

## Desarrollo de Mapas Genéticos y Físicos de Hongos Fitopatógenos: Aplicaciones y Perspectivas

**Gilberto Manzo-Sánchez**, Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Laboratorio de Biotecnología, Apdo. Postal 36, km 40 Autopista Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima, México CP 28100; **Andrew James-Kay**, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Unidad de Biotecnología, Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México CP 97200; **Elizabeth Ortiz-Vázquez**, Instituto Tecnológico de Mérida, Depto. Ingeniería Química-Bioquímica, km 5 Carr. Mérida-Progreso, Mérida, Yucatán, México CP 97118; y **June Simpson-Williamson**, CINVESTAV Unidad Irapuato, Depto. de Ingeniería Genética de Plantas, Apdo. Postal 629, km 9.6 Lib. Norte, Carr. Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, México CP 36500. Correspondencia: gmanzo@cicy.mx

(Recibido: Abril 26, 2006 Aceptado: Agosto 24, 2006)

Manzo-Sánchez, G., James-Kay, A., Ortiz-Vázquez, E. y Simpson-Williamson, J. 2007. Desarrollo de mapas genéticos y físicos de hongos fitopatógenos: Aplicaciones y perspectivas. Revista Mexicana de Fitopatología 25:54-65.

**Resumen.** El objetivo de la presente revisión es informar los avances que se han logrado sobre el desarrollo de mapas de genomas de hongos fitopatógenos, sus principales ventajas y aplicaciones. Para un mejor entendimiento y manejo de los patógenos se han desarrollado mapas genéticos en algunos hongos fitopatógenos; además, mediante el apoyo de los marcadores de DNA se han podido identificar y desarrollar mapas de algunos genes de interés [avirulencia/patogenicidad, el locus *MAT* (grupo de apareamiento), algunos que están involucrados en la producción de toxinas, y en la producción de pigmentos, ínter estériles, principalmente]. Por otra parte, uno de los usos principales de los mapas físicos es localizar e identificar la región en el cromosoma de algún gene en particular. Algunos genes son usados como sondas para hibridar con algún cromosoma, como: DNAr (DNA ribosomal),  $\alpha$ -tubulina, *sod1* (superóxido dismutasa), *niaD* (nitrato reductasa), *Skn-7* (histidina kinasa 7), y *ops* (opsina), por mencionar algunos de ellos. Con el fin de lograr entender la estructura, función y evolución del genoma de hongos fitopatógenos, algunos grupos de investigación mantienen prioridades como obtener mapas genéticos de alta densidad, desarrollar mapas físicos, obtener la secuencia completa del genoma y localizar genes en base a secuencias (STE's o secuencias de genomas) ya conocidas por similaridad de secuencias.

Palabras claves adicionales: Marcadores de DNA, genes de avirulencia, cariotipo electroforético, mapas genéticos, mapas físicos.

**Abstract.** The objective of this review is to inform about the progress achieved on genome mapping of phytopathogenic fungi, its main advantages, and applications. In order to better understand and manage pathogens, genetic linkage maps have been developed for some phytopathogenic fungi; also, through support of DNA markers it has been possible to map and identify some genes of interest [avirulence/pathogenicity genes, *MAT* (mating type) locus, some which are involved in toxin production, and pigment production, mainly intersterile]. On the other hand, one of the main uses of physical maps is to locate and identify the region of a particular gene within a chromosome. Some genes are used as primers to hybridize with a specific chromosome, for example: ribosomal DNA (DNAr),  $\alpha$ -tubuline ( $\alpha$ tub), superoxidise dismutase (*sod1*), nitrate reductase (*niaD*), histidine kinase 7 (*Skn-7*), and opsine (*ops*), just to mention some of them. In order to understand the structure, function, and evolution of the genome of phytopathogenic fungi, some research groups maintain priorities like: Producing genetic maps of high density, develop physical maps, obtain the complete sequence of the genome, and to locate genes based on sequences (EST's or genome sequences) known by sequence similarity.

Additional keywords: DNA markers, avirulence genes, electrophoretic karyotype, genetic map, physical maps.

### INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la genética y la biología en el siglo pasado y en los últimos años, ha generado importantes logros, como son: El “redescubrimiento” de las leyes de Mendel en 1900 surgió como un logro trascendental para las bases de la genética clásica, la determinación del DNA como el material genético, el descubrimiento de la estructura de la doble hélice

del DNA y sus aplicaciones, los análisis de DNA por medio de marcadores, la manipulación y clonación de fragmentos grandes de DNA y por último la obtención de la secuencia del DNA que puede ser en información digital y almacenada en una computadora para su análisis posterior (Lander y Weinberg, 2000; Zhang y Wing, 1997). Los mapas genéticos y mapas físicos forman la base para numerosas investigaciones básicas y aplicadas, incluyendo estudios de la organización, estructura y evolución del genoma, clonación de genes blanco, comparaciones evolutivas entre especies y otras aplicaciones. Los mapas genéticos de hongos fitopatógenos se han construido con la ayuda de marcadores de DNA y recientemente con la información de secuencias genómicas, siendo su principal aplicación el mapeo de genes de avirulencia (*avr*) y el locus *MAT* (grupo de apareamiento). Hoy en día, se han desarrollado mapas genéticos en varios hongos fitopatógenos (Cuadro 1), dentro de los cuales, los Ascomicetos son los más estudiados. Por otra parte, los mapas físicos se han iniciado a partir de la determinación del cariotipo electroforético, la construcción y caracterización de bibliotecas de cromosomas artificiales de bacterias (BAC = Bacterial Artificial Chromosome), las cuales han permitido realizar estudios en genómica comparativa entre especies relacionadas y determinar la localización física de algún gene. El mapeo genético, el mapeo físico y la secuenciación de genomas podrían ayudar a elucidar la función de un gene, su regulación y su expresión bajo condiciones específicas (Peters *et al.*, 2003), siendo estas herramientas una prioridad en los proyectos de análisis de genomas. Se plantea exponer en esta revisión los avances que se han logrado sobre la construcción de mapas genéticos y físicos en hongos fitopatógenos, y otras aplicaciones para estudiar y comprender el genoma de este tipo de microorganismos.

**Mapas genéticos.** Los mapas genéticos ayudan a entender la estructura, función y evolución del genoma y pueden ser una herramienta importante para la identificación de genes de interés (Jurgenson *et al.*, 2002a). Los mapas genéticos muestran la localización relativa de marcadores específicos de DNA a lo largo de los cromosomas. Cuanto más cercanos estén dos marcadores, es poco probable que durante un proceso de recombinación genética se separen y lo más probable es que se hereden juntos en una población segregante (Jones *et al.*, 1997). En los últimos años, los polimorfismos son revelados por técnicas moleculares, tales como los marcadores RFLP (polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción), RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar), SSR (secuencias simples repetitivas) y AFLP (polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados), entre otras. Una característica que deben de tener este tipo de marcadores para ser utilizados en la construcción de un mapa genético, es que deben ser altamente polimórficos, es decir, deben existir formas alternativas (alelos) entre los padres para ser detectables entre los miembros de la progenie y que segreguen en una proporción 1:1. Para organismos haploides, el análisis de ligamiento es uno de los

métodos básicos e indispensables en la genética clásica (Jones *et al.*, 1997). El ligamiento puede definir las distancias genéticas entre algunos genes o loci polimórficos existentes dentro del genoma, las cuales podrían ser reconocidas como diferencias en apariencia de longitudes de fragmentos de restricción o secuencias de nucleótidos en un locus alélico (Jones *et al.*, 1997 y Peters *et al.*, 2003). Un mapa genético determina las distancias entre dos puntos, la cual es una medida de la frecuencia de recombinación entre los dos puntos. Los mapas se miden en términos de centimorgans (cM). Dos marcadores están a 1.0 cM si están separados por una frecuencia de recombinación del 1% (o una recombinación en 100 eventos de meiosis). Para llevar a cabo la construcción de mapas genéticos de hongos fitopatógenos, primeramente se lleva a cabo una selección de aislados compatibles sexualmente y principalmente que sean genéticamente diversos y / o que porten genes de interés, por ejemplo: genes de avirulencia/patogenicidad, locus *MAT* (grupo de compatibilidad, involucrados en la producción de alguna toxina). En organismos haploides, en una crusa entre aislados genéticamente distantes, las poblaciones segregantes o poblaciones *F*<sub>1</sub> que se obtengan podrían ser ricas en marcadores polimórficos, los cuales podrían usarse para generar un mapa genético detallado (Jurgenson *et al.*, 2002a). Respecto a los estudios genéticos de algunos genes de resistencia a los fungicidas, Faretra y Pollastro (1996) determinaron los parámetros de segregación del locus *MAT* y genes involucrados para la resistencia a los fungicidas dicarboximida y benzimidazol en *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. mediante el análisis de tétradas ordenadas. Sin embargo, para mapear dichos genes es necesario contar con una población segregante de 60 a 100 individuos aproximadamente, que tengan una segregación 1:1 y por último que mantengan un ligamiento con al menos un marcador de DNA. Por otra parte, Brown *et al.* (1996) mencionan que los genes para la resistencia a los grupos de fungicidas ethirimol, triadimenol y morfolinas son independientes, por consiguiente existen diferentes genes que controlan la respuesta de *Blumeria graminis* (DC.) Speer f. sp. *hordei* Marschal (Bgh) a los fungicidas antes mencionados. En base a lo anterior, es difícil llevar a cabo estudios para el mapeo de genes de resistencia a fungicidas, ya que será necesario mapear el gene o los genes involucrados para la resistencia para cada uno de los grupos químicos de fungicidas.

**Mapas físicos.** Un mapa físico es un arreglo ordenado de fragmentos de DNA, dentro de los cuales las distancias se expresan en unidades de distancias físicas (pares de bases). Un mapa físico usualmente comprende un arreglo de insertos de clones grandes ordenados, tales como bibliotecas BAC. Los mapas físicos pueden proporcionar información independiente de la información genética, pero tienen más valor si están ligados a marcadores genéticamente mapeados, y son mucho más importantes si están integrados con los datos de la secuencia del genoma (Meyer *et al.*, 2004). Un mapa físico completo podría facilitar la clonación de genes

Cuadro 1. Características de mapas genéticos y mapas físicos desarrollados en hongos fitopatógenos.

Patógeno <sup>v</sup>	Marcadores moleculares <sup>w</sup>	No. de marcadores	Gene o locus mapeado <sup>x</sup>	No. de segregantes analizados	GL <sup>y</sup>	Cariotipo electroforético (centiMorgans)	Tamaño del genoma (Megabases) <sup>z</sup>	Fuente <sup>z</sup>
<b>Ascomicetos</b>								
<i>Ascochyta rabiei</i> (1) <sup>x</sup>	SSR, DAF	50	No mapeado	77	10	261.4	No estimado	1, 11, 20
<i>Ascochyta rabiei</i> (2)	AFLP, RAPD, SSR, SCAR	126	<i>MAT</i>	96	28	1271	10-14	20.5-30.5
<i>Blumeria graminis</i> (1)	RFLP	31	Avrla10, Avrlc y Avrlh	80	7	~326	No estimado	4
<i>Blumeria graminis</i> (2)	AFLP, RFLP	359	<i>MAT</i> , Avr <sub>a2</sub> , Avr <sub>a3</sub> , Avr <sub>a6</sub> , Avr <sub>a7</sub> , Avr <sub>a10</sub> , Avr <sub>a22</sub> , Avr <sub>k1</sub>	81	34	2114	7 a 8	100-160
<i>Cochliobulus heterostrophus</i>	RFLP	125	Tox1, <i>MAT</i>	91	16	1500	15 a 16	35
<i>Cochliobulus sativus</i>	AFLP, RFLP	134	<i>MAT</i> , VHv1	103	27	849	15	33
<i>Gibberella moniliformis</i>	RFLP	636	Mat A, Ste1, FUM1	121	12	145	12	46
<i>Gibberella zeae</i> (1)	AFLP	1070	PIG1, PER1, DON, NIV, TR15	111	9	1300	9	40
<i>Gibberella zeae</i> (2)	AFLP, STS	235	HygR, nitM, nyt1	111	9	1234	4	36
<i>Leptosphaeria maculans</i> (1)	AFLP	56	Avr <sub>alm1</sub>	100	14	336	No estimado	21
<i>Leptosphaeria maculans</i> (2)	AFLP, RAPD	58	<i>MAT</i> , HS	58	21	1160	16	34
<i>Leptosphaeria maculans</i> (3)	AFLP, RAPD, ISSR	125	<i>MAT</i> , 1 Avr	301	18	116.8	No estimado	3
<i>Magnaporthe grisea</i>	RFLP, RAPD, SSR	226	<i>MAT</i> , AVR1-CO39	61	7	900	6	30
<i>Magnaporthe grisea</i>	RFLP, RAPD,	65	<i>MAT</i> , Avr <sub>Pik</sub> , Avr <sub>Piz</sub> y Avr <sub>Piz-t</sub>	60	7-8	525.8	7-8	8, 16, 28
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	AFLP, SSR	280	No mapeado	51	25	1073	8 a 13	14
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	AFLP, RAPD	280	<i>MAT</i> , AVR	68	23	1216	17 a 18	35
<i>Pyrenophora teres</i> f. sp. <i>teres</i>	AFLP	108	<i>MAT</i> , Avr	78	15	909	6	38
<b>Basidiomicetos</b>								
<i>Puccinia graminis</i>	AFLP, RAPD	57	AvrTU, AvrT6, AvrT8a, AvrT9, AvrT10, AvrT21, AvrT28, AvrT30	81	7	525	No estimado	26
<i>Heterobasidion annosum</i>	AFLP	358	Genes inter estériles S y P	102	39	2252	10	25
<b>Deuteromicetos</b>								
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	AFLP	167		108	34	1923.3	9 a 12	13, 17
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	AFLP	83	Avr-3	32	23	76	10 a 15	50

<sup>v</sup>El número entre paréntesis representa un mapa genético diferente. Para *Magnaporthe grisea*, la información fue generada de la integración de 2 o más mapas genéticos

<sup>w</sup>AFLP = polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados; DAF = huellas genéticas de DNA; ISSR = secuencias simples repetidas internas; RAPD = DNA polimórfico amplificado al azar; Rep-PCR = elemento repetitivo básico - reacción en cadena de la polimerasa; RFLP = polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción; SCAR = regiones amplificadas de secuencias caracterizadas; SSR = secuencias simples repetitivas; STS = sitios de secuencias etiquetadas.

<sup>x</sup>Avr = avirulencia; DON = deoxinivalenol; FUM1 = micotoxina fumosina B1; Hygr = fenotipo resistente a la higromicina; MAT = grupo de apareamiento; NIV = toxinas nivalenol; PER1 = reproducción sexual; PIG1 = pigmentación; Ste1 = esterilidad femenina; Tox1 = toxina producida por un poliquetol lineal; TR15 = tricodieno cintaza; VHv = locus para alta virulencia a cebada cv. Bowman; Vir = virulencia.

<sup>y</sup>GL= grupo de ligamiento.

<sup>z</sup>Akamatsu y Peever 2005 (1); Anderson *et al.*, 1993 (2); Attard *et al.*, 2002 (3); Chirstiansen y Giese, 1990 (4); Cozijnsen *et al.*, 2000 (5); Gale *et al.*, 2005 (6); Jurgenson *et al.*, 2002 (7); Kaye *et al.*, 2003 (8); Kema *et al.*, 2002 (9); Lai *et al.*, 2005 (10); Lichtenzweig *et al.*, 2002 (11); Lind *et al.*, 2005a (12); Luna-Martinez *et al.*, 2007 (13); Luo *et al.*, 2005 (14); Manzo-Sánchez *et al.*, 2005 (15); Nitta *et al.*, 1997 (16); O'Sullivan *et al.*, 1998 (17); Pedersen *et al.*, 2002a (18); 2002b (19); Phan *et al.*, 2003 (20); Pongam *et al.*, 1998 (21); Rodriguez-Garcia *et al.*, 2007 (22); Teunissen *et al.*, 2003 (23); Tzeng *et al.*, 1992 (24); Xu y Leslie, 1996 (25); Zambino *et al.*, 2000 (26); Zhong *et al.*, 2002 (27); Zhu *et al.*, 1997 (28).

por varios métodos, podría también proveer las bases para anclar y ordenar la secuencia expresada etiquetada (EST). El desarrollo reciente de la manipulación de fragmentos grandes de DNA y su clonación en levadura (biblioteca YAC: Cromosoma Artificial de Levadura = Yeast Artificial Chromosome =) o bacteria (biblioteca BAC), son herramientas poderosas para la generación de mapas físicos. Por otra parte, las características del genoma en términos del número y tamaño de cromosomas obtenidos por separación en geles de campo pulsante (PFGE) se conocen como el cariotipo electroforético. Con la ayuda de la técnica de PFGE se puede realizar la separación de DNA de tamaño cromosomal (Mills y McCluskey, 1990; Zolan, 1995). La metodología de PFGE se ha aplicado para mapear genes sobre un cromosoma en particular y correlacionarlos con algún grupo ó grupos de ligamiento (GL) (Luo *et al.*, 2005). En casos donde una sonda de un gene está disponible, por ejemplo: DNAribosomal,  $\alpha$ tub ( $\alpha$ -tubulina), *sod1* (superóxido dismutasa), *niaD* (nitrato reductasa), *Skn-7* (histidina kinasa 7) y *ops* (opsina), el análisis tipo Southern Blot se puede usar para identificar el cromosoma en el cual el gene reside (Mills y McCluskey, 1990). En varios hongos fitopatógenos, el análisis de su cariotipo ha sido aplicado y su tamaño de genoma se ha determinado con más precisión (Cuadro 1), generando información importante sobre la variación en el número y tamaños de los cromosomas, dentro y entre especies, así como también en las aplicaciones en el mapeo de genes y su clonación (Zolan, 1995). Una aplicación basada en el desarrollo de un mapa genético, es la correlación con bandas (cromosomas) específicas en el cariotipo electroforético mediante la hibridación, usando sondas específicas de marcadores encontrados en un GL en particular (Zolan, 1995) y así poder correlacionar el mapa genético con el mapa físico, dando la facilidad de identificar marcadores de DNA cercanos a un gene de interés ( $< 2$  cM). Los mapas físicos proveen virtualmente un número ilimitado de marcadores de DNA de una región específica de cualquier cromosoma, lo cual permite el etiquetado de genes, su aislamiento y su manipulación. Los mapas físicos también proveen una fuente importante de información para realizar estudios en la estructura molecular del genoma, su organización y evolución, la regulación de un gene y sus interacciones. El interés es desarrollar mapas genéticos densos y culminar en mapas físicos, en donde los genes o marcadores están localizados en una posición precisa de secuencia. Como resultado, la definición de la secuencia y función de un gene puede realizarse durante un período de 4 años y en algunos casos dependiendo del tamaño del genoma se requerirá de más tiempo.

**Mapas genéticos y físicos de genomas de hongos fitopatógenos.** A continuación se describen los avances de investigación obtenidos a la fecha sobre la construcción de mapas genéticos, la determinación del cariotipo electroforético, la determinación del tamaño de genoma, y la construcción y caracterización de bibliotecas BAC en hongo fitopatógenos (Fig. 1). El mapeo genético se inició en busca

de los genes de avirulencia, de la patogenicidad y el locus *MAT*, así como también de los genes que están involucrados en la producción de alguna toxina, en la producción de pigmentos, en los grupos ínter estériles y con genes específicos de hospedero (Cuadro 1). En algunos casos se mencionan los resultados sobre la comparación entre mapas genéticos y mapas físicos, las aplicaciones hacia el mapeo y clonación de genes de avirulencia, así como estudios de genómica comparativa mediante el análisis de bibliotecas BAC.

***Blumeria graminis* f. sp. *hordei*.** Este hongo, agente causal del oídium o moho de la cebada (*Hordeum vulgare* L.), es un parásito biotrófico obligado. Los primeros trabajos sobre el mapeo genético de genes de avirulencia en este organismo los iniciaron Christiansen y Giese (1990); ellos analizaron la segregación de 31 marcadores RFLP y tres genes de avirulencia (*AvrIa10*, *AvrIc* y *AvrIh*) en una población obtenida por la crusa entre el aislado C15 de Escocia obtenido en 1964 y el aislado TY4 de Dinamarca obtenido en 1978, los cuales difieren en el nivel de avirulencia en 8 de los 14 loci de avirulencia. Estos análisis arrojaron un mapa de 7 GL con una longitud de  $\sim 326$  cM, en dos GL se encontraron los genes de avirulencia. En otro estudio posterior, se analizó una población segregante de una crusa entre los aislamientos C15 y JEH31 (aislado de Dinamarca en 1972), difiriendo en siete genes de avirulencia. Éstos se analizaron con marcadores AFLP, RFLP, así como también el locus *MAT* y siete genes de avirulencia (*Avr<sub>a2</sub>*, *Avr<sub>a3</sub>*, *Avr<sub>a6</sub>*, *Avr<sub>a7</sub>*, *Avr<sub>a10</sub>*, *Avr<sub>a22</sub>* y *Avr<sub>kl</sub>*). Un total de 359 loci fueron mapeados y todos los genes de avirulencia. Con estos resultados se pudo construir un mapa genético de 34 GL cubriendo una longitud total de 2114 cM; se determinó que un gene de avirulencia fue fuertemente ligado a marcadores moleculares, lo que lo hace apropiado para realizar la clonación basada en el mapeo (Pedersen *et al.*, 2002a). Por lo anterior, Pedersen *et al.* (2002b), llevaron a cabo la construcción de una biblioteca BAC del aislamiento C15. Su análisis mostró un alto contenido de secuencias repetitivas, dificultando la construcción de contigs (clonas BAC traslapadas). Sin embargo, la biblioteca BAC permitió identificar el tamaño del genoma de *B. graminis*, el cual fue de 100-160 Mb. También se desarrollaron dos contigs, los cuales contenían dos loci de avirulencia (*Avr<sub>a6</sub>* y *Avr<sub>a22</sub>*). Se desarrollaron marcadores de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) de secuencias de extremos BAC para ligar los contigs al mapa genético previamente reportado por Pedersen *et al.* (2002a). Posteriormente, dos contigs BAC de *B. graminis* se utilizaron para llevar a cabo estudios de microsintenia con *Neurospora crassa* Shear y Dodge y *Aspergillus fumigatus* Fresen. Un dato importante de estas comparaciones, es que algunos genes ortólogos de *N. crassa* fueron correspondientes a *B. graminis*. La biblioteca BAC en combinación con los mapas genéticos provee herramientas invaluables para el aislamiento de genes de avirulencia de *B. graminis* y para el estudio de sintenia con otros hongos. ***Didymella rabiei* (Kovachevski) (anamorfo: *Ascochyta rabiei***

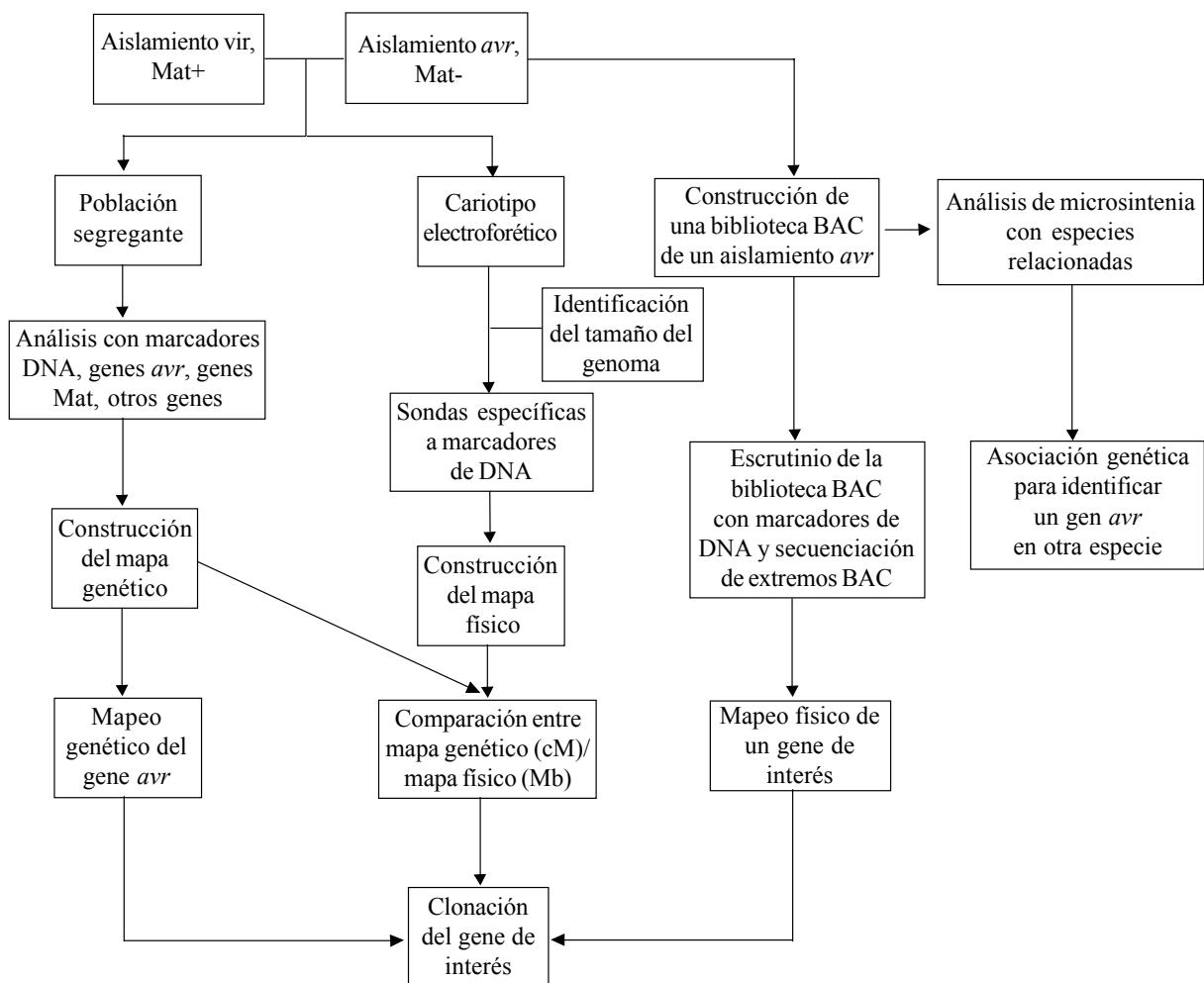


Fig. 1. Esquema gráfico de los principales pasos requeridos para el desarrollo de mapas genéticos y físicos para el estudio de genomas de hongos fitopatógenos

**Pass. Labr.**) *D. rabiei* es un hongo necrotrófico que causa el tizón por *Ascochyta* del garbanzo (*Cicer arietinum* L.), el cual es una de las enfermedades más importantes de este cultivo a nivel mundial. Existe poca información sobre los factores genéticos involucrados en la interacción hospedero-patógeno, por lo que Lichtenzveig *et al.* (2002), desarrollaron un mapa genético a partir del análisis genético de la progenie obtenida de la cruce entre un aislado de *A. rabiei* originario de Estados Unidos (ATCC76501) y otro de Siria (AA13), difiriendo en su agresividad. Se mapearon cincuenta marcadores de los cuales 36 fueron huellas génicas de DNA amplificado (marcadores DAF) y 14 marcadores SSR. El mapa genético estuvo comprendido por diez GL y tuvo una longitud de 261.4 cM. Sin embargo, en un estudio posterior Phan *et al.* (2003), desarrollaron otro mapa genético de este hongo, cruzando el aislado ATCC76502 *MAT* 2 de Estados Unidos con VIC0013 *MAT* 1 de Australia. Ellos emplearon 126 marcadores de DNA, de los cuales 69 fueron marcadores

RAPD, 46 fueron marcadores AFLP, 10 fueron marcadores SSR, y uno SCAR. Se caracterizaron dieciocho GL mayores y 10 GL menores, mientras que el locus *MAT* (de apareamiento) fue mapeado. El mapa tuvo una longitud de 1271 cM y un promedio de distancia entre marcadores de 15.1 cM. Desafortunadamente, los dos mapas no pueden ser integrados ya que solamente dos marcadores SSR fueron comunes para ambos mapas. Por otra parte, Akamatsu y Peever (2005), reportaron el cariotipo electroforético de *A. rabiei*. Ellos usaron una colección mundial de *A. rabiei* y *Ascochyta* spp. incluyendo *A. fabae* Speg., *A. lentis* Vassiljevsky, *A. pisi* Lib. y *A. viciae-villosae* Ondrej. El cariotipo electroforético de 45 aislados de *A. rabiei* originarios de 19 países mostró de 10-14 cromosomas y un tamaño estimado del genoma de 20.5 a 30.5 Mb.

***Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder y H.N. Hansen.** El hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) es el agente causal de la marchitez del

tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). El ciclo sexual de este patógeno no se ha observado en campo. Los aislamientos de *Fol* se clasifican dentro de razas fisiológicas y grupos vegetativamente compatibles (VCGs). Tres razas fisiológicas se distinguen por su virulencia diferencial sobre cultivares de tomate conteniendo diferentes genes de resistencia dominantes. Por lo anterior, para mapear genes de avirulencia en este hongo, una población generada a partir de cruzas parosexuales se desarrolló de dos aislados, uno de la raza 1 (aislado Fo1004), conteniendo el gene de avirulencia *A1* y el otro de la raza 3 (aislado Fo1029), conteniendo *A3*. Ambos aislados fueron transformados con el gene de la resistencia a fleomicina (*ble*) y el gene de la resistencia a higromicina (*hph*), respectivamente. Se llevó a cabo la fusión de protoplastos y la progenie obtenida se seleccionó por la presencia de ambos genes de resistencia a los antibióticos mencionados. Se obtuvieron un total de 32 productos fusionados; los resultados mostraron el intercambio de DNA parental, la recombinación y segregación de los genes de avirulencia (Teunissen *et al.*, 2002). Se emplearon marcadores AFLP con una técnica modificada, la cual combina un oligonucleótido específico al retotranspon *Foxy* (el cual está presente y es altamente variable dentro del genoma de *Fusarium*) con adaptadores de oligonucleótidos standard. Esta metodología se utilizó para construir un mapa genético de *Fol*. Los análisis de ligamiento revelaron 23 GL usando 83 marcadores *Foxy*-AFLP (Teunissen *et al.*, 2003). A la fecha, este es el único mapa creado en base a la fusión de protoplastos de un hongo fitopatógeno.

***Gibberella moniliforme* Wineland (anamorfo: *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.** El primer trabajo sobre la construcción de un mapa genético en *G. moniliforme* se realizó por Xu y Leslie (1996) quienes analizaron marcadores RFLP, dos genes auxotróficos (*arg1, nic1*), el locus *MAT* (*matA+ / matA-*), la esterilidad femenina (*ste1*), la característica de espora muerta (*Sk*) y un gene gobernando la producción de la micotoxina fumosina B1 (*fum1*). Usaron el aislado A00015 (produce *fum1, matA+, Skk, arg1, nic1* y *ste1*) y lo cruzaron con A04643 (no produce *fum1, matA-, Sks*). Los análisis arrojaron 12 GL correspondiendo a los 12 cromosomas que fueron previamente identificados mediante el cariotipo electroforético (Xu *et al.*, 1995). Los GL y los cromosomas fueron correlacionados mediante la técnica de Southern Blot entre marcadores apropiados RFLP de cada uno de los GL. Sin embargo, uno de los problemas que presentó este mapa fue su contenido significativo de huecos dentro de los GL, dificultando la localización rutinaria con precisión de algunos genes biológicamente importantes. Por lo tanto, usando la misma población segregante, Jurgenson *et al.* (2002b) expandieron el mismo mapa descrito por Xu *et al.* (1995), adicionándole 486 marcadores AFLP. El mapa genético resultante tuvo un promedio de intervalo entre marcadores de 3.9 cM y aproximadamente 21 kb / cM, por lo que se pudieron identificar marcadores AFLP en menos de 1 unidad de mapa del locus *MAT* y 2.5 cM del locus de *sk*; mientras

que ocho marcadores AFLP estuvieron dentro de 8.5 cM del locus *fum1*. Estos resultados podrían ser útiles para la localización y clonación de genes de interés en este hongo.

***Gibberella zeae* (Schwein.) Petch. (anamorfo: *Fusarium graminearum* Schwabe).** El hongo *F. graminearum* provoca varios tipos de enfermedades en diferentes cultivos agrícolas. Por ejemplo, en trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada causa la pudrición de la corona, en maíz (*Zea mays* L.) pudrición del tallo y de la espiga, y en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) la pudrición de la corona. Uno de los daños más importantes es cuando ocasiona la reducción de la calidad del grano de cebada, ya que los granos cosechados frecuentemente están contaminados con las toxinas nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON) y zearalenona. Jurgenson *et al.* (2002a) construyeron un mapa genético a partir del análisis de una crusa obtenida de dos mutantes complementarios de *G. zeae* que no utilizan nitrato (*nit*), el aislado R-5470 originario del Japón (línea 6 que produce NIV) y Z-3639 de Kansas (línea 7 que produce DON). La progenie se analizó mediante marcadores AFLP, dando como resultado un total de 468 marcadores AFLP, los cuales se mapearon sobre nueve GL, obteniéndose una longitud total del mapa de 1300 cM con un promedio de intervalo de 2.8 unidades de mapa entre loci. Uno de los resultados mostró que algunos loci que gobernan la cantidad y tipo de toxina (DON o NIV) se localizaron en los GL IV y I, respectivamente. También se demostró que el locus que gobierna el tipo de tricoteceno (DON o NIV) cosegregó con el gene *TR15* (codifica para una tricodieno sintasa). Posteriormente, en otro estudio con la ayuda de este mapa se pudieron identificar loci asociados con la patogenicidad y agresividad de *G. zeae* en trigo (Cumagun *et al.*, 2004). Los resultados mostraron que la progenie segregó cualitativamente (61:38) para la patogenicidad: no patogenicidad, respectivamente. Las 61 progenie patogénicas mostraron que la cantidad de enfermedad inducida (agresividad) varió cuantitativamente. Enseguida, se pudo determinar que dos reproducibles loci de características cuantitativas (QTL = quantitative trait loci) para la agresividad fueron detectados en el GL I del mapa genético. En base a estos resultados, ahora puede ser posible entender las interacciones hospedero-patógeno, en base al análisis de agresividad de aislados que contienen los genes NIV y DON sobre un conjunto de variedades de trigo altamente resistentes. Así, el mapeo de los QTL de esas características de *G. zeae* podría identificar genes involucrados en las interacciones específicas entre el hospedero y el patógeno, y proveer información básica necesaria para el manejo del hospedero y poblaciones del patógeno dentro del agroecosistema de trigo (Cumagun *et al.*, 2004). En un estudio reciente, Gale *et al.* (2005) construyeron un nuevo mapa genético para validar la información generada de la secuencia del genoma de *F. graminearum*. Ellos utilizaron el aislado PH-1 (de Michigan) que se utilizó para secuenciar el genoma, y lo cruzaron con el aislado 00-676 (de Minnesota). Se obtuvieron un total de 111 ascosporas, las cuales se analizaron para la

segregación de 235 loci. Se determinó por estudio del cariotipo citológico, un número de cuatro cromosomas. Los marcadores genéticos consistieron de sitios de secuencias etiquetadas (STS), AFLP y otros marcadores. Se construyó un mapa genético con nueve GL, cubriendo una longitud de 1234 cM y anclando 99.83% de la secuencia del genoma. Los nueve GL y 22 secuencias de correlación ancladas de la secuencia pudieron ser ensamblados dentro de los cuatro cromosomas. ***Leptosphaeria maculans* (Desmaz.) Ces. y De Not.** [anamorfo: *Phoma lingam* (Tode:Fr.) Desmaz.]. El hongo *L. maculans* es el agente causal de la pudrición seca o pierna negra de la colza (*Brassica napus* L.), la cual provoca pérdidas de más del 90% de la producción. En este patógeno se han realizado diferentes estudios para el mapeo genético y físico de su genoma. Tres mapas genéticos han sido reportados por varios grupos (Attard *et al.*, 2002; Cozijnsen *et al.*, 2000; Pongam *et al.*, 1998), pero ninguno ha podido ser integrado con algún otro. El primer mapa se llevó a cabo utilizando dos aislados, PHW1245 avirulento y PHW1223 virulento sobre *B. napus* cv. Major. Se emplearon marcadores AFLP y se analizó el locus de avirulencia (*alm1*). El mapa genético arrojó nueve GL mayores y cinco GL pequeños menores conformados con al menos 3 marcadores cada uno. Dos marcadores AFLP fueron ligados al locus *alm1*, los cuales estaban a una longitud de 3.1 y 8.1 cM (Pongam *et al.*, 1998). Estos datos muestran que la identificación de marcadores ligados al gene de avirulencia indican que la interacción diferencial está controlada por un solo gene (Pongam *et al.*, 1998). En cambio, en otro estudio se llevó el análisis genético de la crusa entre el aislado C13 avirulento y M1 virulento sobre *Brassica juncea* (L.) Czernj. y J.M. Coulter. La población segregante se estudió usando marcadores AFLP, RAPD, el locus *MAT* y un locus confiriendo especificidad del hospedero (HS) por la habilidad de formar lesiones en *B. juncea* (Cozijnsen *et al.*, 2000). Los resultados presentaron un mapa genético de 21 GL, el cual consistió de cinco GL pequeños y una longitud de 1520 cM. Mediante PFGE, los resultados mostraron que los aislados parentales tuvieron cada uno 16 cromosomas y un tamaño de genoma de 33.5 Mb. Se logró mapear físicamente a HS y el locus *MAT* dentro de los cromosomas cuatro y nueve, respectivamente, así como también a *â-tubulina*, *cianida hidratasa*, *endopoligalacturonasa*, *celulasa 1* y *celulasa 2* (Cozijnsen *et al.*, 2000). Por lo tanto, el mapa genético y físico podría ser extremadamente útil como una base para futuros estudios de genética y genómica funcional de este hongo. Posteriormente, otro grupo de investigación realizó una crusa entre el aislado a.2 (*Mat+*, *avrLm1*) y el H5 (*Mat-*, *avrLm1*) aislados de *B. napus* L. El mapa genético se obtuvo mediante el análisis de marcadores RAPD, secuencias simples repetidas internas (ISSR), AFLP y elemento repetitivo básico - reacción en cadena de la polimerasa (rep-PCR = repetitive-element-based-polymerase chain reaction); éstos produjeron 301 marcadores ligados, definiendo 18 GL de más de cinco marcadores cada uno de ellos. El locus *avrLm1* se localizó dentro de un GL de

116.8 cM de longitud, compuesto de 14 marcadores, de los cuales siete están estrechamente agrupados alrededor del locus *avrLm1*; estos marcadores fueron transformados dentro de regiones amplificadas de secuencias caracterizadas (SCARs), esto con la finalidad de realizar el proceso hacia la clonación de *avrLm1* usando la metodología de clonación posicional, mediante el análisis de una biblioteca BAC hecha de un aislado *avrLm1*. Sin embargo, se observó que el locus blanco correspondió a un área deficiente de recombinación, la cual se determinó mediante el análisis en cruzas obtenidas *in vitro*. Como una alternativa, se eligió incrementar el número de eventos meióticos, por lo tanto, se analizaron aislados virulentos y avirulentos provenientes de diferentes campos en el cultivar que porta el gene de resistencia *Rlm-1*. Los resultados mostraron que existe un alto nivel de conservación de la región del genoma del locus *avrLm1* dentro de los aislados provenientes de distintos campos (Attard *et al.*, 2002).

***Magnaporthe grisea* [(T.T. Hebert) Yaegashi y Udagawa]**

**Marasas (anamorfo: *Pyricularia oryzae* T.T. Hebert).** El hongo *M. grisea* es el agente causal de la mancha foliar o quemazón del arroz (*Oryza sativa* L.), una de las enfermedades más perjudiciales de este cultivo. Este hongo se ha considerado como un organismo modelo para estudios fitopatológicos. Se ha demostrado que *M. grisea* tiene un genoma pequeño (30 Mb) y cuenta con siete cromosomas (Romao y Hamer, 1992; Skinner *et al.*, 1993; Sweigard *et al.*, 1993). Además está genéticamente relacionado con otros hongos modelos no patógenos como *N. crassa* y *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Wint. En décadas pasadas, varios grupos de investigación llevaron a cabo estudios intensos en los cuales resultaron varios mapas genéticos de este hongo; se emplearon diferentes tipos de marcadores como RFLP, RAPD, SSR, secuencias de telómeros, la secuencia de DNA repetitivo nombrada "MGR586" y genes de avirulencia (Dioh *et al.*, 2000; Farman y Leong, 1995; Kaye *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2005; Nitta *et al.*, 1997; Romao y Hamer, 1992; Smith y Leong, 1994; Sweigard *et al.*, 1993). Uno de los logros obtenidos fue que se pudo integrar la información generada de dos mapas genéticos y se obtuvieron siete GL correspondientes a los siete cromosomas del hongo (Nitta *et al.*, 1997). Por consiguiente, el mapa genético obtenido del análisis de la progenie de la crusa entre Guy11 (*MAT1-2*) con 2539 (*MAT1-1*) reportado por Nitta *et al.* (1997), es el que ha servido para estudios posteriores como el mapeo de genes de avirulencia. El desarrollo de los mapas genéticos en *M. grisea* ha facilitado el mapeo de distintos genes de avirulencia y con la ayuda de la metodología de caminado cromosomal, se han clonado varios genes *Avr* (*PWL2*, *AVR1-CO39*, *AVR-Pita* y *ACE1*) (Bohnert *et al.*, 2004; Farman y Leon, 1998; Orbach *et al.*, 2000; Sweigard *et al.*, 1995). Recientemente, Luo *et al.* (2005), construyeron un nuevo mapa genético de la crusa entre el aislado 84R-62B (*MAT1-1*) con Y93-245c-2 (*MAT1-2*). Se pudo determinar las localizaciones cromosómicas de tres genes de avirulencia (*AvrPik*, *AvrPiz* y *AvrPiz-t*), por medio de

marcadores RAPD y RFLP seleccionados como sondas para hibridar por Southern Blots a los cromosomas parentales que fueron separados por PFGE. Los GL que contenían los genes *AvrPiz* y *AvrPiz-t* fueron asignados a los cromosomas 3 y 7, respectivamente; mientras que el gene *AvrPik* está localizado sobre el cromosoma del tamaño de 1.6 Mb en 84R-62B, sugiriendo que los tres genes de avirulencia residen sobre diferentes cromosomas. Por otra parte, en otro estudio se analizaron algunos clones de una biblioteca BAC del aislado 70-15 y fueron ensamblados dentro de 188 contigs cubriendo todo el genoma del hongo. Ciento veinte y tres de esos contigs se anclaron al mapa genético reportado por Nitta *et al.* (1997), empleando marcadores RFLP (Zhu *et al.*, 1999). El cromosoma 7 (con un tamaño de 4.2 Mb) es hoy en día la porción del genoma más estudiada (Mitchell *et al.*, 2003). La importancia de su estudio es que este cromosoma contiene el locus *MAT* (*mat a o á*) así como también 20 marcadores mapeados. Por lo anterior, Zhu *et al.* (1999), construyeron un mapa físico cubriendo > 95% del cromosoma 7 de *M. grisea* usando una biblioteca BAC, obteniendo una importante correlación entre el mapa genético y el mapa físico de este cromosoma (Mitchell *et al.*, 2003). En un estudio realizado para determinar el nivel de sintenia (regiones de un set de genes ortólogos) entre una biblioteca BAC (aislado 4224.7.8) del cromosoma de *M. grisea*, con la información de las secuencias de los genomas de *N. crassa*, *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhouit y *Saccharomyces cerevisiae* Gasp., se encontró que una región fue sintética a una porción del genoma de *N. crassa*, en cambio no hubo sintenia con *C. albicans* y *S. cerevisiae*. La identificación de estas regiones contenido genes altamente conservados a través de dos géneros que han evolucionado independientemente induce muchas preguntas biológicas, como la función y la identidad de esos genes (Hamer *et al.*, 2001). Un estudio importante realizado en *M. grisea* es la secuenciación de su genoma, usando el aislado 70-15 (Dean *et al.*, 2005). El análisis de la secuencia del genoma demostró que presenta un gran y diverso grupo de proteínas secretoras, posee una extensa familia de proteínas G receptoras, varios nuevos genes asociados a la virulencia y una gran cantidad de enzimas involucradas en el metabolismo secundario (Dean *et al.*, 2005), siendo éste el primer análisis detallado del genoma de un hongo fitopatógeno.

**Otros hongos fitopatógenos.** Tzeng *et al.* (1992), reportaron el uso de marcadores RFLP y cuatro marcadores fenotípicos (resistencia a cicloheximida, el locus *MAT*, la producción de la toxina *Tox1* y nivel de patogenicidad) para construir el mapa genético de *Cochliobolus heterostrophus* (Drechs.) Drechs., agente causal del tizón foliar del maíz, usando el aislado Hm540 (*tox1*, *MAT1-1* de Carolina del Norte) y el aislado B30.A3.R45 (*TOX1*, *alb1*, *CyhR*, *MAT1-2*). El cariotipo electroforético se determinó en los padres y en algunos individuos de la progenie, y se usaron sondas para detectar marcadores RFLP que hibridarían hacia algún cromosoma. Se detectaron de 15 a 16 cromosomas, 126 marcadores fueron asignados a cromosomas específicos y se confirmó el

ligamiento entre 120 marcadores. Varios marcadores RFLP fueron ligados al locus *Tox1* (Tzeng *et al.*, 1992). Posteriormente, en otro estudio un mapa genético y el cariotipo electroforético fue desarrollado en *Cochliobolus sativus* (Ito y Kurabayashi) Drechs. Ex Dastur causante de varias enfermedades (tizón foliar y pudrición común de la raíz) de cebada y trigo. Usaron el aislado ND90Pr, el cual presenta alta virulencia al cv. Bowman de cebada y lo cruzaron con ND5883 que presenta un bajo nivel de virulencia. Se analizaron en la progenie obtenida marcadores AFLP, RFLP, el locus *MAT* y un gen condicionando alta virulencia a cebada cv. Bowman (*VHv1*). Los resultados arrojaron un mapa genético comprendido por 27 GL cubriendo una distancia de 1329 cM, y se determinó un número de 15 cromosomas estimándose un tamaño del genoma de 33 Mb. El gen de virulencia *VHv1* co-segregó con seis marcadores AFLP que fueron mapeados sobre un GL. Por medio de la hibridación usando de dos a tres marcadores RFLP y AFLP de cada uno de los GL, 25 de los 27 GL fueron asignados a cromosomas específicos, mientras que el locus *VHv1* se localizó en un cromosoma de un tamaño de 2.8 Mb del aislado ND90Pr (Zhong *et al.*, 2002). Otro de los patógenos estudiados a nivel de su genoma fue *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* Drechs., causante de la mancha reticulada de la cebada, con el cual se obtuvo un mapa genético y el cariotipo electroforético. Ciento ocho marcadores AFLP fueron analizados para construir el mapa genético, el cual consistió de 15 GL y una longitud de 909 cM. El análisis del cariotipo electroforético reveló un mínimo de seis cromosomas con un tamaño del genoma de 23 Mb. Los datos de la respuesta de la infección causada por este patógeno se generó para la población analizada mediante inoculaciones de conídios de cada una de las progenies sobre cuatro líneas de cebada, las cuales mostraron una respuesta diferencial a los aislados usados como padres (Lai *et al.*, 2005). Por último, el primer mapa genético reportado de un basidiomiceto fue hecho por Zambino *et al.* (2000) con el análisis de una población *F<sub>2</sub>* de *Puccina graminis* Pers.:Pers. *tritici* Eriks. y E. Henn., agente causal de la roya del tallo de trigo. Se mapearon 17 marcadores RAPD, 35 marcadores AFLP y ocho genes de avirulencia, y se logró construir un mapa genético compuesto por 7 GL con una longitud de 525 cM. Otro basidiomiceto estudiado fue *Heterobasidion annosum* (Fr.:Fr.) Bref. agente causal de la pudrición de la raíz en coníferas, siendo el patógeno más devastador del hemisferio Norte. Se construyó un mapa genético de la crusa entre dos aislados compatibles de los grupos ínter estériles S y P originarios de Norte América. Se obtuvo una progenie de 102 individuos, la cual se analizó con 358 marcadores AFLP. Los análisis de ligamiento mostraron 19 GL, conteniendo seis o más marcadores, los cuales cubrieron una longitud de 1468 cM; sin embargo, otros 70 marcadores AFLP fueron asignados a pequeños GL. Esos marcadores formaron otros 20 GL, por lo tanto, la longitud total del mapa fue de 2252 cM. Los loci para los dos genes ínter estériles (S y P) fueron localizados en el mapa, mientras que la segregación del locus

*MAT* se analizó por retrocruzas entre la progenie con sus padres (Lind *et al.*, 2005a). Sin embargo, el locus *MAT* no se pudo colocar en el mapa. Posteriormente, se mapearon QTLs para la patogenicidad sobre *Pinus sylvestris* L. Los análisis determinaron un QTL sobre el GL 15 y uno en el GL 20. Estos QTLs podrían ser identificados y caracterizados en estudios posteriores (Lind *et al.*, 2005b).

**Investigaciones realizadas en México.** En el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Mérida, se ha estudiado al hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, el cual causa la Sigatoka negra del plátano (*Musa* spp.), ocasionando pérdidas de un 30 a 40% en la producción de fruta. Su control se basa principalmente en la aplicación de fungicidas, cuya inversión implica hasta el 40% de los costos de producción. Se ha determinado el cariotipo electroforético de aislados provenientes de los Estados de Veracruz, Tabasco, Colima, Chiapas y Yucatán, el cual mostró de 8 a 13 cromosomas y el tamaño estimado del genoma fue de 35 Mb (Rodríguez-García *et al.*, 2007). Por otra parte, se construyó y caracterizó una biblioteca BAC de un aislado proveniente del estado de Veracruz, la cual está conformada por 1,920 clonas, con un promedio de inserto de 90 kb (Canto-Canché *et al.*, 2007). La construcción de un mapa genético de este patógeno se llevó a cabo con la colaboración del Dr. Jean Carlier del Centro de Cooperación Internacional para el Desarrollo de la Investigación Agronómica (CIRAD = Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), Francia y la Dra. June Simpson del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato. Se llevó a cabo un estudio preliminar del análisis de una progenie F<sub>1</sub> generada por la crusa entre el aislado CIRAD86 (*mat+* originario de Camerún, el cual se utilizó para secuenciar el genoma de este hongo) con el aislado CIRAD139A (*mat-* originario de Colombia); luego, esta población se analizó con marcadores AFLP y marcadores SSR. Apoyándose en los resultados obtenidos de la segregación de los marcadores, se generó el mapa genético que consistió de 25 GL formados por cinco o más marcadores; el mapa estuvo conformado por 270 marcadores, de los cuales 257 fueron AFLP y 13 SSR; el mapa tuvo una longitud de 1083 cM (Manzo-Sánchez *et al.*, 2005). Estos datos concuerdan con el mapa genético de *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt., agente causal del tizón foliar del trigo, en donde se cruzaron los aislados IPO232 (*MAT1-1*, aislado de Holanda) que es virulento sobre Veranopolis, Kavazva y Shafir con IPO94269 (*MAT1-2*, aislado de Holanda), el cual es avirulento a los cultivares antes mencionados; en este estudio se reportaron 23 GL y con una longitud del mapa de 1216 cM (Kema *et al.*, 2002). *M. graminicola* es un hongo aparentado genéticamente a *M. fijiensis*, por lo que en un futuro se podría mapear el locus *MAT*, se podría examinar en una base de datos de 40,000 EST originados de *M. fijiensis* la presencia de SSR y desarrollar nuevos marcadores EST-SSR para su posterior mapeo, y por último, utilizar la información que

pronto será generada de la secuencia del genoma para localizar genes de interés. Otro de los objetivos es la clonación del locus *MAT* de *M. fijiensis*, por lo que se llevó a cabo la clonación del gen DNA liasa, el cual se ha demostrado está cercano al locus *MAT* en varios hongos. Un fragmento de este gen fue amplificado con oligonucleótidos degenerados, luego fue clonado y secuenciado. Usando una estrategia de caminado, se logró el anclaje sobre el gene de DNA liasa, en base a esto se obtuvo una región de 7 kb, la cual se localiza hacia la caja HMG incluido en el idiomorfo *MAT-2*. Mientras que en otro aislado, se obtuvo una región de 5 kb, la cual incluye al idiomorfo *MAT-1*. La anotación de los genes está en progreso actualmente (Conde-Ferráez *et al.*, 2005). En el CINVESTAV, Unidad Irapuato, se ha llevado a cabo el análisis del mapeo genético de genes de avirulencia del Deuteromiceto *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. y Magnus) Lams.-Scrib., agente causal de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Dos aislados de origen mexicano que difieren en al menos dos genes de avirulencia fueron cruzados para obtener una población F<sub>1</sub>. Se obtuvo un mapa genético mediante el análisis de 167 marcadores AFLP, el cual presentó una longitud de 1923.3 cM y estuvo conformado por 34 GL, con una distancia promedio entre marcadores de 11.5 cM y una distancia máxima de 39 cM. Además, se pudo determinar que los genes de avirulencia *Avrcl-Mex* y *Avrcl-To* en los aislados usados como padres, segregan dentro de la progenie en forma independiente y en una proporción de 1:1. Hoy en día, este es el primer mapa genético que se reporta para alguna especie de *Colletotrichum* (Luna-Martínez *et al.*, 2007).

## CONCLUSIONES

La búsqueda de soluciones a los problemas causados por hongos fitopatógenos en los últimos años, se ha encaminado hacia el mapeo genético y físico, así como también la secuenciación completa de sus genomas. Las herramientas involucradas en el análisis de dichos genomas han surgido a partir de su amplio uso en otros organismos modelos. El mapeo se ha enfocado hacia la búsqueda de genes de interés, tales como los de avirulencia/patogenicidad, pero hasta la fecha, han sido pocos los que se han clonado. El mapeo físico ha permitido entender la composición física del genoma (tamaño y número de cromosomas), así como también el tamaño del genoma. También se han utilizado algunos genes [DNAr (DNA ribosomal),  $\alpha$ tub ( $\alpha$ -tubulina), *sod1* (superóxido dismutasa), *niaD* (nitrato reductasa), *Skn-7* (histidina kinasa 7), *ops* (opsina), entre otros y algunos marcadores que pertenecen a los grupos de ligamiento] como sondas para hibridar con algún cromosoma. La genómica comparativa, mediante el empleo de secuencias extremas de bibliotecas BAC, es una herramienta poderosa que permite entender los aspectos evolutivos entre los genomas de organismos de la misma especie y entre especies diferentes. Uno de los logros obtenidos recientemente es el análisis de la secuencia completa del genoma de algunos hongos fitopatógenos, el cual permite conocer los recursos moleculares con que cuenta

el patógeno para poder invadir y provocar daños a su hospedero. Son pocos los estudios realizados sobre el mapeo en genomas de hongos fitopatógenos, los cuales se han enfocado en mayor proporción sobre Ascomicetos. Es importante implementar este tipo de metodologías para poder entender mejor el genoma de los hongos fitopatógenos que son potencialmente dañinos a cultivos de interés comercial en México.

**Agradecimientos.** Al CONACYT por la beca otorgada a Gilberto Manzo-Sánchez (128982) para sus estudios de Doctorado y por el financiamiento al proyecto titulado Mapeo físico y genético del patógeno de plátano *Mycosphaerella fijiensis* (37602-B).

#### LITERATURACITADA

- Akamatsu, H., and Peever, T.L. 2005. Molecular karyotypes of the phytopathogenic fungus *Ascochyta rabiei* and related legume-infecting *Ascochyta* spp. Fungal Genetics Newsletter S52:204.
- Anderson, M., Kasuga, T., and Mitchelson, K. 1993. A partial physical karyotype of *Heterobasidion annosum*. In: M. Johansson, and J. Stenlind (eds.). Eight International Conference on Root and Butt Rots. Eight International Conference on Root and Butt Rots. Uppsala, Sweden. 653 p.
- Attard, A., Gout, L., Gourgues, M., Kühn, M.-L., Schmit, J., Laroche, S., Ansan-Melayah, D., Billault, A., Cattolico, L., Balesdent, M.-H., and Rouxel, T. 2002. Analysis of molecular markers genetically linked to the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *avrml1* in field populations indicates a highly conserved event leading to virulence on *rlm1* genotypes. Molecular Plan-Microbe Interactions 15:672-682.
- Bohnert, H.U., Fudal, I., Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J.L., and Lebrun, M.H. 2004. A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistance rice. Plant Cell 16:2499-2513.
- Brown, J.K.M., Le Boulaire, S., and Evans, N. 1996. Genetics of responses to morpholine-type fungicides and of avirulences in *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. European Journal Plant Pathology 102:479-490.
- Canto-Canché, B., Guillén-Maldonado, D.K., Peraza-Echeverría, L., Conde-Ferráez, L., and James-Kay, A. 2007. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of the causal agent of Black Sigatoka fungal leaf spot disease of banana and plantain, *Mycosphaerella fijiensis*. Molecular Biotechnology 23:54-70.
- Christiansen, S.K., and Giese, H. 1990. Genetic analysis of the obligate parasitic barley powdery mildew fungus based on RFLP and virulence loci. Theoretical and Applied Genetics 79:705-712.
- Conde-Ferráez, L., Canto-Canché, B., Waalkwijk, C., Kema, G., James, A., and Abel, E. 2005. Cloning of the mating type locus of *Mycosphaerella fijiensis*. Memorias VI Congreso sobre Biología Molecular y Celular de Hongos. Morelia, Michoacán, México. Resumen, p. 77.
- Cozijnzen, A.J., Popa, K.M., Rolls, B.D., Purwantara, A., and Howlett, B.J. 2000. Genome analysis of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*: mapping mating type and host specificity loci. Molecular Plant Pathology 1:293-302.
- Cumagun, C.J.R., Bowden, R.L., Jurgenson, J.E., Leslie, J.F., and Miedaner, T. 2004. Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. Phytopathology 94:520-526.
- Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbot, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.-R., Pan, H., Read, N.D., Lee, Y.-H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofrio, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeyer, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.-H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.-J., Nicol, R., Purcel, S., Nusbaum, C., Galagan, J.E., and Birren, B.W. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature 434:980-986.
- Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J.L., Orbach, M., and Lebrun, M.H. 2000. Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. Molecular Plant-Microbe Interactions 13:217-227.
- Faretra, F., and Pollastro, S. 1996. Genetics studies of the phytopathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) by analysis of ordered tetrads. Mycological Research 100:620-624.
- Farman, M.L. and Leong, S.A. 1995. Genetic and physical mapping of telomeres in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Genetics 140:479-492.
- Farman, M.L., and Leong, S.A. 1998. Chromosome walking to the AVR-CO39 avirulence gene of *Magnaporthe grisea*: Discrepancy between the physical and genetic maps. Genetics 150:1049-1058.
- Gale, L.R., Bryant, J.D., Calvo, S., Giese, H., Katan, T., O'Donnell, K., Suga, H., Taga, M., Usgaard, T.R., Ward, T.J., and Kistler, H.C. 2005. Chromosome complement of the fungal pathogen *Fusarium graminearum* based on genetic and physical mapping and cytological observations. Genetics 171:985-1001.
- Hamer, L., Pan, H., Adachi, K., Orbach, M.J., Page, A., Ramamurthy, L., and Woessner, J.P. 2001. Regions of microsynteny in *Magnaporthe grisea* and *Neurospora crassa*. Fungal Genetics and Biology 33:137-143.
- Jones, N., Ougham, H., and Thomas, H. 1997. Markers and mapping: we are all genetics now. New Phytologist 137:165-177.
- Jurgenson, J.E., Bowden, R.L., Zeller, K.A., Leslie, J.F., Alexandra, N.J., and Plattner, R.D. 2002a. A genetic map of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). Genetics

- 160:1451-1460.
- Jurgenson, J.E., Zeller, K.A., and Leslie, J.F. 2002b. Expanded genetic map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). *Applied and Environmental Microbiology* 68:1972-1979.
- Kaye, C., Milazzo, J., Rozenfeld, S., Lebrun, M.-H., and Tharreau, D. 2003. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. *Fungal Genetics and Biology* 40:207-214.
- Kema, G.H.J., Goodwin, S.B., Hamza, S., Verstappen, E.C.P., Cavaletto, J.R., Van der Lee, T.A.J., de Weerdt, M., Bonants, P.J.M., and Waalwijk, C. 2002. A combined amplified fragment length polymorphism and randomly amplified polymorphism DNA genetic linkage map of *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* leaf blotch pathogen of wheat. *Genetics* 161:1497-1505.
- Lai, Z., Steffenson, B.J., Faris, J.D., Cartwright, R.D., Webster, R.K., Weiland, J.J., and Friesen, T.L. 2005. Identification and mapping of *Pyrenophora teres* f. *teres* genes conferring avirulence on barley. *Fungal Genetics Newsletter* 52:125
- Lander, E.S., and Weinberg, R.A. 2000. Genomics: Journey to the center of biology. *Science* 287:1777-1782.
- Lichtenzveig, J., Winter, P., Abbo, S., Shtienberg, D., Kaiser, W.J., and Kahl, G. 2002. Toward the first linkage map of the *Didymella rabiei* genome. *Phytoparasitica* 30:467-472.
- Lind, M., Olson, A., and Stenlid, J., 2005a. An AFLP-markers based genetic linkage map of *Heterobasidion annosum* locating intersterility genes. *Fungal Genetics and Biology* 42:519-527.
- Lind, M., Olson, A., and Stenlid, J., 2005b. QTLs for pathogenicity on *Pinus silvestris* located in a *Heterobasidion annosum* genetic linkage map. *Fungal Genetics Newsletter* 52:127.
- Luna-Martínez, F., Rodríguez-Guerra, R., Victoria-Campos, M., and Simpson, J. 2007. Development of a molecular genetic linkage map for *Colletotrichum lindemuthianum* and segregation analysis of two avirulence genes. *Current Genetics* 51:109-121.
- Luo, C.-O., Yin, L.-F., Koyanagi, S., Farman, M.L., Kusaba, M., and Yaegashi, H. 2005. Genetic mapping and chromosomal assignment of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes *Avrpik*, *AvrPiz*, and *AvrPiz-t* controlling cultivar specificity on rice. *Phytopathology* 95:640-647.
- Manzo-Sánchez, G., Zapater, M.-F., Simpson, J., James, A. y Carlier, J. 2005. Obtención de poblaciones  $F_1$  y construcción de un mapa genético de *Mycosphaerella fijiensis* usando marcadores AFLP y SSR. *Memorias VI Congreso sobre Biología Molecular y Celular de Hongos*. Morelia, Michoacán, México. Resumen, p. 142.
- Meyer, B.C., Scalabrin, S., and Morgante, M. 2004. Mapping and sequencing complex genomes: let's get physical!. *Nature* 5:578-588.
- Mills, D., and McCluskey, K. 1990. Electrophoretic karyotypes of fungi: the new cytology. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3:351-3576.
- Mitchell, T.K., Thon, M.R., Jeong, J.-S., Brown, D., Deng, J., and Dean, R.A. 2003. The rice blast pathosystem as a case study for the development of new tools and raw materials for genome analysis of fungal plant pathogens. *New Phytologist* 159:53-61.
- Nitta, N., Farman, M.L., and Leong, S.A. 1997. Genome organization of *Magnaporthe grisea*: integration of genetics maps, clustering of transposable elements and identification of genome duplications and rearrangements. *Theoretical and Applied Genetics* 95:20-32.
- Orbach, M.J., Farrall, L., Sweigard, J.A., Chumley F.G., and Valent, B. 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12:2019-2032.
- O'Sullivan, D., Tosi, P., Creusot, F., Cooke, M., Phan, T.-H., Dron, M., and Langin, T. 1998. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Current Genetics* 33:291-298.
- Pedersen, C., Rasmussen, S.W., and Giese, H. 2002a. A genetic map of *Blumeria graminis* based on functional genes, avirulence genes, and molecular markers. *Fungal Genetics and Biology* 35:235-246.
- Pedersen, C., Wu, B., and Giese, H. 2002b. A *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* BAC library - contig building and microsynteny studies. *Current Genetics* 42:103-113.
- Peters, J.L., Cnudde, F., and Gerats, T. 2003. Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends in Plant Science* 8:484-491.
- Phan, H.T.T., Ford, R., and Taylor, P.W.J. 2003. Mapping the mating type locus of *Ascochyta rabiei*, the causal agent of ascochyta blight of chickpea. *Molecular Plant Pathology* 4:373-381.
- Pongam, P., Osborn, T.C., and Williams, P.H. 1998. Genetic analysis and identification of Amplified Fragment Length Polymorphic markers linked to the *alm1* avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 88:1068-1072.
- Rodríguez-García, C.M., Raigosa-Flores, N., Conde-Ferráez, L., Peraza-Echeverría, L., Canto-Canché, B., and James-Kay, A. 2007. Variation in electrophoretic karyotype among Mexican isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28: 236-241.
- Romao, J., and Hamer, J.E. 1992. Genetic organization of a repeated DNA sequence family in the rice blast fungus. *Proceeding of the National Academic of Science of USA* 89:5316-5320.
- Skinner, D.Z., Budde, A.D., Farman, M.L., Smith, J.R., Leung, H., and Leong, S.A. 1993. Genome organization of *Magnaporthe grisea*: genetic map, electrophoretic karyotype, and occurrence of repeated DNAs. *Theoretical and Applied Genetics* 87:545-557.
- Smith, J.R., and Leong, S.A. 1994. Mapping of a *Magnaporthe*

- grisea* locus affecting rice (*Oryza sativa*) cultivar specificity. Theoretical and Applied Genetics 88:901-908.
- Sweigard, J.A., Carroll, A.M., Kang, S., Farrall, L., Chumley, F.G., and Valent, B. 1995. Identification, cloning, and characterization of PWL2, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. Plant Cell 7:1221-1233.
- Sweigard, J.A., Valent, B., Orbach, M.J., Walter, A.M., Rafalski, A., and Chumley, F.G. 1993. Genetic map of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* (n = 7). pp. 3.112-3.115. In: S.J. O'Brien (ed.). Genetic Maps. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York, USA. 318 p.
- Teunissen, H.A.S., Rep, M., Houterman, P.M., Cornelissen, B.J.C., and Haring, M.A. 2003. Construction of a mitotic linkage map of *Fusarium oxysporum* based on Foxy-AFLP. Molecular Genetics and Genomics 269:215-226.
- Teunissen, H.A.S., Verkooijen, J., Cornelissen, B.J.C., and Haring, M.A. 2002. Genetic exchange of avirulence and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinations of *Fusarium oxysporum*. Molecular Genetics and Genomics 268:298-310.
- Tzeng, T.-H., Lyngholm, L.K., Ford, C.F., and Bronson, C.R. 1992. A restriction fragment length polymorphism map and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. Genetics 130:81-96.
- Xu, J.-R., and Leslie, J.F. 1996. A genetic map of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*). Genetics 143:175-189.
- Xu, J.-R., Yan, K., Dickman, M.B., and Leslie, J.F. 1995. Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Leseola*). Molecular Plant-Microbe Interactions 8:74-84.
- Zambino, P.J., Kubelik, A.R., and Szabo, L.J. 2000. Gene action and linkage of avirulence genes to DNA markers in the rust fungus *Puccina graminis*. Phytopathology 90:819-826.
- Zhang, H.-B., and Wing, R.A. 1997. Physical mapping of the rice genome with BACs. Plant Molecular Biology 35:115-127.
- Zhong, S., Steffenson, B.J., Martinez, J.P., and Ciuffetti, L.M. 2002. A molecular genetic map and electrophoretic karyotype of the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. Molecular Plant-Microbe Interactions 15:481-492.
- Zhu, H., Blackmon, B.P., Sasinowski, M., and Dean, R.A. 1999. Physical map and organization of chromosome 7 in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Genome Research 9:739-750.
- Zhu, H., Choi, S., Johnston, A.K., Wing, R.A., and Dean, R.A. 1997. A large-insert (130 kbp) bacterial artificial chromosome library of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: Genome analysis, contig assembly, and gene cloning. Fungal Genetics and Biology 21:337-347.
- Zolan, M.E. 1995. Chromosome-length polymorphism in fungi. Microbiological Reviews. 59:686-698.