuencias resultado de la prueba BLAST.

Con nuestros resultados, inferimos que podríamos tener más de una especie de bacteria y éstas podrían relacionarse con el origen del hospedero. Es evidente la diferencia que existe entre las bacterias endosimbiontes obtenidas del metagenoma de *C. coronatus* de humanos y las bacterias endosimbiontes obtenidas del metagenoma de *C. coronatus* de insectos (Figura 3.2), lo que se aprecia por la separación entre ambas en el árbol filogenético. *C. coronatus* es un hongo multihospedero, su gama de hospedantes incluye insectos (Sajap *et al.* 1997), mamíferos (humanos) (Valle *et al.* 2001) y también se le ha encontrado en forma saprofitica en el suelo (Papierok *et al.* 1993). En estudios previos no publicados, evaluamos la variación genética de diferentes aislamientos de *C. coronatus* procedente de diferentes hospedantes, con la ayuda de las técnicas moleculares RAPD, SSR y secuenciación de ITS 1 y 2 y región 5.8 (intrones ubicados entre los genes rADN 28S y 18S) y los resultados muestran una variación intraespecífica y una clara distancia genética entre aislamientos obtenidos de humanos y otras fuentes (insectos y suelo). Por su parte, el género *Pseudomonas* es un grupo de bacterias con una gran versatilidad metabólica porque utiliza un gran número de compuestos orgánicos. Sus miembros son reconocidos como saprófitos y reportados como patógenos de plantas, animales y humanos (Palleroni 1991). El hecho de que ambos organismos sean multihospederos y que exista una diferencia entre los procedentes de humanos y otra fuente nos hace considerar que han evolucionado conjuntamente, al igual que otras asociaciones endosimbióticas. El género *Pseudomonas* está citado como causante de enfermedades en pacientes inmunocomprometidos (Rolston 2005) y a su vez el hongo *C. coronatus* está mencionado como causante de micosis subcutánea en humanos (rinoentomofotoromicosis), aunque los reportes de ataques en insectos son mucho más frecuentes (Valle *et al.* 2001).

Existe una hipótesis sobre la posibilidad que la bacteria sea la responsable de la patogenicidad y ésta nace con el descubrimiento de la endosimbiosis *Rhizopus* y la bacteria *Burkholderia sp* (Partida-Martínez y Hertweck, 2005) y en esta relación endosimbiótica se cumple el mismo principio: ambos organismos involucrados son multihospedero y patógenos de humanos. Por su parte, el género *Burkholderia* está compuesto de un grupo de bacterias metabólicamente versátiles que ocupan nichos ecológicos diversos, como animales y humanos (Coenye & Vandamme 2003) y diversos miembros viven en simbiosis (Bianciotto *et al.* 2003). Por otra parte, *Rhizopus* es también un hongo multihospedero y reportado como patógeno oportunista de humanos (Ribes *et al.* 2000).

Pese a que las rizoxinas están reportadas como promotoras de zigomicosis en humanos (Ribes *et al.* 2000), éstas no son indispensables para que se desarrolle la enfermedad. Sobre la relación de *Rhizopus* con la bacteria *Burkholderia sp* Partida- Martinez *et al.* (2008) demostraron que no en todos los aislamientos tomados de lesiones humanas se encuentra la bacteria endosimbiótica y por lo tanto, la rizoxina no es el factor que determina la patogenicidad en humanos o bien, podría existir otro factor que determine la virulencia. En nuestro caso, el aislamiento de *C. coronatus* procedente de humanos sí contiene a la bacteria endosimbiótica y ésta es genéticamente diferente de las provenientes de otras fuentes. De esto se podría inferir que no es la rizoxina la que determina la patogenicidad en humanos, pero que existe otro metabolito producido por la bacteria que lo determina.

Pseudomonas ha sido reportada como simbiote en un hongo patógeno de humanos (*Candida albicans*) (Hogan & Kolter 2002; Valdivia & Heitman 2007); para el caso de *P. fluorescens*, es muy interesante el hecho que comparte con *Burkholderia* la presencia del gen *rhiE*, que es responsable de la biosíntesis de rizoxina (Partida-Martínez & Hertweck 2007; Brendel *et al.* 2007).

Dadas las bacterias endosimbióticas conocidas asociadas a hongos (*Pseudomonas*, *Burkholderia*) y protistas, no sería de sorprenderse si las enfermedades causadas por algunos patógenos eucarióticos fueran influenciadas por los endosimbiontes bacteriales (Valdivia & Heitman 2007), pero hasta ahora no se ha estudiado el factor de virulencia que determina dicha patogenicidad. Al respecto es interesante lo enunciado por Chamilos *et al.* (2006), quienes

postulan que el aumento en el número de reportes por zigomicosis ocasionados por *Rhizopus* está relacionado con el uso de antibacteriales, lo que ha propiciado que las bacterias endosimbióticas generen resistencia al antibiótico.

Descubrir una endosimbiosis ayuda a encontrar más datos que nos permitan entender sobre la biología de las bacterias y descubrir los mecanismos que les hacen llegar a ser endosimbióticas. En conclusión, este trabajo demuestra que el hongo *C. coronatus* está asociado con una bacteria endosimbiótica, que pudo ser claramente ubicada en el género *Pseudomonas*. Los escasos reportes de endosimbiosis hongo-bacteria hacen que los resultados de esta investigación sean importantes ya que *C. coronatus* puede servir como modelo para entender más sobre este tipo de asociaciones.

Una ventaja del descubrimiento de endosimbiosis *C. coronatus* y *Pseudomonas* radica en el hecho que la bacteria está reportada como productora de rizoxina y ésta detiene la división de algunas líneas de células cancerígenas en humanos; el compuesto está bajo investigación como agente antitumoral en potencia (Sanders 2005), así que la identificación de los genes involucrados en la producción de rizoxina pueden constituir información valiosa para los investigadores de cáncer.

En esta parte de esta investigación se podría especular que la bacteria *Pseudomonas* sp juega un papel importante en la patogénesis de *C. coronatus* y que incluso hay más de una especie de bacteria involucrada y cada una de ellas determina el tipo de organismo que *C. coronatus* puede atacar, e incluso se podría especular con base en los resultados moleculares, tanto de la bacteria como del hongo, que existe un aislamiento que no es patógeno para humanos; sin embargo, hay un gran camino por recorrer antes de afirmar tal circunstancia.

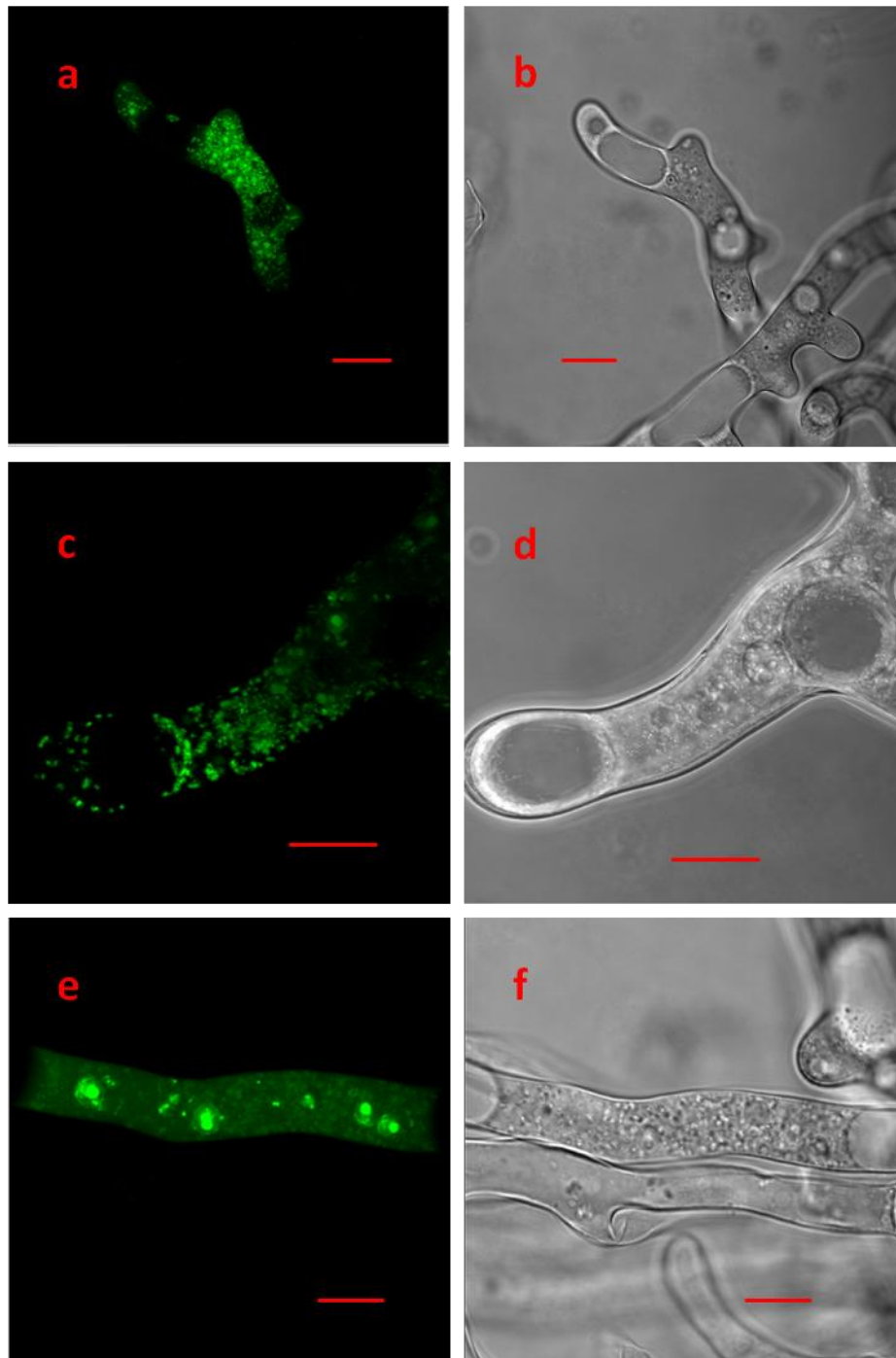


Figura 3.3. Fotografía microscópica tomada con microscopía láser confocal de fluorescencia, evidenciando la presencia de la bacteria endosimbiótica *Pseudomonas* sp dentro del citosol del hongo *C. coronatus*. El micelio fue teñido con SYTO 9 green-Fluorescent Live/dead BacLight Bacterial Viability Kit y observado usando un microscopio metaláser (Zeiss LSM 510) a 480/500 nm. La fluorescencia verde indica que la bacteria está viva. a) Aislamiento Lyco1; b) Aislamiento Lyco1, fotografía tomada sin el modo fluorescente; c) Aislamiento ARSEF 512; d) Aislamiento ARSEF 512, fotografía tomada sin el modo fluorescente; e) Aislamiento ATCC 32865; f) Aislamiento ATCC 32865, fotografía tomada sin el modo fluorescente. En todos los casos la barra roja representa 10 μ m.

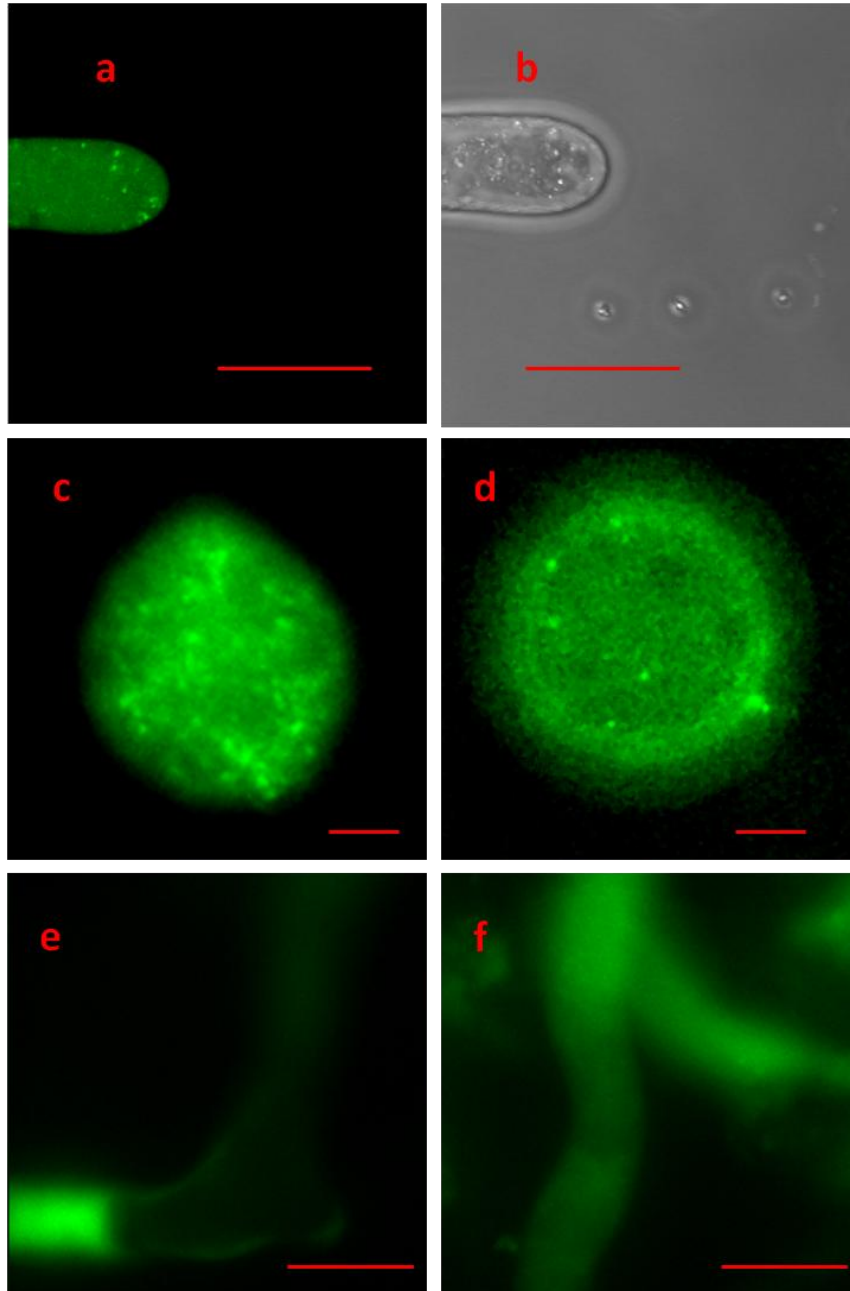


Figura 3.4. Fotografía microscópica tomada con microscopía láser confocal de fluorescencia, evidenciando la presencia de la bacteria endosimbiótica *Pseudomonas* sp dentro del citosol del hongo *C. coronatus*. El micelio fue teñido con SYTO 9 green-Fluorescent Live/dead BacLight Bacterial Viability Kit y observado usando un microscopio metaláser (Zeiss LSM 510) a 480/500 nm. La fluorescencia verde indica que la bacteria está viva. a) micelio del aislamiento Lyc01; b) micelio del aislamiento Lyc01, fotografía tomada sin el modo fluorescente; c) espora del aislamiento ARSEF 512; d) espora del aislamiento ARSEF 512, fotografía tomada sin fluorescencia; e) micelio de *Zoophthora phalloides* usado como testigo negativo, aislamiento NW 418 ; f) micelio de *Zoophthora phalloides* usado como testigo negativo, aislamiento NW 418. Se puede apreciar que en el testigo, negativo aunque hay fluorescencia ésta no corresponde a la presencia de bacterias, mismas que se aprecian con un tono fluorescente más intenso en forma de puntos. En todos los casos la barra roja representa 10µm.

Bibliografía

- Ahrens U & Seemüller E**, 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S RNA gene. *Phytopathology* **82**: 828-832.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**:403-410.
- Artursson V, Finlay RD, Jansson JK**, 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* **8**: 1-10.
- Barbieri E, Potenza L, Rossi I, Sisti D, Giomaro G, Rossetti S, Beimfohr C, Stocchi V**, 2000. Phylogenetic characterization and in situ detection of a Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides phylogroup bacterium in *Tuber borchii* Vittad ectomycorrhizal mycelium. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5035-5042.
- Bertaux J, Schmid M, Hutzler P, Hartmann A, Garbaye J, Frey-Klett P**. 2005. Occurrence and distribution of endobacteria in the plant-associated mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Environmental Microbiology* **7**: 1786-1795.
- Bianciotto V, Lumini E, Bonfante P & Vandamme P**, 2003. '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 121-124.
- Boemare N & Tailliez P**, 2009. Molecular approaches and techniques for the study of entomopathogenic bacteria. In: Stock SP, Vanderberg J, Boemare N (eds), *Insect pathogens. Molecular approaches and techniques*. CABI. 32 -44
- Bonfante P**, 2003. Plants, mycorrhizal fungi and endobacteria: a dialog among cells and genomes. *The Biological Bulletin* **204**:215-220.
- Bonilla-Rosso G, Souza V, Eguiarte LE**, 2008. Metagenómica, genómica y ecología molecular: la nueva ecología en el bicentenario de Darwin. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.* **11** (1): 41-51.

- Brendel NLP, Partida-Martinez K, Scherlach K & Hertweck C.** 2007. A cryptic PKS/NRPS gene cluster in the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 codes for the biosynthesis of an antimitotic rhizoxin complex. *Organic and Biomolecular Chemistry* **5**:2211–2213.
- Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP,** 2006. Multidrug-resistant endosymbiotic bacteria account for the emergence of zygomycosis: A hypothesis. *Fungal Genetics and Biology* **44** (2):88-92.
- Castillo DM & Pawlowska TE,** 2009. Molecular Evolution in Bacterial Endosymbionts of Fungi. *Molecular Biology and Evolution* **27** (3):622-636.
- Coenye T & Vandamme P,** 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* **5**: 719–729.
- de Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L.** 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews* **29**: 795-811.
- Dale C & Moran NA.** 2006. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell* **126**:453-465.
- Grube M & Berg G,** 2009. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis . *Fungal Biology Review* **23**: 72-85.
- Gurtler V & Stanisich VA,** 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142**:3-16.
- Guzmán FA, Atkins SD, Alderson PG and Pell JK,** 2004. Development of species-specific diagnostic primers for *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii*; two co-occurring fungal pathogens of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Mycological Research* **112**: 1227-1240.
- Hogan DA & Kolter R.** 2002. *Pseudomonas–Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science* **296**: 2229–2232.
- Kluge M, Mollenhauer D, Mollenhauer R, Kape R.** 1992. *Geosiphon pyriforme*, an endosymbiotic consortium of a fungus and a cyanobacterium (*Nostoc*), fixes nitrogen. *Acta Botánica* **105**: 343-344.
- Lumini ES, Ghignone V, Bianciotto & Bonfante P,** 2006. Endobacteria or bacterial endosymbionts? To be or not to be. *New Phytologist*. **170**:205–208.

- Moran NA**, 2006. Symbiosis. *Current Biology* **16** (20): R866-R871.
- Ochman H & Moran AN**, 2001. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* **292**: 1096-1098.
- Palleroni NJ**, 1991 Human and animal pathogenic *Pseudomonas*. In: *Prokaryotes* (Balows, A., Ed.), pp. 3086–3103. Springer, New York.
- Papierok B, Rafanomezantsoa-Randriambololona BN, Ziat N**, 1993. Nouvelles données sur l'Écologie et le comportement entomopathogène expérimental de 60 l'entomophthorale *Conidiobolus coronatus* (Zygomycètes). *Entomophaga* **38**: 299-312.
- Partida-Martínez LP, Hertweck C**. 2005. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature* **437**:884-888.
- Partida-Martinez LP, Monajembashi S, Greulich KO, Hertweck C**, 2007 a. Endosymbiont-dependent host reproduction maintains bacterial-fungal mutualism. *Current Biology* **17**:773–777.
- Partida-Martinez LP, Groth I, Schmitt I, Richter W, Roth M, Hertweck C**, 2007 b. *Burkholderia rhizoxinica* sp. nov. and *Burkholderia endofungorum* sp. nov., bacterial endosymbionts of the plant-pathogenic fungus *Rhizopus microspores*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 2583–2590.
- Partida-Martinez LP, Flores dL, Ishida C, Ishida K, Roth M, Buder K, & Hertweck, C**, 2007c. Rhizonin, the first mycotoxin isolated from the zygomycota, is not a fungal metabolite but is produced by bacterial endosymbionts. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 793–797.
- Partida-Martinez LP & Hertweck C**, 2007. A gene cluster encoding rhizoxin biosynthesis in *Burkholderia rhizoxina*, the bacterial endosymbiont of the fungus *Rhizopus microsporus*. *Chembiochem* **8**:41–45.
- Partida-Martinez LP, Rüchel R, Dannoui E & Hertweck C**. 2008. Lack of evidence for endofungal bacteria in the development of *Rhizopus*-borne Zygomycoses in humans. *Mycoses* **51**:266–269.
- Patel JB**. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Journal of Molecular Diagnostics* **6**:313-21.

- Ribes JA, Vanover-Sams CL & Baker DJ**, 2000. Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews* **13**:236–301.
- Rodicio MR & Mendoza MC**, 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **22**(4):238-45.
- Rolston KV**, 2005. Challenges in the treatment of infections caused by gram-positive and gram-negative bacteria in patients with cancer and neutropenia. *Clinical Infectious Diseases* **40**: S246–S252.
- Sajap SA, Atim BA, Husin H & Wahab AY**, 1997. Isolation of *Conidiobolus coronatus* (Zygomycetes:Entomphthorales) from soil and its effects on *Coptotermes curvignatus* (Isoptera:Rhinotermitidae). *Journal Sociobiology* **30**(3):257-262.
- Sambrook J & Russel DW**, 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmitt I, Partida-Martinez LP, Winkler R, Voigt K, Einax E, Dölz F, Telle S, Wöstemeyer J & Hertweck C**, 2008. Evolution of host resistance in a toxin-producing bacterial–fungal alliance. *The ISME Journal* **2**: 632–641.
- Sanders IR**, 2005. Microbiology: conspirators in blight. *Nature* **437**:823-824.
- Stackebrandt E & Goebel BM**, 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**:846-9.
- Saitou N & Nei M**, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* **4** (4):406-25.
- Tamura KJ, Dudley M, Nei & Kumar S**, 2007. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v.4*. Center of Evolutionary Functional Genomics Biodesign Institute Arizona State University.

- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG, 1997.** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple alignments aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876–4882.
- Van Oevelen S, De Wachter R, Vandamme P, Robbrecht E & Prinsen E, 2002.** Identification of the bacterial endosymbionts in leaf galls of *Psychotria* (Rubiaceae, angiosperms) and proposal of '*Candidatus Burkholderia kirki*' sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 2023–2027.
- Valle A CF, Wanke B, Lazéra MD, Monteiro PCF & Viegas ML, 2001.** Entomophthoromycosis by *Conidiobolus coronatus* report of a case successfully treated with combination of Itraconazole and Fluconazole. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **43**(4).
- Valdivia RH & Heitman J, 2007.** Endosymbiosis: the evil within. *Current Biology* **17** (11):R408-R410
- Woyke et al., 2006.** Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* **443**: 950-955.
- Zinder SH & Salyers AA, 2005.** Microbial ecology—new directions, new importance. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. pp 101-110.

Discusión general

El hongo *Conidiobolus coronatus* está reportado como patógeno de insectos y es saprófito del suelo (Hartmann & Wasti 1974; Sajap *et al.* 1997). Como agente de control biológico, destaca por su alta virulencia ya que logra matar el 100% de insectos en 12 horas (evaluaciones sobre *Coptotermes curvignathus*) (Hartmann & Wasti 1974). Desafortunadamente *C. coronatus* está reportado como causante de micosis subcutánea en humanos (rinoentomofotoromicosis) (Segura *et al.* 1981; Valle *et al.* 2001), lo que limita su uso como agente de control biológico debido a que por cuestiones de bioseguridad, un plaguicida microbiano (bioinsecticida) no puede ser usado si daña organismos no blanco (Siegel 1997) o si existe evidencia de alteraciones patológicas en piel y ojos en humanos u otros mamíferos (Toriello *et al.* 2006).

La distribución cosmopolita de *C. coronatus*, la amplia gama de hospedantes que puede infectar y los escasos reportes de ataque en humanos (más aún porque éstos se restringen a ciertas zonas geográficas) nos hace suponer que probablemente no todos los aislamientos son patógenos para humanos y/o que existe algún factor hasta ahora desconocido que propicia la afección en humanos bajo ciertas condiciones (Ribes *et al.* 2000; Wieloch *et al.* 2004).

Tras realizar este trabajo, encontramos que existe una clara distancia genética entre aislamientos evaluados provenientes de humanos y otras fuentes (insectos, suelo). De los aislamientos evaluados, ATCC 32865 presentó el mayor nivel de polimorfismo respecto de los demás y podría atribuirse al hecho de haber sido tomado de lesiones humanas. El resultado fue el mismo para las tres técnicas moleculares usadas (RAPD, SSR y secuenciación de la región ITS). Los resultados se pueden considerar válidos debido a que fueron consistentes con los tres métodos, lo que satisface el hecho de que es necesario confirmar con al menos un método distinto (Soll 2000).

Existen reportes de estudios no moleculares en los que se ha encontrado diferenciación entre aislamientos tomados de humanos y los que provienen de otras fuentes; Mier *et al.* (1980) y Papierok *et al.* (1993) consideran que sólo los aislamientos obtenidos de humanos son capaces de

desarrollarse a 37°C y dicha temperatura es un criterio para evaluar el potencial de éste u otros hongos para actuar como patógeno de humanos (Hall *et al.* 1982). Durante el desarrollo de esta investigación se observó que la velocidad de desarrollo y apariencia fueron otros aspectos que sustentan las diferencias con los aislamientos de insectos y suelo, ya que el aislamiento de humanos ATCC 32865 fue el único que mostró diferencias en esas características; tardó casi cuatro días más con respecto a los obtenidos de insectos en llenar una caja Petri (datos no presentados), además que su aspecto no es tan rugoso y llega a tener una apariencia algodonosa y tonalidades grisáceas, características que nunca se presentaron en los demás aislamientos evaluados con las técnicas RAPD y SSR, lo que podría atribuirse a que fue tomado de lesiones humanas y a la vez sugiere que la fuente del aislamiento podría ser un factor que genera diferencia en las distancias genéticas.

Considerando los reportes como patógeno de insectos, humanos y saprófitos y haciendo uso de los resultados del presente estudio, que muestran una clara variación intraespecífica entre aislamientos obtenidos de humanos, insectos y otras fuentes, consideramos que *C. coronatus* podría servir como modelo para evaluar mecanismos de virulencia fúngica que lo hacen específico para cada uno de estos grupos de organismos hospedantes. De esta forma, se podría realizar una separación genética de aquello que determina la virulencia del hongo durante la patogénesis de un insecto o un mamífero (humano).

La importancia de estos resultados radica en que en este estudio se encontró variación entre aislamientos del mismo organismo tomados de diferentes fuentes; otros autores (O'Donnell *et al.* 2004; Anaissie *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2006) han buscado diferencias intraespecíficas en hongos. Ortoneda *et al.* (2004) realizaron estudios del complejo de especies de *Fusarium*, que aunque no pertenece a los Zygomycetes, comparte con *C. coronatus* la característica de tener una amplia gama de hospederos dentro de los cuales se encuentra el humano. Es importante mencionar que para *C. coronatus* no existe investigación previa sobre la relación entre variación genética y hospedante/origen geográfico. Los resultados del presente estudio revelan que las técnicas RAPD, SSR e ITS son una herramienta adecuada para identificar diferencias intraespecíficas en *C. coronatus* relacionadas con el hospedero. Además, estos resultados podrían ayudar a generar una herramienta para el mejor entendimiento de la epidemiología de la

riñoentomofotoromicosis, con lo que el diagnóstico sería más efectivo y por lo tanto, su tratamiento, como lo hicieron Vilela *et al.* (2010) con *C. lampragues* al utilizar técnicas moleculares como herramienta para la identificación de aislamientos; su estudio filogenético separa dos grupos hermanos bien definidos en el género *Conidiobolus*. Con nuestros resultados se podrían diseñar iniciadores con las secuencias ITS considerando las diferencias en las secuencias entre los provenientes de humanos y otras fuentes (Galgóczy 2005).

La segunda etapa de este trabajo involucró estudios para determinar la presencia de una posible endosimbiosis entre *C. coronatus* y una bacteria. Los resultados obtenidos de la amplificación del gen 16S rARN y de los análisis morfológicos por microscopía láser confocal en tres aislamientos de *C. coronatus* demuestran que existe una endosimbiosis entre el hongo *C. coronatus* y una bacteria. El árbol filogenético generado por el método neighbor-joining (NJ) revela que la bacteria pertenece al género *Pseudomonas*. Tanto las esporas como el micelio de los tres aislamientos de *C. coronatus* evaluados presentaron desarrollo de la bacteria en el citosol, por lo que con esta prueba se confirma la endosimbiosis. Más aún y en congruencia con lo reportado por Lumini *et al.* (2006), para que se pueda aplicar el término endosimbiosis, los organismos involucrados deben estar vivos al momento del análisis, condición que se cumplió en el presente estudio.

Este trabajo es el primer reporte de una endosimbiosis en la que está involucrado un hongo entomoforal y una bacteria del género *Pseudomonas*. Desde la primera observación de bacterias en el citoplasma de los hongos en 1980, pocos reportes de bacterias endofúngicas (Bonfante 2003; Bianciotto *et al.* 2003; de Boer *et al.* 2005; Artursson *et al.* 2006; Lumini *et al.* 2006) han sido publicados y hasta el momento, la endosimbiosis se ha reportado como un evento poco común. Schmitt *et al.* (2008) afirman que hicieron evaluaciones de 300 muestras de hongos pertenecientes a los Zygomycetes por análisis PCR y solamente en unos cuantos aislamientos de *Rhizopus* se determinó la presencia de una bacteria; casos como este permiten comprender la importancia de los resultados obtenidos en esta investigación.

Con los resultados de este trabajo, inferimos que podríamos tener más de una especie de bacteria y que cada especie podría estar relacionada con el hospedero del que proviene. Es evidente la diferencia que existe entre las bacterias endosimbiontes obtenidas del metagenoma de

C. coronatus de humanos y las bacterias endosimbiontes obtenidas del metagenoma de *C. coronatus* de insectos.

Los resultados de ambas etapas de nuestra investigación presentan un panorama muy interesante debido a que existe variación genética tanto en la bacteria como en el hongo bajo estudio, lo que podría atribuirse al hospedero del que provienen y para ambos organismos existe una clara diferencia entre aquéllos que provienen de humanos y los de otras fuentes.

Además de las similitudes mostradas por los resultados de nuestras pruebas moleculares, *Pseudomonas* tiene en común otros aspectos con *C. coronatus*: es un grupo de bacterias con una gran versatilidad metabólica porque utiliza un amplio número de compuestos orgánicos; sus miembros son reconocidos como saprófitos y reportados como patógenos de plantas, animales y humanos (Palleroni 1991) y se cita como causante de enfermedades en pacientes inmunocomprometidos (Rolston 2005), mientras que el hongo *C. coronatus* es causante de micosis subcutánea en humanos (rinoentomofotoromicosis). El hecho de que ambos organismos sean multihospederos y que exista una diferencia entre los procedentes de humanos y otra fuente apunta a que han evolucionado conjuntamente, al igual que otros organismos involucrados en asociaciones endosimbióticas para con ello poder mantener dicha asociación (Douglas 2010).

Existe una hipótesis sobre la posibilidad que la bacteria sea la responsable de la patogenicidad, que nace con el descubrimiento de la endosimbiosis *Rhizopus* y la bacteria *Burkholderia* sp (Partida-Martínez y Hertweck, 2005) y en esta relación endosimbiótica se cumple el mismo principio: ambos organismos involucrados son multihospedero y patógenos de humanos. Al respecto, *Burkholderia* es un grupo de bacterias metabólicamente versátiles que ocupan nichos ecológicos diversos como patógeno de animales y humanos (Coenye & Vandamme 2003), incluso algunos individuos viven en simbiosis (Bianciotto *et al.* 2003). Por su parte, *Rhizopus* es también un hongo multihospedero y reportado como patógeno oportunista de humanos (Ribes *et al.* 2000).

Dadas las bacterias endosimbióticas conocidas asociadas a hongos (*Pseudomonas*, *Burkholderia*) y protistas, no sería sorprendente si las enfermedades causadas por algunos patógenos eucarióticos fueran influenciadas por los endosimbiontes bacteriales (Valdivia &

Heitman 2007), pero hasta ahora no se ha estudiado el factor que determina dicha patogenicidad. Al respecto es interesante lo enunciado por Chamilos *et al.* (2006) quienes postulan que el aumento en el número de reportes por zigomicosis ocasionados por *Rhizopus* está relacionado con el uso de antibacteriales, lo que ha propiciado que las bacterias endosimbióticas generen resistencia al antibiótico. *Pseudomonas* ha sido reportada como simbiote en un hongo patógeno de humanos (*Candida albicans*) (Hogan & Kolter 2002; Valdivia & Heitman 2007).

Corroborar una endosimbiosis permite generar información básica sobre la biología de las bacterias y de los mecanismos endosimbióticos. Los escasos reportes de endosimbiosis hongo-bacteria hacen que estos resultados sean un aporte debido a que *C. coronatus* puede servir como modelo para entender más sobre este tipo de asociación. Una ventaja del descubrimiento de la endosimbiosis *C. coronatus-Pseudomonas* es el hecho que la bacteria está reportada como productora de rizoxina y ésta detiene la división de algunas líneas de células cancerígenas en humanos; el compuesto está bajo investigación como agente antitumoral en potencia (Sanders 2005), así que la identificación de los genes involucrados en la producción de rizoxina proporciona datos para los investigadores de cáncer.

Los resultados de esta investigación apuntan a que la bacteria *Pseudomonas* sp juega un papel importante en la patogénesis de *C. coronatus* y que podría haber más de una especie de bacteria involucrada y cada una de ellas posiblemente determina el tipo de organismo que *C. coronatus* puede atacar; más aún, con los estos resultados moleculares tanto de la bacteria como del hongo, se puede especular que existe algún aislamiento que no es patógeno para humanos que podría considerarse candidato para ser usado como agente de control biológico; sin embargo hay mucho por recorrer antes de hacer tal aseveración, que podría abordarse aprovechando el enorme avance en los años recientes con métodos moleculares, que abren la posibilidad a la exploración de nuevas aproximaciones al estudio de las comunidades microbianas, porque permiten el análisis simultáneo de la caracterización taxonómica de las especies contenidas en una comunidad y las funciones que pueden desempeñar. Se recomienda un estudio más profundo de la relación hongo-bacteria usando el metagenoma, es necesario realizar análisis de la expresión del ARN, medir las tasas de traducción con variaciones temporales y finalmente; la cinética enzimática de las

proteínas más abundantes en condiciones naturales para realizar conclusiones respecto a la funcionalidad de la endosimbiosis y mejor comprensión de la misma (Bonilla-Rosso *et al.* 2008).

Bibliografía

- Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH, Francesconi A, Kasai M, Müller FM, Lozano-Chiu M, Summerbell RC, Dignani MC, Chanock SJ, & Walsh TJ, 2001.** Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clinical Infection Diseases* **33**:1871–1878.
- Artursson V, Finlay RD, Jansson JK, 2006.** Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* **8**: 1-10.
- Bianciotto V, Lumini E, Bonfante P & Vandamme P, 2003.** '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 121–124.
- Bonfante P, 2003.** Plants, mycorrhizal fungi and endobacteria: a dialog among cells and genomes. *The Biological Bulletin* **204**:215–220.
- Bonilla-Rosso G, Souza V, Eguiarte LE, 2008.** Metagenómica, genómica y ecología molecular: la nueva ecología en el bicentenario de Darwin. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* [en línea]: (fecha de consulta: 18 de noviembre de 2010).
- Chamilos G, Lewis RE and Kontoyiannis DP, 2006.** Multidrug-resistant endosymbiotic bacteria account for the emergence of zygomycosis: A hypothesis. *Fungal Genetics and Biology* **44** (2): 88-92.
- Coenye T & Vandamme P, 2003.** Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* **5**: 719–729.
- Douglas AE, 2010.** *The Symbiotic Habit*. Princeton University Press. 1-23.
- de Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L. 2005.** Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews* **29**: 795-811.
- Hall RA, Zimmermann G, Vey A, 1982.** Guidelines for the registration of entomogenous fungi as insecticides. *Entomophaga* **27**(2):121-127.
- Hartmann GC, Wasti SS, 1974.** Infection of the gypsy moth, *Porthetria dispar* with the entomogenous fungus *Conidiobolus coronatus*. *Entomophaga* **19**:353-360.

- Hogan DA & Kolter R.** 2002. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science* **296**: 2229–2232.
- Galgóczy L,** 2005. Molecular characterization of opportunistic pathogenic zygomycetes. *Acta Biologica Szegediensis* **49**(3-4):1-7.
- Lumini ES, Ghignone V, Bianciotto & Bonfante P,** 2006. Endobacteria or bacterial endosymbionts? To be or not to be. *New Phytologist* **170**:205–208.
- Mier T, Toriello C, García-Maynez AM, López-Martínez, R,** 1980. Efecto de diferentes factores físicos y nutricionales sobre el crecimiento de dos cepas de *Conidiobolus coronatus*. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* **14**: 69-79.
- O'Donnell KD, Sutton A, Rinaldi MG, Magnon KC, Cox PA, Revankar SG, Sanche S, Geiser DM, Juba JH, van Burik J-AH, Padhye A, Anaissie JH, Francesconi A, Walsh JT, Robinson SJ,** 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology.* **42**:5109–5120.
- Ortoneda M, Guarro J, Madrid PM. Caracuel Z, Roncero GMI, Mayayo E, Di Pietro A,** 2004. *Fusarium oxysporum* as multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and animals. *Infection and Immunity* **72**:1760–1766.
- Palleroni NJ,** 1991 Human and animal pathogenic *Pseudomonas*. In: *Prokaryotes* (Balows, A., Ed.), pp. 3086–3103. Springer, New York.
- Papierok B, Rafanomezantsoa- Randriambololona BN, Ziat N,** 1993. Nouvelles données sur l'écologie et le comportement entomopathogène experimental de 60 l'entomophthorale *Conidiobolus coronatus* (Zygomycetes). *Entomophaga* **38**: 299-312.
- Partida-Martínez LP & Hertweck C.** 2005. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature* **437**:884-888.
- Ribes AJ, Vanover-Sams LC, Baker JD,** 2000. Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews* **13**(2):236-301.
- Rolston KV,** 2005. Challenges in the treatment of infections caused by gram-positive and gram-negative bacteria in patients with cancer and neutropenia. *Clinical Infectious Diseases* **40**: S246–S252.

- Sajap SA, Atim BA, Husin H, Wahab AY**, 1997. Isolation of *Conidiobolus coronatus* (Zygomycetes:Entomophthorales) from soil and its effects on *Coptotermes curvignatus* (Isoptera:Rhinotermitidae). *Sociobiology* **30**(3):257-262.
- Segura JJ, González K, Berrocal J, Marin J**, 1981. Rhinoentomophthoromycosis report of the first two cases observed in Costa Rica (Central America), and review of the literature. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **30**(5): 1078-1084.
- Siegel JP**. 1997. Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals. *In: Manual of Techniques in Insect Pathology*, Lacey L (ed.). Academic Press, New York. pp. 325-336.
- Soll RD**, 2000. The Ins and Outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* **13** (2): 332-370.
- Schmitt I, Partida-Martinez LP, Winkler R, Voigt K, Einax E, Dölz F, Telle S, Wöstemeyer J & Hertweck C**, 2008. Evolution of host resistance in a toxin-producing bacterial-fungal alliance. *The ISME Journal* **2**: 632-641.
- Sanders IR**, 2005. Microbiology: conspirators in blight. *Nature* **437**:823-824.
- Toriello CN & Mier TG**, 2006. Bioseguridad de agentes de control microbiano. XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima.
- Valdivia RH & Heitman J**, 2007. Endosymbiosis: the evil within. *Current Biology* **17** (11):R408-R410.
- Valle ACF, Wanke B, Lazéra MD, Monteiro PCF, Viegas ML**, 2001. Entomophthoromycosis by *Conidiobolus coronatus* report of a case successfully treated with combination of itraconazole and fluconazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **43**(4).
- Vilela Raquel, Silvana M. S. Silva, Franklin Riet-Correa, Eduardo Dominguez & Leonel Mendoza**, 2010. Morphologic and phylogenetic characterization of *Conidiobolus lamprauges* recovered from infected sheep. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**(2):427-432.
- Wieloch W, Sacharczuk M, Mieczysława I, Boguś, Kazimierz J**, 2004. A study for minisatellitic markers of *Conidiobolus coronatus* pathogenicity to *Galleria mellonella* larvae. *Journal Invertebrate Pathology* **85**: 63-69.

Zhang N, O'Donnell K, Sutton AD, Nalim FA, Summerbell CR, Padhye AA, Geiser MD, 2006.
Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(6): 2186–2190.

Conclusiones generales

El polimorfismo detectado con las técnicas RAPD y SSR evidenció altos niveles de variación intraespecífica entre los aislamientos evaluados; además se encontró una relación entre variación genética y hospedante, pero no así para el origen geográfico.

Se obtuvo variación intraespecífica y una clara distancia genética entre aislamientos obtenidos de humanos y otras fuentes (insectos y suelo). Estos resultados son consistentes en las tres técnicas usadas RAPD, SSR y secuenciación de la región ITS.

Los resultados obtenidos de la amplificación del gen 16S rADN y de los análisis morfológicos por microscopía láser confocal en los tres aislamientos muestran que existe una endosimbiosis entre el hongo *C. coronatus* y una bacteria.

Se logró amplificar y secuenciar el gen 16S rADN completo y el árbol filogenético generado por el método neighbor-joining (NJ), revelando que la bacteria pertenece al género *Pseudomonas*.

Tanto las esporas como el micelio de *C. coronatus* de los tres aislamientos evaluados presentaron desarrollo de la bacteria en el citosol, por lo que con esta prueba se confirmó la endosimbiosis.

Este trabajo es el primer reporte de una endosimbiosis en la que está involucrado un hongo entomoforal y una bacteria del género *Pseudomonas*.

Glosario

Ácido desoxirribonucleico (ADN): Molécula que contiene la información genética de la mayoría de los sistemas vivos. El ADN está compuesto de cuatro bases (adenina, citosina, guanina y timina) y un esqueleto de azúcar-fosfato dispuesto en dos hebras interconectadas formando una doble hélice.

ADN diana: Es el ADN que se desea amplificar, también se le llama ADN molde. Su cantidad y calidad son factores determinantes de la eficacia de la reacción.

Ácidos nucleicos: Macromoléculas que se encuentran generalmente en el núcleo o en el citoplasma celular, constituidas por nucleótidos.

Ácido ribonucleico (ARN): Es un ácido nucleico, polímero lineal de nucleótidos formando una larga cadena. El eje de la cadena lo forman grupos fosfato y azúcares ribosa de forma alternativa del que toma su nombre. Los nucleótidos del ARN contienen el azúcar ribosa y entre sus bases nitrogenadas al uracilo, a diferencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) cuya azúcar es una desoxirribosa y contiene a la timina en vez del uracilo. La función principal del ARN es servir como intermediario de la información que lleva el ADN en forma de genes y la proteína final codificada por esos genes. El ARN es transcrito desde el ADN por enzimas llamadas ARN polimerasas y procesado en el transcurso por muchas más proteínas. El uracilo, aunque es muy diferente, puede formar puentes de hidrógeno con la adenina, lo mismo que la timina lo hace en el ADN. El porqué el ARN contiene uracilo en vez de timina es un enigma del que nadie sabe la respuesta.

Análisis filogenético: La clasificación filogenética es una clasificación científica de las especies basada únicamente en las relaciones de proximidad evolutiva entre las distintas especies, reconstruyendo la historia de su diversificación (filogénesis) desde el origen de la vida en la Tierra hasta la actualidad.

Análisis BLAST: Es una de las herramientas más usadas en las bases de datos, con el cual se pueden alinear secuencias de ADN o de proteínas. Se puede comparar la secuencia estudiada con todas aquellas que forman parte de la base de datos. Si tenemos una secuencia de un organismo que no conocemos, podemos hacer un BLAST como primer paso, para tener una aproximación del organismo en estudio.

Análisis bootstrap: El bootstrap es una técnica de muestreo que, a partir de la simulación, crea sucesivas muestras con reemplazamiento que teóricamente son una buena aproximación al universo muestral.

Amplificación de ADN: Multiplicación repetida de una secuencia concreta de ADN tanto *in vivo*, en un plásmido, fago u otro vector, como *in vitro* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

Amplicón: Producto de una reacción de amplificación de ADN.

Base: Uno de los componentes de los nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos. En condiciones naturales, en el ADN se encuentran cuatro bases diferentes - las purinas A (adenina) y G (guanina) y las pirimidinas C (citosina) y T (timina, nombre común del 5-metiluracilo). En el ARN, U (uracilo) sustituye a T.

Base nitrogenada: Purinas (adenina y guanina) y pirimidinas (citosina y timina o uracilo) que se encuentran en el ADN y en el ARN.

Biología molecular: Es el estudio de la vida a un nivel molecular. Esta área se solapa con otros campos de la biología y la química, particularmente genética y bioquímica. La biología molecular concierne principalmente al entendimiento de las interacciones de los diferentes sistemas de la célula, lo que incluye muchísimas relaciones, entre ellas las del ADN con el ARN, la síntesis de proteínas, el metabolismo, y el cómo todas esas interacciones son reguladas para conseguir un afinado funcionamiento de la célula.

Buffer: Un tampón, o solución *buffer* o amortiguadora es la mezcla de un ácido débil y su base conjugada. Su función es la de mantener estable el pH de una disolución. Cuando un *buffer* es empleado en un sistema, generalmente una disolución acuosa, el primer cambio que se produce es que el pH se vuelve constante. De esta manera, ácidos o bases (álcalis = bases) adicionados posteriormente no podrán tener efecto alguno sobre el sistema, ya que ésta siempre se estabilizará de inmediato.

Células competentes: Célula bacteriana capaz de aceptar moléculas de ADN foráneo y, por ello, de transformarse genéticamente. Esta propiedad puede estar determinada genéticamente o inducirse por un tratamiento físico.

Citosol: Parte fluida del citoplasma; es decir, la que no contiene orgánulos.

Clonar: Insertar un segmento de ADN en un vector o cromosoma hospedador.

Clonación génica: Síntesis de múltiples copias de una secuencia seleccionada de ADN utilizando una célula bacteriana u otro organismo como hospedador. El gen se inserta en un vector y la molécula resultante de ADN recombinante se amplifica en una célula hospedadora apropiada. *Sinónimo:* clonación de ADN.

CLUSTAL W: Es un programa computacional ampliamente utilizado para realizar alineamientos múltiples de secuencias de ADN.

CTAB: Es un detergente llamado bromuro de hexadeciltrimetilamonio, es una sal de amonio cuaternario, uno de cuyos grupos alquilo es de gran longitud. Se usa en el proceso de extracción de ADN.

Dependiente obligado: Se refiere al organismo que se desarrolla en una simbiosis obligada, donde la relación de mutualismo permite mejorar el crecimiento y la supervivencia de las dos poblaciones afectadas.

Electroforesis: Técnica de biología molecular, de uso generalizado y de la que existen muchas variantes. Se utiliza para separar los componentes de mezclas complejas de macromoléculas. Para ello, las muestras se someten a un campo eléctrico aplicado a través de una matriz porosa; en tales condiciones, las moléculas migran a velocidades que dependen de sus cargas eléctricas y/o pesos moleculares.

Electroforesis en gel de agarosa: Método que permite separar moléculas de ADN y ARN en función de su tamaño. En este procedimiento, las muestras se someten a la acción de un campo eléctrico aplicado a un gel de agarosa.

Endosimbiosis: La endosimbiosis es un tipo específico de simbiosis en el cual un integrante (comúnmente un microorganismo) vive dentro del hospedero.

Endosimbionte: Un simbiote que vive dentro de su huésped, comúnmente dentro de las células del huésped (simbiote intracelular).

Enzima: Proteína que incluso a concentraciones muy bajas cataliza reacciones químicas específicas, sin consumirse o modificarse en la reacción. Se clasifican en seis grandes grupos según el tipo de reacción que catalicen: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas o ligasas.

Enzima Taq Polimerasa: Es una ADN polimerasa termoestable, lleva el nombre de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* de la que fue aislada originalmente por Thomas D. Brock en 1965. Se utiliza frecuentemente en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica de

análisis del genoma mediante la ampliación ilimitada de porciones específicas del ADN, en segmentos cortos.

Epizootia: Enfermedad que afecta de forma simultánea a un gran número de animales.

Espora: En biología designa una célula reproductora asexual, generalmente haploide y unicelular. La espora es un elemento importante en los ciclos vitales biológicos de plantas, hongos y algas. El término deriva del griego σπορά (*sporá*), "semilla". Las esporas se pueden clasificar según su función, estructura, origen del ciclo vital o por su movilidad.

Eucarionte: Se denomina eucariontes o eucariotas a todas las células que tienen su material hereditario fundamental (su información genética) encerrado dentro de una doble membrana, la envoltura nuclear, que delimita un núcleo celular.

Exón: Segmento de un gen eucariótico que es transcrito como parte del transcrito primario y que, después del procesado, es retenido con otros exones para formar una molécula de ARNm maduro. La mayoría de los genes eucarióticos están compuestos de un mosaico de exones e intrones.

Fenotipo: Aspecto observable de un individuo (con respecto a uno o más caracteres) que refleja la interacción de su genotipo con un medio determinado.

Gen: Unidad de herencia transmitida de generación en generación durante la reproducción sexual o asexual. El término se usa, de forma más general, en relación a la transmisión y herencia de caracteres específicos identificables. El gen más sencillo consta de un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína individual o ARN.

Gen de patogenicidad: Aquéllos que controlan la patogenicidad.

Genbank: Es la base de datos más conocida de secuencias ADN públicamente disponibles.

Genética molecular: Estudio de la expresión, regulación y herencia de los genes a nivel de ADN y de sus productos de transcripción.

Genoma: 1. Dotación completa de material genético (genes y secuencias no codificantes) que contiene cada célula de un organismo, virus u orgánulo. 2. Conjunto completo de cromosomas (y por lo tanto de genes) heredado de un progenitor como una unidad.

Genoma: Es la totalidad de la información genética que posee un organismo en particular.

Genotipo: 1.- Constitución genética de un organismo. 2. Constitución alélica de un locus particular, *p. ej., Aa o aa*. 3. Efecto suma de todos los loci que contribuyen a la expresión de un carácter.

Gel de agarosa: La electroforesis de ADN se lleva a cabo en geles de agarosa o poliacrilamida. Ambos soportes son restrictivos para los ácidos nucleicos, de modo que los diferentes fragmentos (al tener la misma relación carga/tamaño), migran en función de su tamaño y/o conformación.

Hospedero: Organismo que alberga a otro organismo o a un vector de clonación.

Ingeniería genética: Tecnología que permite inducir cambios por transgénesis en el genotipo y, por tanto, en el fenotipo de un organismo.

Inserción: 1. Incorporar una molécula de ADN en un vector de clonación. 2. Introducir un gen o una construcción génica en un nuevo sitio genómico o en un nuevo genoma.

Inmunocompetentes: Persona que es capaz de producir una respuesta inmunitaria normal.

Inmunocomprometidas: Personas con sistemas inmunológicos debilitados, pueden sufrir una enfermedad grave y de larga duración

Intrón: Segmento del transcrito primario de un gen eucariota, que se elimina (antes de que se traduzca el ARNm maduro) en el proceso que se conoce como corte y empalme de intrones. Algunos genes eucariotas contienen un gran número de intrones, que componen la mayoría de la secuencia del ADN del gen. Los intrones también se encuentran en genes cuyos ARN transcritos no son traducidos, esto es en genes eucariotas de ARNr y de ARNt. En estos casos la secuencia del intrón no aparece en la molécula funcional de ARN. *Sinónimo:* secuencia intercalada.

Liofilización: Es un proceso utilizado para la eliminación del agua mediante desecación al vacío y a muy bajas temperaturas.

Medio de cultivo: Cualquier sistema nutritivo preparado para el cultivo de células, bacterias u otros organismos; generalmente una mezcla compleja de nutrientes orgánicos e inorgánicos.

Marcador molecular: están situados en lugares específicos del genoma. Se usan para “marcar” la posición de un gen en concreto o la herencia de una característica particular. En un cruzamiento genético, las características de interés seguirán generalmente unidas a los marcadores moleculares. Por lo tanto, se pueden seleccionar individuos en los que el

marcador molecular esté presente, ya que el marcador indica la presencia de la característica deseada.

Metagenoma: nombre dado al genoma colectivo de la microbiota total encontrada en un determinado habitat.

Microscopía de fluorescencia: El microscopio de fluorescencia es una variación del microscopio de luz ultravioleta en el que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con mayor longitud de onda. Para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada, se deben colocar filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo. **Micorriza:** Hongos que forman una asociación o mantienen una relación simbiótica con raíces de plantas más evolucionadas.

Micorrizas arbusculares: Caracterizadas por formar arbusculos intracelulares y sin duda las de mayor difusión e importancia económica y ecológica.

Micotoxina: Sustancias tóxicas que producen los hongos. La función de las micotoxinas es proteger al organismo que las produce ante otros que pueden, si no matarlo impedir su desarrollo y crecimiento. En los hongos asociados a insectos constituyen un factor que favorece el incremento de virulencia.

Mutualismo: Es una relación interespecífica temporal en que ambos organismos obtienen algún grado de beneficio.

Neighbor-joining (NJ): Se basa en encontrar vecinos secuencialmente que minimicen la longitud total del árbol filogenético. Es un método de aproximación simple no paramétrica que consiste en estimar el valor de un dato desconocido a partir de las características del dato más próximo, según una medida de similitud o distancia.

Nucleótido: Nucleótido con uno o más grupos fosfato unidos al hidroxilo 3'- o 5'- de una pentosa. Cuando la pentosa es ribosa, el nucleótido es un ribonucleótido; cuando es 2-desoxirribosa, es un desoxirribonucleótido. El ARN y el ADN son polímeros del ribonucleósido 5'-monofosfato y del desoxirribonucleósido 5'-monofosfato, respectivamente. Los nucleótidos que contienen las bases adenina, guanina y citosina (A, G, C) se encuentran en el ADN y en el ARN; la timina (T) solamente en el ADN, y el uracilo (U) en el ARN. Los ribonucleósidos mono-, di-, y trifosfatos de una base sin especificar tienen como acrónimos NMP, NDP, y NTP, mientras que los desoxirribonucleósidos mono-, di-, y trifosfatos, dNMP, dNDP, y dNTP. En los demás casos, la "N" se reemplaza por la abreviatura de la base en cuestión.

Pares de bases (pb): En genética un par de bases consiste en dos nucleótidos opuestos y complementarios en las cadenas de ADN y ARN que están conectadas por puentes de hidrógeno. En el ADN adenina y timina, así como guanina y citosina, pueden formar un par de bases. En ARN, la timina es reemplazada por el uracilo, conectándose este con la adenosina.

Oligonucleótido: Oligómero de nucleótidos. Su interés radica en su utilización como iniciadores en el proceso de síntesis de ADN *in vitro*.

PCR: La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Parásito: Un simbiote que tiene un efecto negativo en la salud de su hospedante.

Patógeno: Organismo causante de enfermedades (suele ser microbiano: bacterias, hongos, virus; pero también se aplica a otros organismos: *p. ej.*, nematodos, etc.). Sinónimo: agente infeccioso.

Patogenicidad: Capacidad de un patógeno para producir enfermedad.

Plásmido: Molécula circular de ADN extracromosómico de replicación autónoma que muchas bacterias poseen y que es transferible a otras células bacterianas de la misma y, ocasionalmente, de diferente especie. Generalmente, los genes de resistencia a antibióticos se localizan en plásmidos. Los plásmidos han adquirido una gran importancia como vectores en los procesos de ingeniería genética.

Polimerasa: Enzima que cataliza la formación de polímeros a partir de monómeros. Una ADN polimerasa sintetiza ADN a partir de desoxinucleósidos trifosfato utilizando una hebra de ADN complementario y un cebador. Una ARN polimerasa sintetiza ARN a partir de ribonucleósidos trifosfato y una hebra de ADN complementario.

Primer: También llamados Iniciadores, cebadores o partidores, es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases con una hebra molde complementaria y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde. Se necesitan dos para la reacción de PCR, uno en el extremo 3' y el otro complementario para la otra hebra.

Proteinasa K: usada en la biología molecular para digerir proteínas de las membranas celulares y eliminar la contaminación de preparaciones de ácidos nucleicos, ya que después de romper

las membranas, degrada las proteínas que son liberadas. La proteinasa K, cuando se agrega a las preparaciones de ácidos nucleicos, inactiva las nucleasas, las cuales podrían degradar el ADN o ARN.

Procarionte (procariota): Miembro de un extenso grupo de organismos, que incluye bacterias y algas verdeazuladas, en los que el cromosoma, que se encuentra en forma de cadena lineal o circular, no está encerrado en un núcleo. Los procariotas no experimentan meiosis y no contienen orgánulos funcionales similares a mitocondrias o cloroplastos.

Ribosoma: Estructura subcelular que contiene moléculas de ARN y proteínas, donde tiene lugar la traducción del ARNm en proteína. Los ribosomas constan de dos subunidades, una grande y otra pequeña.

Rizoxina: Sustancia en estudio para el tratamiento del cáncer. Viene de un hongo y es similar a los medicamentos alcaloides obtenidos de la vincristina y la vimblastina. Es un tipo de antimitótico.

Saprófito: Organismo (generalmente un hongo) cuya fuente de alimento y energía metabólica está constituida por tejidos muertos, tanto vegetales como animales.

Secuencia ADN: Orden lineal de nucleótidos en las moléculas de ADN o ARN (o de aminoácidos en proteínas). El objetivo de la secuenciación de un genoma es determinar el orden lineal de todos los nucleótidos del ADN nuclear de un organismo.

Secuenciación: Procedimiento para determinar la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN.

Secuencia consenso: Especifica cuáles son los elementos comunes a las secuencias encontradas en distintas situaciones (genes, especies) para una misma función. La mera existencia de ese consenso; es decir, la presencia sistemática de esos elementos comunes, es informativa porque nos indica que son importantes para la función.

Simbiosis: 1. Una asociación entre dos o más especies. 2. Asociación estrecha de dos organismos vivos de distinta clase que resulta beneficiosa para ambos o de la cual ambos sacan provecho. Un ejemplo destacado es la colonización por *Rhizobium* sp de las raíces de leguminosas.

Termociclador: Es un aparato usado en biología molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación de ADN.

Transformación: 1. Proceso mediante el que se introduce e integra ADN en una célula, con el propósito de cambiar de manera predecible el fenotipo del organismo receptor. 2. Conversión de un tipo de crecimiento celular controlado que mantienen las células de cultivo animales en otro no controlado, y que generalmente se produce por infección con un virus tumoral.

Testigo (control): Parte del material viviente destinado a una experimentación que, manteniendo en condiciones normales, sirve para determinar por comparación el resultado de las manipulaciones o tratamientos a que se somete otra parte de dicho material.

Testigo negativo (control negativo): Aquél del que se conoce y espera una determinada reacción o que se comportará normalmente en unas condiciones dadas y, por ello, se introduce en el experimento.

Testigo positivo (control positivo): Aquél del que se conoce y espera una determinada reacción o comportamiento en unas condiciones dadas y, por ello, se introduce en el experimento.

Vector de clonación: 1. Organismo, normalmente un insecto que transporta y transmite patógenos. 2. Pequeña molécula de ADN (plásmido, virus, bacteriófago, ADN artificial o fragmento de una molécula de ADN) que puede utilizarse para introducir ADN en una célula. Los vectores deben tener capacidad de replicarse y contener sitios de clonación para la introducción de ADN exógeno.

Virulencia: La virulencia designa el carácter patogénico, nocivo y violento de un microorganismo, como una bacteria, hongo o virus, o en otras palabras, la capacidad de un microbio de causar enfermedad. Virulencia deriva del latín *virulentus* que significa «lleno de veneno».