



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis de un fragmento del gen *cox-II* mitocondrial y su utilización para el establecimiento de las relaciones filogenéticas del hongo *Sporothrix schenckii*.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A**

IGNACIO GONZÁLEZ SÁNCHEZ



México, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Marisol López López
Vocal	Prof. Marina Gavilanes Ruiz
Secretario	Prof. Haydée Torres Guerrero
Primer Suplente	Prof. Misael González Ibarra
Segundo Suplente	Prof. Ma. Benita Leonor Fernández Salgado

Lugar donde se desarrolló este trabajo:

Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Hongos
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina, UNAM.

Asesor del tema:

Dra. Haydée Torres Guerrero

Sustentante:

Ignacio González Sánchez

DEDICATORIAS

A MIS PADRES: Carmen Sánchez Lecona y Aureliano González Luna.
Por darme incondicionalmente todo, enseñarme todo lo que han podido y guiarme para obtener la educación que me ha formado.

A MI ESPOSA: Cristina Coronel Cruz.
Por su comprensión y su valiosa ayuda durante la realización de este trabajo.

A MI pequeño Diego: Por ser el motivo que me alienta.

A MIS HERMANOS: Jesús, Gilberto, Noel, Clemencia, Aureliano, Gabriel y Virginia.
Por su gran apoyo y orientación en cada momento en cada una de mis decisiones.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Haydeé Torres Guerrero.

Por su orientación para la realización de este trabajo.

A mis compañeras de laboratorio: Edith Trejo Gómez y Gabina Arenas.

Por su amistad y por su apoyo.

A los Drs. Luis J. Delaye Arredondo y Arturo Carlos Il Becerra Bracho, por su orientación en la reconstrucción filogenética.

A la UNAM.

Por darme una diversidad de emociones al estar en sus aulas, pasillos y en cada lugar donde me encontraba.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO.

Por sus críticas oportunas para esta tesis.

A mis amigos y todas aquellas personas que se han interesado en lo que hacía y por darme sus opiniones.

ÍNDICE

Introducción	1
Antecedentes	19
Objetivos	23
Hipótesis	24
Metodología Experimental	25
Resultados	29
Discusión	36
Conclusiones	39
Bibliografía	40
Abreviaturas	44
Apéndice	46

RESUMEN

El hongo dimórfico *Sporothrix schenckii* es el agente causal de la esporotricosis, que es la segunda micosis subcutánea más frecuente en México (Ruíz, 1996). La esporotricosis es una micosis crónica, normalmente limitada a los tejidos cutáneo o subcutáneo siendo sus formas clínicas: la localizada, linfangítica y diseminada. Generalmente el hospedero se infecta a través de traumatismos y escoriaciones en contacto con material contaminado con hifas y conidios. Si el hongo no es destruido por el hospedero, este cambia su morfología desarrollando la forma parasitaria de levadura (Rippon, 1990; Bonifaz, 2000).

En este estudio se realizó un análisis filogenético utilizando un fragmento de 165 pb del gen mitocondrial *cox-II* de *S. schenckii* y se comparó con las respectivas secuencias de diferentes hongos. Los hongos estudiados incluyen a las especies *Schizophyllum commune*, *Crinipellis pernicioso*, *Cryptococcus neoformans*, *Filobasidiella neoformans*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces rosinni*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium marneffe*, *Neurospora crassa* y *Podospora anserina* entre otros. En este análisis se utilizó como grupo externo al zigomiceto *Rhizopus oryzae*.

El análisis filogenético nos permitió separar perfectamente entre basidiomicetos (*Schizophyllum commune*, *Crinipellis pernicioso*, *Cryptococcus neoformans* y *Filobasidiella neoformans*) y ascomicetos (*Sporothrix schenckii*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces rosinni*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium marneffe*, *Neurospora crassa* y *Podospora anserina*). A su vez se observó que los ascomicetos se separan en dos grandes grupos: hongos levaduriformes y hongos filamentosos. En este último grupo encontramos al hongo dimórfico *S. schenckii*.

Cryptococcus neoformans y *Filobasidiella neoformans* quedaron juntos en una rama, debido a que éste último es la fase asexual de *Cryptococcus neoformans*.

Estos resultados son muy semejantes a los generados en otros estudios con diversos métodos y marcadores moleculares (incluyendo el rRNA 18S) utilizados para establecer las relaciones filogenéticas entre las distintas especies de hongos (Berbee y Taylor, 1993; Cavalier-Smith, 2000).

I. INTRODUCCIÓN.

1. *Sporothrix Schenckii*.

La esporotricosis es la micosis subcutánea más frecuente en México, el agente causal es el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*. El hongo se encuentra comúnmente en la vegetación descompuesta y muchas veces se ha aislado del suelo y de diferentes plantas (Rippon, 1990).

La esporotricosis es una micosis crónica, normalmente limitada a los tejidos cutáneo o subcutáneo siendo sus formas clínicas: la localizada, linfangítica y diseminada. La principal vía de ingreso del agente es la cutánea a través de traumatismos y escoriaciones con material contaminado con la forma saprobia del hongo (hifas y conidios) que al penetrar al hospedero cambia su morfología desarrollando la forma parasitaria de levadura (Rippon, 1990; Bonifaz, 2000).

S. schenckii en su fase micelial o infectante forma colonias membranosas con bordes bien delimitados y una coloración clara; en ciertas condiciones de cultivo puede acumular melanina llegando a adquirir una tonalidad negra. Las hifas generalmente tienen menos de 3 μm de diámetro y pueden llegar a medir hasta 300 μm de largo. A partir de las hifas se lleva a cabo la diferenciación de los conidios. Microscópicamente se han identificado dos regiones que dan origen a estas estructuras, los simpodioconidios; los cuales originan conidios en el extremo de la hifa y los aleuroconidos que los producen a lo largo de la hifa. Estos conidios son de dos tipos: hialinos y pigmentados. Los conidios hialinos son elípticos, ovals o piriformes, su tamaño varía de 1-2 μm de diámetro; los conidios pigmentados, los cuales contienen melanina en su pared celular son esféricos, ovals o triangulares de 2-4 μm de diámetro (Fig. 1).

Las colonias que se obtienen de la fase parasitaria o levaduriforme del hongo crecen en medios complejos como BHI (Infusión Cerebro Corazón), incubados a 37°C. Microscópicamente se observan levaduras redondas, ovals o en forma de

cigarro, uni o bigemantes, con un diámetro de 1-3 μm X 3-17 μm (Fig. 2) (Kwon-Chung y Bennett, 1992).

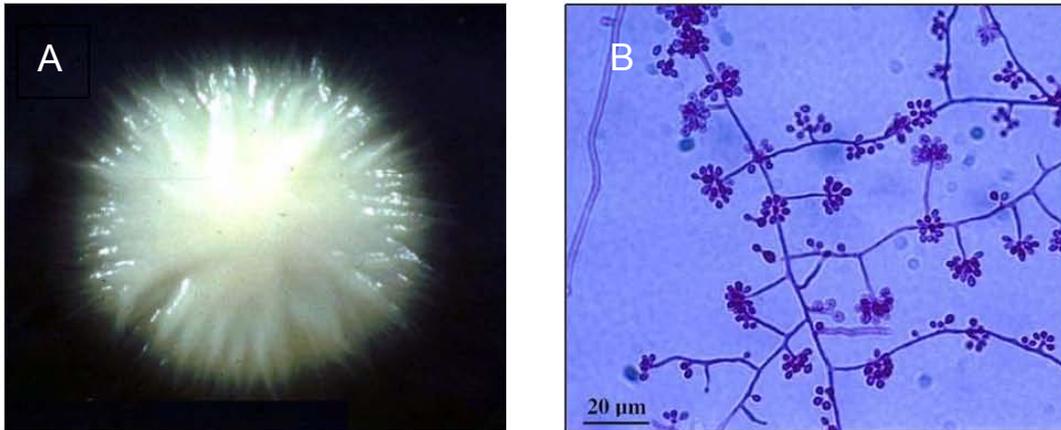


Figura 1A) Imagen macroscópica de la fase micelial de *S. schenckii*. 1B) Micrografía de la fase micelial de *S. schenckii* donde se observan las hifas y conidios (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/sporo8.html>, http://www.doctorfungus.org/thefunqi/img/spr3_l.jpg).

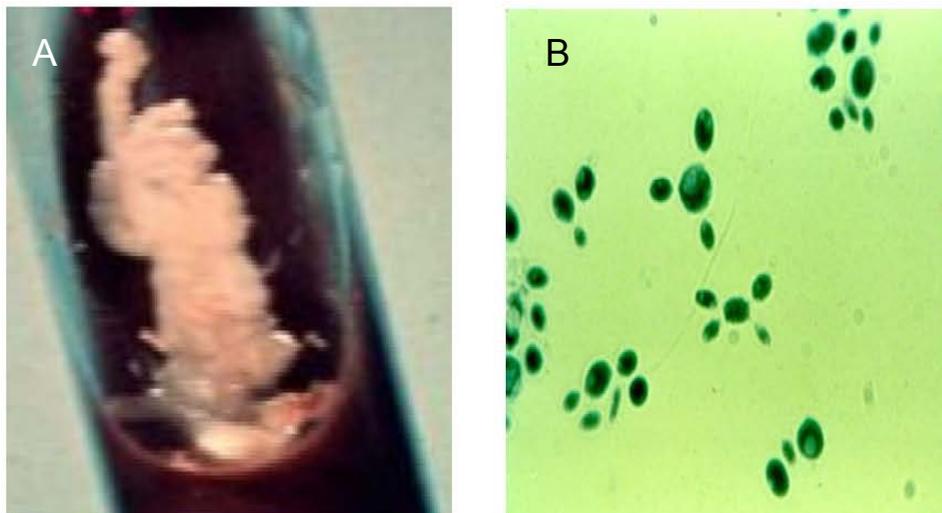


Figura 2A) Imagen macroscópica de la fase levaduriforme de *S. schenckii*. 1B) Micrografía de la fase levaduriforme de *S. schenckii* *in vitro* (<http://botit.botany.wisc.edu/>).

1.1 Epidemiología.

En México la esporotricosis ocupa el segundo lugar dentro de las micosis. La esporotricosis se ha presentado en todos los estados de la República, sin embargo, dos son las zonas más importantes: el occidente (Jalisco y Nayarit) y la zona centro, incluyendo los estados de Guanajuato, Hidalgo Puebla, Tlaxcala y el Distrito Federal, como se muestra en la figura 3. *S. schenckii* generalmente habita en climas templados y húmedos, con un promedio de temperatura de 20-25°C y humedad relativa superior a 90%. Debido a la presencia de *S. schenckii* en el suelo y en materia vegetal la esporotricosis se ha relacionado como una enfermedad ocupacional (Bonifaz, 2000).



1.2 Taxonomía y nomenclatura de *S. schenckii*.

Desde su descubrimiento a *S. schenckii* se le ha denominado de diversas formas. Schenck en 1989 fue el primero en proponer el nombre genérico de *Sporotrichum* para designar a un aislado a partir de un caso clínico. A un segundo aislado en 1900, Hektoen y Perkins le llamaron *Sporothrix schenckii*, nombre que sólo fue usado en su publicación. Fue hasta 1962 que Carmichael reconoció las diferencias en el modo de conidiar de las especies de *Sporotrichum* y de los aislados a partir de los casos de la esporotricosis, retomando nuevamente la designación de *Sporothrix schenckii* propuesto por Martuchot en 1910. Mariat y colaboradores aislaron cepas de *Ophiostoma stenoceras*, a las cuales habían denominado *Ceratocystis stenoceras*, estas presentaban una forma similar de conidiación a *S. schenckii*, en varias publicaciones subsecuentes propusieron que *C. stenoceras* podría ser la forma perfecta de *S. schenckii* (Mendonca-Hagler et al., 1974).

2. Genoma nuclear y mitocondrial.

La célula eucariota tiene organizado su material genético en dos genomas: el nuclear y el mitocondrial. El genoma nuclear está estructurado en cromosomas, mientras que el genoma mitocondrial es una molécula circular cerrada que contiene pocos genes. El genoma nuclear está formado por secuencias muy variadas como son: genes estructurales, secuencias repetidas, satélites y microsátélites.

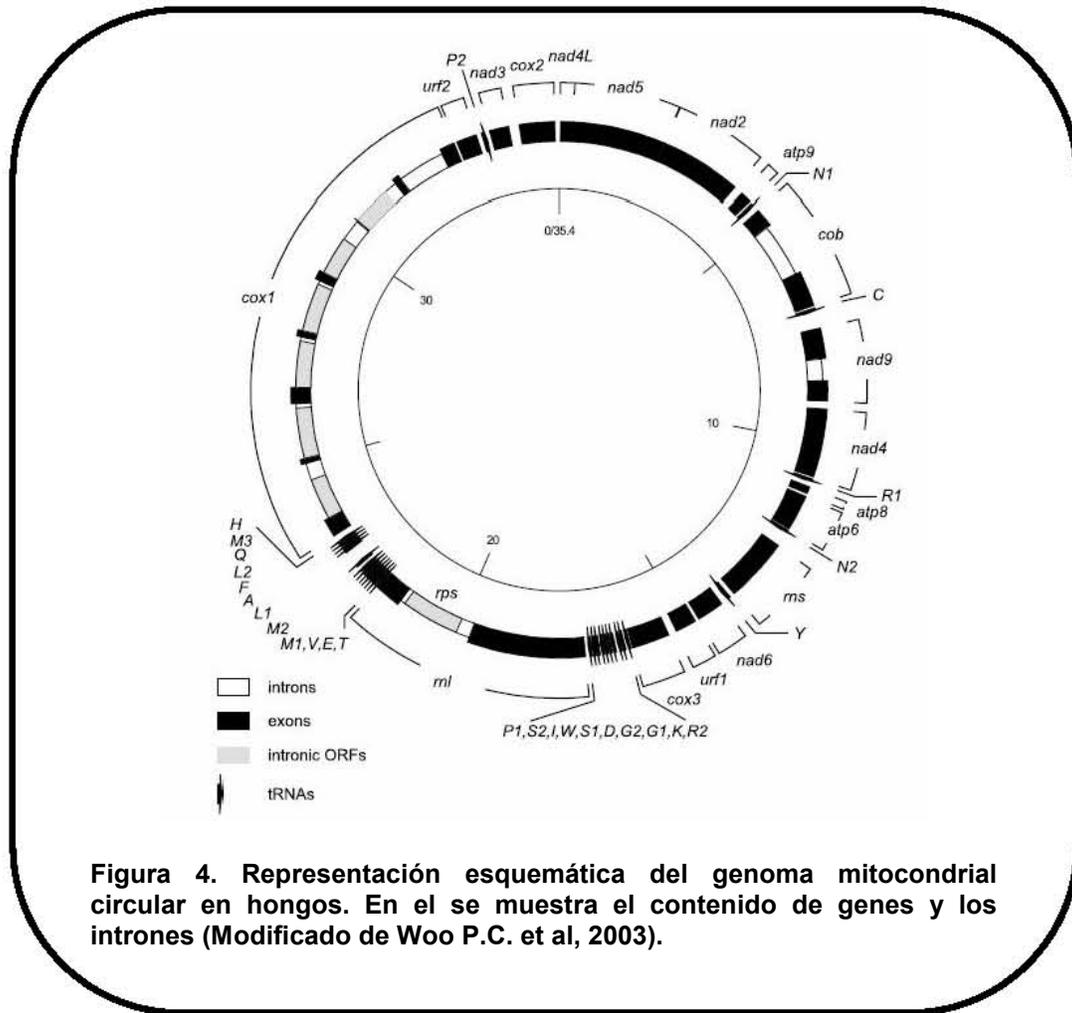
En el mtDNA pueden estar presentes URFs (fragmentos de lectura no identificados) adicionales. Los hongos, a comparación del humano, contienen cuatro orígenes putativos de replicación denominados secuencias ori/rep de naturaleza bidireccional (Hamari et al., 2001; Shadel, 1999; Kurland y Anderson, 2000).

En el curso del apareamiento el genoma mitocondrial no recombina, por que es de estricta herencia uniparental (Hamari et al., 2001).

El genoma mitocondrial es más pequeño que el nuclear y tiene un número limitado de secuencias. En algunos hongos y plantas su tamaño varía, en la mayoría de los eucariotas es de 15 a 60 kb, mientras que en mamíferos el tamaño es de aproximadamente 20 Kb (ver apéndice), sin embargo, hay algunas excepciones notables, *Plasmodium* tiene un genoma pequeño de 6 kpb y *Oryza sativa* (arroz) tiene un genoma de 490 kb, 80 veces más grande que el de *Plasmodium*. Se sabe que no existe una correlación entre el tamaño del mtDNA y el contenido de genes, las diferencias en tamaño se deben a variaciones en la longitud y organización de regiones intergénicas, las cuales consisten de secuencias repetidas en grupos e intrones de tamaño y número variables. En el hongo *Podospora anserina* los intrones ocupan el 75% del tamaño total del mtDNA (Burger et al., 2003).

El genoma mitocondrial de los mamíferos difiere del de los eucariotas menos complejos en la organización de los genes, en el número de genes y en la ausencia de regiones intergénicas (Macino y Morelli, 1983).

El genoma mitocondrial en la mayoría de los eucariotas es una molécula de forma circular (Fig. 4), sin embargo también se han detectado moléculas de mtDNA lineal en organismos ciliados (*Plasmodium*), en algas (*Chlamydomonas*) y hongos. El genoma mitocondrial típicamente consiste de un solo cromosoma, aunque existen casos en lo que contiene múltiples moléculas circulares como se ha reportado para el hongo citridomiceto *Spizellomyces punctatus* y en los animales *Dicyema* y *Globodera* (Burger et al., 2003)



2.1 Secuencias no codificantes presentes en el genoma mitocondrial.

El mtDNA, al igual que el nuclear, presenta intrones y en el caso de los hongos existe gran variación en el contenido de éstos (Hamari et al., 2001). En hongos, los intrones se insertan en genes mitocondriales diferentes, preferentemente en genes que codifican proteínas, más frecuentemente *cox-1* y *cob*. No se han encontrado intrones en los genes mitocondriales tRNA y se han localizado pocos en los genes rRNA. Genes como *nad6*, *cox-11* o *atp9* raramente contienen intrones, lo que sugiere que los intrones residen en regiones altamente conservadas entre especies. Los intrones mitocondriales de diferentes especies se localizan frecuentemente en posiciones idénticas de genes, indicando que son capaces de

dirigirse a sitios homólogos. La distribución filogenética de los intrones indica intercambios frecuentes entre especies distantes (Paquin et al., 1997). La propagación de los intrones entre organismos poco relacionados puede ocurrir vía transferencia horizontal, este fenómeno puede explicar las diferentes distribuciones de los intrones en el genoma mitocondrial entre especies estrechamente relacionadas (Hamari et al., 2001).

2.2 Gen *cox-II*.

El gen mitocondrial *cox-II* codifica para la subunidad II de la enzima citocromo c oxidasa, esta última consiste de un complejo metalo-proteína que tiene una función crítica en la respiración celular tanto en procariontes como en eucariontes. La enzima cataliza la reacción $4H^+ + 4e^- + O_2 \leftrightarrow 2H_2O$. Dicha enzima en eucariontes se encuentra codificada en dos genomas, varios polipéptidos son codificados en el mtDNA y sintetizados en la mitocondria; otros polipéptidos son codificados en el genoma nuclear y su síntesis ocurre en el citoplasma, estos posteriormente son marcados para enviarse a la mitocondria. Las subunidades I, II y III de la citocromo c oxidasa (Tabla 1) son codificadas en el genoma mitocondrial y son el núcleo catalítico de la enzima en eucariontes. Los grupos hemos y cobres se encuentran localizados en las subunidades I y II, los ligandos de los grupos prostéticos deben ser residuos conservados, un total de ocho residuos de histidina y dos de cisteína se requieren para unir los cuatro centros redox (Capaldi, 1990).

Tabla 1. Subunidades estructurales de la citocromo c oxidasa en hongos.

Subunidad	Masa relativa
I	56000
II	26678
III	30340
IV	14570
V	14858
VI	12627
VII	6603
VIIa	6303
VIII	5364

(Modificado de Capaldi, 1990).

3. Marcadores moleculares.

La tipificación de microorganismos es relevante para la epidemiología porque ayuda a identificar algunas fuentes de contaminación, detectar brotes en el medio ambiente o en hospitales e identificar cepas que son más virulentas o más resistentes a fármacos (Sanson y Briones et al., 2000).

Los genes nucleares que han sido utilizados como marcadores moleculares son los que codifican para los RNA ribosomales 18S, 5.8S y 28S. Estos genes muestran una baja tasa de mutación, por lo que se han usado para investigar relaciones entre organismos muy antiguos, así como relaciones entre phyla, clases y familias (Littlewood et al., 1998; Giribet et al., 2000). Son poco útiles en comparaciones intraespecie ya que presentan una velocidad evolutiva muy pequeña, exhiben pocas o nulas substituciones lo que impide el uso de dichas secuencias para la tipificación (Frisrvad et al., 1998).

También se han utilizado como marcadores a los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2); estos segmentos tienen una alta variabilidad, la rápida tasa de evolución en estas regiones no codificadoras ha permitido usarlas para estudiar las relaciones entre especies de un mismo género. Además los ITS1 e ITS2 generalmente son regiones pequeñas (800-1200 pb), delimitadas por regiones conservadas en zonas codificadoras, lo que facilita el diseño de oligonucleótidos universales para amplificarlos por PCR (Littlewood et al., 1998).

El DNA mitocondrial también ha sido utilizado en análisis intraespecies, debido a que los genes codificados en la mitocondria evolucionaron 10 veces más rápido que los nucleares al presentar una baja fidelidad en la replicación, reparación defectuosa y una elevada frecuencia de mutaciones (por la exposición a agentes mutágenos), lo que los hace más apropiados para su uso en la resolución filogenética de especies estrechamente relacionadas. En particular se usa para inferir las relaciones filogenéticas de especies que divergieron recientemente o en análisis intraespecie. Las secuencias de mtDNA que han sido más extensamente utilizadas son las de los genes de RNA ribosomal (12S y 16S), citocromo *b* y *cox I* y *II* (Sanson y Briones, 2000). El gen mitocondrial de la subunidad II de la citocromo c oxidasa (*cox-II*) es un buen marcador para inferir relaciones filogenéticas intraespecie, ya que es un gen que presenta mayor variabilidad que el rRNA ribosomal 18S (Belloch et. al., 2000).

4. Variabilidad genética.

A los cambios genéticos se les denomina mutaciones y son los responsables de la producción de la diversidad genética (Velázquez y Valdez, 2005). El proceso de evolución depende de la existencia de la variación genética. Las frecuencias de mutación espontánea varían de un organismo a otro y de un locus génico a otro dentro del mismo organismo. En virus, bacterias y organismos unicelulares, las frecuencias de mutación observadas por gen y por división celular varían desde

10^{-9} hasta 10^{-6} . En organismos más complejos, las frecuencias de mutación varían desde 10^{-6} hasta 10^{-4} por gen y por gameto (Ayala, 1980).

La variabilidad genética se estudia en dos moléculas: el genoma nuclear y el mitocondrial. Los procesos más generales mediante los cuales han tenido lugar la mayoría de los cambios evolutivos del genoma nuclear son las deleciones y duplicaciones (Ayala, 1980). En el caso del genoma mitocondrial se sabe que los mecanismos moleculares involucrados en la variabilidad son principalmente: la propagación o inserción de intrones, recombinaciones inter e intramitocondriales principalmente en grupos ricos G+C, translocaciones, inversiones, duplicaciones y secuencias repetidas invertidas. Los cambios en la secuencia de nucleótidos (incluyendo las mutaciones puntuales, sin sentido o de sentido equivocado), deleciones (eliminación de nucleótidos) e inserciones (adición de nucleótidos), aunque no son propiamente rearrreglos moleculares también dan lugar a la variabilidad del mtDNA (Cardazzo et al., 1997).

La variabilidad del DNA se puede detectar de varias maneras: secuenciando directamente el DNA o bien usando técnicas moleculares como: RFLP: (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) o RAPD (polimorfismo del DNA amplificado al azar).

El procedimiento para RFLP involucra la comparación de los patrones de fragmentos de restricción de DNA genómico o mitocondrial, electroforesis en gel e hibridación con una sonda de DNA. En tanto que para el RAPD se requiere encontrar los oligonucleótidos adecuados, sitios y sondas que sean capaces de discriminar entre aislados estrechamente relacionados (Frisvad et al., 1998).

Los patrones electroforéticos generados por análisis RFLP y RAPD se comparan para cuantificar las variaciones entre cepas, estimando sus relaciones filogenéticas representadas en un árbol (Frisvad et al., 1998). Sin embargo, la mayoría de diferencias en el patrón de bandas son difíciles de interpretar porque la intensidad de las bandas y la reproducibilidad no son absolutamente consistentes.

Los métodos basados en la comparación de patrones son medidas indirectas de divergencia genética. Las diferencias en el patrón de bandas son mucho más difíciles de analizar bajo modelos probabilísticos de divergencia. Por lo anterior la comparación directa de secuencias de DNA es preferible para la tipificación.

5. Estimaciones filogenéticas.

Un árbol filogenético es una gráfica bidimensional que muestra las relaciones a través del tiempo entre organismos o secuencias de genes homólogos, es decir, de secuencias similares que tienen la misma función y que están relacionadas genéticamente. Tradicionalmente los árboles filogenéticos se han usado para representar la relación histórica de grupos de organismos, generalmente especies. Hasta hace algunos años las relaciones se basaban en caracteres morfológicos y en registros fósiles (Hall, 2001).

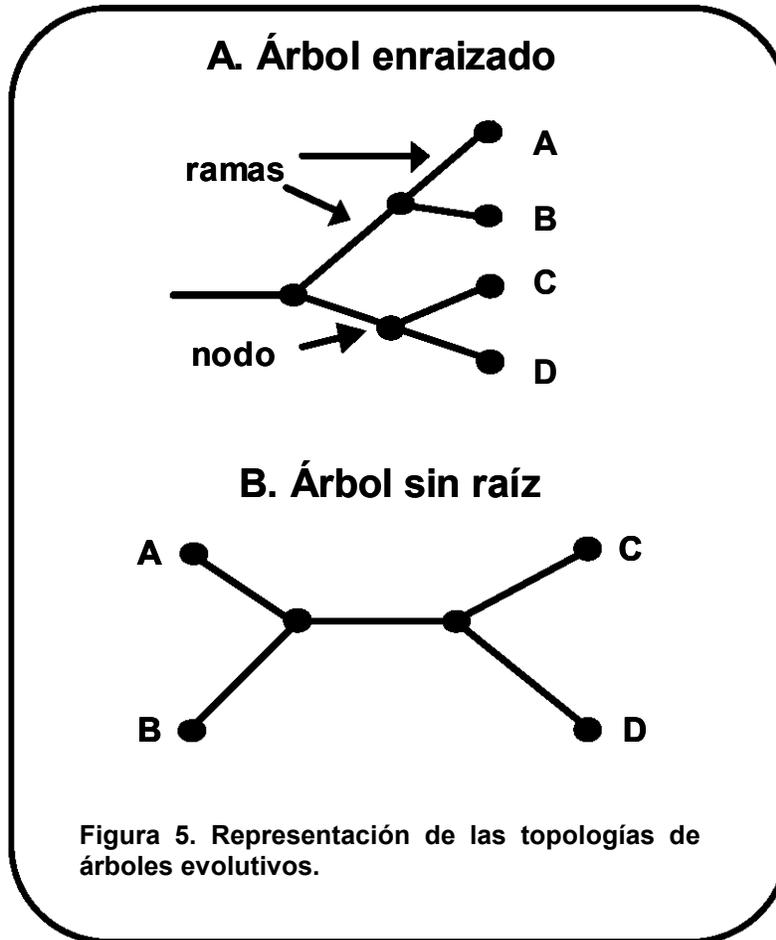
Las secuencias separadas u organismos individuales se denominan taxa y representan unidades distintas sobre el árbol. El árbol está compuesto de ramas y nodos que son los puntos donde se unen dos o más ramas. Los nodos pueden ser externos, los cuales son las puntas del árbol que son los taxa recientes, o internos, los cuales representan un ancestro común de otros dos nodos, las ramas muestran las relaciones entre los taxa. Todos los taxa descendientes de un ancestro común representados por un nodo pertenecen al mismo taxón; un taxón es también llamado grupo monofilético, es decir, es un grupo de especies descendientes de un mismo ancestro común que puede o no existir y que incluye a todos los descendientes de éste. Un grupo es parafilético cuando el ancestro más reciente no es miembro de este grupo, por lo que especies que tienen un ancestro común se encuentran en taxones diferentes. Usualmente se asume que la especiación evolutiva es un proceso binario que resulta en la formación de dos especies de una sola especie ancestral (Mount, 2001; Hall, 2001).

Como se observa en la figura 5A las secuencias o taxas A y B derivan de un ancestro común representado por el nodo, así como C y D están estrechamente relacionadas. Cada uno de esos pares es un grupo monofilético. A su vez las secuencias A/B y C/D comparten un ancestro común. Es importante reconocer que cada nodo en el árbol representa una división de la ruta evolutiva del gen en dos especies diferentes aisladas reproductivamente. La longitud de cada rama al siguiente nodo es la distancia que representa el número de sustituciones en la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos que tienen lugar a lo largo de una rama.

La cantidad de tiempo evolutivo que ha transcurrido desde la separación de los taxa A y B no se conoce, lo que se estima por el análisis filogenético es la cantidad de cambios en las secuencias entre el nodo A/B y A, así a juzgar por la longitud de la rama en este nodo las secuencias A y B han sufrido el mismo número de cambios.

Una representación alterna de la relación entre las secuencias A-D se muestra en la figura 5B, la diferencia es que no se indica el ancestro común a los cuatro organismos, este también muestra la relación evolutiva entre las secuencias A-D. Estos son sólo ejemplos de árboles, pero el número de árboles posibles incrementa con el número de secuencias o taxa.

Los árboles sin raíz definen solo las relaciones entre taxa, pero no las rutas evolutivas (Hall, 2001; Mount, 2001).



El análisis filogenético de una familia de secuencias relacionadas de ácidos nucleicos o proteínas, es una determinación de cómo la familia se derivó durante la evolución. Las relaciones evolutivas entre las secuencias se representan colocando las secuencias como ramificaciones externas e internas sobre un árbol, reflejando el grado en el cual las diferentes secuencias están relacionadas. Dos secuencias muy semejantes pueden ser colocadas como vecinas cercanas en una rama en común. El objeto del análisis filogenético es descubrir las relaciones entre las ramas del árbol y la longitud de las ramas (Mount, 2001).

Otro evento molecular del proceso evolutivo del genoma que es importante considerar en el análisis filogenético es la duplicación de genes que originan copias en grupos de un gen. Dos copias pueden desarrollarse después en rutas

separadas originando funciones diferentes, sin embargo, estas copias mantienen un cierto nivel de similitud. Los eventos de especiación que siguen a la duplicación de genes podrían originar dos clases de genes y secuencias.

Algunos tipos de análisis filogenético asumen que las velocidades de evolución en las ramas del árbol son las mismas, mientras que otras asumen que estas varían. La suposición de una velocidad uniforme de mutación en las ramas del árbol se conoce como la hipótesis del reloj molecular y esta es usualmente más adecuada para especies estrechamente relacionadas (Mount, 2001).

5.1 Aplicaciones de los métodos filogenéticos.

El análisis filogenético de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas es útil para analizar cambios que han ocurrido durante la evolución de diferentes organismos. Cuando una familia de genes se encuentra en un grupo de organismos, las relaciones filogenéticas entre los genes ayuda a predecir cuales tienen una función equivalente. Las predicciones funcionales posteriormente pueden probarse por experimentos genéticos. El análisis filogenético también se usa para seguir los cambios que ocurren en especies que mutan rápidamente, como los virus. El análisis de los tipos de cambios dentro de una población puede revelar, por ejemplo, si un gen particular está bajo selección, una importante fuente de información en aplicación a la epidemiología (Mount, 2001).

El análisis filogenético se utiliza también para estimar la velocidad de evolución de *cox-II* en levaduras y consecuentemente los tiempos de divergencia entre diferentes especies y aislados. Es importante para la investigación epidemiológica porque proporciona estimados de la probabilidad de cómo diferentes pacientes han adquirido *C. glabrata* de uno o de orígenes diferentes.

En resumen los métodos filogenéticos han permitido la estimación de tiempos de divergencia, reconstrucción de proteínas antiguas, encontrar los residuos de aminoácidos que son importantes para la selección natural, detectar puntos de recombinación, identificar mutaciones que probablemente estén asociadas con enfermedades, determinar la identidad de los patógenos, etc. (Holder y Lewis, 2003).

5.2 Métodos para la reconstrucción de árboles filogenéticos:

Los cuatro métodos más comunes para construir filogenias de alineamientos de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos son:

- Métodos de distancia de los cuales “*Neighbor Joining*” (NJ) es el favorito.
- Máxima Parsimonia (*Maximum parsimony*).
- Máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*).
- Bayesiano.

Ninguno de estos métodos es el mejor para todas las circunstancias. El método de selección depende del tamaño y complejidad de los datos (Hall, 2001). Algunas ventajas y desventajas de cada método se muestran en la tabla 2.

5.2.1 *Neighbor joining*.

Este método es especialmente adecuado cuando varía la velocidad de evolución de linajes en estudio. Este método selecciona las secuencias que deben unirse para estimar mejor la longitud de las ramas que reflejan más estrechamente la distancia actual entre las secuencias (Mount, 2001).

Este método es relativamente rápido por que usa una matriz de distancia, la cual reduce su tamaño en cada paso. Busca el par de organismos con menor distancia y calcula la nueva distancia desde este nodo con los demás organismos. Se ejecuta bien cuando la divergencia entre las secuencias es baja. Una debilidad de este método es que las diferencias observadas entre las secuencias no son el reflejo preciso de las distancias evolutivas entre éstas. Las substituciones

múltiples en el mismo sitio obscurecen la distancia verdadera y hace que las secuencias parezcan artificialmente cercanas (Holder y Lewis, 2003).

5.2.2 Máxima parsimonia.

Este método predice el árbol evolutivo que minimiza el número de pasos requeridos para generar la variación observada en las secuencias. Se usa para secuencias que presentan gran similitud, o que han evolucionado recientemente y para números pequeños de secuencias. El algoritmo que utiliza no es complicado, utiliza los sitios informativos que son nucleótidos en una posición dada que favorecen algunos árboles sobre otros. Después de identificar los sitios informativos, para cada árbol se calcula el número mínimo de sustituciones que originaron ese nucleótido en cada sitio informativo (Li y Graur, 1991).

Por esta razón el método consume mucho tiempo y no es útil para datos que incluyen un gran número de secuencias con gran variación (Mount, 2001).

5.2.3 *Bootstrap*.

Es una prueba estadística que permite calcular el grado de confianza de la topología de un árbol dado (Whelan et al., 2001). Esta prueba involucra la generación de pseudoréplicas de secuencias mediante reemplazo en determinados sitios al azar de las secuencias originales. Predice como se modifica la topología si se hiciera una mayor cantidad de muestreos para las mismas secuencias (Holder y Lewis, 2003).

5.2.4 Máxima verosimilitud.

Reconstruye exactamente la relación entre las secuencias que se separaron hace largo tiempo o que evolucionaron rápidamente. Es un método que corrige múltiples eventos de mutación en el mismo sitio. Este método considera todas las posibles rutas de mutación que son compatibles con los datos y la función de probabilidad, es una herramienta poderosa en la inferencia estadística en general. (Holder y Lewis, 2003).

5.2.5 Bayesiano.

Es una variante del método de máxima verosimilitud. En lugar de buscar el árbol que maximiza la probabilidad de observar los datos, éste busca los árboles con la mayor probabilidad dados los datos. En lugar de producir un solo árbol, el análisis bayesiano produce un grupo de árboles robustos de igual probabilidad. Los resultados son fáciles de interpretar por que la frecuencia de una taxa dada en un grupo de árboles es virtualmente idéntica a la probabilidad de una taxa.

Tabla 2. Comparación de métodos para reconstrucción de filogenias.

Método	Ventajas	Desventajas	Software
Neighbor Joining	Rápido.	Pérdida de información al comprimir las secuencias en distancias; difícil obtener estimados confiables para secuencias divergentes.	PAUP MEGA PHYLIP
Máxima Parsimonia.	Rápido para el análisis de cientos de secuencias; robusto si las ramas son cortas (secuencias estrechamente relacionadas).	Ejecución pobre si hay una variación substancial en la longitud de las ramas.	PAUP NONA MEGA PHYLIP
Máxima verosimilitud.	Captura toda la probabilidad de que los datos indican la filogenia bajo un modelo dado.	Puede ser extremadamente lento, dependiendo de lo minucioso de la investigación y acceso a fuentes computacionales.	PAUP PAML PHYLIP TREE-PUZZLE
Bayesiano.	Tiene una fuerte conexión con el método de máxima verosimilitud, aunque puede ser más rápido.	Las distribuciones anteriores para los parámetros deben especificarse.	MrBayes BAMBE

Modificado de Holder y Lewis, 2003.

II. ANTECEDENTES

En el caso particular de los hongos la taxonomía se ha basado principalmente en criterios morfológicos y en las características de las estructuras de reproducción sexuada, ya que permiten distinguir entre familias, sin analizar los atributos bioquímicos o fisiológicos. En la actualidad para estudios taxonómicos, de identificación y de diagnóstico se hacen indispensables los estudios de DNA y RNA de los organismos fúngicos en su forma parasitaria o en cultivo (Arenas, 2003).

En 1993 Berbee y Taylor publicaron un estudio de las relaciones evolutivas en un grupo de hongos Ascomicetos, Citridos, Zigomicetos y Basidiomicetos. En este usaron las secuencias del gen de RNA ribosomal 18S disponibles en las bases de datos y otros secuenciados por ellos. En el estudio se resolvieron relaciones que resultaban difíciles de determinar morfológicamente para algunos hongos. También propusieron que los linajes de hongos de reproducción asexual derivaron más recientemente que los de reproducción sexual.

Utilizando el método de máxima parsimonia se generaron 6 árboles, en la figura 6 se muestra uno de los árboles más parsimoniosos, encontrando que este soporta la taxonomía tradicional de los hongos; Ascomicetos y Basidiomicetos aparecieron como grupos hermanos, ya que divergen a partir de un ancestro común, aunque cada uno pertenece a un grupo monofilético. Para tener una escala de tiempo geológico con respecto al relativo usaron un registro fósil y la edad del hospedero o simbiote del hongo.

Los resultados sugieren que Ascomicetos y Basidiomicetos se originaron hace 400 ± 125 millones de años, las levaduras relacionadas con *Saccharomyces cerevisiae* y hongos del género *Penicillium* y *Aspergillus* parecen de origen más reciente.

La secuencia del gen rRNA 18S de 2 cepas patógenas de *S. schenckii* fueron casi idénticas a la secuencia de *Ophiostoma stenoceras* sugiriendo que *S. schenckii* tiene probablemente menos de 20 millones de años de historia evolutiva sin reproducción sexual (Berbee y Taylor, 1993).

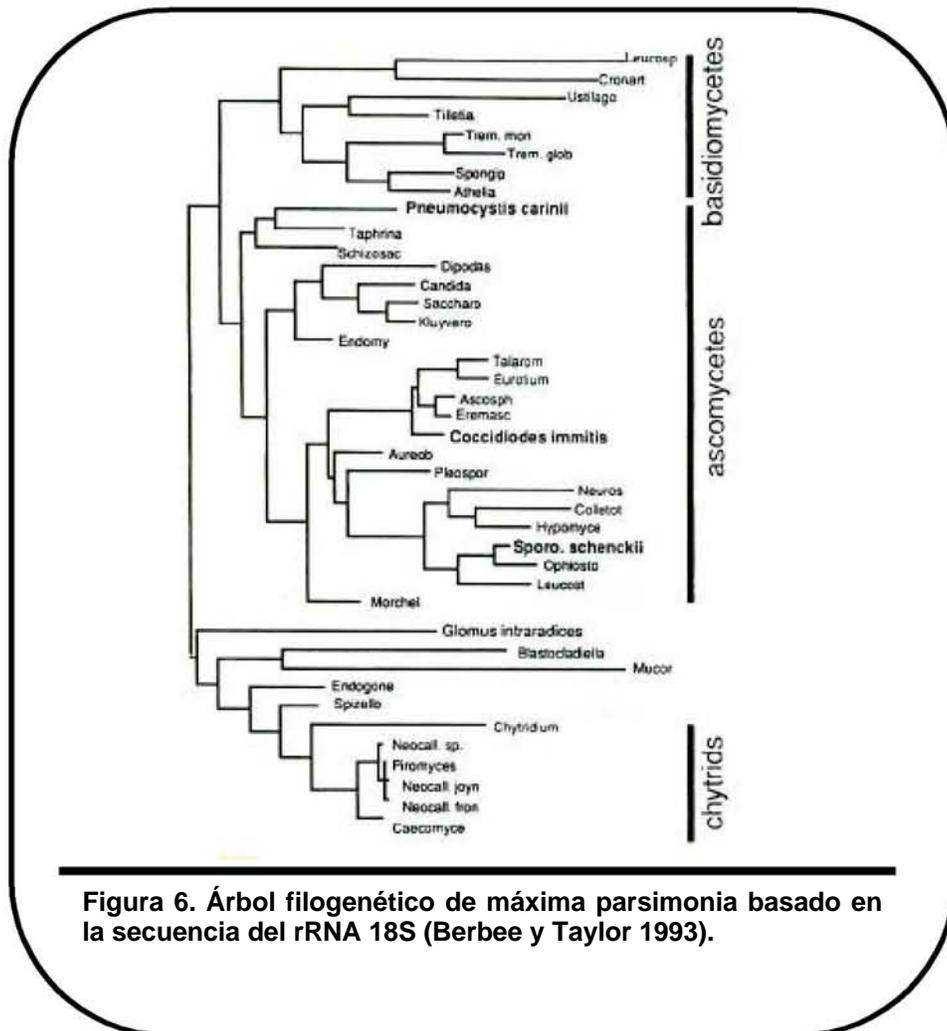
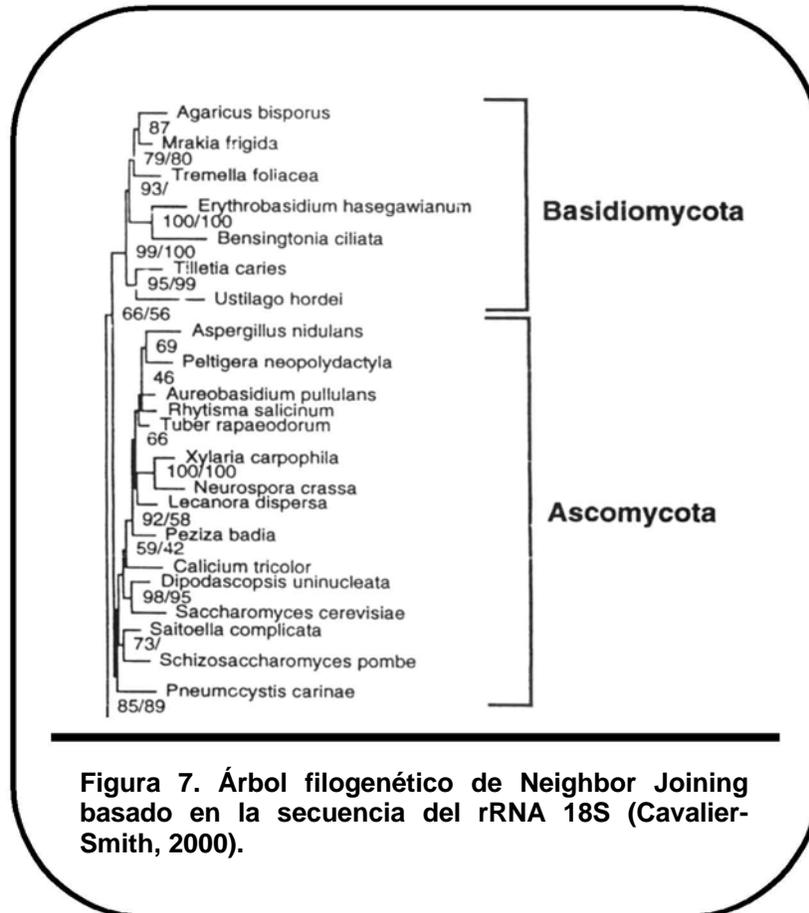


Figura 6. Árbol filogenético de máxima parsimonia basado en la secuencia del rRNA 18S (Berbee y Taylor 1993).

Por otra parte Cavalier- Smith generó un árbol filogenético de *Neighbor Joining* basado en 1525 pb de la misma secuencia de rRNA 18S como se muestra en la figura 7, el cual soporta la taxonomía tradicional de hongos y que guarda

relaciones filogenéticas semejantes a las ya reportadas por Berbee y colaboradores.



Posteriormente se generó un árbol utilizando la misma secuencia de rRNA 18S y por el método de máxima verosimilitud se realizó el análisis y la construcción del árbol que se muestra en la figura 8 (Cavalier-Smith, 2000).

Este árbol incluye un mayor número de hongos mostrando su diversificación y da una clara idea de los principales linajes. También soporta la taxonomía tradicional del reino de los hongos.

En los árboles de las figuras 6 y 7 se observó que se encuentran separados los Ascomycetes y Basidiomycetes. Dentro del grupo de los Ascomycetes están las

levaduras en dos ramas diferentes y en el grupo de los hongos filamentosos se encuentra *S. schenckii* y hongos estrechamente relacionados como *Neurospora crassa* y hongos del genero *Ophiostoma*. Para este último se ha encontrado que *S. schenckii* difiere con *Ophiostoma stenoceras* en 3 nucleótidos de 1700 bases secuenciadas del gene ribosomal 18S y con *Ophiostoma ulmi* difiere en 28 nucleótidos (Berbee y Taylor, 1992).

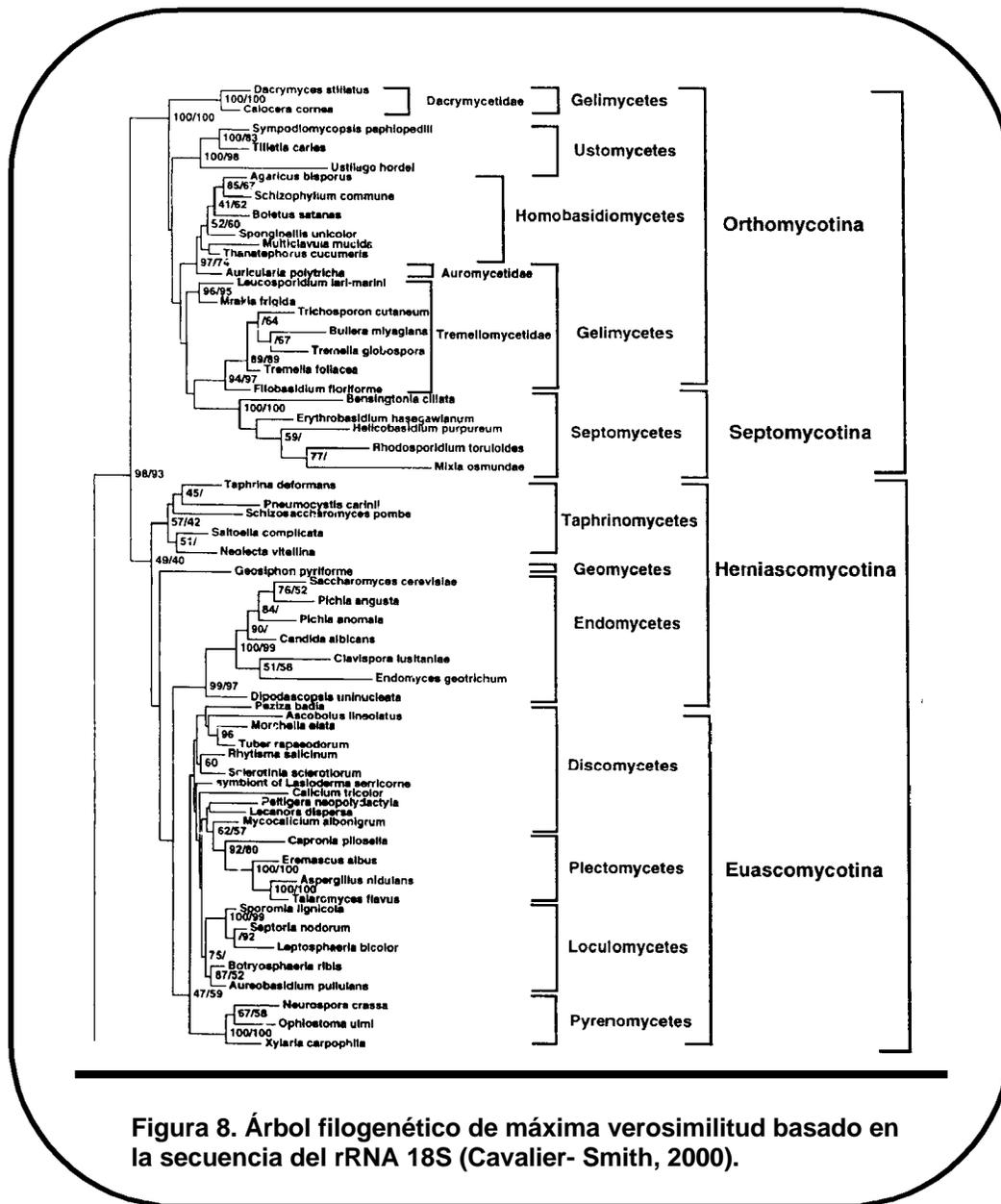


Figura 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la secuencia del rRNA 18S (Cavalier- Smith, 2000).

III. OBJETIVO GENERAL:

Analizar las relaciones filogenéticas del hongo *S. schenckii* utilizando un fragmento de la secuencia del gen mitocondrial *cox-II* como marcador molecular.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Obtener la secuencia de un fragmento de la secuencia del gen mitocondrial *cox-II*.
2. Alinear y comparar secuencias homólogas de otros hongos para analizar la variabilidad de este gen.
3. Construir filogenias (generando árboles de *Neighbor Joining* y máxima parsimonia) con las secuencias de *cox-II*.
4. Analizar las relaciones filogenéticas del hongo *S. schenckii* a partir de los árboles construidos.

IV. HIPÓTESIS

Los genes mitocondriales tienen una tasa de mutación mayor que los genes nucleares, por lo que fragmentos pequeños del gen *cox-II* serán capaces de resolver las relaciones filogenéticas entre *S. schenckii* y otros hongos.

V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

5.1 Amplificación de un fragmento del gen *cox-II* de *S. schenckii*.

El fragmento del gen *cox-II* de *S. schenckii* se obtuvo por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos degenerados:

Sentido 5'TWW TAT TAW TTA TTG CTT3'

Antisentido 5' ATA TGA WTC AAA TWY AAT3' (Donde W = A+T y Y = C+T).

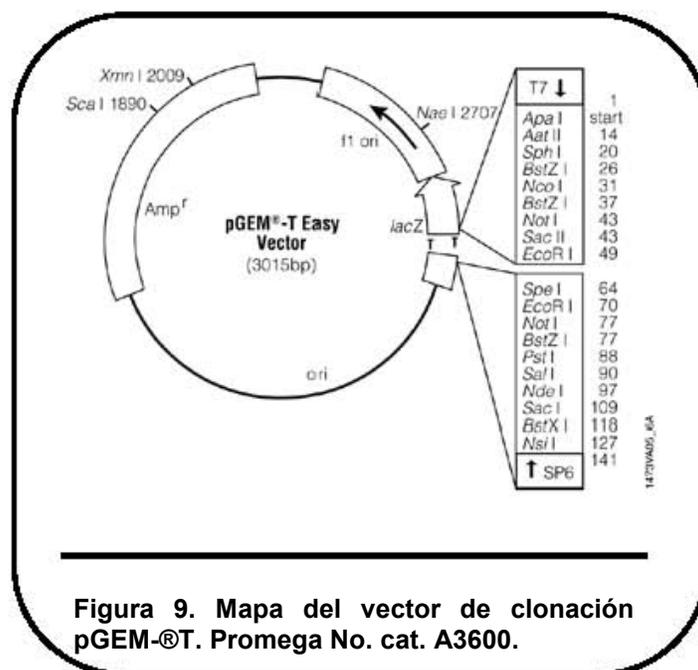
Los cuales fueron diseñados a partir de secuencias reportadas para el mismo gen en hongos estrechamente relacionados (*Neurospora crassa*, *Podospora anserina* y *Aspergillus sp.*, entre otros). Para la reacción de PCR los oligonucleótidos sintetizados fueron usados a una concentración de 2.5 μ M en un volumen final de 20 μ L, en presencia de MgCl 2.5 mM y Taq polimerasa 0.5 U. El protocolo de amplificación se realizó en un termociclador iCycler de Biorad, el programa consistió de un ciclo inicial de 4 minutos a 94 °C para desnaturalizar el DNA y 30 ciclos de 3 pasos: 60 segundos a 94 °C, 60 segundos a 42 °C para permitir el alineamiento de los oligonucleótidos al DNA templado y 60 segundos a 72 °C. para iniciar la polimerización, con un ciclo final de extensión a 72 °C por 5 minutos para asegurar que todas las cadenas tuvieran una polimerización completa.

Para verificar la amplificación del gen se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, el cual se tiñó con bromuro de etidio a una concentración final de 1 μ g/ml y se visualizó en un transiluminador de luz UV. Paralelamente en cada experimento se incluyó un control negativo sin DNA.

5.2 Clonación del fragmento amplificado del gen *cox-II* de *S. schenckii*.

Una vez que se verificó la presencia del gen *cox-II*, se realizó una ligación en un vector T pGem (Promega, fig. 9). Se realizó una transformación en células competentes JM109, en un volumen de 50 μ l se agregaron 25 ng de la reacción de ligación y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se dio un choque térmico a 42°C durante 90 segundos y se colocó el tubo en hielo por 2 minutos adicionales. Se adicionó medio LB a un volumen final de 1 ml y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Al final se sembraron 100 μ l de la reacción de transformación en cajas petri con

medio LB con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml y se incubaron toda la noche a 37 °C. Para corroborar la clonación de los fragmentos se amplificó el DNA de 10 clonas seleccionadas al azar bajo las condiciones ya descritas. El fragmento clonado se secuenció.



5.3 Secuenciación de un fragmento del gen *cox-II* de *S. schenckii*.

Las clonas que contuvieron plásmidos con el amplificado del gen *cox-II* de *S. schenckii* fueron crecidas en medio de Luria con ampicilina para realizar maxipreparaciones, a las que se sometió a una purificación pasándola a través de una columna de sílica. La presencia y pureza de las muestras se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, se cuantificaron en un fluorómetro y se llevaron a una concentración de 1200 ng para su secuenciación en CINVESTAV, Irapuato. Gto.

5.4 Reconstrucción filogenética.

Una vez que se obtuvo la secuencia del fragmento del gen *cox-II* de *S. schenckii* se realizó una comparación con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). En la tabla 3 se enlistan los hongos y sus respectivas secuencias del gen *cox-II* utilizados para la construcción del árbol filogenético.

Las secuencias de los hongos fueron obtenidas en formato Fasta, posteriormente se hizo la traducción en los seis marcos de lectura para poder localizar las regiones codificantes y poder discriminar intrones, como fue el caso de *Podospora anserina*. Una vez localizada la región homóloga en aminoácidos de los hongos con respecto a nuestra secuencia de *S. schenckii*, se regresó a la secuencia de nucleótidos, esto sin que fuera afectado por el código genético degenerado.

Las secuencias en marco de lectura fueron alineadas con Clustal W contenido en BioEdit versión 7.0.0, se les eliminó los extremos, así como los intrones y fueron convertidas al formato que es reconocido por MEGA 3.1 para posteriormente construir una filogenia por el método *Neighbor Joining* y un análisis de *Bootstrap* para 10000 pseudoréplicas.

Tabla 3. Hongos incluidos en el estudio filogenético.

	No. de Acceso en el GenBank	Comentario
Ascomycota		
<i>Aspergillus nidulans</i>	X15441.1	Sinónimo: <i>Emericella nidulans</i>
<i>Aspergillus niger</i>	DQ207726.1	
<i>Aspergillus oryzae</i>	AP007176.1	Fase teleomorfa: <i>Eurotium oryzae</i>
<i>Candida glabrata</i>	X69430.1	Sinónimo: <i>Torulopsis glabrata</i>
<i>Candida glabrata</i>	AF450301.1	Sinónimo: <i>Torulopsis glabrata</i>
<i>Epidermophyton floccosum</i>	AY916130.1	
<i>Kluyveromyces africanus</i>	AJ235922.1	
<i>Kluyveromyces lodderae</i>	AJ235925.1	
<i>Neurospora crassa</i>	K00825.1	
<i>Penicillium marneffeii</i>	AY347307.1	
<i>Podospora anserina</i>	X55026.1	
<i>Saccharomyces rosinii</i>	AF442218.1	
<i>Saccharomyces unisporus</i>	AF442214.1	
<i>Sporothrix schenckii</i> EH-265	*****	Aún no depositados en el GenBank
<i>Trichophyton rubrum</i>	X65223.1	
Basidiomycota		
<i>Crinipellis perniciosa</i>	AY376688.1	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	AY101381.1	
<i>Filobasidiella neoformans</i>	AY138989.1	Fase anamorfa: <i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Schizophyllum commune</i>	AF402141.1	
Zygomycota		
<i>Rhizopus oryzae</i>	AY863212.1	*Varios sinónimos

Nota. Las respectivas fases y sinónimos son las propuestas en el NCBI.

VI. RESULTADOS.

Con el objetivo de realizar un análisis filogenético de *S. schenckii* y otras especies de hongos utilizando un fragmento de la secuencia del gen *cox-II*, se amplificó un fragmento de éste y posteriormente se clonó en el vector pGEM®-T. La presencia del fragmento clonado se corroboró por electroforesis en un gel de agarosa como se muestra en la figura 10.

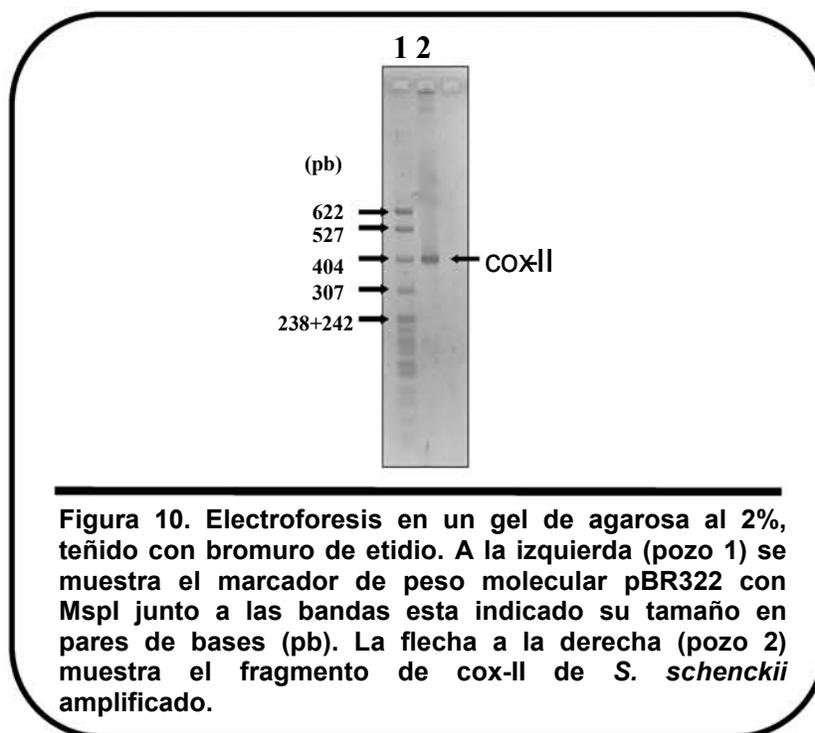


Figura 10. Electroforesis en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. A la izquierda (pozo 1) se muestra el marcador de peso molecular pBR322 con *MspI* junto a las bandas esta indicado su tamaño en pares de bases (pb). La flecha a la derecha (pozo 2) muestra el fragmento de *cox-II* de *S. schenckii* amplificado.

Posteriormente el fragmento del gen *cox-II* de *S. schenckii* fue secuenciado. La secuencia se muestra en la figura 11, las regiones sombreadas pertenecen a la secuencia del vector de clonación pGEM®-T.

```

1 GAATTCGATT TTATATTATT TATTGCTTTC CCTTCTTTTA AGTTATTATA
51 CTTAATGGAT GAAGTTAGTG ATCCTTCAAT GTCTATTTTA GCTGAAGGAC
101 ATCAATGATA TTGAAGTTAC CAATACCCTG ATTTCTAGA TTCTAATGAA
151 GAATTTATTG AATTTGAATC ATATAATCAC TAGT

```

Figura 11. Secuencia del fragmento del gen *cox-II* de *S. schenckii*.

Con base en el fragmento del gen *cox-II* secuenciado se calculó la composición de las bases de la cadena codificante, mostrando una alta proporción de Adenina-Timina que corresponde al 73.3% (tabla 4).

Tabla 4. Composición de nucleótidos de la cadena sencilla secuenciada.

Base	Número	%
A	50	30.3
C	22	13.3
G	22	13.3
T	71	43.0

Con el objetivo de conocer la probable secuencia de aminoácidos se realizó la traducción de la secuencia del gen *cox-II* manualmente empleando el código genético mitocondrial de *Neurospora crassa* (ver Apéndice) debido a que este es un hongo estrechamente relacionado con *S. schenckii* (Berbee y Taylor, 1993; Cavalier-Smith, 2000), en la figura 12 se muestran los aminoácidos junto a su respectivo codón.

```

1  TTT ATA TTA TTT ATT GCT TTC CCT TCT TTT AAG TTA TTA TAC TTA ATG
   Phe Ile Leu Phe Ile Ala Phe Pro Ser Phe Lys Leu Leu Tyr Leu Met

49 GAT GAA GTT AGT GAT CCT TCA ATG TCT ATT TTA GCT GAA GGA CAT CAA
   Asp Glu Val Ser Asp Pro Ser Met Ser Ile Leu Ala Glu Gly His Gln

97 TGA TAT TGA AGT TAC CAA TAC CCT GAT TTC CTA GAT TCT AAT GAA GAA
   Trp Tyr Trp Ser Tyr Gln Tyr Pro Asp Phe Leu Asp Ser Asn Glu Glu

145 TTT ATT GAA TTT GAA TCA TAT
     Phe Ile Glu Phe Glu Ser Tyr

```

Figura 12. Traducción a aminoácidos de la secuencia del fragmento cox-II de *S. schenckii*.

Con la finalidad de observar las relaciones filogenéticas entre diversos hongos se alinearon 163 nucleótidos de las secuencias del gen cox-II de *S. schenckii* con las secuencias homologas de otros hongos Ascomicetos, Basidiomicetos e incluyendo un Zigomiceto, las cuales se muestran en la figura 13. Se puede observar las regiones conservadas representadas por los puntos. Se observa que *S. schenckii* comparte mayor similitud con *Neurospora crassa* con quien difiere sólo en 21 nucleótidos y en 22 nucleótidos con *Podospora anserina* (tabla 5).

Tabla 5. Número de bases diferentes comparadas con el fragmento del gene *cox-II* de *S. schenckii*.

	No. Bases
Ascomycota	
<i>Aspergillus nidulans</i>	41
<i>Aspergillus niger</i>	40
<i>pAspergillus oryzae</i>	38
<i>Candida glabrata</i> X69430.1	43
<i>Candida glabrata</i> AF450301.1	42
<i>Epidermophyton floccosum</i>	44
<i>Kluyveromyces africanus</i>	38
<i>Kluyveromyces lodderae</i>	43
<i>Neurospora crassa</i>	21
<i>Penicillium marneffeii</i>	41
<i>Podospora anserina</i>	22
<i>Saccharomyces rosinii</i>	43
<i>Saccharomyces unisporus</i>	41
<i>Trichophyton rubrum</i>	42
Basidiomycota	
<i>Crinipellis pernicioso</i>	55
<i>Cryptococcus neoformans</i>	53
<i>Filobasidiella neoformans</i>	53
<i>Schizophyllum commune</i>	50
Zygomycota	
<i>Rhizopus oryzae</i>	46

Posterior al análisis de las secuencias de los diferentes hongos incluyendo a *S. schenckii* se construyeron 9 árboles filogenéticos con el método de Máxima Parsimonia, de los cuales se muestra uno en la figura 14 con *Bootstrap* para 10000 pseudorélicas para cada nodo, utilizando el Programa MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004)

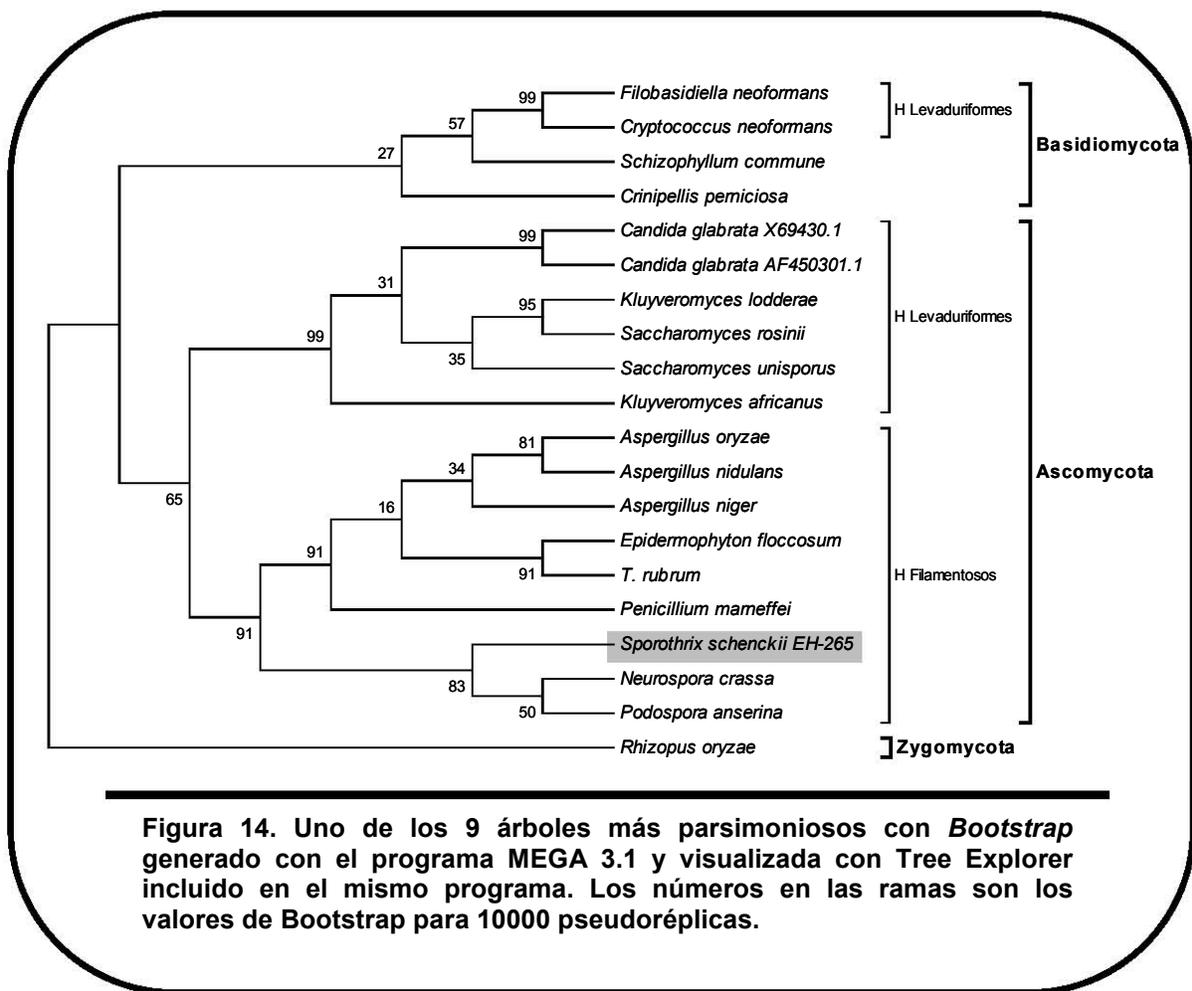


Figura 14. Uno de los 9 árboles más parsimoniosos con *Bootstrap* generado con el programa MEGA 3.1 y visualizada con Tree Explorer incluido en el mismo programa. Los números en las ramas son los valores de *Bootstrap* para 10000 pseudorélicas.

Con el objetivo de conocer si la topología del árbol se conservaba al hacer la reconstrucción filogenética por otros métodos, se realizó la reconstrucción por el método de *Neighbor Joining* con *Bootstrap* para 10000 pseudorélicas con el programa MEGA 3.1 (fig. 15). Este método genera árboles cuyas ramas son proporcionales al número de sustituciones en las secuencias, a diferencia del de *Máxima Parsimonia*, en el que sólo se consideran los sitios informativos.

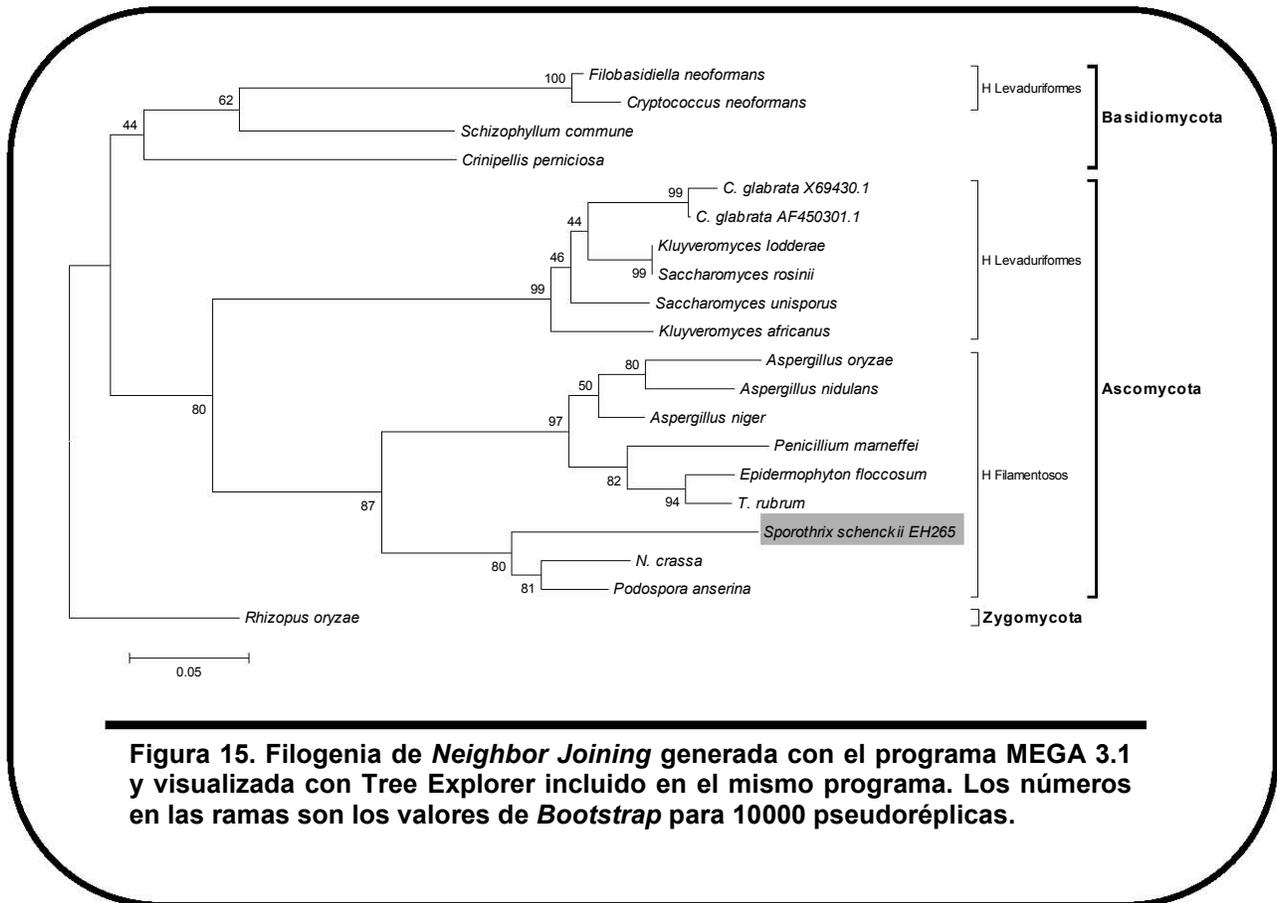


Figura 15. Filogenia de *Neighbor Joining* generada con el programa MEGA 3.1 y visualizada con Tree Explorer incluido en el mismo programa. Los números en las ramas son los valores de *Bootstrap* para 10000 pseudoréplicas.

DISCUSIÓN

Los patrones electroforéticos generados por análisis de RFLP, RAPD, etc. se han utilizado para cuantificar las variaciones entre cepas, estimando sus relaciones filogenéticas representadas en un árbol (Frisvad et al., 1998). Sin embargo, la mayoría de diferencias en el patrón de bandas son difíciles de interpretar porque la intensidad de las bandas y la reproducibilidad no son absolutamente consistentes. Los métodos basados en la comparación de patrones son medidas indirectas de divergencia genética (Sanson y Briones, 2000). Por lo anterior la comparación directa de secuencias de DNA de un fragmento del gen *cox-II* se ha preferido para determinar las relaciones filogenéticas de *S. schenckii* con diversas especies de hongos.

La tabla 5 muestra por el número de diferencias en las bases del fragmento de *cox-II* a las especies de hongos que se encuentran más estrechamente relacionados con *S. schenckii*. Estas diferencias se reflejaron en los árboles filogenéticos construidos.

La filogenia de Máxima Parsimonia generada con el programa MEGA 3.1 utilizando la secuencia de un fragmento del gen *cox-II* de *S. schenckii* y las secuencias de otros hongos, nos permitió separar perfectamente entre basidiomicetos (*Schizophillum comune*, *Crinipellis perniciosa*, *Cryptococcus neoformans* y *Filobasidiella neoformans*) y ascomicetos (*S. schenckii*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces rosinni*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium marneffeii*, *Neurospora crassa* y *Podospora anserina* entre otros) usando como grupo externo el zigomiceto *Rhizopus oryzae* (figura 14). Los valores de *Bootstrap* para cada rama indicaron que los datos sí aportan información de la topología de la filogenia presentada, ya que 12 de 17 valores son superiores a 50.

En este árbol también se observó que el grupo de los ascomicetos se separa en dos grandes grupos: hongos filamentosos y hongos levaduriformes. En el grupo de los hongos filamentosos encontramos al hongo dimórfico *S. schenckii* el cual está más cercanamente relacionado a otros hongos filamentosos. *Penicillium marneffeii*, otro hongo dimórfico, se encontró estrechamente relacionado con el género *Aspergillus* como ya se había observado (Woo, et al., 2003). Los hongos levaduriformes de los géneros *Candida*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* se encuentran más distantemente relacionados con *S. schenckii*. Lo anterior coincide con las observaciones filogenéticas realizadas con la subunidad 18S del RNA ribosomal (Berbee y Taylor, 1993; Cavalier-Smith, 2001).

En el análisis filogenético se encontró que el género *Aspergillus* se separa en dos grupos, sin embargo, éstos se encuentran estrechamente relacionados. Los hongos patógenos *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* comparten la rama con *Penicillium marneffeii*. Otra rama del grupo de los hongos filamentosos es la que se encuentra formada por los hongos *Neurospora crassa* y *Podospora anserina* quienes comparten la misma rama y a su vez se encuentran ligados a *S. schenckii*. Relaciones filogenéticas muy semejantes han sido descritas por otros investigadores (Galagan, et al., 2005; Woo et al., 2003).

Los géneros *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* son grupos que no están bien definidos, mostrando una gran variabilidad intraespecie. Dicha variabilidad coincide con la encontrada por Belloch y colaboradores, quienes construyen un árbol basado en *Neighbor Joining*. Ellos forman el grupo de “*Saccharomyces cerevisiae*” constituido por *Kluyveromyces lodderae*, *Saccharomyces exigus*, *Kluyveromyces delphensis*, *Kluyveromyces polysporus*, *Kluyveromyces africanus* y *Candida glabrata* entre otros, considerándolo como un grupo parafilético, es decir, que aunque tienen un origen en común se encuentran en ramas separadas (Belloch et al., 2000). Este grupo no es apreciable en nuestra filogenia debido a que no incluye a todos los hongos mencionados.

Cryptococcus neoformans y *Filobasidiella neoformans* quedan juntos en una rama, de manera consistente, ya que este último es la fase asexual de *Cryptococcus neoformans*.

Al construir el árbol filogenético por el método de Neighbor Joining con los mismos alineamientos de la figura 13, se observó que la información de las secuencias del fragmento del gen *cox-II* apoya la misma topología que con el método de Máxima Parsimonia, mostrando por tanto la misma información taxonómica. Por otro lado, los resultados nos indican que el pequeño fragmento de 165 pb del gen *cox-II* aporta la información suficiente para resolver las relaciones filogenéticas de *S. schenckii* y diferentes especies de hongos. Ambos métodos de reconstrucción filogenética son sólidos, respetando la taxonomía tradicional de los hongos.

CONCLUSIONES

El fragmento del gen mitocondrial *cox-II* en este estudio resultó un buen marcador molecular que permitió corroborar las relaciones filogenéticas entre diversas especies de hongos, situándolos en dos grandes grupos Ascomicetos y Basidiomicetos. *S. schenckii* se encontró estrechamente relacionado con los hongos filamentosos como *Neurospora crassa*, *Podospora anserina*, *Penicillium marneffe* y el genero *Aspergillus*.

Tanto el árbol de Máxima Parsimonia como el de *Neighbor Joining* generados con la secuencia del fragmento del gen *cox-II* apoyan la taxonomía ya establecida del reino de los hongos.

BIBLIOGRAFÍA

- Arenas, R. 2003. Taxonomía y Clasificación. Micología Médica Ilustrada 2ª edición. Mc Graw Hill-Interamericana. México D.F. pp 35-39.
- Ayala, J. Francisco. 1980. Evolución Molecular. Ed. Omega. España. Capitulo 1, 2 y 11.
- Beer, Z. B., Harrington, T. C., Vismer, H. F., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. 2003. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. Mycology 95: 434-441.
- Belloch, C., Querol, A., García, M.D., and Barrio, E. 2000. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. Int. J. Syst. Microbiol. 50: 405-416.
- Berbee, M.L. and Taylor, J.W. 1992. 18S Ribosomal RNA sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. Exp. Mycol. 16:87-91.
- Berbee, M.L. and Taylor, J.W. 1993. Ascomycete relationships: dating the origin of asexual lineages with 18S ribosomal RNA gen sequence data. The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. CAB International.
- Bonifaz A. Esporotricosis. Micología Médica Básica 2ª edición. Méndez Editores México D.F. 2000. pp 185-206.
- Bullerwell C. E. and Lang B. F. 2005. Fungal evolution: the case of the vanishing mitochondrion. Curr. Opin. Microbiol. 8:362–369.
- Burger, G., Gray, W.M. and Lang, F. 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. Trends Genet. 19: 709-716.
- Capaldi, A. R. 1990. Structure and function of cytochrome c oxidase. Annu. Rev. Biochem. 59:569-596.
- Cardazzo, B., Rinaldi, T., Frontali, L., Carignani, G., and Palleschi, C. 1997. Evolution of mitochondrial genomes in yeast: A study of

-
- mitochondrial divergence in two closely related species, *Saccharomyces douglassi* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Evol.* 14:200-203.
- Cavalier-Smith. 2001. What are fungi?. *The Mycota*. VII parte p. 3-38. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
 - Fisrvad, J. C., Bridge, P. D., Arora, D. K.1998. Chemical fungal taxonomy. Use of PCR an RFLP in fungal systematics. Ed. M. Dekker, USA.
 - Galagan J. E., Calvo S. E., 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*. 438:1105-1115.
 - Giribet, G., Distel, D.L., Polz, M., Sterrer and wheeler. C.W. 2000. Triploblastic relationships with emphasis on the acoelomates and the position of Gnathostomulida, Cycliophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: A Combined Approach of 18S RNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* 49:539–562.
 - Hamari, Zsuzsanna., Juhász, Ákos., Gácsér, Attila., Kucsena, Judit., Pfeiffer, Ilona., and Kevei, Ferenc. 2001. Intron mobility results in rearrangement in mitochondrial DNAs of heterokaryon incompatible *Aspergillus japonicus* strains after protoplast fusion. *Fungal Genet. Biol.* 33:83-95.
 - Hall, B. G. 2001. *Pylogenetic trees made easy. A how-to manual for molecular biologist.* Sinauer Associates, Inc. Massachusetts USA.
 - Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
 - Holder, M. and Lewis, O. P. 2003. Phylogeny estimation traditional and Bayesian approaches. *Nature Rev. Genet.* 4: 275-283.
 - Kwon-Chung and Jolin E. Bennett. 1992. *Medical Mycology.* Ed. Lea & Febiger. U.S.A.
 - Kurland, G.C., and Anderson, E.G. 2000. Origin and evolution of the Mitochondrial Proteome. *Microbiol. Mol. Biol Rev.* 64:786-820.

-
- Kumar S., Tamura K., and Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* 5:150-163.
 - Li, W.H. and Graur D., 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*, p 111-113. Sinauer Associates, USA.
 - Littlewood, D.T.J., Rhode, K. and Clough, K.A. 1998. The phylogenetic position of *Udonella* plathelminthes. *Int. J. Parasitol.* 28:1241-1250.
 - MacAlpine, M.D., Perlman, S.P. and Butow, A.R. 2000. The numbers of individual mitochondrial DNA molecules and mitochondrial DNA nucleoids in yeast are co-regulated by the general amino acid control pathway. *EMBO J.* 19:765-775.
 - Macino, G. and Morelli, G. 1983. Cytochrome oxidase subunit 2 gene in *Neurospora crassa* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 258:13230-13235.
 - Mendonca-Hagler, L., Travassos, L.R., Lloyd, K.O. and Phaff, H.J. 1974. Deoxyribonucleic acid base composition and hybridization studies on the human pathogen *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis species*. *Infect. Immun.* 9:934-938.
 - Mora, Cabrera Minerva D. Polimorfismo del DNA mitocondrial de aislamientos de *Sporothrix schenckii*. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 1997.
 - Mount, D.W., 2001. *Bioinformatics sequence and genome analyses. Phylogenetic Prediction.* p. 237-379. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York USA
 - Paquin, B., Laforest, M.J., Ingeborg, R.F., Wang, S., Longeore, J. and Lang, F. 1997. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr. Genet.* 31:380-395.
 - Rippon, J.W., 1990, *Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes*, p.325, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

-
- Ruíz E. J., Arenas, R. y Vega, M. M. E. 1996. Esporotricosis: estudio histopatológico de 22 casos. *Dermatología Rev. Mex.* 40:106-112.
 - Sanson, O. F. G. And Briones, S. R. M. 2000. Typing of *Candida glabrata* in clinical isolates by comparative sequence analysis of the cytochrome c oxidase subunit 2 gene distinguishes two clusters of strains associated with geographical sequence polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 38: 227-235.
 - Shadel, S.G. 1999. Yeast as a model for human mtDNA replication. *Am. J. Hum. Genet.* 65:1230-1237.
 - Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, submitted, June 1994.
 - Velázquez, A. A., Valdez, V. 2005. Lo que somos y el genoma humano. Ed. Fondo de Cultura Económica.
 - Whelan S., Lio P., Goldman N. 2001. Molecular phylogenetics: state-of-art methods for looking into the past. *Trends Genet.* 17:262-272.
 - Woo P.C.Y., Zhen H., Cai J. J. 2003. The mitochondrial genome of the thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffe* is more closely related to those of molds than yeasts. *FEBS Lett.* 555:469-477

ABREVIATURAS

A	adenina
<i>atp9</i>	gen de la subunidad 9 de la ATP sintetasa
C	citosa
COB	apocitocromo b
COX-II	citocromo oxidasa II
<i>cox-II</i>	gen de la citocromo c oxidasa II
c.b.p.	cuanto baste para
DNA	ácido desoxiribonucleico
e ⁻	electrón
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
°C	grados centígrados
G	guanina
g	gramos
ITS	espaciador interno transcrito (por sus siglas en inglés)
Kb	kilopares de bases
LB	agar Luria
LSU	subunidad ribosomal grande
mg	miligramos
ml	mililitros
mtDNA	ácido desoxiribonucleico mitocondrial
μl	microlitros
mM	milimolar
μM	micromolar
min.	minutos
M	molar
MOPS	ácido 4-morfolinopropanosulfónico
MQ	doblemente desionizada
ng	nanogramos

N-J	<i>Neighbor Joining</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	marco de lectura abierto
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pb	pares de bases
pH	potencial de hidrógeno
%	por ciento
RAPD	polimorfismo del DNA amplificado al azar
RFLP	polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
rRNA	Ácido ribonucleíco ribosomal
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
<i>S. schenckii</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>
T	timina
tRNA	Ácido ribonucleíco de transferencia
TE	Tris-EDTA
UFC	Unidades formadoras de colonias
URF	fragmentos de lectura no identificados
YPD	medio de levadura-papa-dextrosa

APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Tfbl pH 5.8 para 500 ml

Acetato de potasio	1.47 g
Cloruro de manganeso	4.95 g
Cloruro de potasio	3.73 g
Cloruro de calcio	0.74 g
Glicerina	60 ml

Mezclar, ajustar el pH a 5.8 con ácido acético 0.2 M, esterilizar por filtración y almacenar a 4°C hasta su uso.

TfbII para 500 ml

Mezclar 10.47 g de MOPS en 300 µl de agua destilada, ajustar el pH a 7 con NaOH 10 M, agregar

Cloruro de calcio	5.51 g
Cloruro de potasio	0.37 g
Glicerina	60 ml

Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C hasta su uso.

Medio LB para 250 ml

Extracto de levadura	1.25 g
Bacto-triptona	2.5 g
Cloruro de sodio	1.25 g
Bacto-agar	5 g
Agua c.b.p.	250 ml

Esterilizar en autoclave.

Transformación en células competentes JM109.

1. Descongelar las células competentes en hielo, colocar los tubos donde se hará la transformación en hielo (deben ser nuevos y estar fríos), en condiciones estériles.
2. Colocar 50 μ L de células competentes descongeladas en los tubos, agregar al tubo 50 ng de plásmido pGEM®.
3. Incubar en hielo por 30 minutos.
4. Dar un pulso de calor por 90 segundos a 42 °C.
5. Dejar en hielo por 2 minutos.
6. Agregar c.b.p 1000 μ L de medio luria o SOC.
7. Incubar a 37 °C por una hora para permitir la recuperación de las células del choque térmico.
8. Espatular 100 μ L en medio de selección (luria + ampicilina). Rotular las cajas.
9. Incubar a 37 °C toda la noche.

Código genético usado para la traducción del fragmento *cox-II* de *S. schenckii*.

Phe	UUU	Ser	UCU	Tyr	UAU	Cys	UGU
	UUC		UCC		UAC		UGC
Leu	UUA		UCA	Ter	UAA	Trp	UGA
	UUG		UCG		UAG		UGG
Leu	CUU	Pro	CCU	His	CAU	Arg	CGU
	CUC		CCC		CAC		CGC
	CUA		CCA	Gln	CAA		CGA
	CUG		CCG		CAG		CGG
Ile	AUU	Thr	ACU	Asn	AAU	Ser	AGU
	AUC		ACC		AAC		AGC
	AUA		ACA	Lys	AAA	Arg	AGA
Met	AUG		ACG		AAG		AGG
Val	GUU	Ala	GCU	Asp	GAU	Gly	GGU
	GUC		GCC		GAC		GGC
	GUA		GCA	Glu	GAA		GGA
	GUC		GCG		GAG		GGG

(Macino, et al., 1983).

Comparación del tamaño de genomas mitocondriales en diversos organismos.

Organismos	Tamaño del genoma (pb)	Numero total de genes*
Metazoa		
<i>Homo sapiens</i>	16 569	37
<i>Metridium senile</i>	17 443	17
Varios protistas		
<i>Reclinomonas americana</i>	69 034	96
<i>Monosiga brevicollis</i>	76 568	53
<i>Prototheca wickerhamii</i>	55 328	60
Plantas		
<i>Marchantia polymorpha</i>	186 609	68
<i>Arabidopsis thaliana</i>	366 924	52
Chytridiomycota (Hongos)		
<i>Allomyces macrogynus</i>	57 473	42
<i>Harpochytrium94</i>	19 473	24
<i>Harpochytrium105</i>	24 169	24
<i>Monoblepharella15</i>	60 432	25
<i>Hyaloraphidium curvatum</i>	29 593	23
<i>Spizellomyces punctatus</i>	61 347	24
<i>Rhizophyidium brooksianum</i>	68 834	23
Zygomycota (Hongos)		
<i>Mortierella verticillata</i>	58 745	42
<i>Rhizopus oryzae</i>	54 178	42
<i>Smittium culisetae</i>	58 654	42
Ascomycota (Hongos)		
<i>Hypocrea jecorina</i>	42 130	42
<i>Neurospora crassa</i>	64 840	43
<i>Podospora anserina</i>	94 192	43
<i>Candida albicans</i>	40 420	48
<i>Saccharomyces castellii</i>	25 753	34
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85 778	35
<i>Pichia canadensis</i>	27 694	43
<i>Yarrowia lipolytica</i>	47 916	44
<i>Schizosaccharomyces jap.</i>	80 059	34
<i>Schizosaccharomyces oct.</i>	44 227	35
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	19 431	36
Basidiomycota (Hongos)		
<i>Schizophyllum commune</i>	49 704	41
<i>Crinipellis pernicioso</i>	109 103	40

* No incluye ORFs ni ORFs de intrones.

Bullerwell, et al., 2005.

APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Tfbl pH 5.8 para 500 ml

Acetato de potasio	1.47 g
Cloruro de manganeso	4.95 g
Cloruro de potasio	3.73 g
Cloruro de calcio	0.74 g
Glicerina	60 ml

Mezclar, ajustar el pH a 5.8 con ácido acético 0.2 M, esterilizar por filtración y almacenar a 4°C hasta su uso.

Tfbll para 500 ml

Mezclar 10.47 g de MOPS en 300 µl de agua destilada, ajustar el pH a 7 con NaOH 10 M, agregar

Cloruro de calcio	5.51 g
Cloruro de potasio	0.37 g
Glicerina	60 ml

Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C hasta su uso.

Medio LB para 250 ml

Extracto de levadura	1.25 g
Bacto-triptona	2.5 g
Cloruro de sodio	1.25 g
Bacto-agar	5 g
Agua c.b.p.	250 ml

Esterilizar en autoclave.

Transformación en células competentes JM109.

1. Descongelar las células competentes en hielo, colocar los tubos donde se hará la transformación en hielo (deben ser nuevos y estar fríos), en condiciones estériles.
2. Colocar 50µL de células competentes descongeladas en los tubos, agregar al tubo 50 ng de plásmido pGEM®.
3. Incubar en hielo por 30 minutos.
4. Dar un pulso de calor por 90 segundos a 42 °C.
5. Dejar en hielo por 2 minutos.
6. Agregar c.b.p 1000 µL de medio luria o SOC.
7. Incubar a 37 °C por una hora para permitir la recuperación de las células del choque térmico.
8. Espatular 100 µL en medio de selección (luria + ampicilina). Rotular las cajas.
9. Incubar a 37 °C toda la noche.

Código genético usado para la traducción del fragmento *cox-II* de *S. schenckii*.

Phe	UUU	Ser	UCU	Tyr	UAU	Cys	UGU
	UUC		UCC		UAC		UGC
Leu	UUA		UCA	Ter	UAA	Trp	UGA
	UUG		UCG		UAG		UGG
Leu	CUU	Pro	CCU	His	CAU	Arg	CGU
	CUC		CCC		CAC		CGC
	CUA		CCA	Gln	CAA		CGA
	CUG		CCG		CAG		CGG
Ile	AUU	Thr	ACU	Asn	AAU	Ser	AGU
	AUC		ACC		AAC		AGC
	AUA		ACA	Lys	AAA	Arg	AGA
Met	ACG		AAG		AGG		
Val	GUU	Ala	GCU	Asp	GAU	Gly	GGU
	GUC		GCC		GAC		GGC
	GUA		GCA	Glu	GAA		GGA
	GUC		GCG		GAG		GGG

(Macino, et al., 1983).

Comparación del tamaño de genomas mitocondriales en diversos organismos.

Organismos	Tamaño del genoma (pb)	Numero total de genes*
Metazoa		
<i>Homo sapiens</i>	16 569	37
<i>Metridium senile</i>	17 443	17
Varios protistas		
<i>Reclinomonas americana</i>	69 034	96
<i>Monosiga brevicollis</i>	76 568	53
<i>Prototheca wickerhamii</i>	55 328	60
Plantas		
<i>Marchantia polymorpha</i>	186 609	68
<i>Arabidopsis thaliana</i>	366 924	52
Chytridiomycota (Hongos)		
<i>Allomyces macrogynus</i>	57 473	42
<i>Harpochytrium94</i>	19 473	24
<i>Harpochytrium105</i>	24 169	24
<i>Monoblepharella15</i>	60 432	25
<i>Hyaloraphidium curvatum</i>	29 593	23
<i>Spizellomyces punctatus</i>	61 347	24
<i>Rhizophyidium brooksianum</i>	68 834	23
Zygomycota (Hongos)		
<i>Mortierella verticillata</i>	58 745	42
<i>Rhizopus oryzae</i>	54 178	42
<i>Smittium culisetae</i>	58 654	42
Ascomycota (Hongos)		
<i>Hypocrea jecorina</i>	42 130	42
<i>Neurospora crassa</i>	64 840	43
<i>Podospora anserina</i>	94 192	43
<i>Candida albicans</i>	40 420	48
<i>Saccharomyces castellii</i>	25 753	34
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85 778	35
<i>Pichia canadensis</i>	27 694	43
<i>Yarrowia lipolytica</i>	47 916	44
<i>Schizosaccharomyces jap.</i>	80 059	34
<i>Schizosaccharomyces oct.</i>	44 227	35
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	19 431	36
Basidiomycota (Hongos)		
<i>Schizophyllum commune</i>	49 704	41
<i>Crinipellis perniciososa</i>	109 103	40

* No incluye ORFs ni ORFs de intrones.

Bullerwell, et al., 2005.