

Detección del gen *xyI3* en cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

Mauricio Luna-Rodríguez¹
Nelly Abigail González-Oviedo¹
Andrés Rivera-Fernández¹
Felipe Roberto Flores-de la Rosa^{2,§}

1 Facultad de Ciencias Agrícolas-Universidad Veracruzana. Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Xalapa, Veracruz, México. CP. 91090. (mluna@uv.mx; nabigo.888@gmail.com; arivera@uv.mx).

2 Campo Experimental Ixtacuaco-INIFAP. Carretera Martínez de la Torre-Tlapacoyan km 4.5, Tlapacoyan, Veracruz, México.

Autor para correspondencia: flores.felipe@inifap.gob.mx.

Resumen

Los mecanismos de *Fusarium oxysporum* relacionados con la degradación de componentes estructurales de la raíz, como el xilano, son muy importantes, dado que la colonización de este órgano es pieza clave en el establecimiento de la enfermedad. El presente estudio se enfocó en detectar el gen codificante para la enzima xilanasa *xyI3* en cepas de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* y buscar homólogos a este gen en secuencias de otras *formae speciales* y especies del género *Fusarium*, con el fin de determinar las relaciones filogenéticas entre las xilanasas dentro del complejo de especies *F. oxysporum*, así como, buscar evidencia de selección natural en el año 2020. Los resultados indicaron que, de las nueve cepas evaluadas, solo tres tuvieron una copia del gen *xyI3*. La filogenia mostró ocho clados, donde el clado 3 fue consistente con la clasificación de *xyI3*, mientras que los otros tipos de xilanasas quedaron agrupados en el clado 2. La prueba de selección natural no mostró evidencia de selección positiva dentro de la filogenia, lo que sugiere que la mutación neutral es la responsable de la diversidad en el gen xilanasa entre el complejo de especies *F. oxysporum*, lo que lleva a proponer que el gen no parece haber cambiado con la colonización de nuevos hospedantes.

Palabras clave:

gen xilanasa, mutaciones, selección positiva.



Introducción

El hongo *Fusarium oxysporum* es un habitante ubicuo de suelos en casi todos los ecosistemas. Actualmente es considerado un complejo de especies, basado en filogenias realizadas con diferentes genes (O'Donnell *et al.*, 2009). *F. oxysporum* cumple con diversos roles ecológicos, aunque principalmente es considerado un saprófito (Abdul *et al.*, 2016), tiene un papel importante como endófito benéfico (Waweru *et al.*, 2014) y patógeno (Demers *et al.*, 2015). Estos últimos, reciben especial atención al causar enfermedades muy destructivas en diversos cultivos.

Los endófitos patógenos de *F. oxysporum* se nombran de acuerdo con su especificidad al hospedero, esto es conocido como *formae speciales* (Edel-Hermann y Lecomte, 2019). Al ser un habitante del suelo, la mayoría de las *formae speciales* de *F. oxysporum* invaden a la planta a través de la raíz (Olivain *et al.*, 2006; Turrá *et al.*, 2015; Koyyapurath *et al.*, 2016). Por lo tanto, es esencial entender los mecanismos que el hongo usa para la degradación de los componentes principales de las paredes celulares de la raíz. Entre dichos componentes se puede mencionar a la celulosa, hemicelulosa y lignina (Pattathil *et al.*, 2015).

El xilano es uno de los componentes estructurales de la hemicelulosa y por tanto, es primordial determinar la capacidad del patógeno para degradar dicho polisacárido (Pattathil *et al.*, 2015). Debido a la complejidad química del xilano, una serie de enzimas son necesarias para degradarlo y romper la resistencia de la pared celular (De Vries y Visser, 2001; Kalluri *et al.*, 2014)

Algunas cepas patógenas de *F. oxysporum* contienen genes funcionales codificantes de distintas variantes de la enzima xilanasa, por ejemplo, se ha observado la expresión diferencial de los genes *xyl2* y *xyl3* durante la colonización de plantas de tomate por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, siendo el gen *xyl3* el que demostró actividad en las raíces (Ruiz-Roldán *et al.*, 1999). Asimismo, se determinó que el gen *xyl3* se expresa diferencialmente entre razas y patotipos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en garbanzo, por lo cual, puede ser utilizado como un marcador para diferenciar entre las razas fisiológicas de esta *forma specialis* (Jorge *et al.*, 2005; Gurjar *et al.*, 2009).

Por otro lado, se demostró que la presencia y actividad de dos genes *xyl3* y *xyl4*, no están directamente relacionadas con la capacidad patógena de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate (Gómez-Gómez *et al.*, 2002). *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* es causante de la pudrición de tallo y raíz en la vainilla (*Vanilla planifolia*), orquídea de alto valor comercial por ser la fuente natural de la vainillina (Pinaría *et al.*, 2010; Adame-García *et al.*, 2015; González-Oviedo *et al.*, 2022). Para este patógeno, existe evidencia de variación en la actividad de enzimas líticas relacionadas con las diferencias patógenas encontradas entre distintos aislamientos del hongo (Adame-García *et al.*, 2011; Koyyappurath *et al.*, 2015).

Análisis histológicos realizados en la zona radicular de vainilla infectada con el patógeno han demostrado que, a diferencia de otras *formae speciales*, *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* invade la zona de pelos radiculares, penetra a través de células corticales, pero no coloniza el sistema vascular, lo que indica que sus mecanismos de daño en la raíz son esenciales para el establecimiento de la enfermedad (Koyyappurath *et al.*, 2016). Sin embargo, no existe información sobre las enzimas que degradan componentes importantes de la raíz como el xilano y a la fecha no se han establecido con claridad los mecanismos que este patógeno utiliza para establecer la enfermedad.

El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia del gen *xyl3* en cepas de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* que han mostrado diferentes niveles de patogenicidad, con el fin de determinar las relaciones filogenéticas entre las xilanasas dentro del complejo de especies *F. oxysporum*, así como, buscar evidencia de selección natural positiva.

Materiales y métodos

Cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

Se emplearon nueve cepas de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* previamente reportadas como patógenas a vainilla (Adame-García *et al.*, 2015), pertenecientes a la colección de patógenos de vainilla bajo el resguardo del Laboratorio de Genética e Interacciones Planta- Microorganismo de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana. Cada resguardo fúngico consistía en discos de agar PDA con micelio sumergido en agua destilada estéril almacenado a 4 °C. Para su uso, las cepas fueron reactivadas en medio PDA a partir de la inoculación de 10 µl de la suspensión fúngica de la cepa en resguardo, incubadas durante siete días a 27 °C, con un periodo de 16 h de luz y ocho de oscuridad.

Extracción de ADN y amplificación del gen *xy13*

La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el protocolo establecido por Adame-García *et al.* (2016). Las condiciones para la amplificación del gen *xy13* fueron basadas en el protocolo descrito por Gurjar *et al.* (2009), usando los oligonucleótidos XY13-F (5'- GAC AAY AGC ATG AAG TGG GAT- 3') y XY13-R (5'- ACA CCC CAD ACR GTR ATD CC-3'). La mezcla de reacción consistió en 1X PCR buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerasa (marca Promega), 0.25 mM de dNTPs, 25 pmol de cada oligonucleótido y 50 ng de ADN genómico, en un volumen final de 25 µl.

El ciclo térmico utilizado para la amplificación fue el siguiente: una fase de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 50 °C por 30 s y polimerización a 72 °C por 30 s y extensión final a 72 °C durante 10 min. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador T100 (Bio-Rad®). Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de 1.8% de agarosa en tampón TAE (80 V, 60 min), teñido en bromuro de etidio al 2% (Promega®) bajo luz UV en un fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad®), para comparar el tamaño del producto de amplificación se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega®).

Posteriormente, los productos de amplificación se purificaron mediante el protocolo del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y secuenciados mediante el método de secuenciación de Sanger. Las amplificaciones se repitieron por triplicado.

Búsqueda de secuencias homólogas al gen *xy13*

Las secuencias fueron analizadas y editadas en el software Bioedit 7.2.5 (Hall, 1999) para realizar un análisis Blast (parámetros ofrecidos por default) en la base de datos genbank del NCBI. Para esto, se incluyó en el análisis, genomas de diferentes *formae speciales* de *F. oxysporum*, así como, genomas de otras especies del género *Fusarium* obtenidas desde diferentes bases electrónicas de datos de acceso libre.

Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Se utilizó un grupo de 81 de secuencias de genes codificantes de la enzima xilanasa, alineadas mediante el algoritmo ClustalW (gap open= 15; gap extend= 3). La base de datos se compuso de 76 secuencias de diferentes *formae speciales* y cinco de otras especies del género *Fusarium*. El alineamiento se realizó en el software Bioedit 7.2.5 (Hall, 1999). Los análisis de parsimonia no ponderados se realizaron con el software TNT 1.1 (Goloboff *et al.*, 2008) empleando la interfaz Winclada (1.94.1). La búsqueda del árbol más parsimonioso se ejecutó con 1 000 réplicas para cada caso, utilizando una combinación de algoritmos (Ratchet + Drift + Sectorial Fusion + TBR-max). Las inferencias sobre la robustez del clado se derivaron con remuestreo Bootstrap (1 000 repeticiones con las mismas características de búsqueda).

Detección de selección positiva por codón

Se aplicó el modelo de Nei-Gojobori modificado para determinar los parámetros dN y dS (Nei y Gojobori, 1986). Los cálculos se realizaron mediante un método de máxima verosimilitud basada en el árbol filogenético obtenido previamente. Se aplicó el modelo general reversible en el tiempo general time reversible (GTR) como modelo de sustitución de nucleótidos y se seleccionó un código genético estándar, este análisis se realizó con el software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

Resultados y discusión

Amplificación del gen *xyl3* en *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*

Sólo tres de las nueve cepas de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (JAGH5, JAGH10, JAGH12) fueron positivas para la amplificación del gen *xyl3*. Se observó un producto único de 0.7 kb sin bandas inespecíficas. El proceso de secuenciación permitió obtener tres secuencias con alta definición en el electroferograma. El análisis Blast unió todas las secuencias al gen xilanasa *xyl3* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (número de acceso AF052582.1) con 99% de similitud.

Estos resultados permitieron una división genotipada de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* en dos grupos, uno en que el gen *xyl3* está presente y otro en que está ausente. Dado que hasta el momento no había reportes de algún tipo de xilanasa en *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, en el presente estudio se informa por primera vez la detección del gen *xyl3* en esta *forma especialis*. En adición, puesto que las reacciones de amplificación del gen no generaron productos en todas las cepas previamente estudiadas por Adame-García *et al.* (2015), se afirma que existen diferentes genotipos dentro de esta *forma specialis* y que entre estas diferencias se encuentran la enzima xilanasa 3 (XYL3).

El gen *xyl3* ha sido utilizado para distinguir razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Gurjar *et al.*, 2009) y su actividad diferencial ha apoyado la diferenciación de patotipos (Jorge *et al.*, 2005). Es destacable que las cepas de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* que generaron productos de amplificación del gen *xyl3* pertenecen al grupo de virulencia moderada para la vainilla (Adame-García *et al.*, 2015), en tanto que, se ha demostrado que varios motivos estructurales de xilano han cambiado durante la evolución de los grupos vegetales (Peña *et al.*, 2016).

Dicha información será valiosa para determinar que tanto la diversidad de enzimas xilanasas de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* está relacionada con cepas que presentan un mayor grado de patogenicidad, considerando la composición estructural de xilanos de la pared celular de las raíces de *V. planifolia* y en comparación con *Vanilla pompona*, que cuenta con la característica de ser una de las especies del género más resistente a patógenos (Soto-Arenas y Solano Gómez, 2007).

Búsqueda del gen xilanasa *xyl3* en genomas de *Fusarium* spp. y *formae speciales* de *F. oxysporum*

El análisis Blast en cada genoma encontrado en la base de datos de NCBI permitió identificar algunas copias del gen xilanasa *xyl3* en diferentes especies y *formae speciales* de *F. oxysporum*. En el Cuadro 1 muestra los porcentajes de similitud alcanzados con las secuencias de este estudio.

Cuadro 1. Resultados del análisis Blast del gen *xyl3* de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* realizado contra genomas de *formae speciales* de *F. oxysporum* y *Fusarium* spp.

Especie	Cepa	Acceso Genebank	Similitud (%)
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	4287	NC_030997	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	MN25	JH650838	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	HdV247	JH651390	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	26 381	JH650976	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	25 433	JH657940	98
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupressi</i>	54 006	JH658292	92
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> race 2	54 008	KK033209	98
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	54 005	JH658394	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	26 406	JH659333	99
<i>F. oxysporum</i>	Fo47	JH717908	99
<i>F. oxysporum</i>	FOSC 3-a	JH717848	98
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupressi</i> race 1	race 1	KB730516	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupressi</i> race 4	race 4	KB726570	96
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i>		KV442496	99
<i>F. oxysporum</i>	Fo5176	AFQF01000985	98
<i>F. oxysporum</i>	UASWSAC1	JNNQ01001126	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cupressi</i>	C1HIR-9889	MBFV01000633	91
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	1	LPZQ01011374	98
<i>F. oxysporum</i>	JCM 11502	BCHB01000008	96
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Foc013	MABJ01000473	91
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Fon005	MAKY01000369	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Foc001	MAKZ01000123	98
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Foc018	MABM01000088	98
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Foc021	MABL01000269	98
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Foc015	MABK01000132	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Foc030	MABN01001749	98

Especie	Cepa	Acceso Genebank	Similitud (%)
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	Forc031	MABS01000137	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Foc035	MABO01000683	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	Forc016	MABQ01000104	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Fon019	MAMH01001256	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	Forc024	MABR01000083	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Fon002	MALA01000310	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Fon013	MALC01000494	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Fon010	MALB01000085	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Fon015	MALD01000061	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Fon020	MALE01000131	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Fon037	MALF01000365	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Fon021	MALG01000164	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol004	MALH01000304	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol007	MALI01000160	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol026	MALK01000267	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol014	MALJ01000177	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol018	MALL01000293	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol016	MALM01000304	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol038	MALO01000385	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol029	MALN01000525	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol069	MALP01000090	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol072	MALQ01000181	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol073	MALR01000973	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol074	MALS01000346	99
<i>F. oxysporum</i>	FoMN14	MALU01000082	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol075	MALT01000042	99

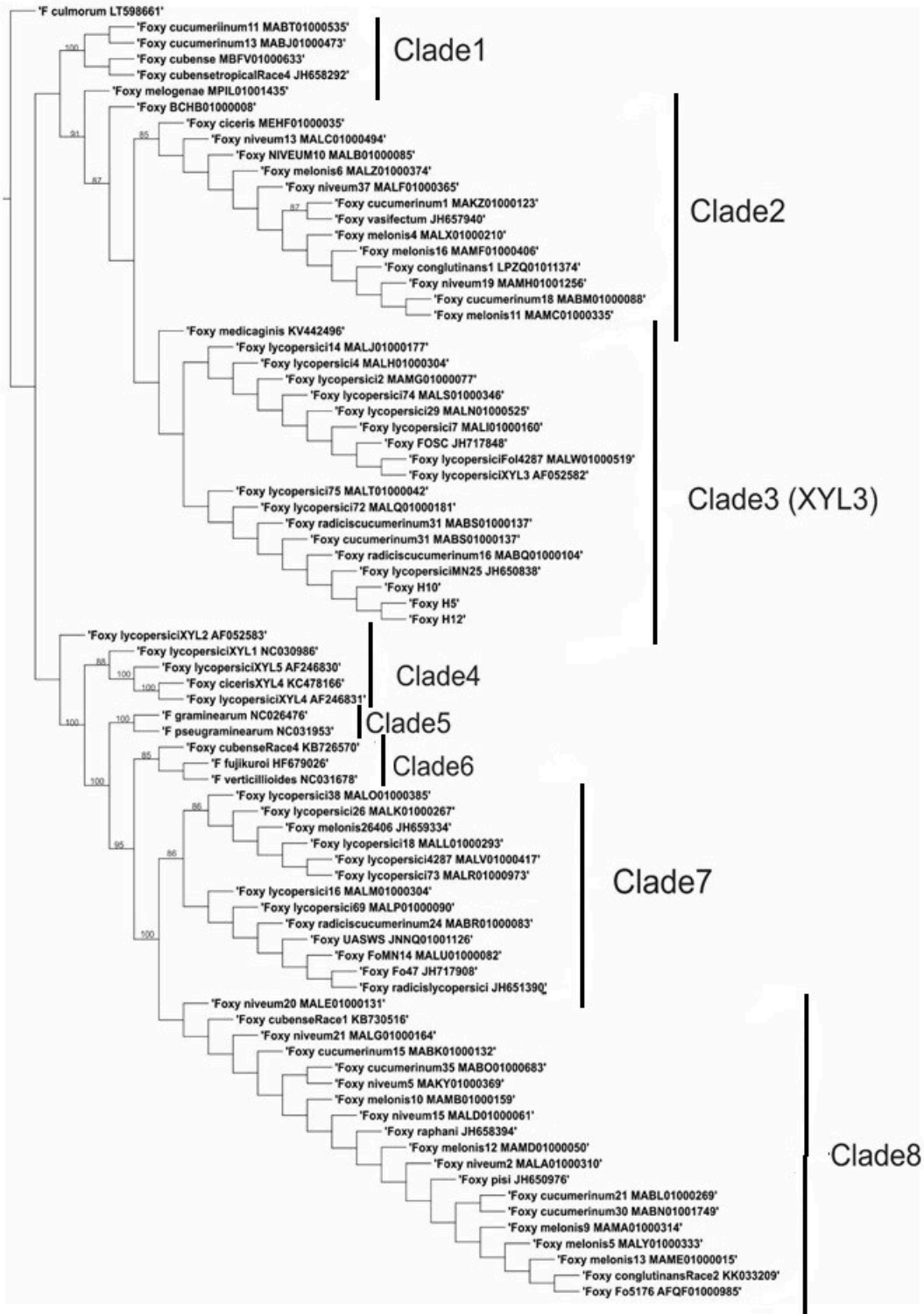
Especie	Cepa	Acceso Genebank	Similitud (%)
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	4 287	MALW01000519	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Fom005	MALY01000333	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Fom004	MALX01000210	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Fom006	MALZ01000374	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Fom009	MAMA01000314	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Fom011	MAMC01000335	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Fom010	MAMB01000159	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Fom013	MAME01000015	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Fom012	MAMD01000050	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol002	MAMG01000077	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Fom016	MAMF01000406	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Foc011	MABT01000535	91
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	38-1	MEHF01000035	99
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melongenae</i>	14 004	MPIL01001435	93
<i>F. verticilliodes</i>	7 600	XM-018901170	88
<i>F. fujikuroi</i>	58 289	HF679026	88
<i>F. culmorum</i>		LT598661	80
<i>F. graminearum</i>		NC-026476	80
<i>F. pseudograminearum</i>	CS309	NC-031953	80

Filogenia del gen *xyl3*

El análisis de parsimonia generó un árbol más parsimonioso único (Figura 1). En esta topología, se recuperaron ocho clados con apropiado soporte bootstrap. El clado 3 contiene la secuencia correspondiente a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici xyl3* (AF052582) y las tres secuencias del gen xilanasa de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, esto corrobora que estas cepas contienen un gen homólogo de *xyl3*. Es destacable resaltar que este clado contiene la mayoría de las cepas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y solo una cepa de *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*.



Figura 1. Árbol más parsimonioso (L= 1825; Ci=73; Ri= 96). Obtenido de la base de datos de secuencias codificantes de xilanasas de *F. oxysporum* y *Fusarium* spp.



Otras isoformas del gen de xilanasa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*xyl1*, *xyl4*, *xyl5*) y *xyl4* de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se agrupan en el clado 4 y son hermanas de un linaje con solo la isoforma *xyl2* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Junto a este clado, existen dos pequeños clados, el primero compuesto por xilanasa de *F. graminearum* (NC026476) y *F. pseudograminearum* (NC031953) y el segundo compuesto por xilanasa de *F. verticillioides* (NC031678), *F. fujikuroi* (NC031678) y una cepa de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* RT4 (KB726570).

Estos dos clados son muy distintivos porque estas secuencias se utilizaron como grupos externos junto con *F. culmorum* (LT598661). Los clados 1, 2 y 8 no tienen secuencias de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; esos clados están compuestos por cepas patógenas de cucurbitáceas, banano y otras plantas. Algunos linajes individuales no se resolvieron adecuadamente. Se obtuvieron ocho clados bien soportados para la filogenia del gen xilanasa. Se propuso una clasificación previa para los genes de la enzima xilanasa, se clasificaron como *xyl1* (Ruiz *et al.*, 1999), *xyl2* y *xyl3* (Ruiz *et al.*, 1999), *xyl4* y *xyl5* (Gómez-Gómez *et al.*, 2002). Sin embargo, en la filogenia mostrada en el presente estudio, todos los genes *xyl*, excepto *xyl3*, están situados en el mismo clado (Clado 2; Figura 1).

DetECCIÓN DE SELECCIÓN POSITIVA EN CADA CODÓN

Se utilizó el modelo Nei-Gojobori (1986) para determinar si algunos codones de la secuencia del gen xilanasa *xyl3* se ven afectados por la selección positiva. Para tal efecto, se analizaron 108 codones en busca de mutaciones sinónimas y no sinónimas. El aminoácido más común encontrado fue glicina, con cuatro codones diferentes, GGC (ocho veces), GGG (cinco veces), GGA (dos veces), GGT (una vez). Esto muestra que las mutaciones sinónimas están frecuentemente presentes en las secuencias de xilanasa *xyl3*. No se observaron resultados significativos respecto a selección positiva para otros aminoácidos.

Para evaluar las diferencias entre los genes de xilanasa conforme a la división de clados se realizaron pruebas de selección natural basadas en codones entre los diferentes linajes que señala el árbol genético. Se encontró que las mutaciones sinónimas fueron más abundantes y comunes que las mutaciones no sinónimas, lo que a su vez es evidencia de mutaciones neutrales (Nei y Gojobori, 1986). Este enfoque se ha utilizado en otros genes para detectar la selección positiva; es decir, evidencia de que la selección natural da origen a la diversidad de algún gen (Zhang *et al.*, 2005; Hughes y Friedman, 2008; Metzger y Thomas, 2010). De acuerdo con una exhaustiva búsqueda en la literatura científica, este es el primer estudio con un enfoque de pruebas de selección positiva en codones utilizado para el análisis de genes en relación con la patogenicidad en *F. oxysporum*.

Las diferencias en la amplificación del gen de la xilanasa *xyl3* en cepas de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* se puede explicar sobre la base de la distribución polifilética de esta *formae specialis* entre el Complejo de Especies de *F. oxysporum* (Pinaría *et al.*, 2015; Flores-de la Rosa *et al.*, 2018). Algunos efectores de patogenicidad se movilizan horizontalmente entre diferentes linajes de *F. oxysporum*, otorgando capacidad patogénica a estos linajes. Parte de estos nuevos linajes patogénicos contienen el gen *xyl3* en sus genomas, mientras que otros no, por lo que existen cepas patógenas con y sin actividad del gen (Laurence *et al.*, 2015).

Conclusiones

Esta investigación mostró que la presencia del gen *xyl3* no es una característica de todas las cepas de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, incluso la presencia del gen podría estar asociada a una virulencia moderada. La filogenia sugiere diferentes tipos de genes *xyl*; sin embargo, no se observó evidencia de selección positiva en las secuencias codificantes para este gen en *F. oxysporum*.

Bibliografía

- 1 Abdul-Karim, N. F.; Mohd, M.; Izhah-Mohd, N. M and Zakaria, L. 2016. Saprophytic and potentially pathogenic *Fusarium* species from peat soil in Perak and Pahang. Trop Life Sci. Res. 27(1):1-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4807956/>.
- 2 Adame-García, J.; Trigos, Á.; Iglesias-Andreu, L. G.; Flores-Estévez, N. and Luna-Rodríguez, M. 2011. Isozymic and pathogenic variations of *Fusarium* spp. associated with vanilla stem and root rotting. Trop subtrop agroecosystems. 13(3):299-306. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1330/663>.
- 3 Adame-García, J.; Rodríguez-Guerra, R.; Iglesias-Andreu, L. G.; Ramos-Prado, J. M. and Luna-Rodríguez, M. 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. Bot. Sci. 93(3):669-678. <https://doi.org/10.17129/botsci.142>.
- 4 Adame-García, J.; Flores-Rosa, F. R.; Ricaño-Rodríguez, J. and Luna-Rodríguez, M. 2016. Adequacy of a protocol for amplification of EF-1 α gene of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. ARPN J. Agric. Biol. Sci. 11(6):236-241. <http://www.arpnjournals.org/jabs/research-papers/rp-2016/jabs-0616-804.pdf>.
- 5 Demers, J. E.; Gugino, B. K. and Jiménez-Gasco, M. M. 2015. Highly diverse endophytic and soil *Fusarium oxysporum* populations associated with field-grown tomato plants. Appl. Environ. Microbiol. 81(1):81-90. <https://doi.org/10.1128/AEM.02590-14>.
- 6 De-Vries, R. P. and Visser J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiol Mol. Biol Rev. 65(4):497-522. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001>.
- 7 Edel-Hermann, V. and Lecomte, C. 2019. Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. Phytopathology. 109(4):512-530. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW>.
- 8 Flores-Rosa, F. R.; Luna, E.; Adame-García, J.; Iglesias-Andreu, L. G. and Luna-Rodríguez, M. 2018. Phylogenetic position and nucleotide diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* worldwide based on translation elongation factor 1 α sequences. Plant Pathol. 67(6):1278-1285. <https://doi.org/10.1111/ppa.12847>.
- 9 Goloboff, P. A.; Farris, J. S. and Nixon, K. C. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. Cladistics. 24(5):774-786. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00217.x>.
- 10 González-Oviedo, N.; Iglesias-Andreu, L. G.; Flores-Rosa, F. R.; Rivera-Fernández, A. and Luna-Rodríguez M. 2022. Genetic analysis of the fungicide resistance in *Fusarium oxysporum* associated to *Vanilla planifolia*. Mex. J. Phytopathol. 40(3):1-19. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2203-3>.
- 11 Gómez-Gómez, E.; Ruíz-Roldán, M. C.; Pietro, A.; Roncero, M. I. G. and Hera, C. 2002. Role in pathogenesis of two endo- β -1,4-xylanase genes from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. Fungal Genet Biol. 35(3):213-222. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1318>.
- 12 Gurjar, G.; Barve, M.; Giri, A. and Gupta, V. 2009. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. Mycologia. 101(4):484-495. <https://doi.org/10.3852/08-085>.
- 13 Hall, T A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser. 41:95-98.
- 14 Hughes, A. L. and Friedman, R. 2008. Codon-based tests of positive selection, branch lengths, and the evolution of mammalian immune system genes. Immunogenetics. 60:495-506. <https://doi.org/10.1007/s00251-008-0304-4>.
- 15 Jorge, I.; Rosa, O.; Navas-Cortés, J. A.; Jiménez-Díaz, R. M and Tena, M. 2005. Extracellular xylanases from two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*:

- enzyme production in culture and purification and characterization of a major isoform as an alkaline endo beta xylanase of low molecular weight. *Antonie van Leeuwenhoek*. 88:48-59. <https://doi.org/10.1007/s10482-004-7584-y>.
- 16 Kalluri, U. C.; Yin, H.; Yang, X. and Davison, B. H. 2014. Systems and synthetic biology approaches to alter plant cell walls and reduce biomass recalcitrance. *Plant Biotechnol J*. 12(9):1207-1216. <https://doi.org/10.1111/pbi.12283>.
 - 17 Koyyappurath, S.; Conéjéro, G.; Dijoux, J. B.; Lapeyre-Montès, F.; Jade, K.; Chiroleu, F.; Gatineau, F.; Verdeil, J. L.; Besse, P. and Grisoni, M. 2015. Differential responses of vanilla accessions to root rot and colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae*. *Front Plant Sci*. 6:1-16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01125>.
 - 18 Koyyappurath, S.; Atuahiva, T.; Le Guen, R.; Batina, H.; Le Squin, S.; Gautheron, N.; Edel-Hermann, V.; Peribe, J.; Jahiel, M.; Steinberg, C.; Liew, E. C. Y.; Alabouvette, C.; Besse, P.; Dron, M.; Sache, I.; Laval, V. and Grisoni, M. 2016. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of vanilla. *Plant Pathol*. 65(4):612-625. <https://doi.org/10.1111/ppa.12445>.
 - 19 Kumar, S.; Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7):1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
 - 20 Laurence, M. H.; Summerell, B. A. and Liew, E. C. Y. 2015. *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*: evidence for horizontal gene transfer of putative pathogenicity genes. *Plant Pathol*. 64(5):1068-75. <https://doi.org/10.1111/ppa.12350>.
 - 21 Metzger, K. J. and Thomas, M. A. 2010. Evidence of positive selection at codon sites localized in extracellular domains of mammalian CC motif chemokine receptor proteins. *BMC Evol. Biol.* 10(139):1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-139>.
 - 22 Nei, M. and Gojobori, T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3(5):418-426. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040410>.
 - 23 O'Donnell, K.; Gueidan, C.; Sink, S.; Johnston, P. R.; Crous, P. W.; Glenn, A.; Riley, R.; Zitomer, N. C.; Colyer, P. and Waalwijk, C. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Gen. Biol.* 46(12):936-948. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.08.006>.
 - 24 Olivain, C.; Humbert, C.; Nahalkova, J.; Fatehi, J.; L'Haridon, F. and Alabouvette, C. 2006. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(2):1523-1531. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1523-1531.2006>.
 - 25 Pattathil, S.; Hahn, M. G.; Dale, B. E. and Chundawat, S. P. S. 2015. Insights into plant cell wall structure, architecture, and integrity using glycome profiling of native and AFEXTM-pretreated biomass. *J. Exp. Bot.* 66(14):4279-4294. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv107>.
 - 26 Peña, M. J.; Kulkarni, A. R.; Backe, J. Boyd, M. O.; Neill, M. A. and York, W. S. 2016. Structural diversity of xylans in the cell walls of monocots. *Planta*. 244:589-606. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2527-1>.
 - 27 Pinaria, A. G.; Liew, E. C. Y. and Burgess, L. W. 2010. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australasian Plant. Pathol.* 39:176-183. <https://doi.org/10.1071/AP09079>.
 - 28 Pinaria, A. G.; Laurence, M. H.; Burgess, L. W. and Liew, E. C. Y. 2015. Phylogeny and origin of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* in Indonesia. *Plant Pathol*. 64(6):1358-65. <https://doi.org/10.1111/ppa.12365>.
 - 29 Ruiz-Roldan, M. C.; Di-Pietro, A.; Huertas-Gonzalez, M. D. and Roncero, M. I. 1999. Two xylanase genes of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* are differentially

- expressed during infection of tomato plants. *Mol. Gen. Genet.* 261:530-536. <https://doi.org/10.1007/s004380050997>.
- 30 Soto-Arenas, M. A y Solano-Gómez, A. R. 2007. Ficha técnica de *Vanilla planifolia*. En: información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C. Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología AC. Proyecto No. W029. México. DF. 1-18 pp. <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Vanillaplanifolia00.pdf>.
- 31 Turrà, D.; Ghalid, M.; Rossi, F. and Pietro, A. 2015. Fungal pathogen uses sex pheromone receptor for chemotropic sensing of host plant signals. *Nature.* 527:521-524. <https://doi.org/10.1038/nature15516>.
- 32 Waweru, B.; Turoop, L.; Kahangi, E.; Coyne, D. and Dubois, T. 2014. Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes provide field control of nematodes, improving yield of banana (*Musa* sp.). *Biological Control.* 74:82-88. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.04.002>.
- 33 Zhang, J.; Nielsen, R.; and Yang, Z. 2005. Evaluation of an improved branch-site likelihood method for detecting positive selection at the molecular level. *Mol. Biol. Evol.* 22(12):2472-2479. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi237>.

Detección del gen *xy13* en cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 April 2023
Date accepted: 01 July 2023
Publication date: 22 August 2023
Publication date: August 2023
Volume: 14
Issue: 6
Electronic Location Identifier: e2711
DOI: 10.29312/remexca.v14i6.2711

Categories

Subject: Artículo

Palabras clave:

Palabras clave:

gen xilanasa
mutaciones
selección positiva

Counts

Figures: 1
Tables: 1
Equations: 0
References: 33
Pages: 0