

**ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN GÉNICA PRESENTE EN MICROSECUENCIAS DE
GENES ORTÓLOGOS EN EL GÉNERO *FUSARIUM***



AUTOR

MARÍA CAMILA JIMÉNEZ LOAIZA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

BIÓLOGO

Director:

JUAN JOSE FILGUEIRA DUARTE MSc PhD

**UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
PROGRAMA BIOLOGIA APLICADA
CAJICÁ, 2024**

Contenido

RESUMEN – ABSTRACT.....	4
1. CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	1
1.1. Generalidades de <i>Fusarium</i>	6
1.2. Taxonomía de <i>Fusarium</i>	6
1.3. Métodos moleculares	8
1.3.1. Filogenia y taxonomía molecular	8
1.3.2. Bioinformática y su importancia	9
1.3.3. Alineamiento de secuencias	9
1.3.4. Modelo de sustitución	10
1.3.5. Modelo de Jukes-Cantor.....	11
1.3.6. Método de Neighbor-Joining	11
2. CAPITULO 2: ARTICULO DE INVESTIGACIÓN	11
2.1. INTRODUCCIÓN	
2.2. OBJETIVOS	
2.2.1. Objetivo general	
2.2.2. Objetivos específicos.....	10
3. METODOLOGÍA.....	11
3.1. Obtención de las muestras	8
3.2. Alineamiento de secuencias	
3.3. Agrupaciones filogenéticas.....	8
3.4. Obtención de las microsecuencias	8
3.5. Análisis matemático.....	8
3.5.1. Frecuencias de cambio de las microsecuencias.....	8
3.5.2. Proporciones de cambio para todos los genes	8
3.6. Pruebas estadísticas	8
3.7. Secuencias de comparación	8
4. RESULTADOS.....	11
5. DISCUSIÓN	11

6. CONCLUSIONES	11
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	11

Resumen

Fusarium es uno de los géneros de hongos más diverso y amplio que existe, es uno de los hongos responsables de la producción de micotoxinas las cuales contribuyen a muchas enfermedades en plantas, animales y el hombre. En cuanto a la taxonomía de las especies de *Fusarium*, a lo largo del tiempo ha sido muy compleja y controversial y aún no se logra encontrar un método que sea lo suficientemente adecuado para realizar un diagnóstico confiable de la diversidad de especies dentro de este género.

En este trabajo se realizó un análisis bioinformático de 13 especies del género *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. foetens*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. sp.*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans* y *F. verticillioide*) utilizando regiones altamente variables (microsecuencias) de 27 genes ortólogos que son comúnmente usados para realizar análisis taxonómicos y filogenéticos con el fin de poder determinar las frecuencias de cambio en dichas microsecuencias y así encontrar patrones que proporcionen información del modo de evolución de estos organismos. También se aplicó el mismo análisis bioinformático en diferentes géneros (*Bacillus*, *Ambystoma*, *Drosophila*, *Bombus*, *Carcharhinus*, *Panthera*, *Ursus*, entre otros) con el fin de analizar y comparar el comportamiento de dicha variabilidad genética en otros organismos.

De los resultados obtenidos se puede observar que existe un patrón en el cambio o variabilidad genética dentro de las especies del género *Fusarium* y así mismo un patrón de cambio específico para cada género o familia.

Palabras clave: Bioinformática, ortólogos, *Fusarium*, microsecuencias, variabilidad génica.

Abstract

Fusarium is one of the most diverse and extensive fungal genera that exists, it is responsible for the production of mycotoxins, which contribute too many diseases in plants, animal and human. Concerning the taxonomy of *Fusarium* species, over time it has been very complex and controversial and it has not yet been possible to find a method that is adequate to make a reliable diagnosis of the diversity of species within this genus.

In this work, a bioinformatic analysis of 13 species of genus *Fusarium*: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. foetens*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. sp.*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, and using highly variable regions (microsequences) of 27 orthologous genes that are commonly used for taxonomic and phylogenetic analyzes; in order to determine the frequencies of change in these microsequences and thus find patterns that provide information on the mode of evolution of these organisms. The same Bioinformatics analysis was also applied in different genera (*Bacillus*, *Ambystoma*, *Drosophila*, *Bombus*, *Carcharhinus*, *Panthera*, *Ursus*, among others) in order to analyze and compare the behavior of said genetic scarcity in different organisms.

From the results obtained, it can be observed that there is a pattern in the genetic change or variability within the species of the *Fusarium* genus and likewise a specific change pattern for each genera or family.

Keyword: Bioinformatics, orthologues, *Fusarium*, microsequences, genetic variability.

Capítulo 1: Revisión bibliográfica

1.1 Generalidades de *Fusarium*

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos, los cuales se encuentran comúnmente distribuidos en regiones tropicales, sin embargo, se pueden encontrar en regiones frías o en donde las condiciones climáticas son extremas como desiertos y regiones árticas (Leslie *et al.*, 2008; Benadosf, 2010).

Durante muchos años ha sido considerado uno de los géneros de hongos más importantes debido a que es patógeno de varias plantas y causa enfermedades como pudrición, tizón, y la costra en granos de cereales, entre otras enfermedades (Nelson *et al.*, 1994). Además de ser un patógeno de plantas, las especies de *Fusarium* se consideran importantes en el sentido económico y de salud animal y human debido a su producción de metabolitos secundarios tóxicos (Herron *et al.*, 2015) los cuales son llamados micotoxinas que producen enfermedades en plantas como lo son el tizón, marchitez y pudrición. Entre las más comunes se encuentran los tricótesenos (Torres, 2000; Stocco *et al.*, 2018; Summerell, 2019;).

Desde hace más de 20 años, las especies de este género han sido estudiadas con gran interés debido a la producción de micotoxinas (Marasas *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 1995). A pesar de eso algunas especies de *Fusarium* son benéficas para la agricultura (aislamientos no patogénicos de *F. oxysporum*), puesto que ha sido utilizado como controlador biológico de *Fusarium oxysporum* patogenico (p.e. f.sp. *licopersici* o *dianthi*). Además de eso algunas especies como *F. oxysporum* han sido usadas como mico-herbicidas para el control y manejo de malezas (Arbeláez, 2000; IVAMI, 2019).

Fusarium produce 3 tipos de esporas que son características, microconidias (comúnmente unicelulares), macroconidias y clamidosporas. Estas son usadas como caracteres morfológicos, para poder clasificar las especies, sin embargo, muchas presentan diferencias más que todo en las clamidosporas ya que pueden variar de forma y tamaño según el ambiente en el que estas se desarrollen, pero para lograr una estimación de la diversidad de las especies dentro de este género también se tiene en cuenta la forma y tamaño de los conidios y conidióforos y el color y textura de las colonias (Skovgaard *et al.*, 2003; Carrillo, 2003).

1.2 Taxonomía de *Fusarium*

Las primeras descripciones de este género se basaron en la forma de las macroconidias, ya que tienen una forma característica de banano o canoa, años después se reformuló el concepto de especie dentro del género y se propusieron diferentes guías de identificación basadas en caracteres morfológicos de cepas incluidas sus plantas hospederas (Leslie *et al.*, 2008). Sin embargo, la

taxonomía para las especies de este género ha sido un tema de mucha discusión, ya que en un tiempo hubo más de 1.000 especies con formas y variedades diferentes, basados en las observaciones morfológicas (Toussoun *et al.*, 1975); pero en esa época los científicos no realizaron descripciones de los organismos completos ni buscaron similitudes entre los hongos, aumentando así la necesidad de encontrar un sistema de clasificación confiable que pudieran determinar las especies de *Fusarium* que causaban enfermedades en diferentes plantas (Wollenweber, 1913).

En el siglo XX se pudo llegar a identificar más de cien especies de *Fusarium* las cuales fueron descritas dependiendo del huésped en que se encontraban, sin embargo, dos científicos (Wollenweber y Reinking) se dedicaron a estudiar este género con mayor determinación y redujeron el número de especies a 65, estas especies fueron agrupadas en 16 secciones en donde se tuvo en cuenta las características macroscópicas y microscópicas (morfología de la colonia y de los conidios), (Guadet *et al.*, 1989; Hennequin *et al.*, 1997). Esta clasificación no fue muy conveniente ya que los caracteres morfológicos en los que se basaba la división de especies eran poco estables y varían en función de las condiciones ambientales y del medio de cultivo utilizados; unas de las limitaciones que tiene el estudio de los caracteres morfológicos es la dificultad de diferenciar hongos que estuvieran estrechamente relacionados, delimitar de manera eficiente algunos taxa y que los métodos usados llevaban mucho tiempo (Snyder y Hansen, 1945).

Usando la taxonomía clásica, para la identificación de especies del género *Fusarium*, no siempre se obtienen resultados convenientes ya que estos organismos poseen una gran variación en cuanto a sus caracteres morfológicos y fisiológicos, por lo cual muy pocas veces se logra llegar hasta la identificación de la especie. Además, a nivel de especies *Fusarium* presenta en sus caracteres morfológicos una gran cantidad de condiciones, las cuales también se ven afectadas por las condiciones de cultivo. Los caracteres primarios para identificar especies son la morfología de la macroconidia; presencia o ausencia, morfología o disposición de microconidias; morfología de los microconidióforos (simples o ramificados) portadores de células conidiógenas con el desarrollo de las fiálides; y presencia o ausencia de clamidosporas (Leslie *et al.*, 2008).

Es por eso por lo que actualmente, se han incorporado las técnicas de biología molecular como apoyo a la taxonomía clásica para resolver estas limitaciones (Guarro *et al.*, 1999). Gracias a la biología molecular se han reportado 500 especies de *Fusarium*, sin embargo, este número puede incrementar a medida que se exploren nuevos ecosistemas y así mismo los conceptos de especies (Summerell y Laurence, 2010). Para la identificación de dichas especies, pueden utilizarse pruebas de amplificación genómica para secuencias intergénicas codificantes de ARN-ribosómicos, o también puede usarse el gen Factor de Elongación 1-alfa (EF-1 alfa), los cuales permiten diferenciar a nivel de especie (IVAMI, 2019).

1.3 Métodos moleculares

1.3.1 Filogenia y taxonomía molecular

La filogenia se encarga de estudiar las relaciones de parentesco entre los organismos, con el fin de explicar el origen y la historia evolutiva de los taxones (Tinaut *et al.*, 2017). Existen dos procesos que están involucrados para poder explicar dichos orígenes: estimación de la topología y estimación de la longitud de las ramas para una topología. Para la filogenia molecular existen tres métodos: distancia, verosimilitud y parsimonia (Nei, 1996; Pagel, 1999; O'Meara, 2012).

Las regiones que son comúnmente usadas para los análisis filogenéticos son porciones del ADN ribosomal ya que estas regiones son las más conservadas en una especie y son poco variables entre las especies; también se usan secuencias de proteínas para estos análisis (Desjardins, 2006). Estas son herramientas indispensables para estudiar la historia evolutiva de los organismos (Yang *et al.*, 2012).

Uno de los métodos más utilizados en las filogenias usando secuencias es el de Neighbor-joining, este algoritmo fue creado por Saitou y Nei en 1987, que consiste en generar un único árbol filogenético, sin embargo, este no necesariamente sería el árbol verdadero. En las secuencias de ADN la distancia genética entre dos secuencias se calcula en base al número total de sustituciones de los nucleótidos (Saitou y Nei, 1987).

Estos estudios filogenéticos contruidos con datos moleculares no excluyen los estudios morfológicos, ya que en muchos casos la filogenia molecular y la morfología se apoyan mutuamente cuando los resultados son congruentes y es común hacer uso de estos dos para realizar una filogenia (Carpenter, 1999).

Una de las regiones más usadas para análisis de filogenia molecular son los ITS (Internal Transcribed Spacer), esta región es altamente variable, es la razón por la cual es usada para estudiar las relaciones entre especies y géneros cercanos. Las regiones más comunes dentro de esta secuencia son los espaciadores internos ITS1 e ITS2, estas regiones son no codificantes, pero se transcriben dentro de la unidad transcripcional (Baldwin, 1992). En estudios anteriores se ha demostrado que esta región es apta para mostrar las diferencias entre las especies (Nicolaisen *et al.*, 2005).

Rincón (2014) realizó un estudio de filogenia con el uso de microsecuencias (regiones más variables de una secuencia génica particular), donde comparó las distribuciones topológicas de las especies del género *Fusarium* basándose en árboles unigen, árboles multigen con secuencias completas y árboles multigen con microsecuencias, obteniendo mejores topologías en el análisis realizado con microsecuencias, en donde se observa que este tipo de análisis conservan las relaciones entre las secciones. El soporte numérico de Bootstrap es más confiable, ya que, al usar secuencias completas, estas van a tener un mayor número de nucleótidos, lo que genera más

valores de distancias pareadas lo cual genera más convergencias; por otro lado, las topologías obtenidas con las microsecuencias son más consistentes al compararlas con los árboles obtenidos por medio de caracteres morfológicos (Efron *et al.*, 1996; Holmes, 2003; Tamura *et al.*, 2004;).

En cuanto a la taxonomía, para que se pueda realizar un diagnóstico de unidades moleculares taxonómicas operacionales (MOTU's: Molecular Operational Taxonomic Units), es necesario hacer uso de secuencias que tengan un relativo grado de conservación. El uso de estos MOTU's permite que la identificación de los diferentes taxa sea mucho más rápida y efectiva; al principio esta metodología inició en un contexto no molecular el cual era OTU (Operational Taxonomic Units), en esta se utilizaban todos los caracteres que fueran posibles sin tener en cuenta ni conocer el valor taxonómico de cada carácter (Floyd *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta esto, Floyd y colaboradores (2002) introdujeron el concepto MOTU, con esta metodología se revela el grado de variación de secuencias entre taxa que están estrechamente relacionadas con base en regiones genómicas específicas que son cortas (Floyd *et al.*, 2002). Esta metodología en el caso de *Fusarium* se ha aplicado tanto en grupos como de manera individual (Schroers *et al.*, 2009).

Una parte importante para realizar análisis taxonómicos moleculares es la secuenciación de los nucleótidos, esto con el fin de determinar el orden de estos que conforman una molécula de ADN y así mismo proporcionar información genética (Stackebrandt *et al.*, 2002). Para esto se han desarrollado diferentes métodos; el más conocido es el método enzimático de Sanger (Woese, 2000). Sin embargo, con los avances tecnológicos se han desarrollado otros métodos como lo son el método de next generation sequencing (NGS), este método se basa en una secuenciación masiva de ADN de manera rápida y eficiente, facilitando el estudio de genomas completos (Jara *et al.*, 2023).

1.3.2 Bioinformática y su importancia

Para poder conocer y entender como son las correlaciones, las estructuras y los patrones de los datos biológicos, es importante tener en cuenta y estudiar acerca de la bioinformática. Esta rama que involucra las áreas de biología molecular, biología celular, bioquímica, química, física e informática para entender dichas correlaciones biológicas. Utiliza las bases de datos y conocimientos útiles para almacenar y recuperar datos, algoritmos y herramientas estadísticas que sirven para analizar y determinar las relaciones entre los datos biológicos y así mismo poder identificar e interpretar conjuntos de datos (Escobar *et al.*, 2011; Verli, 2014).

1.3.3 Alineamiento de secuencias

Una de las partes fundamentales para el análisis y la comparación de secuencias de ADN es el alineamiento de las secuencias, este es el proceso en donde se puede hacer la comparación de dos o más secuencias con el fin de poder detectar regiones que comparten caracteres comunes que a su vez estos hacen referencia a una historia evolutiva común (Escobar *et al.*, 2011; Rucci, 2016).

1.3.4 Modelo de sustitución

Las mutaciones genéticas son los procesos por los cuales un gen cambia debido a cambios en uno o más nucleótidos (Adenina, Guanina, Citocina y Timina), dentro de estos cambios se pueden encontrar transiciones o transversiones (Figura 1). Las transiciones son los cambios o las recombinaciones entre moléculas que tienen la misma base nitrogenada, es decir, puede haber recombinaciones entre una purina por otra purina (Adenina y Guanina) o haber cambios entre una pirimidina por otra pirimidina (Citocina y Timina); mientras que las transversiones son los cambios entre diferentes bases nitrogenadas, es decir, un cambio entre una purina por una pirimidina o viceversa (Shewaramani, 2015).

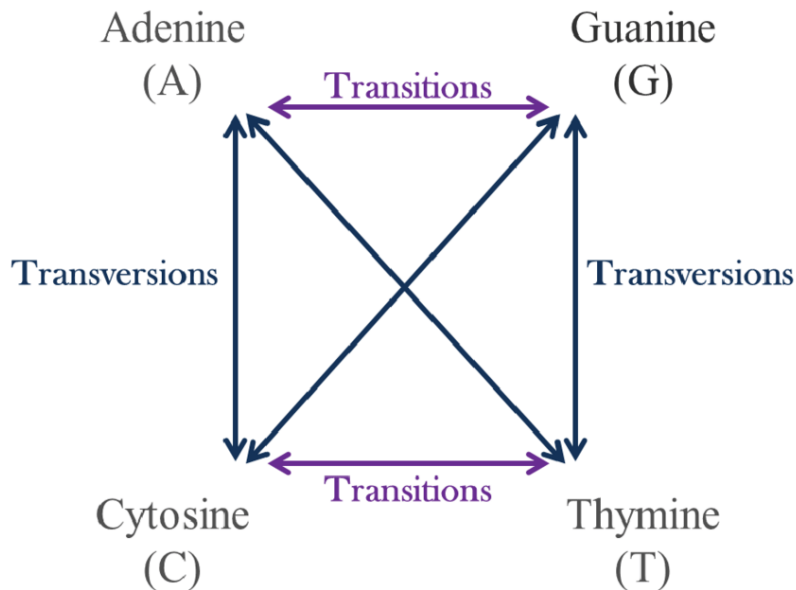


Figura 1. Sustituciones que se pueden encontrar en las mutaciones genéticas. Las flechas moradas representan las transiciones y las flechas azules representan las transversiones. Tomado de: Shewaramani, 2015.

Sin embargo, estas no son las únicas mutaciones o sustituciones que pueden ocurrir, también se pueden encontrar las inserciones y deleciones de los nucleótidos o también conocidas como indels, esta es una mutación que ocurre espontáneamente, sin embargo, puede conllevar a problemas en la comparación de las secuencias, ya que a lo largo del tiempo dos especies pudieron haber evolucionado de diferente forma y desarrollar diferentes procesos de inserciones, deleciones o recombinaciones, estos fenómenos alteran las diferentes secuencias y al hacer la comparación entre ambas puede que tengan longitudes diferentes sin importar que pertenezcan a la misma región (Henao, 2015).

1.3.5 Modelo de Jukes-Cantor

El modelo de Jukes-Cantor es una teoría conocida en la genética y la evolución molecular, fue propuesta por Jukes y Cantor en 1969 como un modelo simplificado para describir la evolución de

las secuencias de nucleótidos en el ADN, esta teoría es una base para entender como las mutaciones y la selección natural influyen en la diversidad genética a lo largo del tiempo. Esta parte de la idea de que las mutaciones de una secuencia de ADN ocurren de manera aleatoria y a una tasa constante a lo largo del tiempo; este modelo asume que todas las sustituciones de nucleótidos (transiciones y transversiones) tienen la misma probabilidad de ocurrir (Jukes y Cantor, 1969; Kimura, 1980).

1.3.6 Método de Neighbor-Joining

Para la construcción de árboles filogenéticos es común usar el principio de mínima evolución o máxima parsimonia, este tiene como objetivo examinar las topologías posibles y posteriormente escoger un árbol final que se base en la menor cantidad total de cambios evolutivos, el problema de este método es que requiere de bastante tiempo y cuando se cuenta con un gran número de MOTUs solo se examina una pequeña parte de todas las topologías posibles. Es por lo que a lo largo del tiempo se han generado diferentes métodos en donde el proceso de búsqueda del árbol filogenético final se basa en un algoritmo que obtiene la topología automáticamente (Saitou y Nei, 1987). Uno de estos métodos es el método de Neighbor-Joining, este es una herramienta muy conocida para construir arboles filogenéticos cuando se tiene una gran cantidad de datos y son complejos debido a su rapidez en la obtención de estas construcciones filogenéticas, además se garantiza un buen desempeño de algoritmo debido a las condiciones estadísticas dadas en este (Davidson y Martin del Campo, 2020).

2 Desarrollo de la opción de grado

2.1 INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo, para clasificar los organismos se ha realizado el proceso de clasificación biológica el cual los agrupa a partir de características morfológicas que tengan en común; esta agrupación ordena el conocimiento de dichos organismos y evidencia las relaciones entre los mismos. En la clasificación tradicional los métodos más usados son la fenética y la sistemática filogenética (Cepero de García, 2012).

Sin embargo, esta clasificación tradicional es inestable, por lo que en la última década se han desarrollado diferentes técnicas que ayudan a identificar y tipificar los organismos a un nivel genético del ADN, en donde se ven claras diferencias en cuanto a su taxonomía tradicional; estas técnicas son usadas para determinar posibles niveles de variación génica dentro de las poblaciones (Portilla, 2012).

Uno de los géneros de hongos que presenta problemas en cuanto a su identificación y clasificación es *Fusarium*, debido a que es un género muy heterogéneo y tiene doble nomenclatura: una para la reproducción asexual y otra para la reproducción sexual (Summerbell *et al.*, 2003). Estos problemas se han reducido gracias a la biología molecular, ya que se han podido describir

aproximadamente 150 especies morfológicas y filogenéticamente diferentes, las cuales han sido aceptadas por los taxónomos (IVAMI, 2019). Sin embargo, aún no se ha llegado a un método específico que logre eliminar los problemas de clasificación en este género y los análisis filogenéticos moleculares utilizando microsecuencias son un tema poco explorado por lo que no se han realizado estudios a profundidad.

El género *Fusarium* es conocido por su capacidad de infectar y ser patógeno de un gran número de plantas, causando enfermedades con síntomas como marchitamiento o pudrición. Esto genera grandes pérdidas económicas en la agricultura a nivel mundial, ya que estos organismos son considerados saprofitos y parásitos, siendo colonizadores de varios tipos de sustratos y del interior de la planta, en diferentes cultivos como lo son el plátano, la avena, el arroz y plantas ornamentales como el clavel (Leslie *et al.*, 2008). Con el pasar del tiempo la importancia de *Fusarium* ha incrementado ya que el número de hospederos ha aumentado, y estos han desarrollado resistencia a diferentes tratamientos químicos (Summerell *et al.*, 2010).

No se sabe con exactitud cuáles son las especies de este género que son responsables de los daños causados a los cultivos, por lo tanto, es importante tener la información exacta de estas especies la cual facilitara los diagnósticos y tratamientos, con el fin de mejorar la productividad de los cultivos.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Determinar si el análisis con microsecuencias de genes ortólogos son útiles para resolver problemas de clasificación en el género *Fusarium*.

2.2.2 Objetivos específicos

- Analizar matemáticamente las proporciones de las variaciones génicas presentes en las microsecuencias de cada gen ortólogo utilizado en este estudio.
- Determinar la existencia de patrones de similitud en las variaciones génicas de cada gen para las 13 especies analizadas.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS GÉNICAS

Se recopilaron secuencias de genes ortólogos para diferentes especies del género *Fusarium*. Estas fueron recopiladas de los trabajos de Rincón en 2014 y del trabajo de Cadena en 2015. Estas secuencias fueron obtenidas en la base de datos del Genbank NCBI (National Center for Biotechnology Information), dentro de esta base de datos para algunos genes solo se encontraron las secuencias completas para tres especies.

A continuación, en la tabla 1 se muestran las especies utilizadas en el presente trabajo.

Tabla 1. Especies usadas para el análisis.

Especies
<i>Fusarium anthophilum</i>
<i>Fusarium avenaceum</i>
<i>Fusarium culmorum</i>
<i>Fusarium equiseti</i>
<i>Fusarium foetens</i>
<i>Fusarium graminearum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Fusarium proliferatum</i>
<i>Fusarium solani</i>
<i>Fusarium sp.</i>
<i>Fusarium sporotrichioides</i>
<i>Fusarium subglutinans</i>
<i>Fusarium verticillioides</i>

En la siguiente tabla (tabla 2) se muestran los genes ortólogos utilizados para el análisis del presente trabajo. Para los genes subrayados el análisis se realizó con tres especies (*F. oxysporum*, *F. verticillioides* y *F. graminearum*) con el fin de comparar los resultados de los análisis realizados con diferente cantidad de especies.

Tabla 2. 27 genes ortólogos usados para el análisis.

Genes ortólogos
Proteasa aspártica (ARP)
Histidina quinasa (HOG)
β -Tubulina 2 (BT-2)
β -Tubulina (BT-1)
Histona 3 (H3)
Histona 4 (H4)
Citocromo oxidasa (COX)
Factor de elongación 1- α (EF)
Secuencias espaciadoras internas transcritas 1-2 (ITS 1-2)
Secuencias espaciadoras internas transcritas 1-4 (ITS 1-4)
Secuencias espaciadoras internas transcritas 2-4 (ITS 2-4)
Secuencias espaciadoras internas transcritas 4-5 (ITS 4-5)
Calmodulina (CMD)
Subunidad pequeña ribosomal (mtSSU)
Adenilil-sulfato quinasa

ADN-ribosa pirofosfato
Alcohol oxidasa
Proteína ribosomal 40s S0 (RPS0)
Subunidad reguladora del proteosoma 26s 6B (PSMC6)
3-metil-2-oxobutano hidroximetiltransferasa (KPHMT)
Proteína ribosómica 30s S12 (RPSL)
Proteína ribosómica 40s S11 (RPS11)
Proteína ribosómica 40s S16.1 (RPS16)
Proteína ribosómica 40s S7 (RPS7)
Proteína ribosomal 50s L11 (RPL11)
Proteína ribosomal 50s L14 (RPL14)
Proteína ribosomal 60s L12 (RPL12)

3.2 Alineamiento de secuencias

Las secuencias fueron alineadas en el programa bioinformático CLC Genomic Workbench 24 con el fin de observar y comparar las secuencias nucleotídicas entre especies para un mismo gen o secuencia.

3.3 Agrupaciones filogenéticas

Posteriormente se realizó un árbol filogenético con el mismo programa CLC Genomic Workbench 24. para cada secuencia completa disponible para cada gen ortólogo con el fin de observar las diferentes distribuciones y con referencia a este se ordenaron las secuencias ubicando en primer lugar la especie más primitiva hasta llegar a la especie más derivada. Esto se realizó para cada gen ortólogo. Estos árboles se construyeron siguiendo el método de distancia Neighbor-Joining, y para la medida de distancia de nucleótidos se usó el modelo de Jukes-Cantor (Keith, 2010).

3.4 OBTENCION DE LAS MICROSECUENCIAS

Para obtener y seleccionar las microsecuencias de cada gen se utilizó el programa “MicSeq” diseñado por Filgueira (2014), este programa utiliza un algoritmo el cual identifica el número de transiciones (Ti), transversiones (Tv) e indels o gaps con respecto al número de nucleótidos totales (Nt) y el número de especies analizadas (OTUs), dando como resultado el índice de cambio (Mi); mejor representado en la siguiente ecuación:

$$Mi = \frac{((Ti * 0,125) + (Tv * 0,375)(Indels * 0,5))}{(Nt * OTUS)}$$

Por último, se escogieron las regiones génicas que presentaron los valores de índice de cambio (Mi) más alto ya que representan las zonas altamente variables dentro del gen. Dado que el programa presentaba inconsistencias con los resultados obtenidos, se realizó manualmente el

cálculo para obtener el índice de cambio de las regiones seleccionadas por el programa. Para ello se realizaron los siguientes cálculos:

- a. Cálculo de transiciones

$$Ti = \sum_{i=1}^N (A \rightarrow G)i + \sum_{i=1}^N (G \rightarrow A)i + \sum_{i=1}^N (C \rightarrow T)i + \sum_{i=1}^N (T \rightarrow C)i$$

$$ITi = Ti * 0.165$$

i = numero de transiciones segun cada nucleotido

- b. Cálculo de transversiones

$$Tv = \sum C \rightarrow A + \sum A \rightarrow C + \sum G \rightarrow T + \sum T \rightarrow G + \sum A \rightarrow T + \sum T \rightarrow A + \sum G \rightarrow C + \sum C \rightarrow G$$

$$ITv = Tv * 0.33$$

- c. Cálculo de Gaps o indels debido a inserciones o deleciones en las secuencias

$$G = \sum_{i=1}^N Gaps$$

$$Ig = G * 0.5$$

- d. Índice de cambio en relación con el número total (Nt) de nucleótidos de las microsecuencias

$$Ic = \frac{ITi + ITv + Ig}{Nt}$$

Al obtener el índice de cambio (Ic) de cada microsecuencia, se selecciona la microsecuencia con mayor valor para cada gen Finalmente, las microsecuencias se volvieron a alinear y se guardaron en formato FASTA para su posterior análisis matemático.

Cabe aclarar que las microsecuencias se escogieron con un rango de 50 pb a 200 pb.

3.5 ANALISIS MATEMATICO

Este análisis fue necesario para determinar si los cambios génicos generados dentro del género *Fusarium* se dan de manera aleatoria o siguen un patrón en común para cada gen. Inicialmente estos análisis se realizaron usando el programa “SustRate” diseñado por Filgueira y Henao (2015).

3.5.1 Frecuencias de cambio en las microsecuencias

Para calcular las frecuencias de cambio se realizaron los siguientes cinco pasos:

- a. Frecuencias de cada uno de los nucleótidos y gaps en las microsecuencias siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned}gA &= \frac{\sum(A/N)}{0t} \\gT &= \frac{\sum(T/N)}{0t} \\gG &= \frac{\sum(G/N)}{0t} \\gC &= \frac{\sum(C/N)}{0t} \\gGaps &= \frac{\sum(Gaps/N)}{0t}\end{aligned}$$

Siendo A: adenina, T: timina, G: guanina, C: citosina, N: longitud de las microsecuencias,

0t: número de especies analizadas.

- b. A partir de las frecuencias calculadas en el numeral anterior, se calculó la frecuencia de las purinas, pirimidinas y gaps:

$$\begin{aligned}gR &= gA + gG \\gY &= gT + gC \\gZ &= gGaps\end{aligned}$$

$$gR + gY + gZ = 1$$

Siendo gR: frecuencia de purinas, gY: frecuencia de pirimidinas y gZ: frecuencia de gaps.

- c. Luego se calculó las frecuencias de los cambios con las siguientes ecuaciones:

- I. Frecuencia de transiciones purina-purina.

$$P1ij = \frac{\sum A - G + \sum G - A}{N}$$

- II. Frecuencias de transiciones pirimidina-pirimidina.

$$P2ij = \frac{\sum C - T + \sum T - C}{N}$$

III. Frecuencia de transversiones purina- pirimidina y pirimidina- purina.

$$Q_{ij} = \frac{\sum A - T + \sum T - A + \sum G - C + \sum C - G + \sum A - C + \sum C - A + \sum G - T + \sum T - G}{N}$$

IV. Frecuencia de gaps gap-nucleótido y nucleótido-gap.

$$Gap, ij = \frac{\sum Gap - Ni + \sum Ni - Gap}{N}$$

Siendo Ni: nucleótido eliminado o adicionado.

N: número total de nucleótidos contenidos en la microsecuencia.

d. El último paso de esta parte fue el cálculo de las tasas de transiciones, transversiones vs gaps siguiendo las siguientes ecuaciones.

I. Tasa de purina vs transversiones.

$$K1 = \frac{P1_{ij}/gA * gG}{Q_{ij}/(gR * gY * gZ)}$$

II. Tasa de pirimidina vs transversiones.

$$K2 = \frac{P2_{ij}/gT * gC}{Q_{ij}/(gR * gY * gZ)}$$

III. Tasa de transversiones.

$$B_{ij} = \frac{Q_{ij}}{4(gR * gY * gZ)}$$

IV. Tasa de gaps.

$$K3 = \frac{Gap_{ij}}{4(gR * gY * gZ)}$$

3.5.2 Proporciones de cambio para todos los genes

Con las frecuencias de cambio calculadas en el numeral anterior se procedió a obtener las proporciones de cambio (transiciones, transversiones y gaps) para los diferentes genes ortólogos; esto se realizó en los siguientes tres pasos:

a. Se calculó las frecuencias de todos los genes usados en las microsecuencias de los diferentes genes ortólogos analizados.

I. Frecuencias de transiciones purina-purina para todas las microsecuencias utilizadas en este estudio.

$$RP1 = \frac{\sum_{n=0}^n P1ij}{nt}$$

II. Frecuencias de transiciones pirimidina-pirimidina para todas las microsecuencias.

$$RP2 = \frac{\sum_{n=0}^n P2ij}{nt}$$

III. Frecuencia de transversiones purina- pirimidina y pirimidina- purina para todas las microsecuencias.

$$RQ = \frac{\sum_{n=0}^n Qij}{nt}$$

IV. Frecuencia de gap gaps-nucleótido y nucleótido-gap para todos las microsecuencias.

$$RGap = \frac{\sum_{n=0}^n Gap, ij}{nt}$$

Siendo nt: número de genes totales usados para el análisis.

b. Luego se sumó las frecuencias anteriormente calculadas (Rt).

$$Rt = RP1 + RP2 + RQ + RGap$$

c. Finalmente, se calcularon las proporciones de las sumas anteriormente calculadas.

$$Rt1 = \frac{RP1}{Rt} * 0.082$$

$$Rt2 = \frac{RP2}{Rt} * 0.082$$

$$Rt3 = \frac{RQ}{Rt} * 0.33$$

$$Rt4 = \frac{RGap}{Rt} 0.5$$

Por último, se realizaron las gráficas obtenidas en cada paso para así realizar los respectivos análisis tanto unigen como poligen. A cada una de estas graficas se les realizó regresión lineal.

3.6 PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Para los análisis estadísticos se realizaron pruebas de correlación de Pearson, con el fin de poder determinar si hay o no relación entre las diferentes variables.

3.7 SECUENCIAS DE COMPARACIÓN

En esta sección se tomaron como referencia los datos obtenidos para el trabajo final de la materia de Genética Molecular a cargo del profesor Juan José Filgueira, durante los periodos académicos entre 2018-2 y 2020-1; con estos datos se realizó el mismo proceso de los cálculos de análisis matemático, desde la selección de las secuencias hasta el cálculo de proporciones finales. Y finalmente se realizaron las respectivas graficas de acuerdo con los numerales anteriores con la regresión lineal de cada una de estas, con el fin de realizar una comparación de cómo se comportan los genes en diferentes organismos con respecto al género *Fusarium*.

4 RESULTADOS

4.1 Obtención de los árboles filogenéticos y ordenamiento de las secuencias

A partir de las secuencias alineadas, se realizaron los árboles filogenéticos en el programa CLC Genomic Workbench 24 y a partir de estos se ordenaron las secuencias para cada gen, donde la primer secuencias es la especie ancestral.

A continuación, se muestran las distribuciones filogenéticas para cada gen.

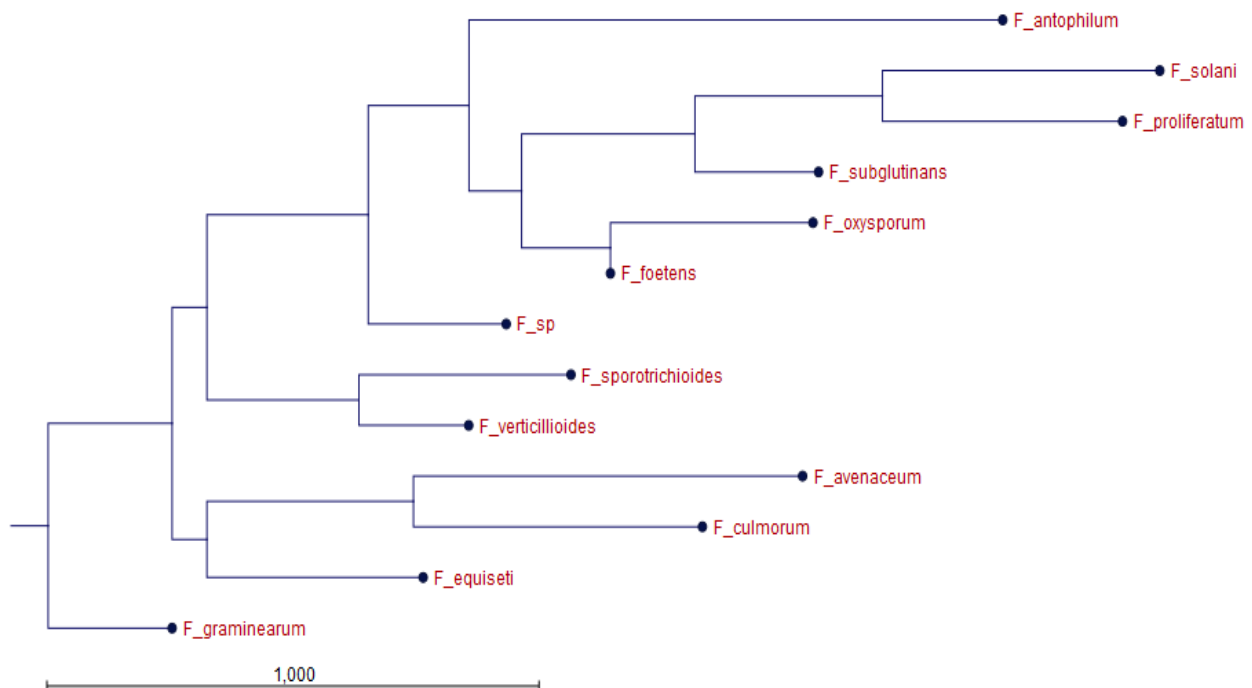


Figura 2. Distribución filogenética para el gen Proteasa aspártica (ARP).

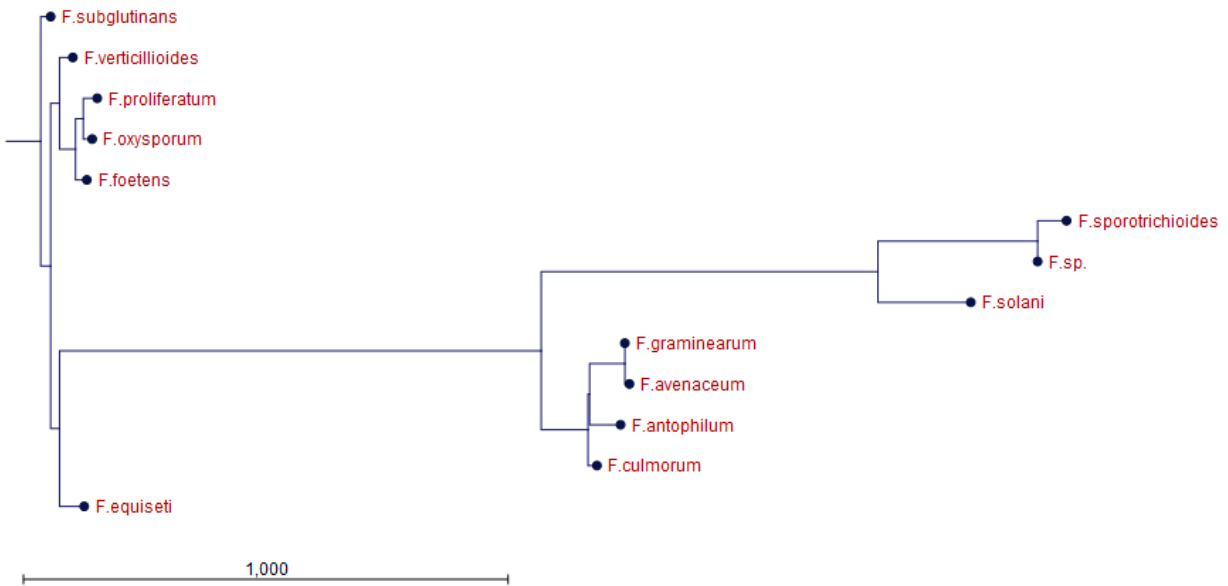


Figura 3. Distribución filogenética para el gen Histidina quinasa (HOG).

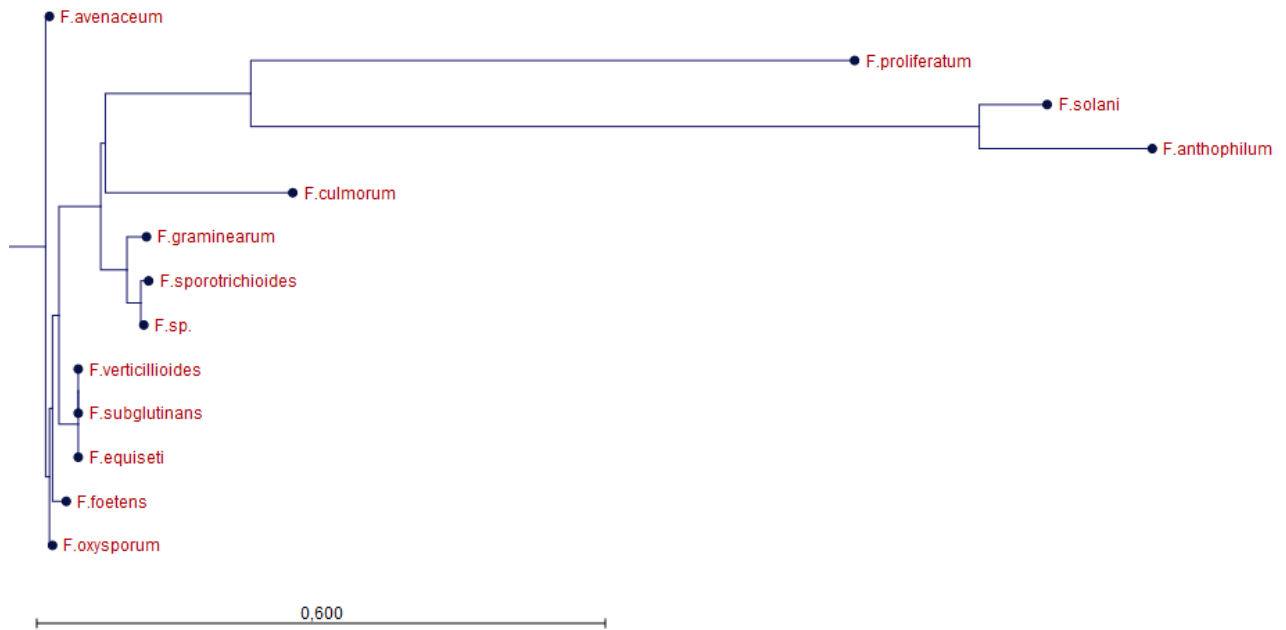


Figura 4. Distribución filogenética para el gen Beta Tubulina 1 (BT-1).

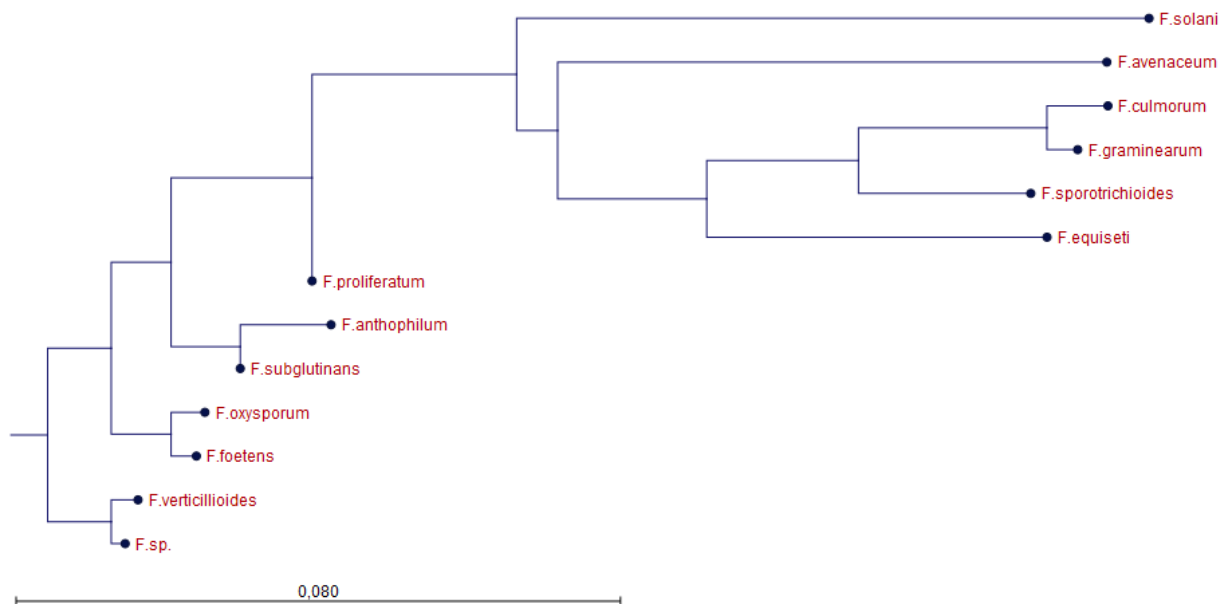


Figura 5. Distribución filogenética para el gen Beta Tubulina 2 (BT-2).

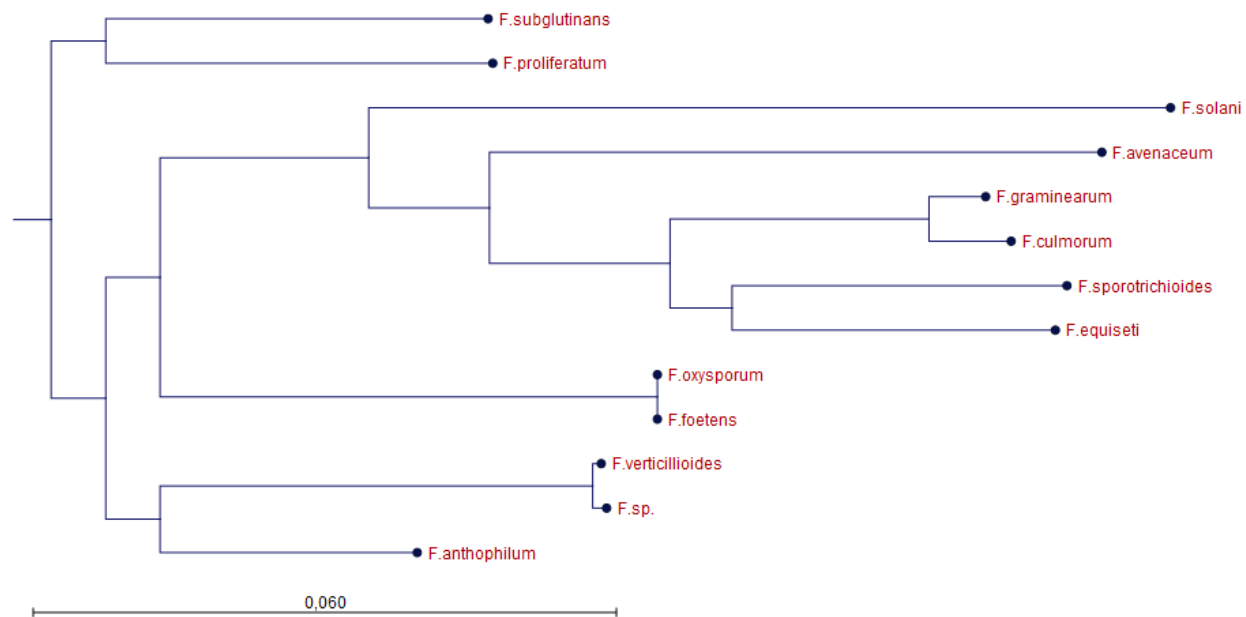


Figura 6. Distribución filogenética para el gen Histona 3 (H3).

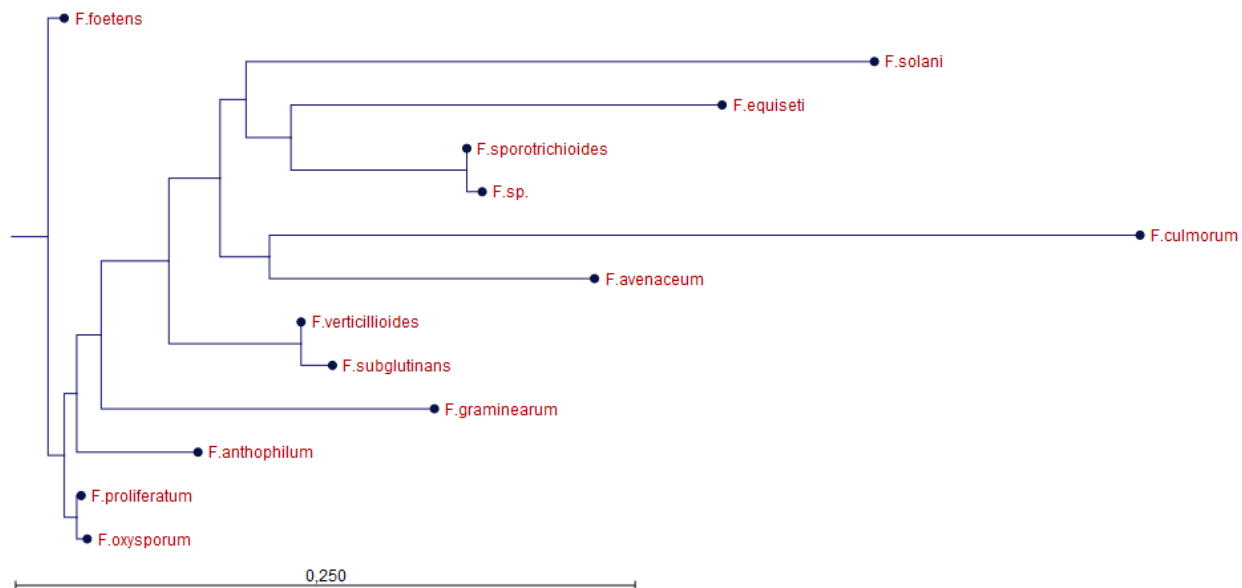


Figura 7. Distribución filogenética para el gen Histona 4 (H4).

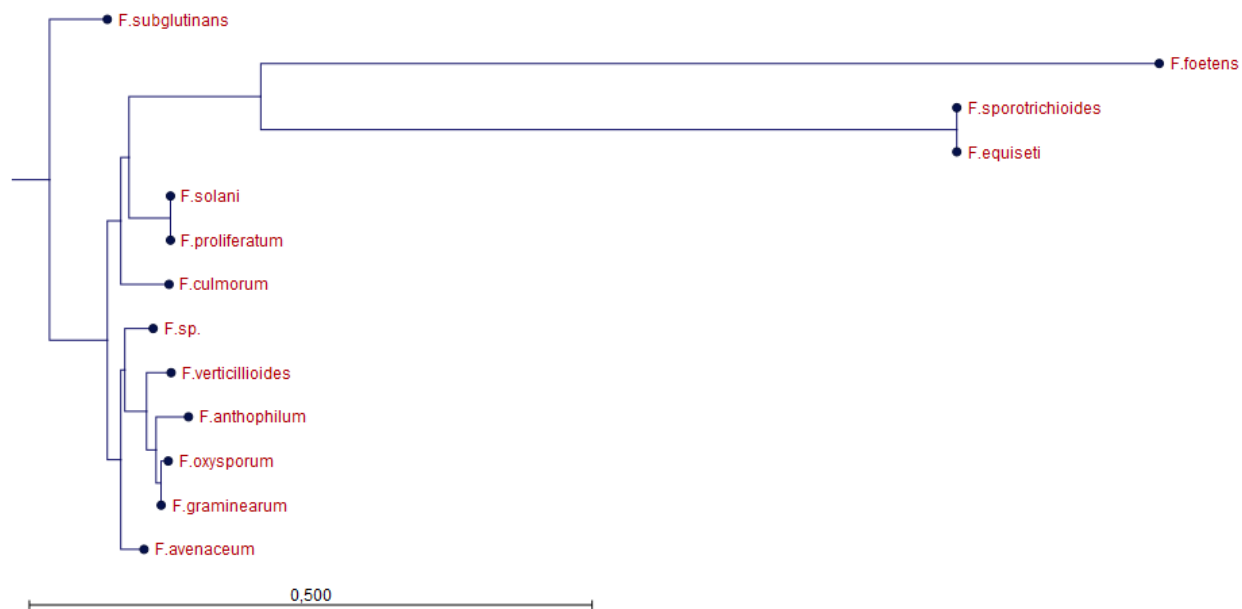


Figura 8. Distribución filogenética para el gen Citocromo Oxidasa (COX).

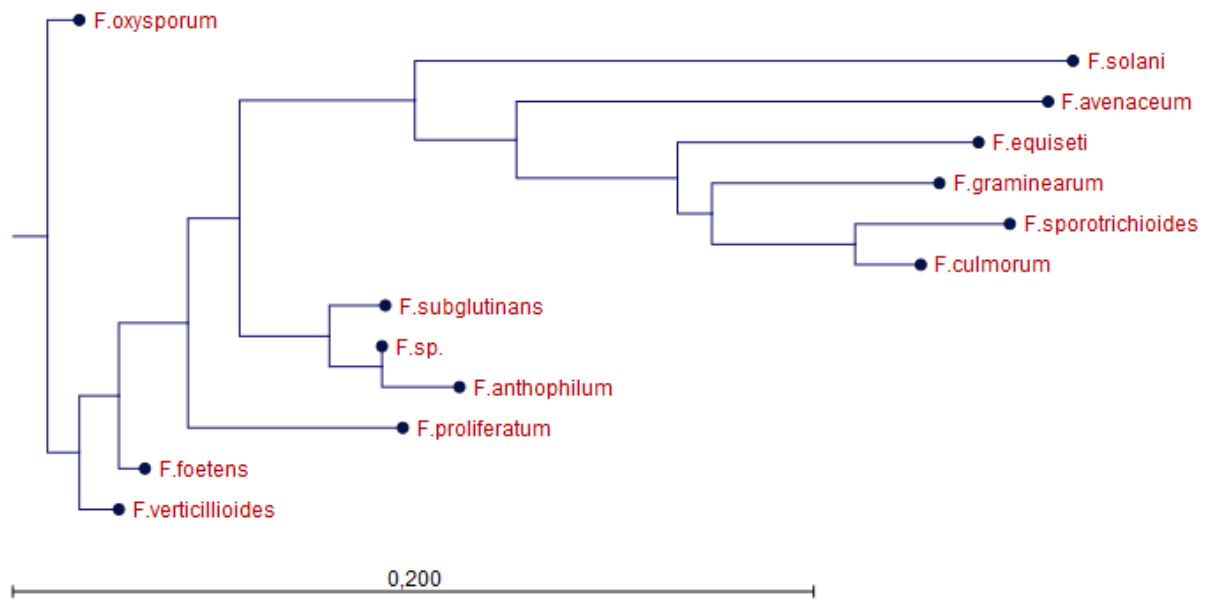


Figura 9. Distribución filogenética para el gen Factor de elongación 1- α (EF).

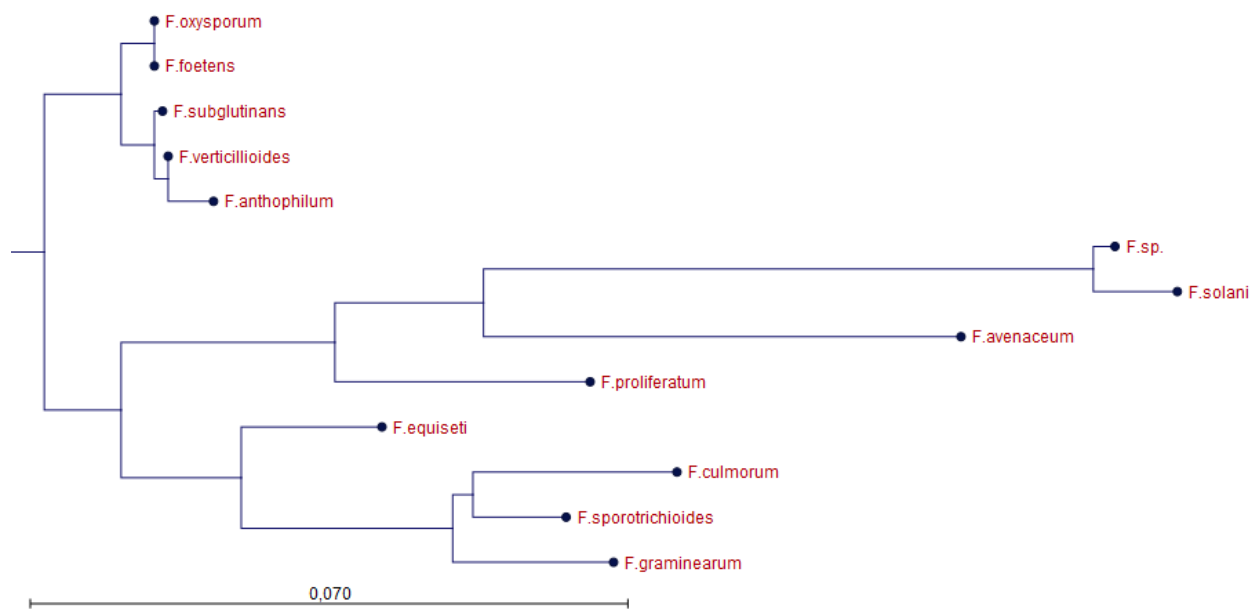


Figura 10. Distribución filogenética para el gen Secuencias espaciadoras internas transcritas 1-2 (ITS 1-2).

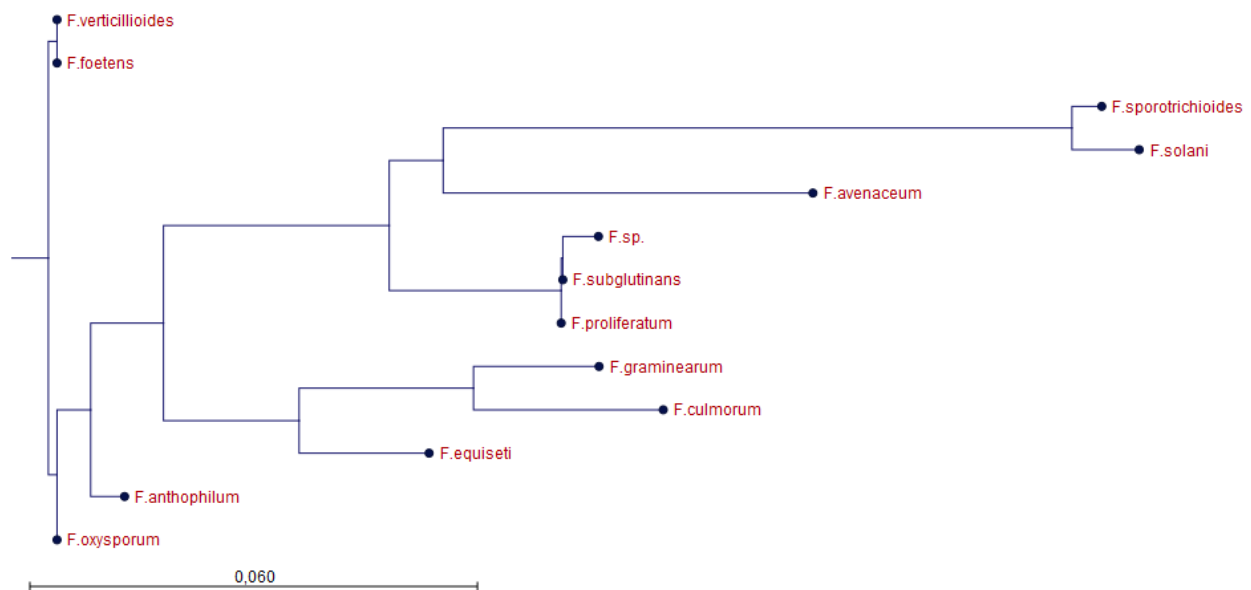


Figura 11. Distribución filogenética para el gen Secuencias espaciadoras internas transcritas 1-4 (ITS 1-4).



Figura 12. Distribución filogenética para el gen Secuencias espaciadoras internas transcritas 2-4 (ITS 2-4).

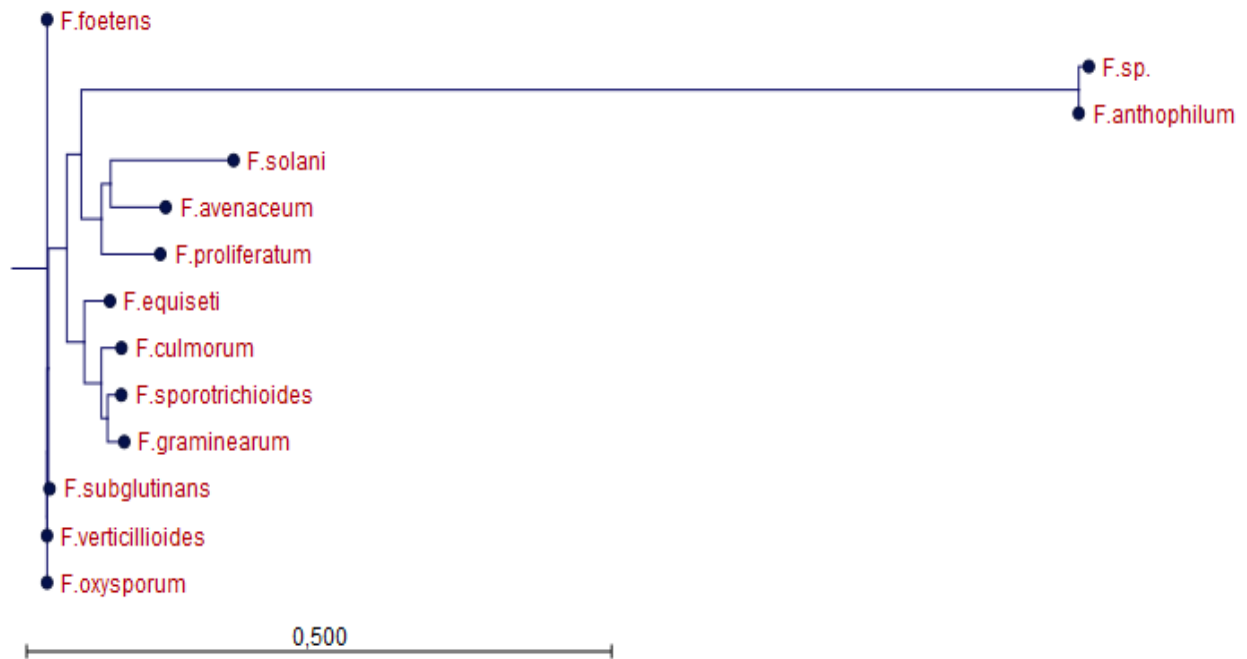


Figura 13. Distribución filogenética para el gen Secuencias espaciadoras internas transcritas 4-5 (ITS 4-5).

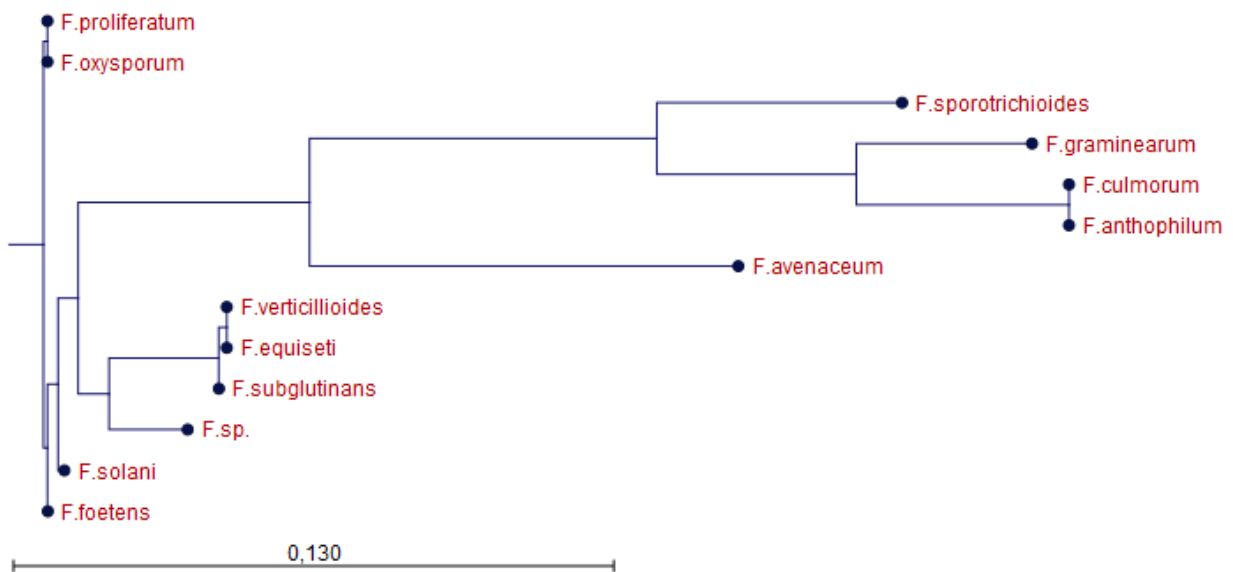


Figura 14. Distribución filogenética para el gen Calmodulina (CMD).

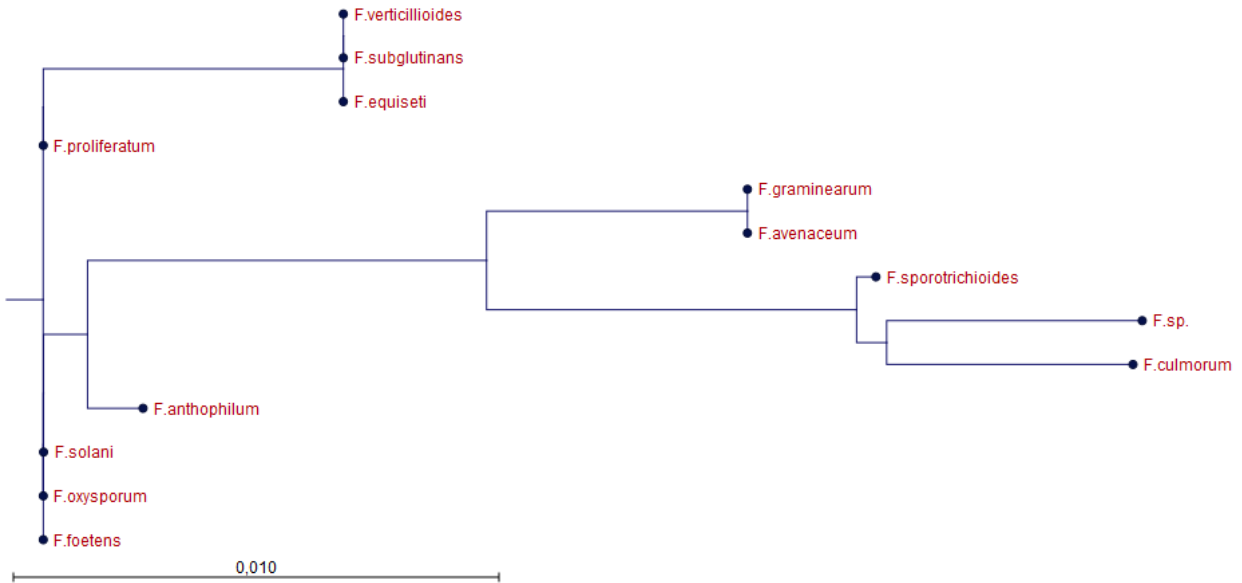


Figura 15. Distribución filogenética para el gen Subunidad pequeña ribosomal (mtSSU).

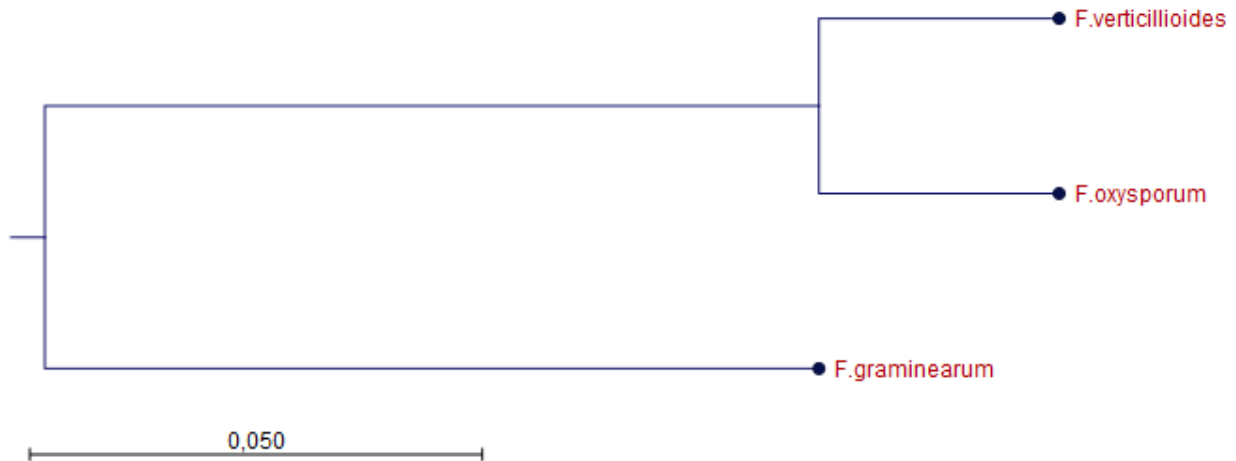


Figura 16. Distribución filogenética para el gen Adenylyl-sulfate kinase.

Para las demás secuencias génicas las agrupaciones filogenéticas fueron las mismas que la figura 16, su diferencia radicaba en la longitud de sus ramas.

4.2 Microsecuencias obtenidas

A continuación, se muestran las microsecuencias obtenidas para todos los genes, cada una con el índice de cambio (Ic) calculado.

Tabla 3. Microsecuencias obtenidas para cada uno de los genes. Donde los valores resaltados son las microsecuencias con el mayor valor índice de cambio, escogidas para el análisis matemático.

Genes	Microsecuencias		
	Posición inicial	Posición final	Índice de cambio
Factor de elongación 1- α (EF)	1	123	0,091
	602	665	0,051
Secuencias espaciadoras internas transcritas 1-4 (ITS 1-4)	25	96	0,033
Alcohol oxidase	775	850	0,021
	1898	2034	0,119
proteína ribosómica 40S S16.1	180	249	0,148
β -Tubulina (BT-1)	1	60	0,057
	181	234	0,054
β -Tubulina 2 (BT-2)	422	499	0,082
	808	887	0,012
	901	970	0,011
	982	1032	0,011
Proteína ribosómica 40s S0 (RPS0)	1074	1161	0,069
	1191	1305	0,061
3-metil-2-oxobutano hidroximetiltransferasa (KPHMT)	141	196	0,070
	1140	1221	0,034
Proteína ribosomal 60S L12 (RPL12)	2	87	0,103
Proteasa aspártica (ARP)	80	140	0,172
Histidina quinasa (HOG)	68	120	0,067
Secuencias espaciadoras internas transcritas 4-5 (ITS 4-5)	87	147	0,042
	342	402	0,058
Proteína ribosomal 50S L11 (RPL11)	1	79	0,047
	171	228	0,025
	338	399	0,029
	426	523	0,031
	540	629	0,036
Subunidad reguladora del proteosoma 26S 6B (PSMC6)	1277	1352	0,032
Secuencias espaciadoras internas transcritas 2-4 (ITS 2-4)	1	78	0,040
Secuencias espaciadoras internas transcritas 1-2 (ITS 1-2)	276	329	0,063
Calmodulina (CMD)	283	340	0,024
Citocromo oxidasa (COX)	66	124	0,037

	320	376	0,040
Histona 4 (H4)	17	79	0,092
Histona 3 (H3)	3	111	0,045
	243	327	0,049
ADP-ribosa pirofosfato	1	75	0,039
	234	294	0,031
	417	474	0,035
	487	552	0,033
	588	689	0,077
Proteína ribosomal 40S S11 (RPS11)	847	972	0,044
Proteína ribosómica 40S S7 (RPS7)	690	758	0,075
Proteína ribosomal 50S L14 (RPL14)	392	533	0,083
Adenilil-sulfato quinasa	1	87	0,062
	715	770	0,069
	784	857	0,032
Subunidad pequeña ribosomal (mtSSU)	30	76	0,019
Proteína ribosómica 30S S12 (RPSL)	175	262	0,028
	580	694	0,038

4.3 Microsecuencias de cada uno de los genes

Como se mencionó anteriormente, se escogió la microsecuencia con el valor más alto de índice de cambio (Ic) para cada gen.

A continuación, se muestran las microsecuencias escogidas para cada uno de los genes.

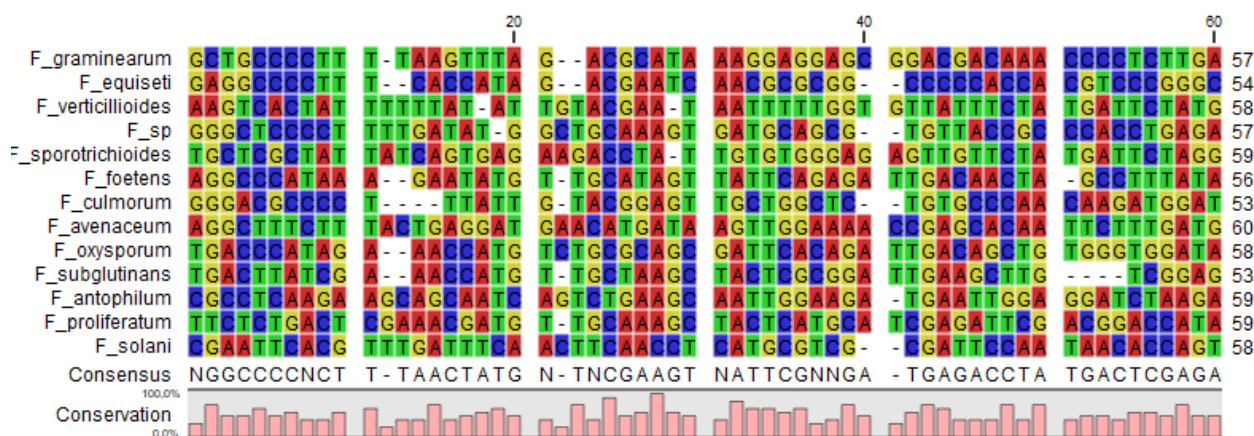


Imagen 1. Microsecuencia alineada del gen Proteasa aspártica (ARP).



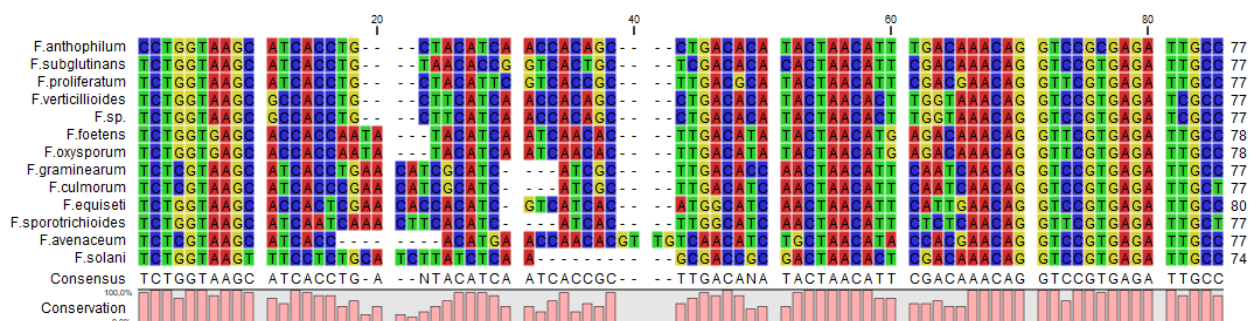


Imagen 5. Microsecuencia alineada del gen Histona 3 (H3).

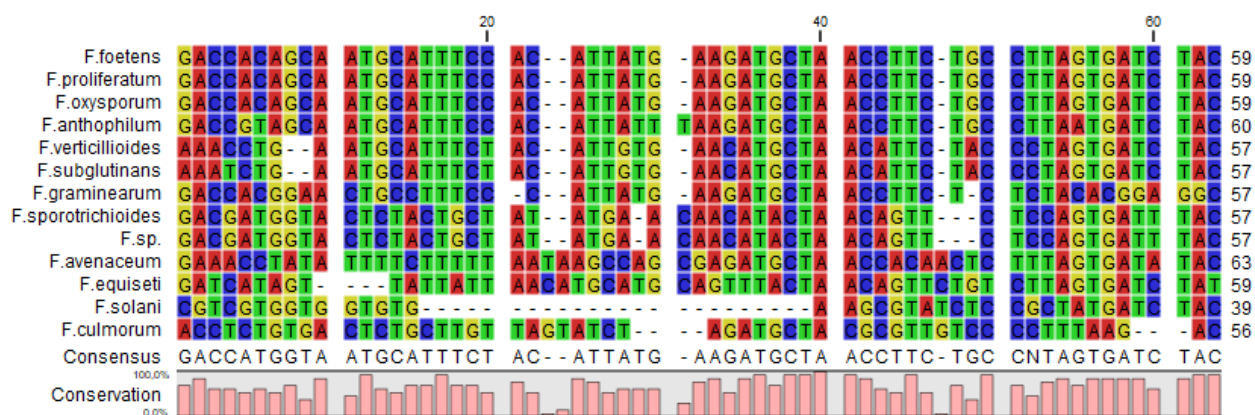


Imagen 6. Microsecuencia alineada del gen Histona 4 (H4).

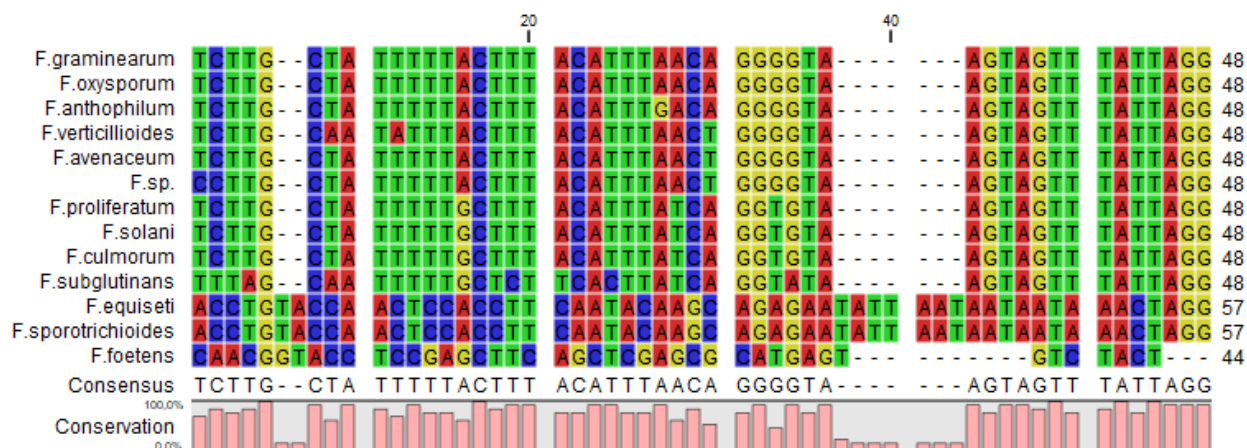


Imagen 7. Microsecuencia alineada del gen Citocromo oxidasa (COX).

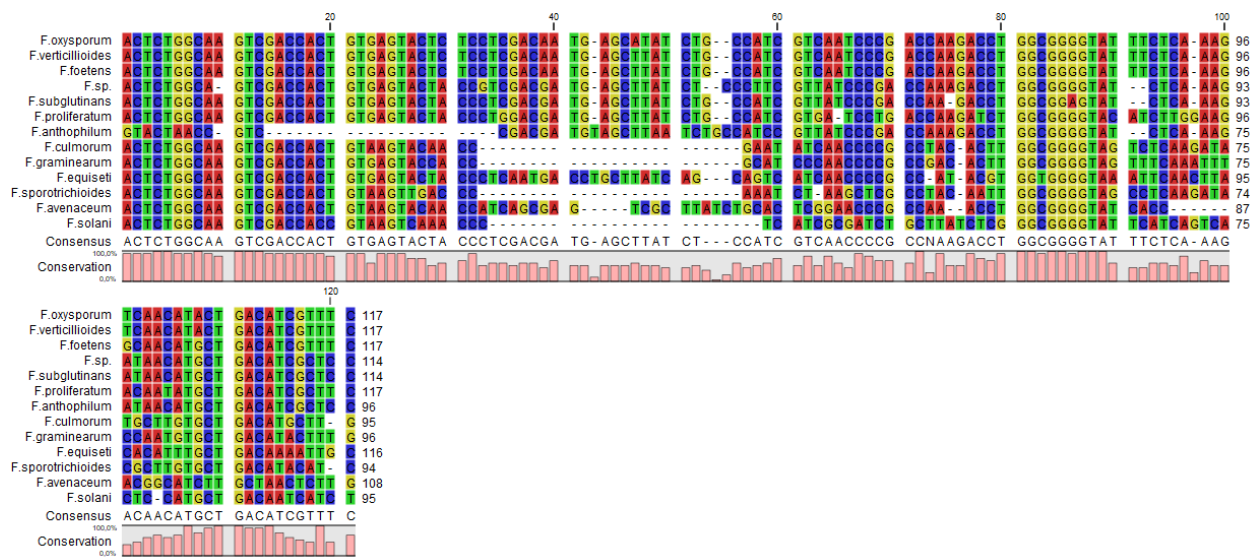


Imagen 8. Microsecuencia alineada del gen Factor de elongación 1-α (EF).

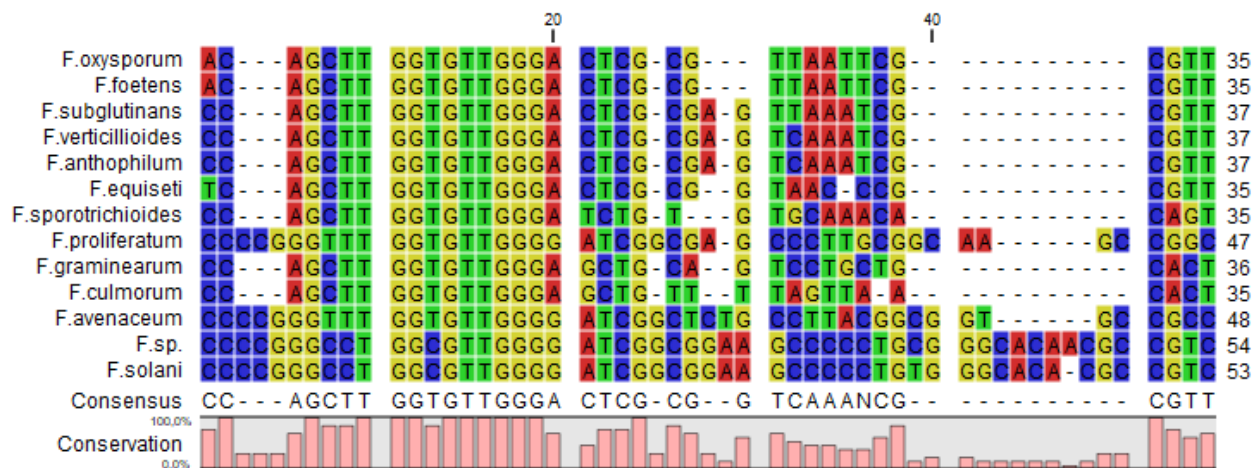


Imagen 9. Microsecuencia alineada del gen Secuencias espaciadoras internas transcritas 1-2 (ITS 1-2).

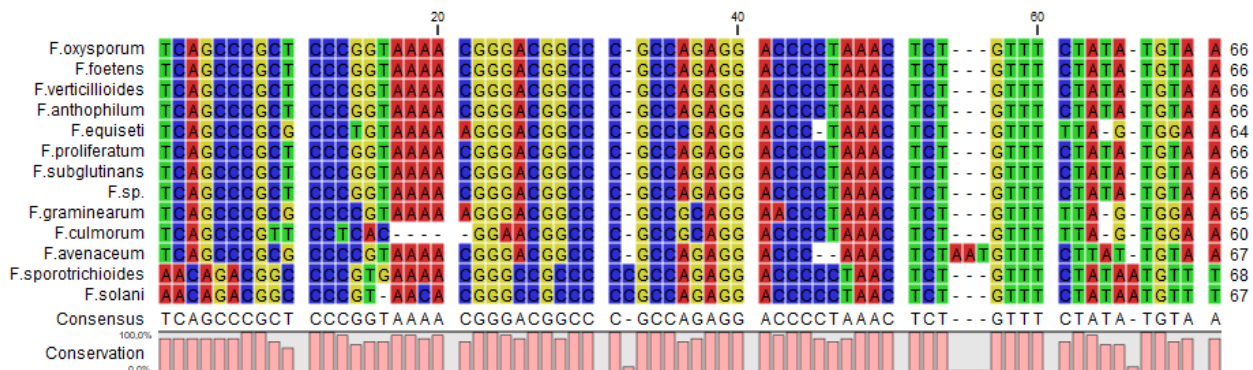


Imagen 10. Microsecuencia alineada del gen Secuencias espaciadoras internas transcritas 1-4 (ITS 1-4).

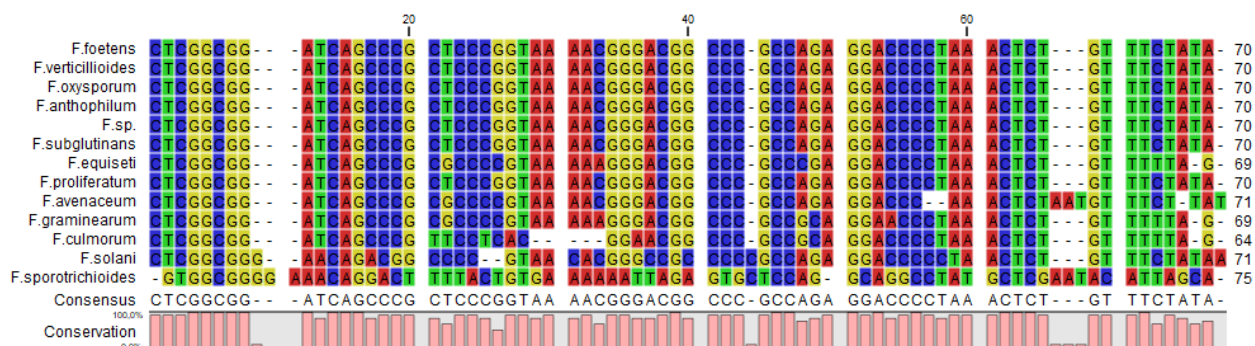


Imagen 11. Microsecuencia alineada del gen Secuencias espaciadoras internas transcritas 2-4 (ITS 2-4).

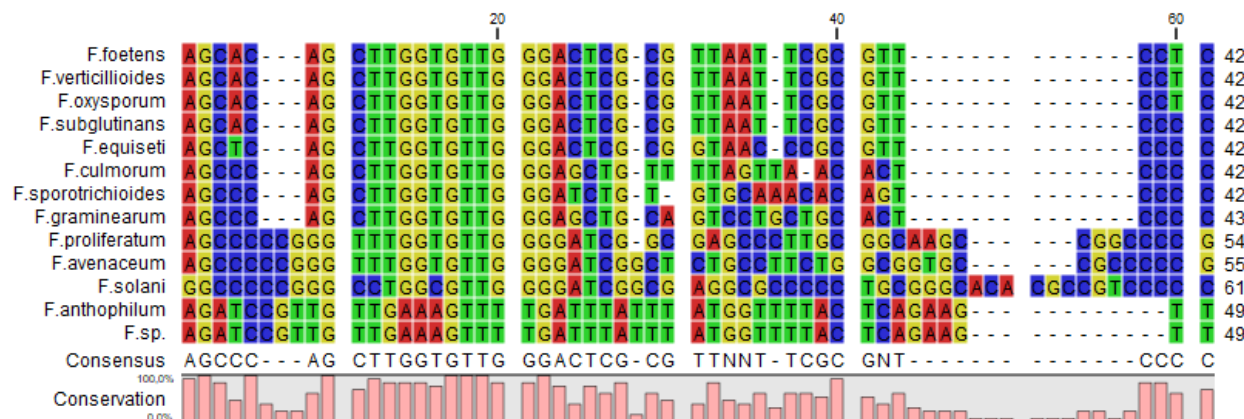


Imagen 12. Microsecuencia alineada del gen Secuencias espaciadoras internas transcritas 4-5 (ITS 4-5).

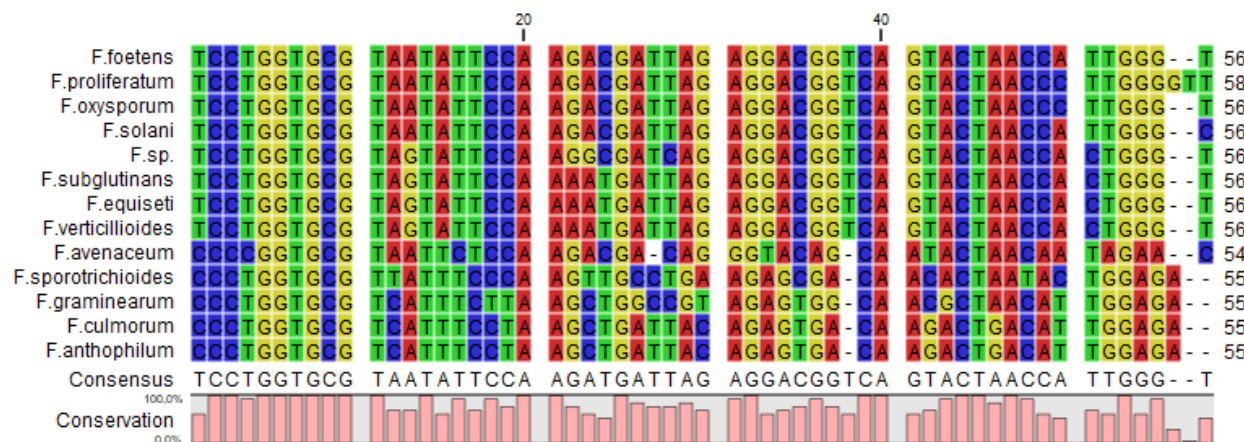


Imagen 13. Microsecuencia alineada del gen Calmodulina (CMD).

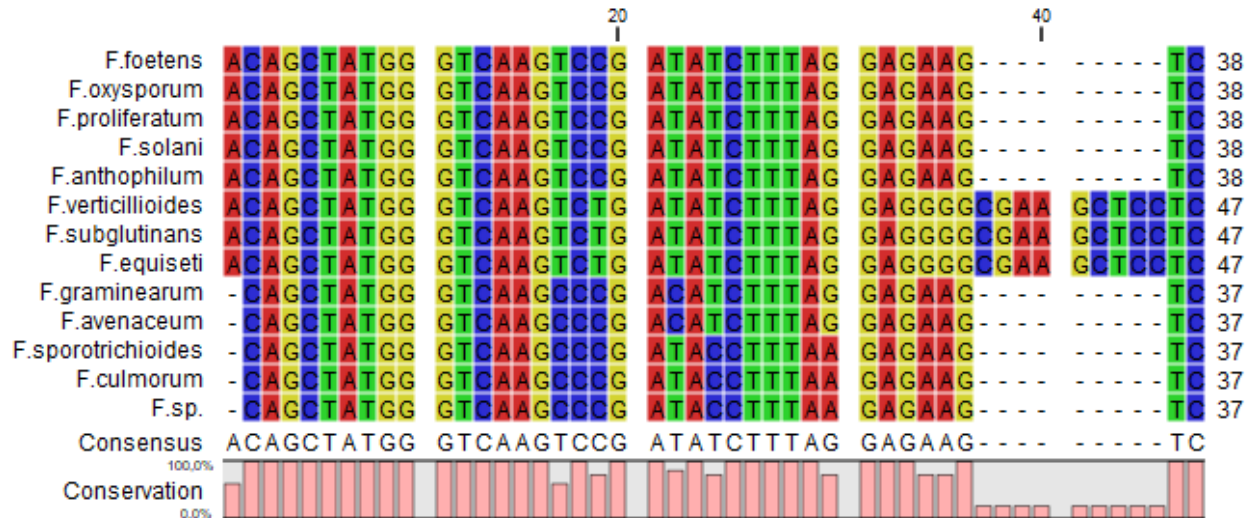


Imagen 14. Microsecuencia alineada del gen Subunidad pequeña ribosomal (mtSSU).

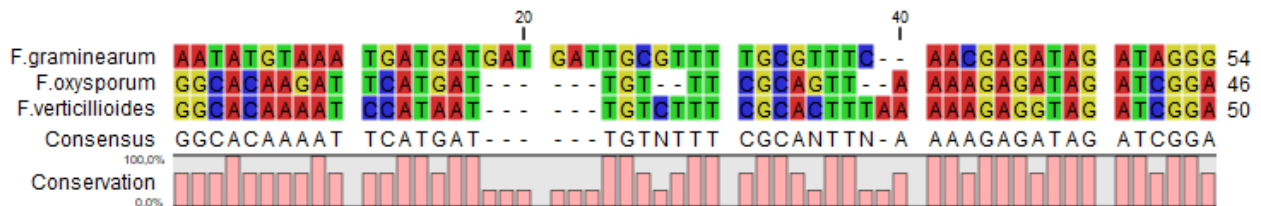


Imagen 15. Microsecuencia alineada del gen Adenylyl-sulfate kinase.

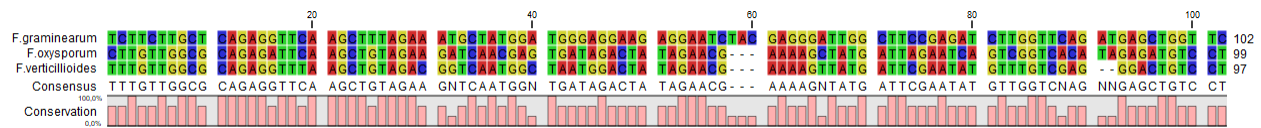


Imagen 16. Microsecuencia alineada del gen ADN-ribose pyrophosphate.

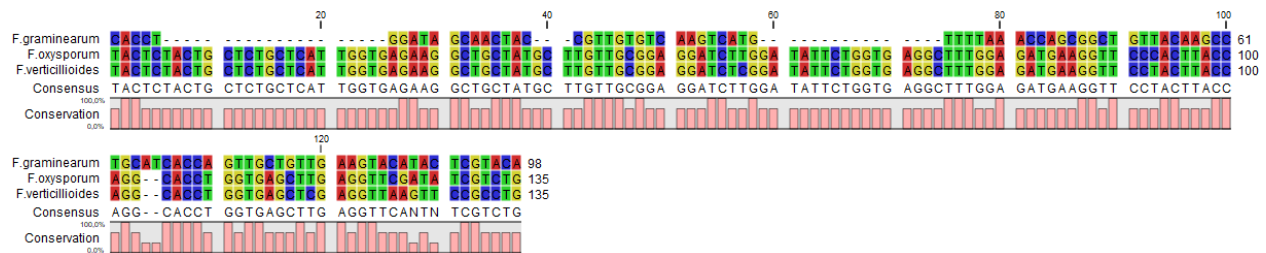


Imagen 17. Microsecuencia alineada del gen Alcohol oxidase.

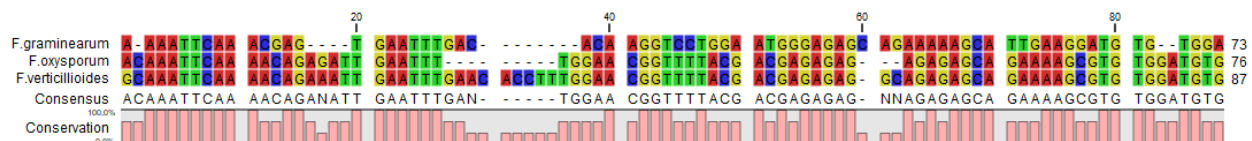


Imagen 18. Microsecuencia alineada del gen 40s ribosomal protein S0 (RPS0).

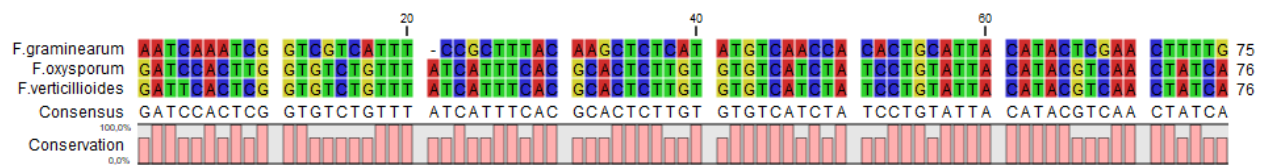


Imagen 19. Microsecuencia alineada del gen 26s protease regulatory subunit 6B (PSMC6).

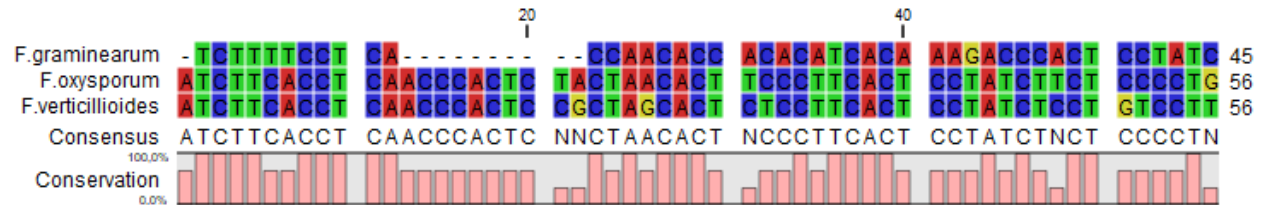


Imagen 20. Microsecuencia alineada del gen 3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase (KPHMT).

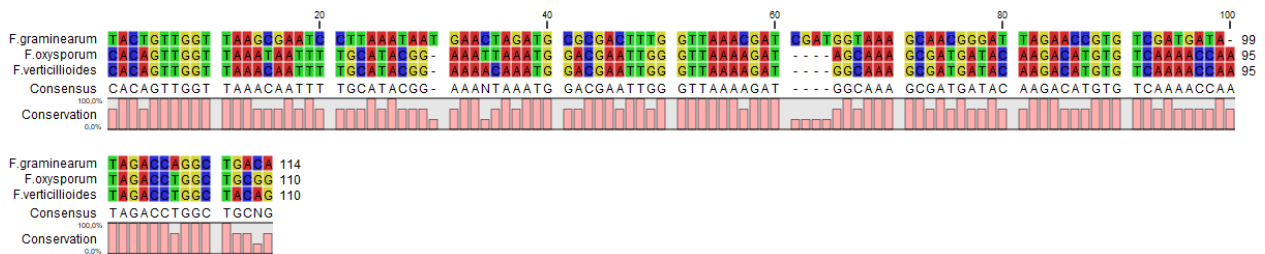


Imagen 21. Microsecuencia alineada del gen 30 ribosomal protein S12 (RPSL).

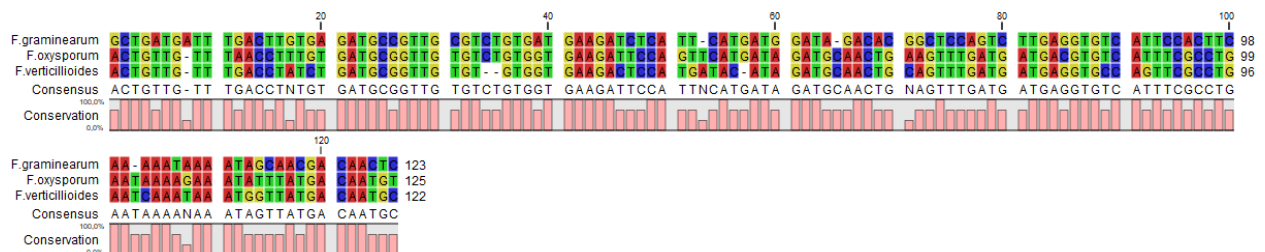


Imagen 22. Microsecuencia alineada del gen 40s ribosomal protein S11 (RPS11).

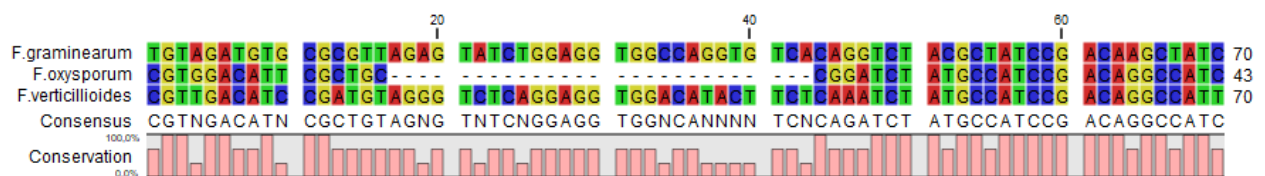


Imagen 23. Microsecuencia alineada del gen 40s ribosomal protein S16.1 (RPS16).

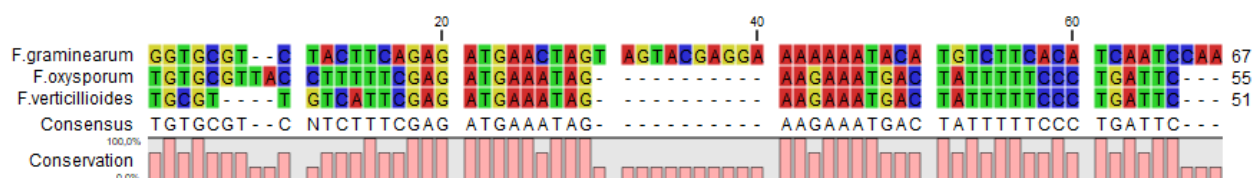


Imagen 24. Microsecuencia alineada del gen 40s ribosomal protein S7 (RPS7).

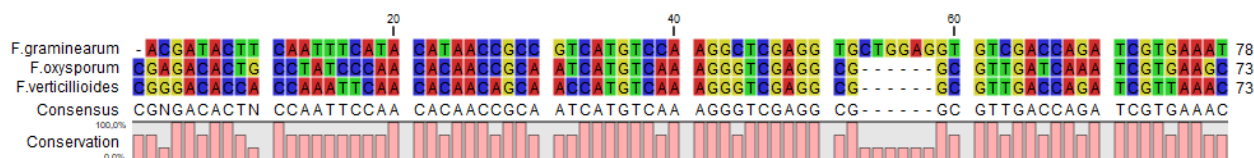


Imagen 25. Microsecuencia alineada del gen 50s ribosomal protein L11 (RPL11).

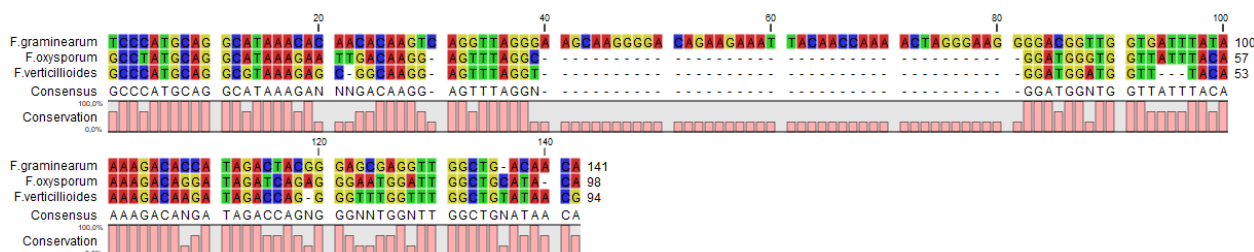


Imagen 26. Microsecuencia alineada del gen 50s ribosomal protein L14 (RPL14).

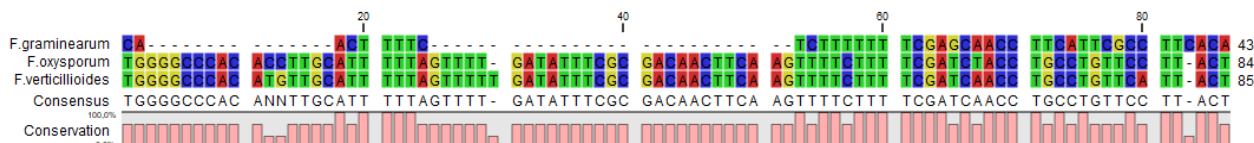


Imagen 27. Microsecuencia alineada del gen 60s ribosomal protein L12 (RPL12).

4.4 Microsecuencias analizadas

Al pasar las secuencias por el programa MicSeq se obtuvieron en algunos genes más de una microsecuencia, para estos casos se escogió la microsecuencia con el índice de cambio más alto, ya que este representa una variabilidad más alta. A continuación, se muestran los índices de cambio obtenidos para cada una de las microsecuencias elegidas para cada gen.

Tabla 4. Índices de cambio (Mi) calculados de las microsecuencias escogidas para cada uno de genes ortólogos analizados.

Genes	Índice de cambio (Mi)
Proteasa aspártica (ARP)	0,172
Histidina quinasa (HOG)	0,067
β-Tubulina 2 (BT-2)	0,082

β -Tubulina (BT-1)	0,057
Histona 3 (H3)	0,049
Histona 4 (H4)	0,092
Citocromo oxidasa (COX)	0,04
Factor de elongación 1- α (EF)	0,091
Secuencias espaciadoras internas transcritas 1-2 (ITS 1-2)	0,063
Secuencias espaciadoras internas transcritas 1-4 (ITS 1-4)	0,033
Secuencias espaciadoras internas transcritas 2-4 (ITS 2-4)	0,04
Secuencias espaciadoras internas transcritas 4-5 (ITS 4-5)	0,058
Calmodulina (CMD)	0,024
Subunidad pequeña ribosomal (mtSSU)	0,019
Adenilil-sulfato quinasa	0,069
ADP-ribosa pirofosfato	0,077
Alcohol oxidase	0,119
Proteína ribosómica 40s S0 (RPS0)	0,069
Subunidad reguladora del proteosoma 26S 6B (PSMC6)	0,032
3-metil-2-oxobutano hidroximetiltransferasa (KPHMT)	0,07
Proteína ribosómica 30S S12 (RPSL)	0,038
Proteína ribosomal 40S S11 (RPS11)	0,044
Proteína ribosómica 40S S16.1 (RPS16)	0,148
Proteína ribosómica 40S S7 (RPS7)	0,075
Proteína ribosomal 50S L11 (RPL11)	0,047
Proteína ribosomal 50S L14 (RPL14)	0,083
Proteína ribosomal 60S L12 (RPL12)	0,103

4.5 Análisis matemáticos para las microsecuencias obtenidas

Para los análisis matemáticos de las microsecuencias inicialmente se realizaron por medio del programa SustRate, sin embargo, el programa generaba una serie de inconsistencias en los resultados, por lo que se procedió a realizar los cálculos de manera manual tomando como referencia las ecuaciones iniciales con las que se realizó el programa SustRate.

Al revisar la guía en donde se encontraban los cálculos que realiza el programa, se detectaron algunos errores que fueron corregidos (mostrados en la metodología) para realizar los cálculos

manualmente. Además de esto, el programa no mostraba los datos de frecuencias de nucleótidos y gaps, frecuencias de purinas, pirimidinas y gaps de forma apropiada.

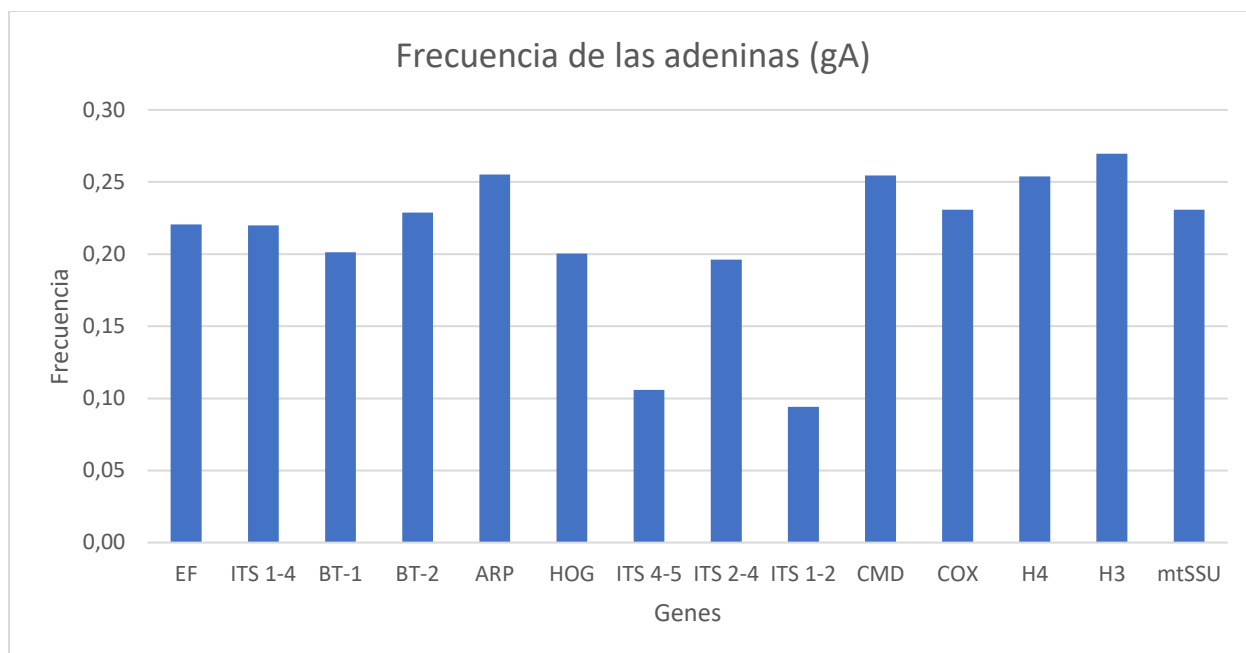
4.5.1 Frecuencias de los nucleótidos y gaps

A continuación, en la tabla 5 se muestran las frecuencias de cada nucleótido y gap calculadas para 13 especies del género *Fusarium* usando las microsecuencias de 14 genes ortólogos.

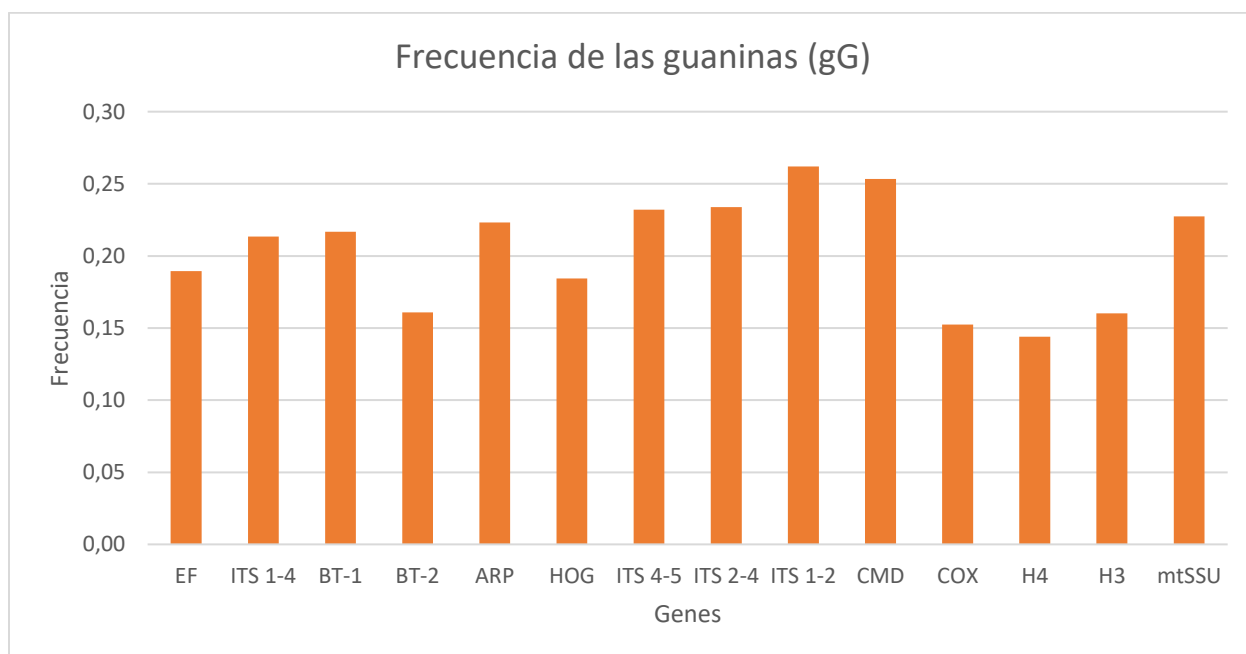
Tabla 5. Frecuencias de cada uno de los nucleótidos (gA=frecuencia de adeninas, gG=frecuencia de guaninas, gC=frecuencia de citocinas, gT=frecuencia de timinas y gGaps=frecuencia de gaps) para 14 microsecuencias analizado 13 especies de *Fusarium*.

Genes	gA	gG	gC	gT	gGaps
EF	0,22060	0,18945	0,26383	0,21360	0,11252
ITS 1-4	0,21993	0,21343	0,31094	0,17985	0,07584
BT-1	0,20128	0,21667	0,30513	0,20897	0,06667
BT-2	0,22880	0,16075	0,25740	0,20907	0,14398
ARP	0,25513	0,22308	0,21026	0,26026	0,05000
HOG	0,20029	0,18433	0,23803	0,30044	0,07840
ITS 4-5	0,10593	0,23203	0,21311	0,21185	0,23707
ITS 2-4	0,19625	0,23373	0,31065	0,15582	0,10355
ITS 1-2	0,09402	0,26211	0,20228	0,18803	0,25356
CMD	0,25464	0,25332	0,21088	0,24138	0,03979
COX	0,23077	0,15250	0,12416	0,35358	0,13900
H4	0,25397	0,14408	0,21978	0,28449	0,09768
H3	0,26968	0,16018	0,26787	0,20995	0,09231
mtSSU	0,23077	0,22750	0,18003	0,20622	0,15548

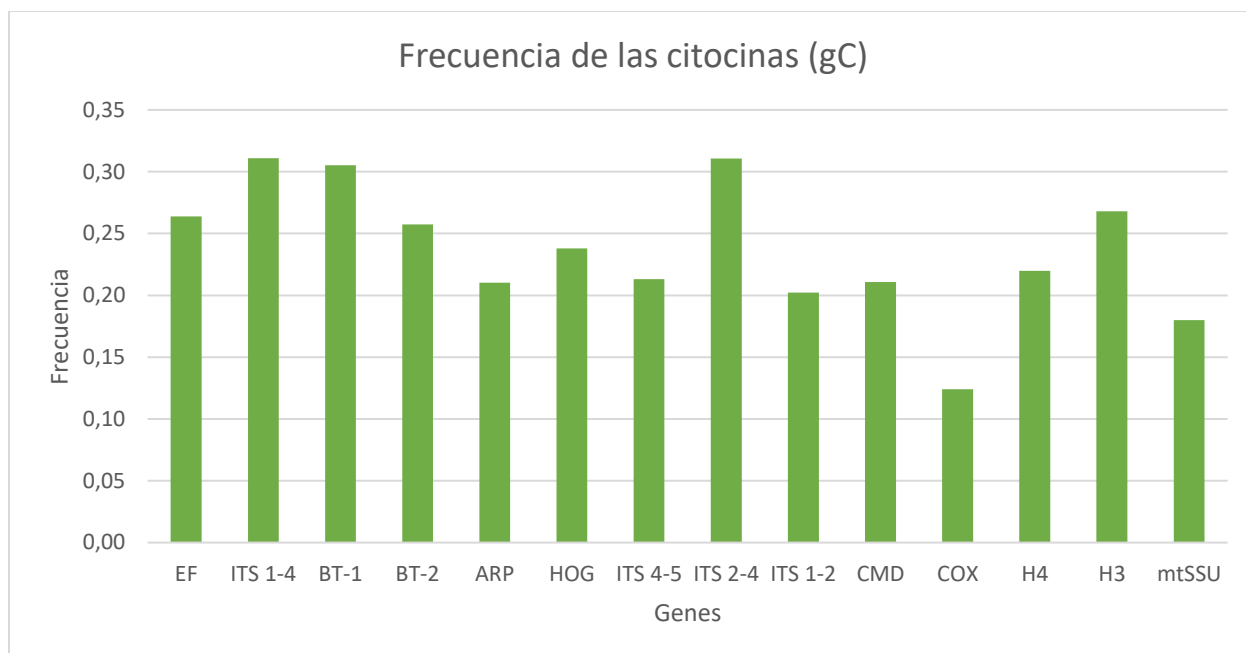
A partir de estos datos se realizaron las respectivas graficas por separado para cada nucleótido y gap. Estas graficas (grafica 1, grafica 2, grafica 3, grafica 4 y grafica 5) representan las relaciones entre los nucleótidos encontrados en las diferentes microsecuencias de cada secuencia génica. Cabe resaltar que las variaciones de cada nucleótido o gap es independiente entre los genes.



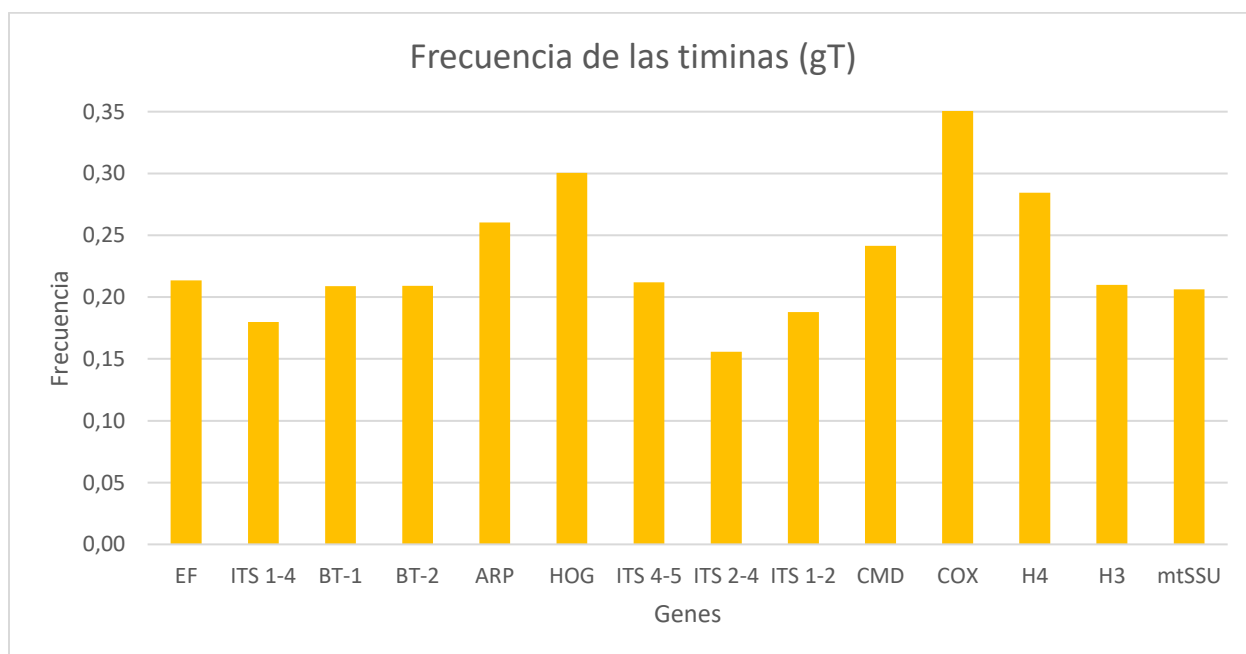
Grafica 1. Frecuencias de las adeninas contenidas en 14 microsecuencias para 13 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 5.



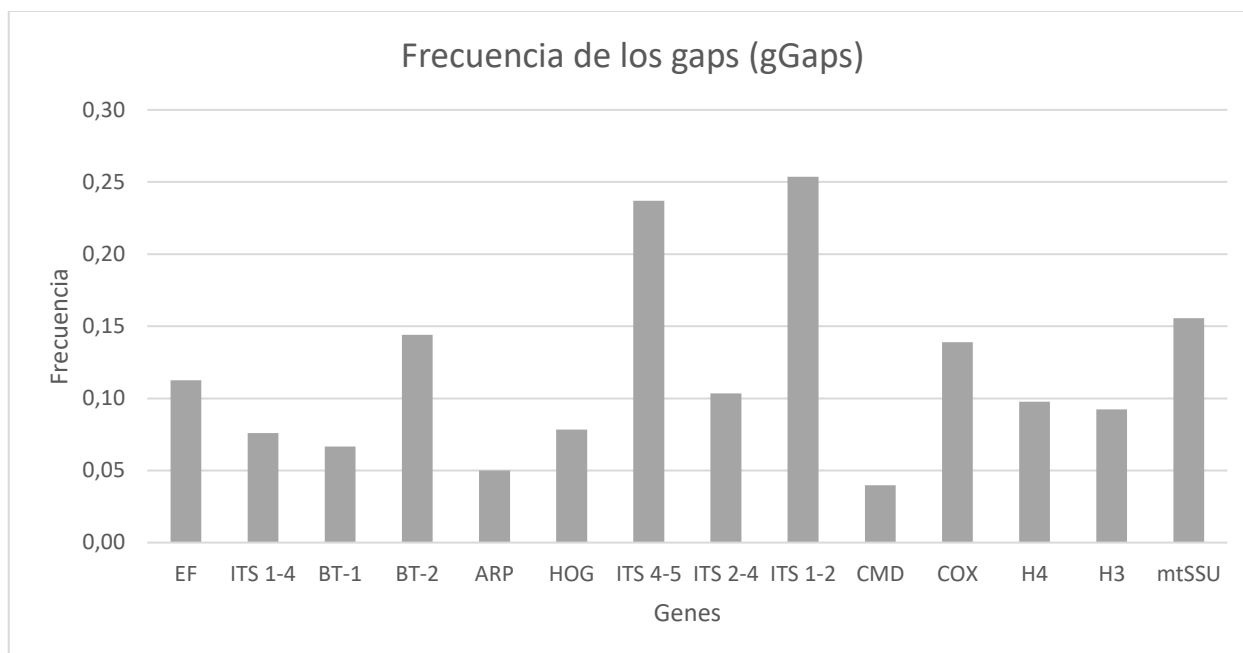
Grafica 2. Frecuencias de las guaninas contenidas en 14 microsecuencias para 13 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 5.



Grafica 3. Frecuencias de las citocinas contenidas en 14 microsecuencias para 13 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 5.

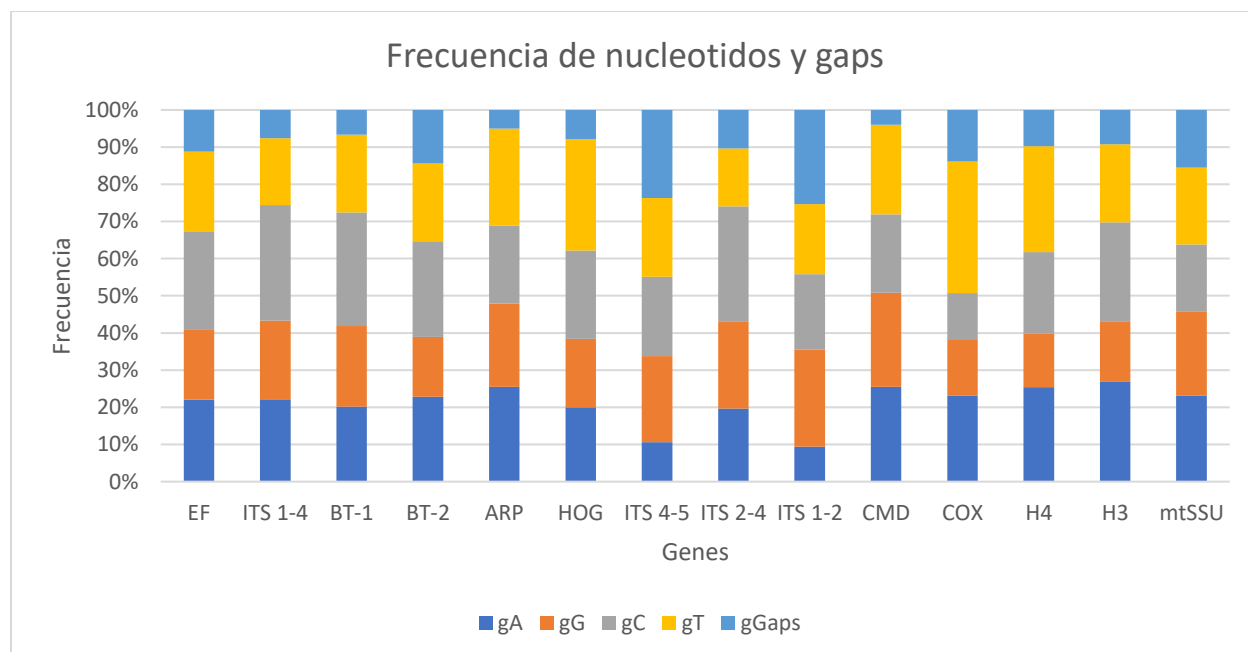


Grafica 4. Frecuencias de las timinas contenidas en 14 microsecuencias para 13 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 5.



Grafica 5. Frecuencias de los gaps contenidas en 14 microsecuencias para 13 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 5.

A continuación, la gráfica 6 representa las frecuencias de cada uno de los nucleótidos y gaps en porcentaje para las 13 especies de *Fusarium*, siendo el 100% la cantidad total de nucleótidos y gaps contenidos dentro de cada microsecuencia para cada secuencia génica.



Grafica 6. Representación en porcentajes de la frecuencia de nucleótidos y gaps contenidos en cada microsecuencia para las 14 microsecuencias con 13 especies de *Fusarium*.

En esta grafica se puede observar los diferentes valores para cada gen. En algunos casos se observa que la frecuencia de adeninas es similar a la frecuencia de las guaninas y así mismo la frecuencia de las citocinas es similar a la frecuencia de las timinas.

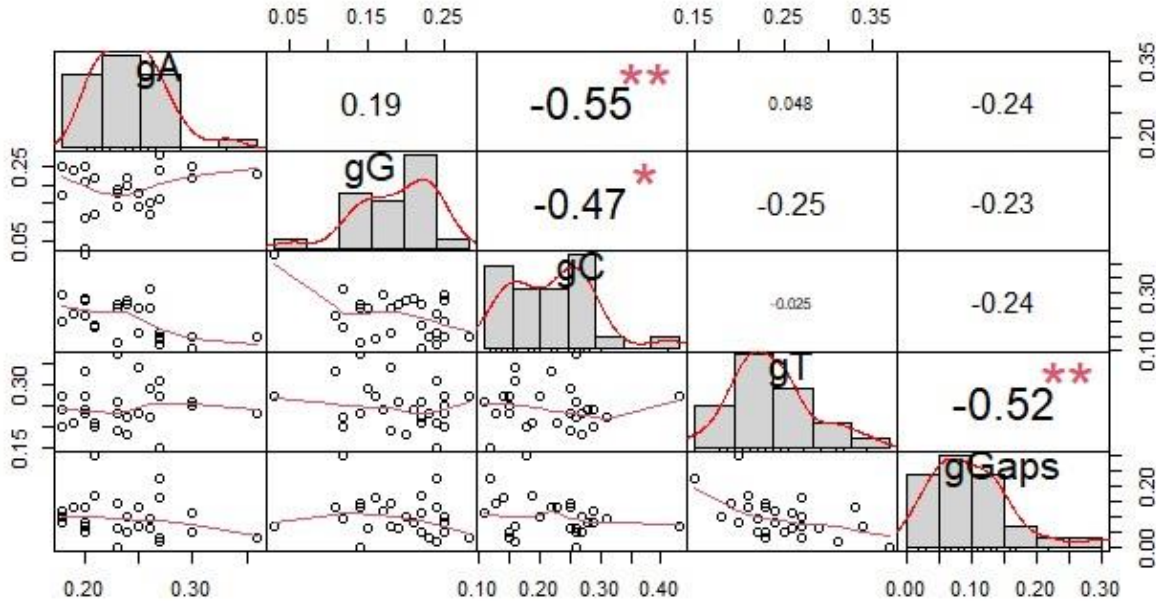


Figura 17. Resultados obtenidos de la correlación de Pearson para la frecuencia de los nucleótidos y gaps de 13 especies de *Fusarium* realizada en Rstudio®. La cantidad de asteriscos en cada valor determina la significancia de los datos, entre más asteriscos, más significativo el valor.

En la figura 17 se muestran graficas de dispersión, en la diagonal principal se pueden observar los histogramas para las diferentes variables donde la línea roja representa la distribución de los datos para cada frecuencia por separado, adicionalmente, en la parte superior se visualizan los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables y en la parte inferior se muestran las gráficas de dispersión con su respectiva línea de tendencia.

Para evaluar la variabilidad génica se realizó la prueba estadística de correlación de Pearson con el fin de cuantificar la relación de los nucleótidos. En la Figura 17 se resaltan 3 valores (valores con asterisco) que representan una correlación negativa fuerte, estos casos son:

- a) Frecuencia de adenina - frecuencia de citocina, con un valor de significancia de -0,55.

- b) Frecuencia de guanina - frecuencia de citocina, con un valor de significancia de -0,47.
- c) Frecuencia de timina - frecuencia de gaps, con un valor de significancia de -0,52.

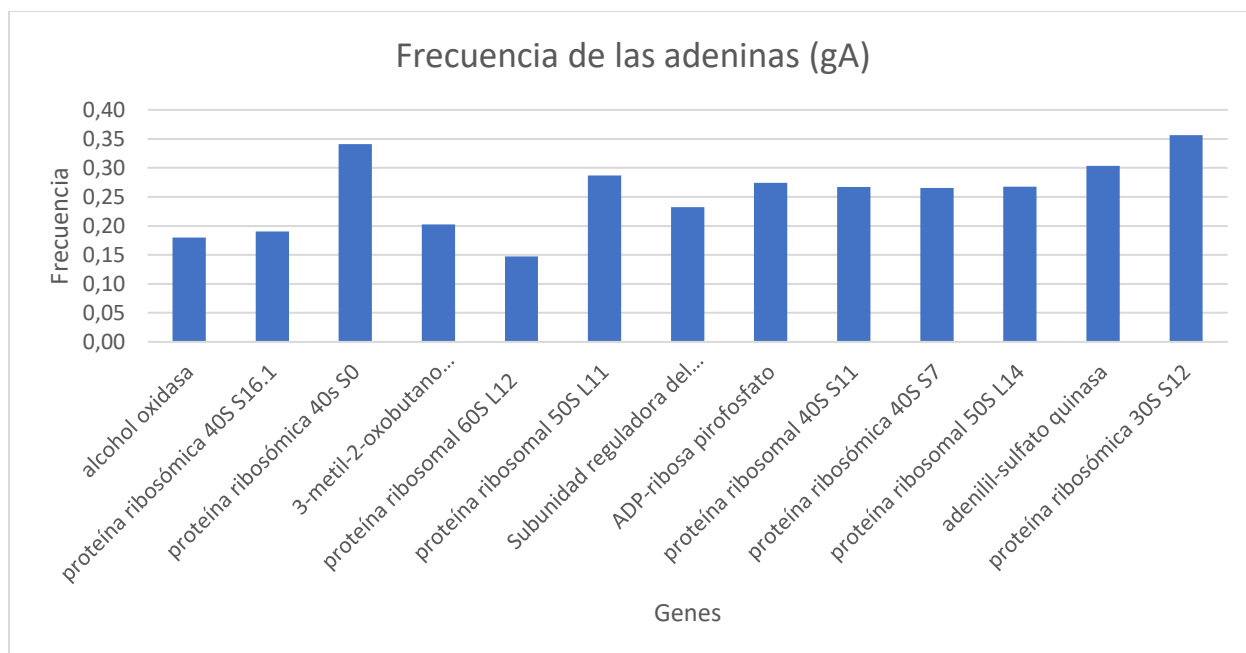
En los gráficos de dispersión de estos casos específicos se observa que la línea de tendencia (línea roja) tiene un patrón descendente, esto significa que a medida que los valores de una variable aumentan, los valores de la otra variable tienden a disminuir, mostrando así una asociación negativa entre dichas variables y corroborando los coeficientes de correlación para las frecuencias de los nucleótidos.

A continuación, en la tabla 6 se muestran las frecuencias obtenidas para los análisis realizados con 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.

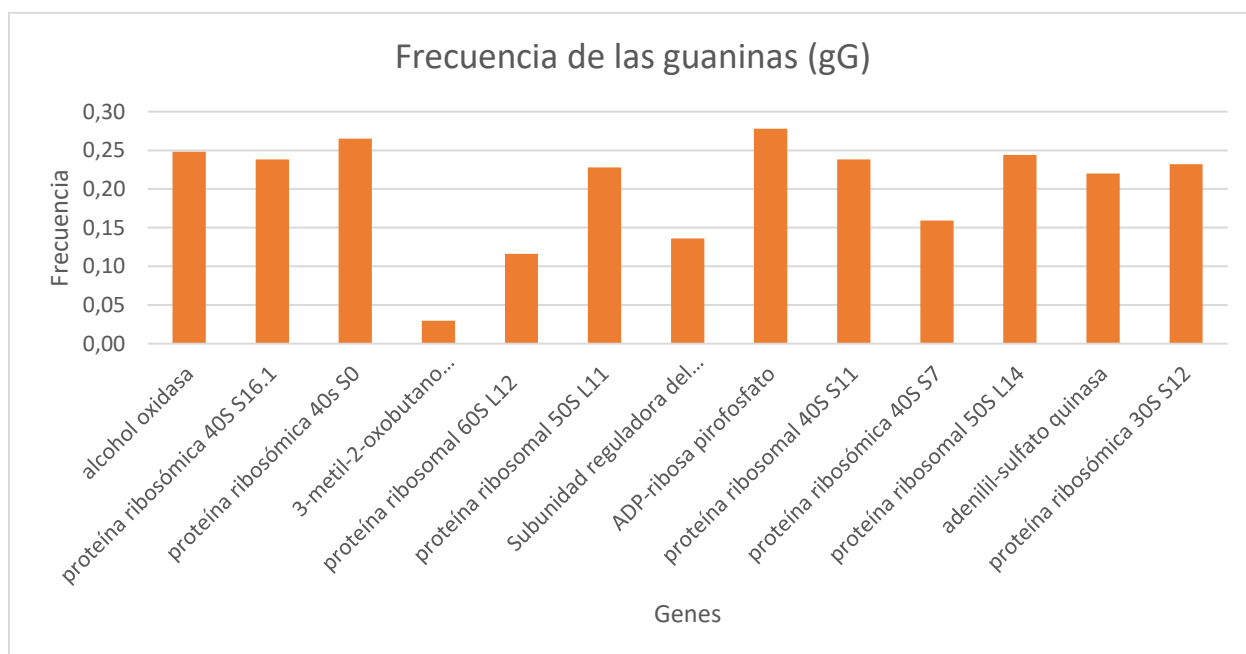
Tabla 6. Frecuencias de cada uno de los nucleótidos para 14 microsecuencias analizado 3 especies de *Fusarium*.

Genes	gA	gG	gC	gT	gGaps
alcohol oxidasa	0,18005	0,24818	0,19708	0,27007	0,10462
proteína ribosómica 40S S16.1	0,19048	0,23810	0,22857	0,21429	0,12857
proteína ribosómica 40s S0	0,34091	0,26515	0,10606	0,18182	0,10606
3-metil-2-oxobutano hidroximetiltransferasa	0,20238	0,02976	0,42857	0,27381	0,06548
proteína ribosomal 60S L12	0,14729	0,11628	0,21318	0,34496	0,17829
proteína ribosomal 50S L11	0,28692	0,22785	0,25738	0,17300	0,05485
Subunidad reguladora del proteosoma 26S 6B	0,23246	0,13596	0,25877	0,36842	0,00439
ADP-ribosa pirofosfato	0,27451	0,27778	0,14706	0,27451	0,02614
proteína ribosomal 40S S11	0,26720	0,23810	0,16138	0,31217	0,02116
proteína ribosómica 40S S7	0,26570	0,15942	0,14493	0,26570	0,16425
proteína ribosomal 50S L14	0,26761	0,24413	0,11972	0,15023	0,21831
adenilil-sulfato quinasa	0,30357	0,22024	0,11310	0,25595	0,10714
proteína ribosómica 30S S12	0,35652	0,23188	0,15362	0,22609	0,03188

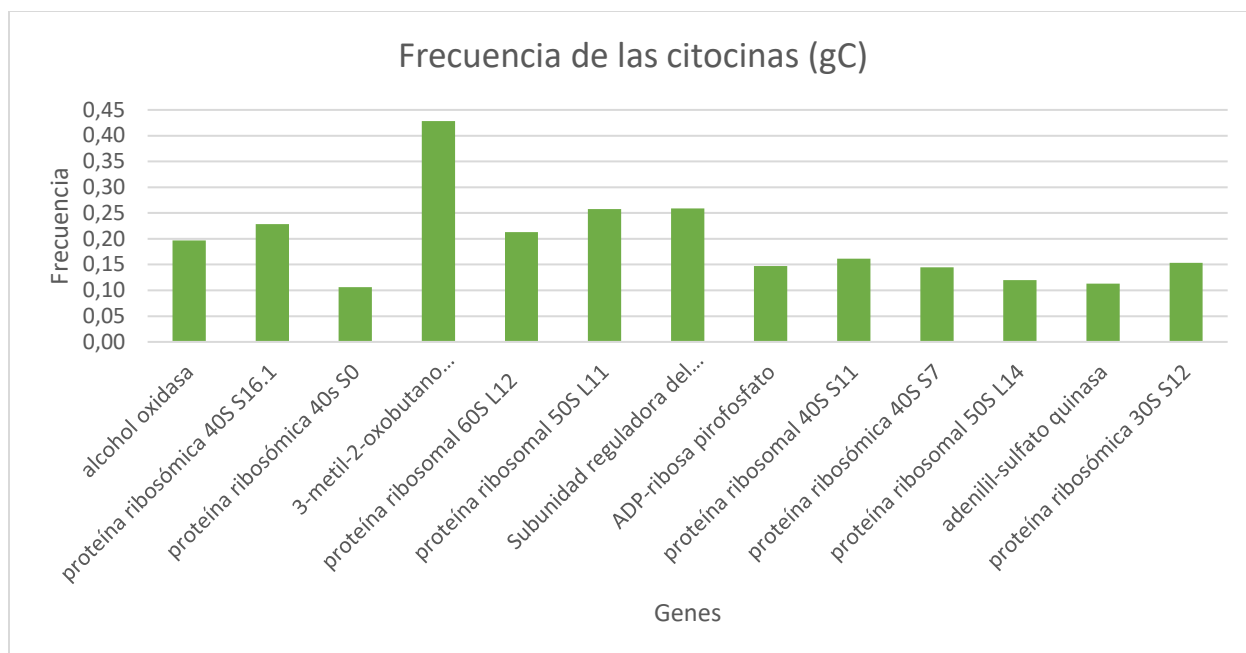
A partir de la tabla 6 se obtuvieron las siguientes gráficas de las frecuencias de cada uno de los nucleótidos obtenidas para los análisis realizados con 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.



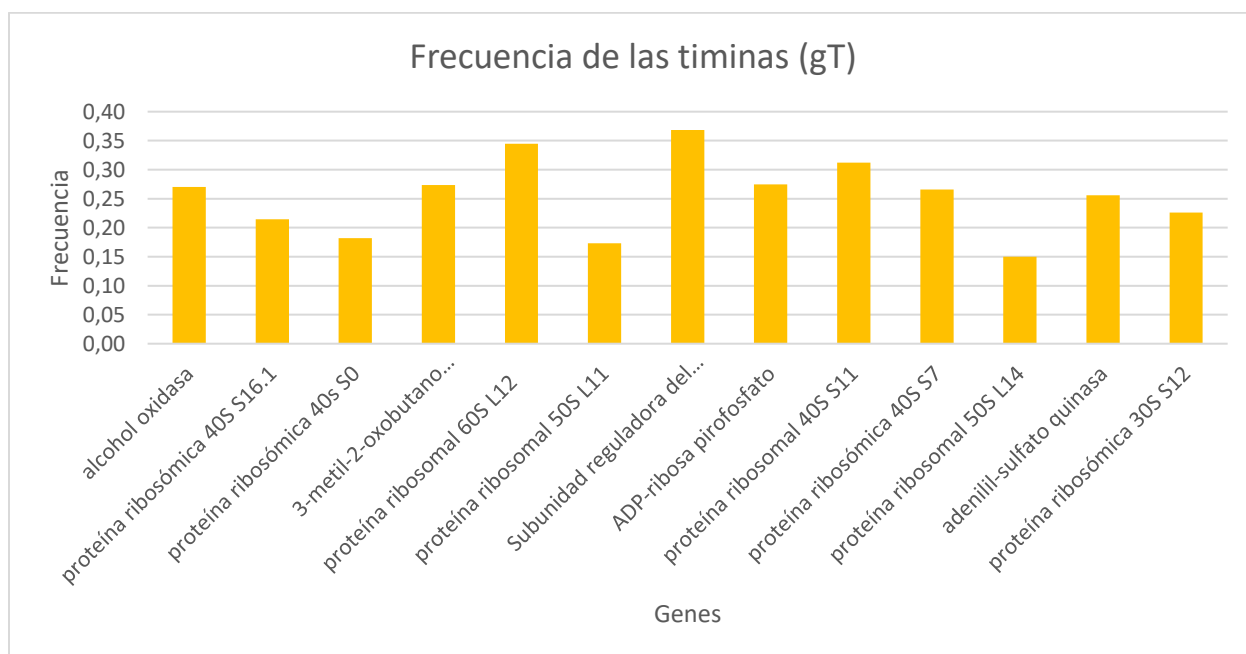
Grafica 7. Frecuencias de las adeninas contenidas en 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 6.



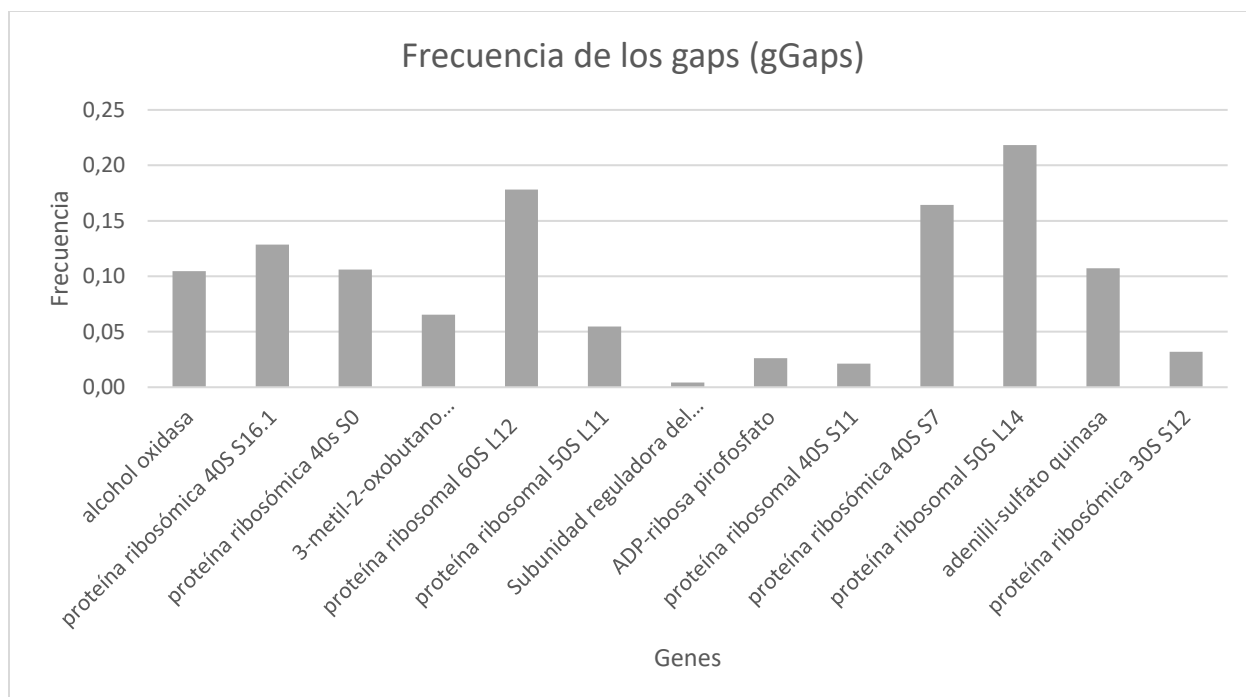
Grafica 8. Frecuencias de las guaninas contenidas en 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 6.



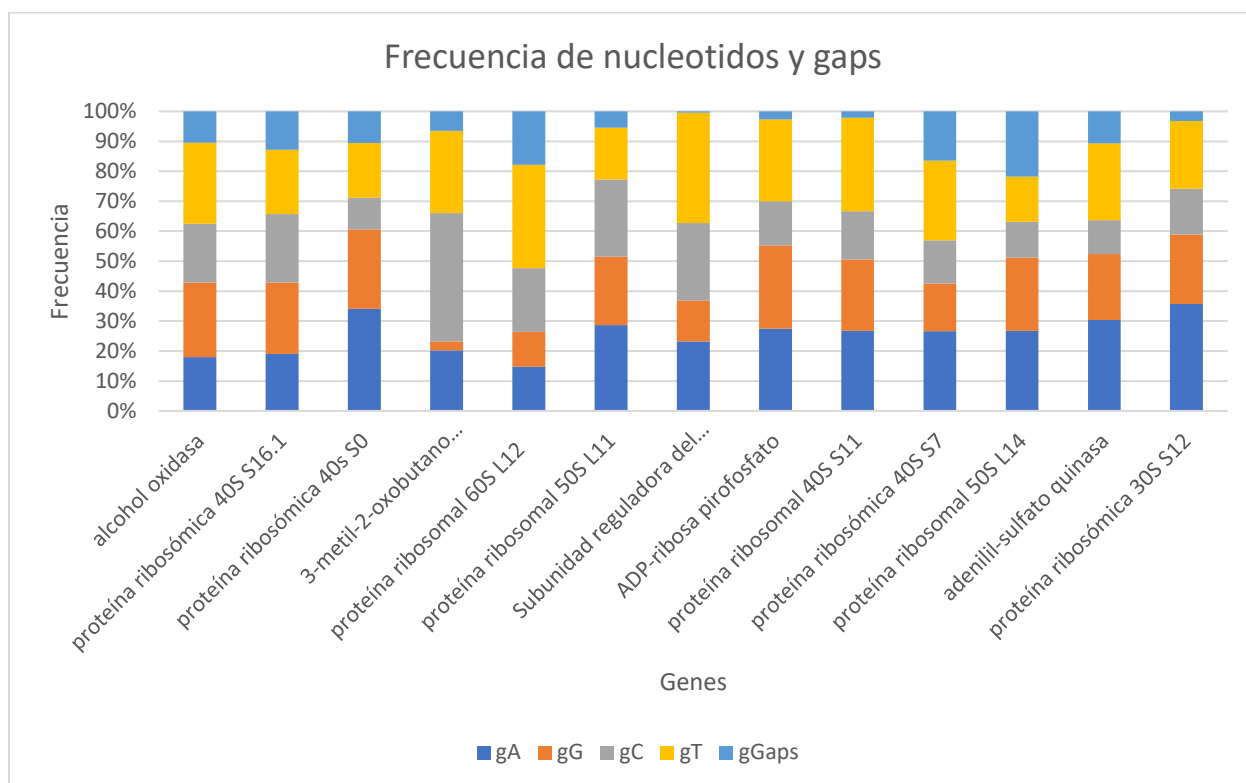
Grafica 9. Frecuencias de las citocinas contenidas en 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 6.



Grafica 10. Frecuencias de las citocinas contenidas en 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 6.



Grafica 11. Frecuencias de gaps contenidos en 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 6.



Grafica 12. Representación en porcentajes de la frecuencia de nucleótidos y gaps contenidos en cada microsecuencia para las 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 6.

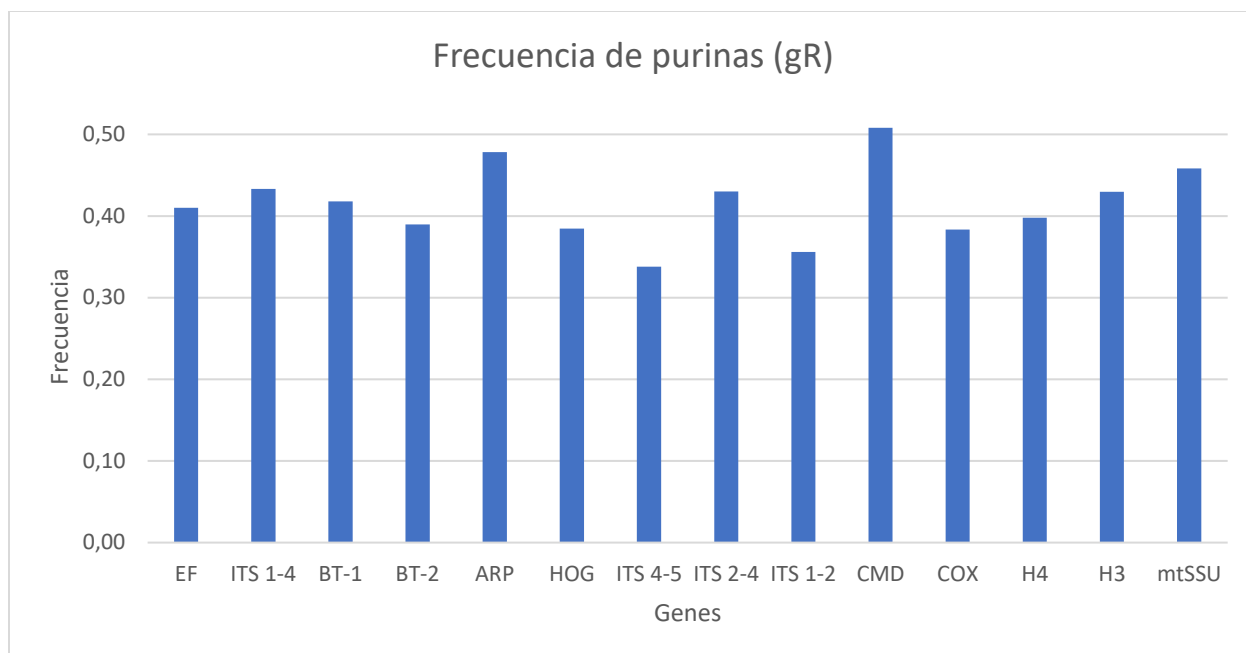
4.5.2 Frecuencias de purinas (gR), pirimidinas (gY) y gaps (gZ)

A continuación, en la tabla 7 se muestran los valores obtenidos para las frecuencias de purinas, pirimidinas y gaps, para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.

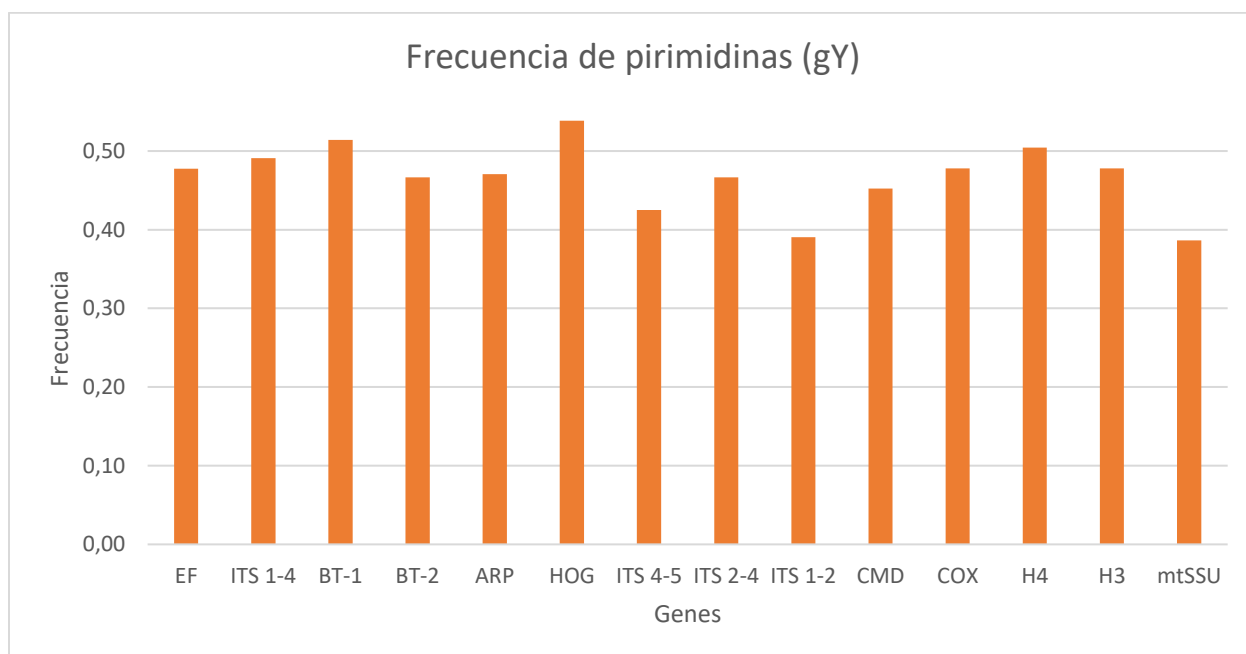
Tabla 7. Frecuencias de purinas (gR), pirimidinas (gY) y gaps (gZ) calculadas para 14 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.

Genes	gR	gY	gZ
EF	0,41004	0,47743	0,11252
ITS 1-4	0,43337	0,49079	0,07584
BT-1	0,41795	0,51410	0,06667
BT-2	0,38955	0,46647	0,14398
ARP	0,47821	0,47051	0,05000
HOG	0,38462	0,53846	0,07840
ITS 4-5	0,33796	0,42497	0,23707
ITS 2-4	0,42998	0,46647	0,10355
ITS 1-2	0,35613	0,39031	0,25356
CMD	0,50796	0,45225	0,03979
COX	0,38327	0,47773	0,13900
H4	0,39805	0,50427	0,09768
H3	0,42986	0,47783	0,09231
mtSSU	0,45827	0,38625	0,15548

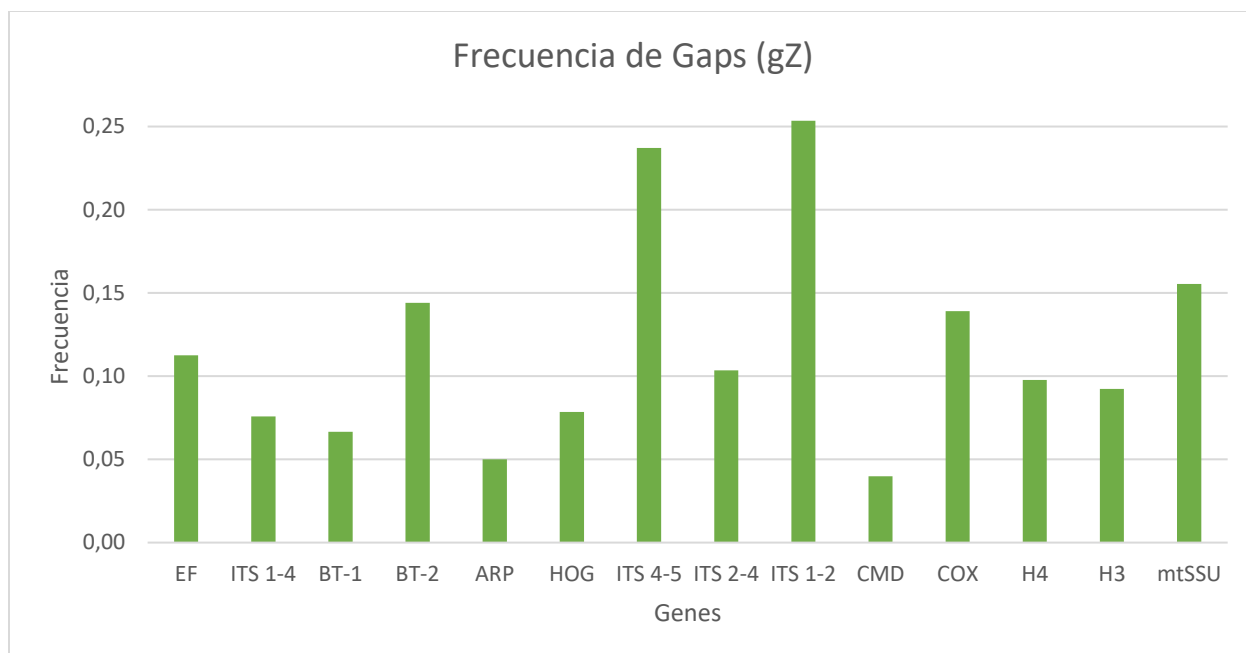
A partir de los valores mostrados en la tabla 7, se realizaron las siguientes graficas para cada frecuencia por separado.



Grafica 13. Frecuencias de las purinas (gR) para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 7.

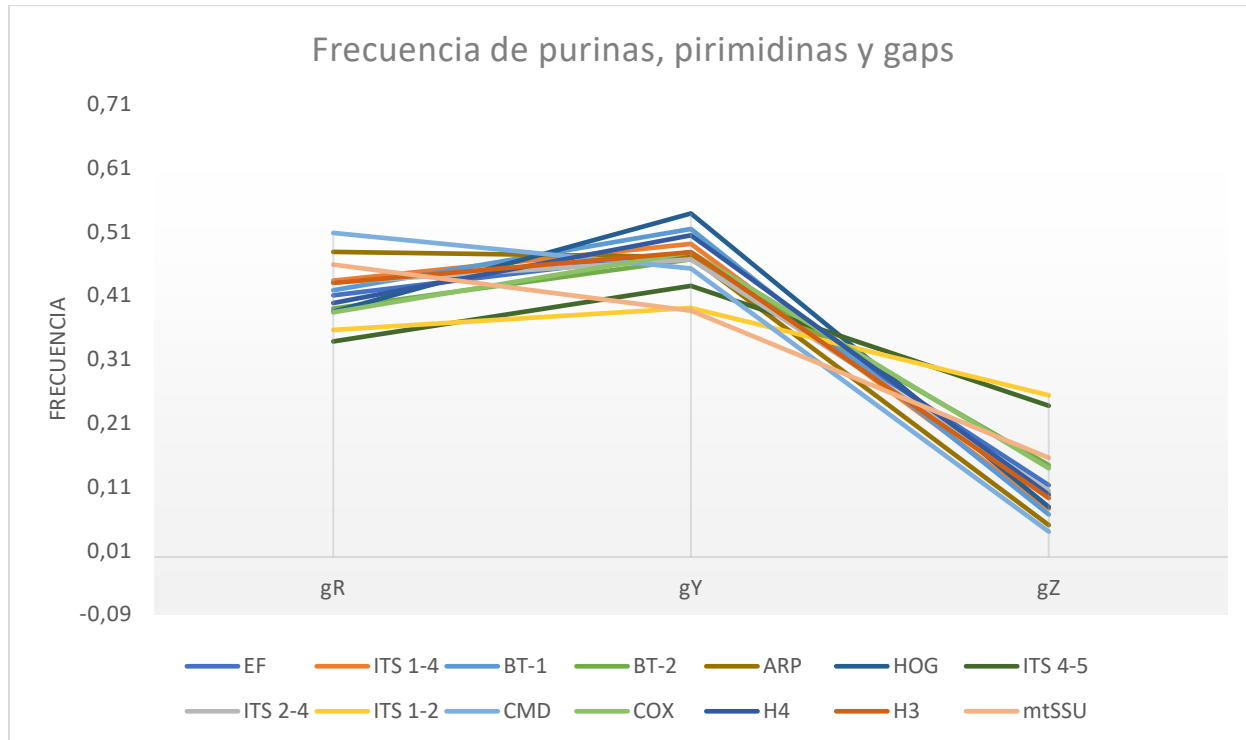


Grafica 14. Frecuencias de las pirimidinas (gY) para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las microsecuencias siguiendo el mismo orden de la tabla 7.



Grafica 15. Frecuencias de gaps (gZ) para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las secuencias microsecuencias el mismo orden de la tabla 7.

A continuación, se muestra la gráfica que recopila las frecuencias de purinas, pirimidinas y gaps para las 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.



Grafica 16. Frecuencia de purinas (gR), pirimidinas (gY) y gaps (gZ) para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.

En la gráfica 16 se puede observar que las 14 microsecuencias analizadas siguen un patrón similar con respecto a la frecuencia de las purinas, pirimidinas y gaps, donde la mayoría de las secuencias la frecuencia de las pirimidinas es mayor que la frecuencia de purinas, así mismo, la frecuencia de los gaps es la menor para todas las secuencias génicas analizadas.

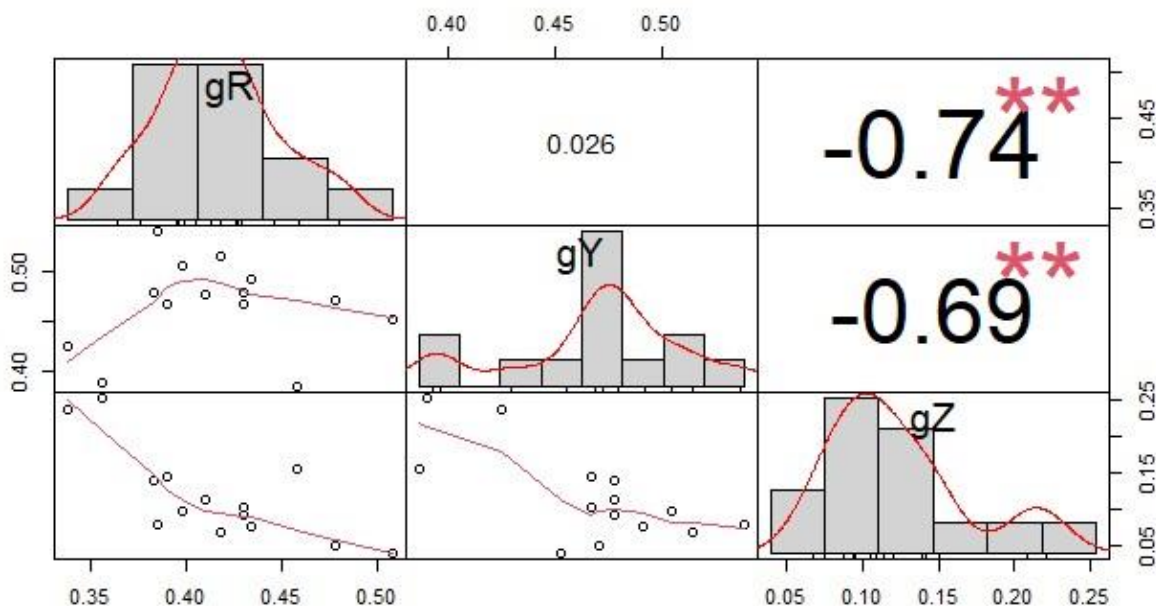


Figura 18. Resultados obtenidos de la correlación de Pearson para la frecuencia de purinas, pirimidinas y gaps de 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium* realizada en Rstudio®.

En la figura 18 se pueden ver observar las correlaciones entre la frecuencia de purinas, frecuencia de pirimidinas y frecuencia de los gaps para las 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*. Se resaltan 2 valores (valores con asterisco) que representan una correlación negativa fuerte, estos casos son:

- Frecuencia de purinas - frecuencia de gaps, con un valor de significancia de -0,74.
- Frecuencia de pirimidinas - frecuencia de gaps, con un valor de significancia de -0,69.

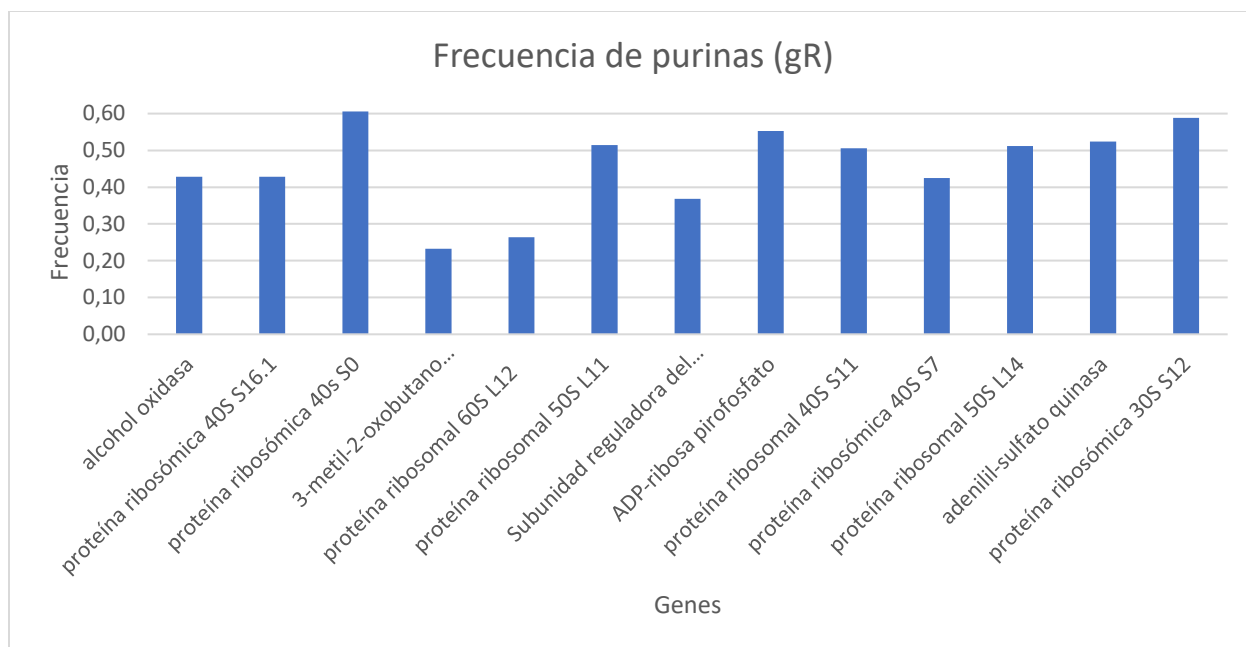
Por otro lado, se observa que la correlación entre la frecuencia de purinas y la frecuencia de pirimidinas tiene un valor de significancia positiva de 0,026, esto sugiere una relación significativa entre estas dos frecuencias.

A continuación, en la tabla 8 se muestran las frecuencias de purinas, pirimidinas y gaps obtenidas para los análisis realizados con 13 microsecuencias y 3 especies de *Fusarium*.

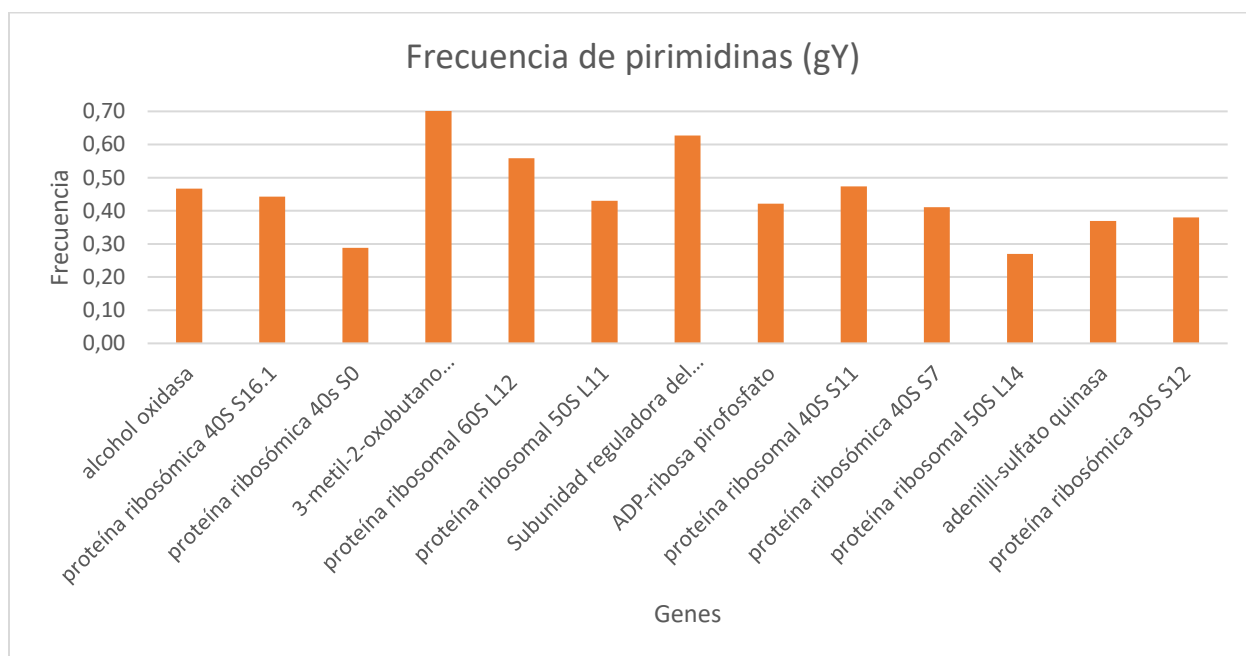
Tabla 8. Frecuencias de purinas, pirimidinas y gaps de 13 microsecuencias para 3 especies de *Fusarium*.

Genes	gR	gY	gZ
alcohol oxidasa	0,42822	0,46715	0,10462
proteína ribosómica 40S S16.1	0,42857	0,44286	0,12857
proteína ribosómica 40s S0	0,60606	0,28788	0,10606
3-metil-2-oxobutano hidroximetiltransferasa	0,23214	0,70238	0,06548
proteína ribosomal 60S L12	0,26357	0,55814	0,17829
proteína ribosomal 50S L11	0,51477	0,43038	0,05485
Subunidad reguladora del proteosoma 26S 6B	0,36842	0,62719	0,00439
ADP-ribosa pirofosfato	0,55229	0,42157	0,02614
proteína ribosomal 40S S11	0,50529	0,47354	0,02116
proteína ribosómica 40S S7	0,42512	0,41063	0,16425
proteína ribosomal 50S L14	0,51174	0,26995	0,21831
adenilil-sulfato quinasa	0,52381	0,36905	0,10714
proteína ribosómica 30S S12	0,58841	0,37971	0,03188

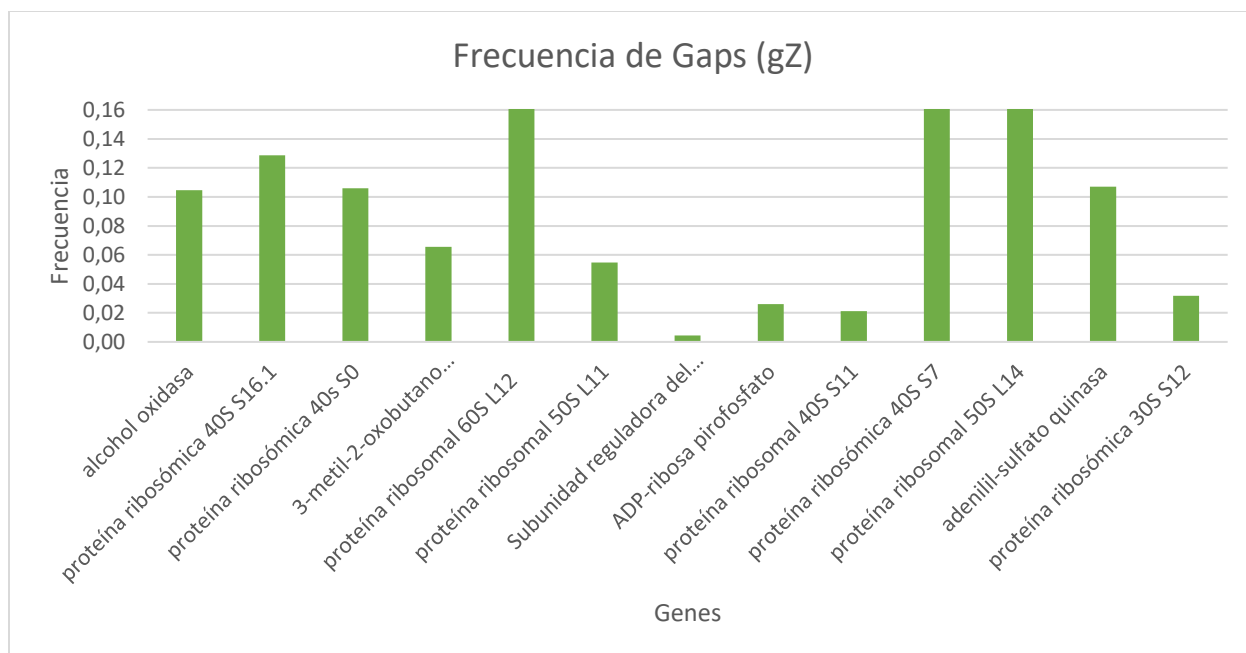
A partir de los valores mostrados en la tabla 8, se realizaron las siguientes graficas para cada frecuencia por separado.



Grafica 17. Frecuencias de las purinas (gR) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las secuencias génicas siguiendo el mismo orden de la tabla 8.

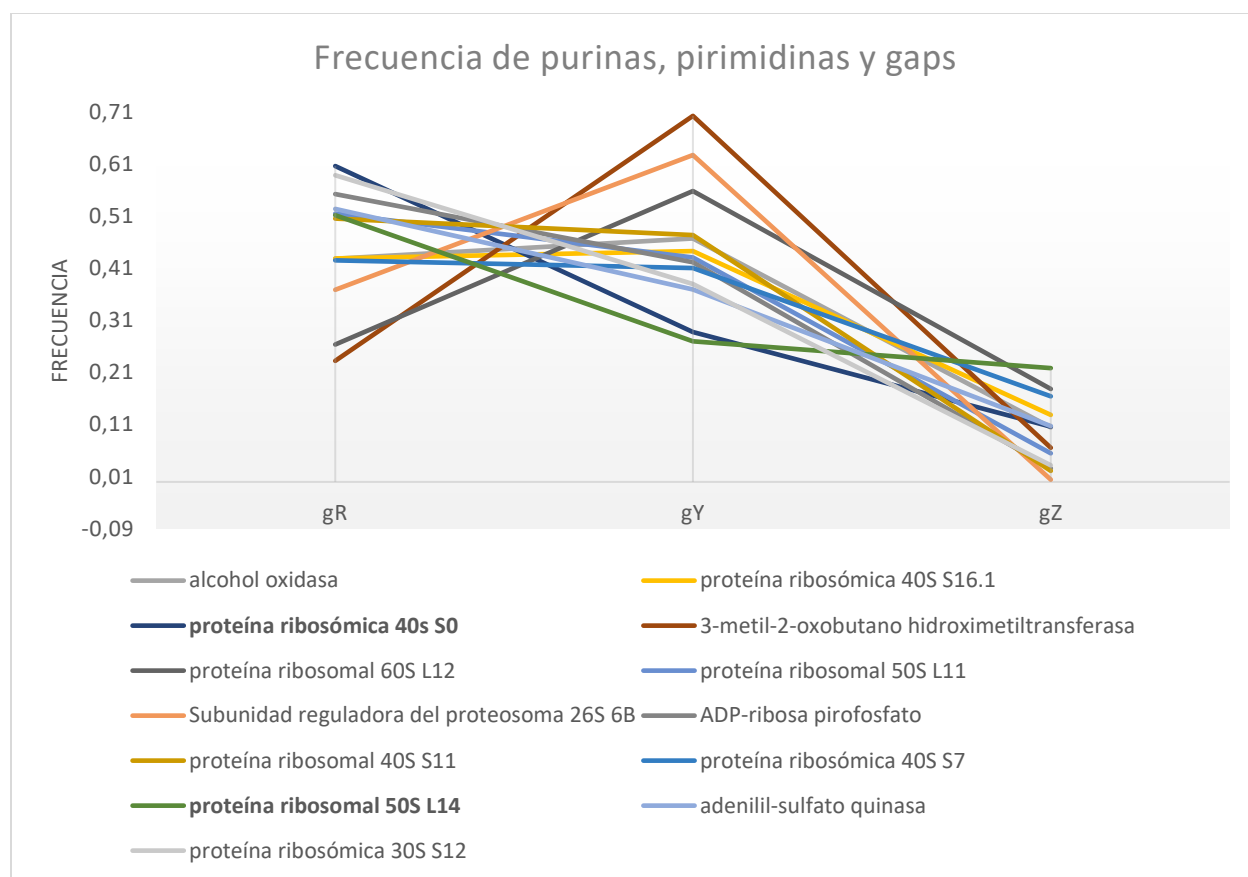


Grafica 18. Frecuencias de las pirimidinas (gY) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las secuencias génicas siguiendo el mismo orden de la tabla 8.



Grafica 19. Frecuencias de las pirimidinas (gZ) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*. En donde el eje x corresponde a las secuencias génicas siguiendo el mismo orden de la tabla 8.

A continuación, se muestra la gráfica que recopila las frecuencias de purinas, pirimidinas y gaps para las 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.



Grafica 20. Representación en porcentajes de la frecuencia de purinas (gR), pirimidinas (gY) y gaps (gZ) contenidos en 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.

Como se muestra en grafica 20, los patrones para cada secuencia génica son diferentes unos de otros, esto se debe a la cantidad de especies (3 especies) que se usaron para el análisis de estas secuencias génicas, ya que entre menos especies analizadas menos información hay disponible para relacionar las variables. Para las secuencias génicas de proteína ribosómica 40S S0 y proteína ribosomal 50S L14, estas dos presentaron una mayor frecuencia de purinas (gR), mientras que la frecuencia de pirimidinas (gY) y gaps (gZ) es menor.

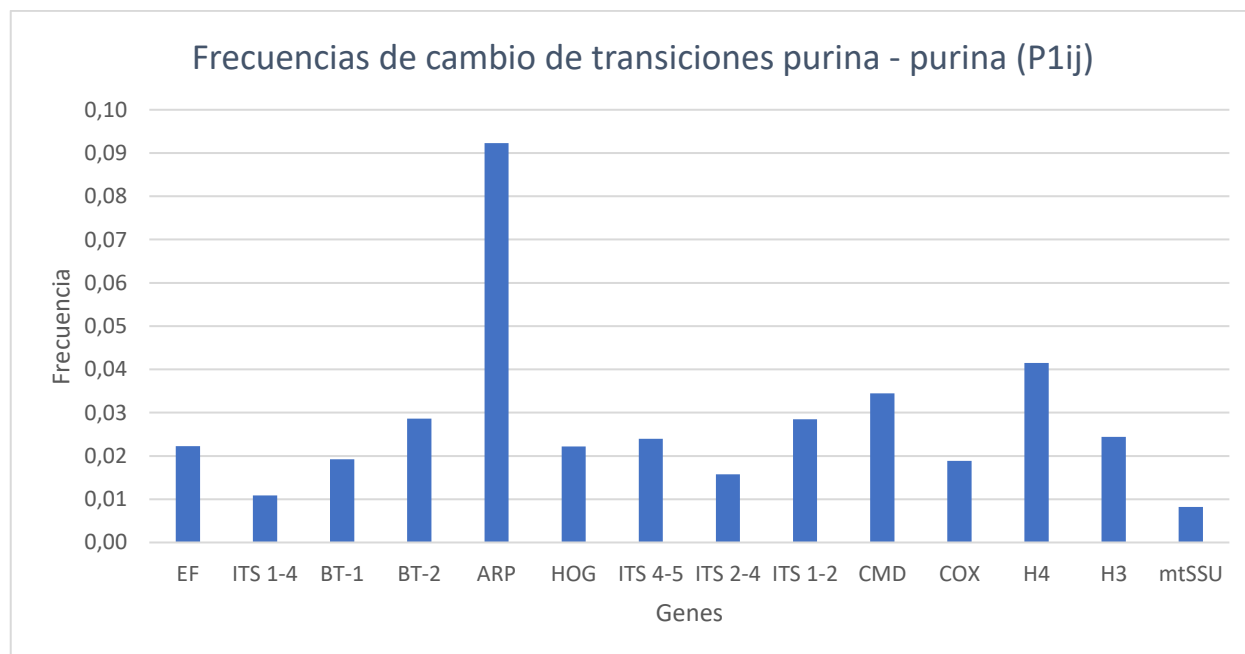
4.5.3 Frecuencias de cambio de las transiciones, transversiones y gaps

A continuación, se encuentra la tabla 9 donde se muestran los valores obtenidos para las frecuencias de los cambios de transiciones purina-purina (P1ij), transiciones pirimidina-pirimidina (P2ij), transversiones purina-pirimidina y pirimidina-purina (Qij) y gap-nucleótido y nucleótido-gap (Gap, ij) para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.

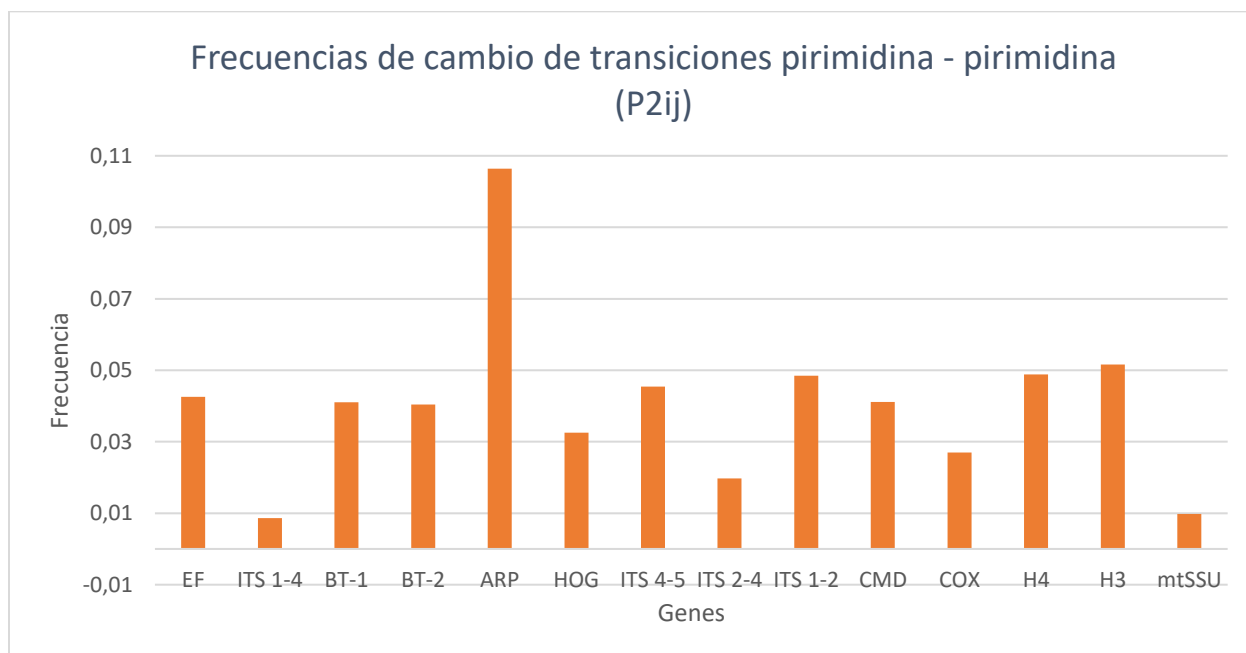
Tabla 9. Frecuencias de frecuencias de cambio calculadas para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.

Genes	P1ij	P2ij	Qij	Gap,ij
EF	0,02225	0,04259	0,07629	0,11125
ITS 1-4	0,01083	0,00867	0,04442	0,03142
BT-1	0,01923	0,04103	0,07949	0,04103
BT-2	0,02860	0,04043	0,04142	0,11440
ARP	0,09231	0,10641	0,31154	0,07179
HOG	0,02219	0,03254	0,06805	0,09763
ITS 4-5	0,02396	0,04540	0,07566	0,04414
ITS 2-4	0,01578	0,01972	0,04043	0,04241
ITS 1-2	0,02849	0,04843	0,04558	0,07123
CMD	0,03448	0,04111	0,01724	0,01061
COX	0,01889	0,02699	0,05398	0,02969
H4	0,04151	0,04884	0,09768	0,08913
H3	0,02443	0,05158	0,04344	0,04615
mtSSU	0,00818	0,00982	0,00000	0,03110

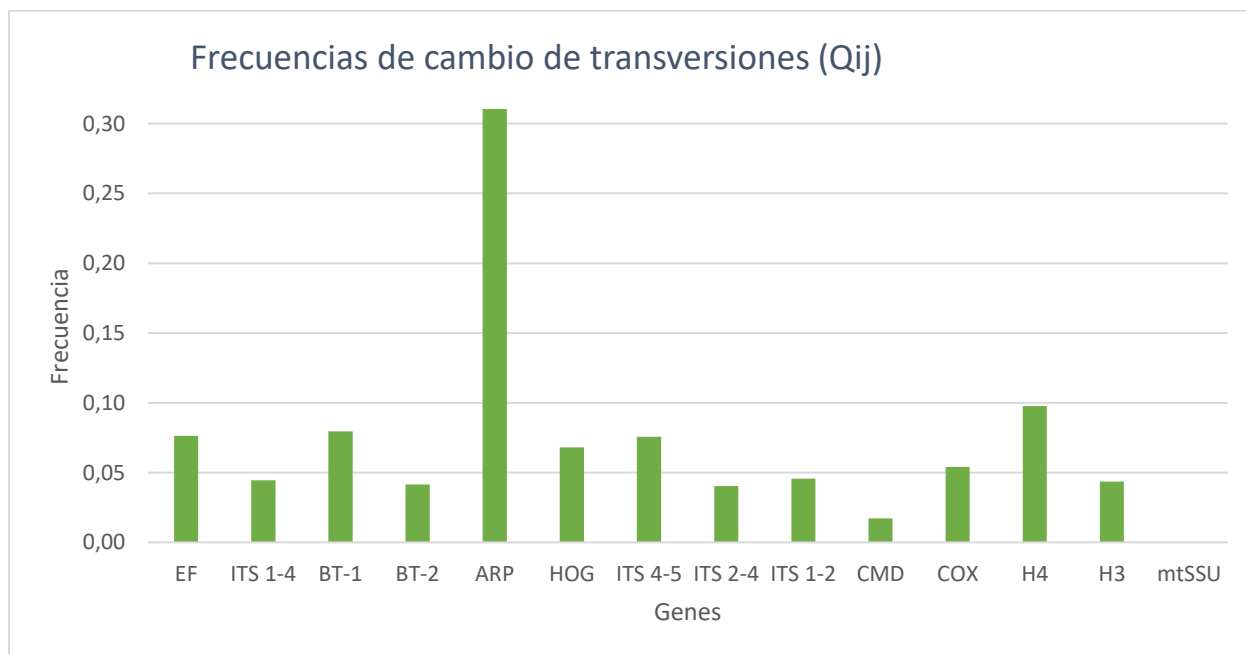
A continuación, se muestran las representaciones graficas de las proporciones de cambio para cada secuencia génica.



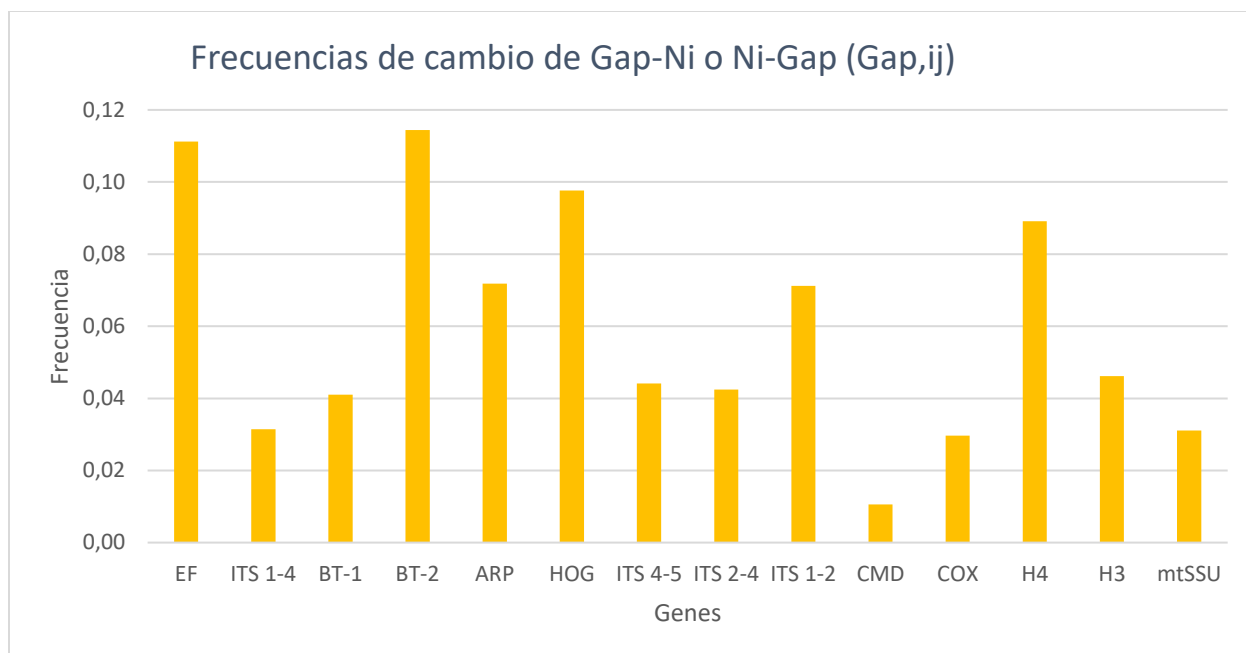
Grafica 21. Frecuencias de cambio de las transiciones purina-purina (P1ij) para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.



Grafica 22. Frecuencias de cambio de las transiciones pirimidina-pirimidina (P2ij) para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.

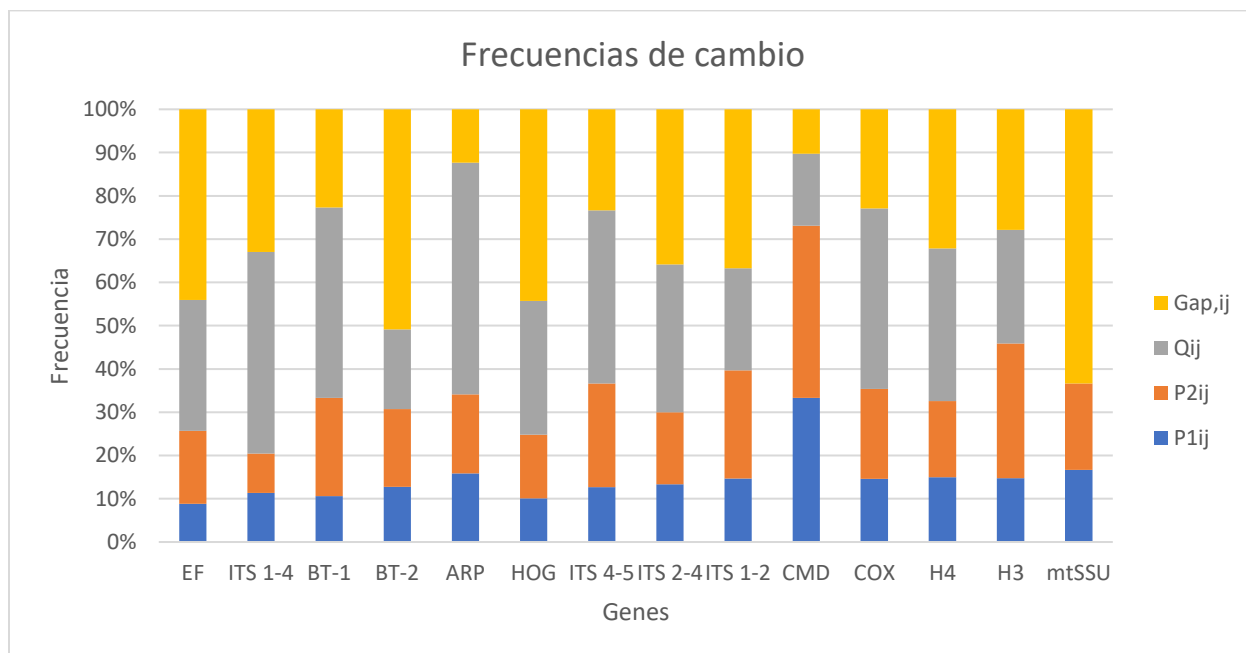


Grafica 23. Frecuencias de cambio de las transversiones (Qij) para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.



Grafica 24. Frecuencias de cambio de las gap-nucleótido y nucleótido-gap (Gap,ij) para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.

A continuación, se muestra la gráfica que recopila las frecuencias de cambio para las 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.



Grafica 25. Representación en porcentaje de las frecuencias de cambio de purina a purina (P1ij), frecuencia de cambio de pirimidina a pirimidina (P2ij), frecuencia de cambio de purina a

pirimidina y viceversa (Q_{ij}) y frecuencia de cambio de gap a nucleótido y viceversa (Gap_{ij}) para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.

En la gráfica 25 se observa que en la mayoría de las microsecuencias la frecuencia de las transiciones ($P1_{ij}$ y $P2_{ij}$) es mucho menor a las frecuencias de transversiones y la frecuencia de gaps. Adicionalmente la secuencia génica de la subunidad pequeña ribosomal (mtSSU) no presenta transversiones en la microsecuencia.

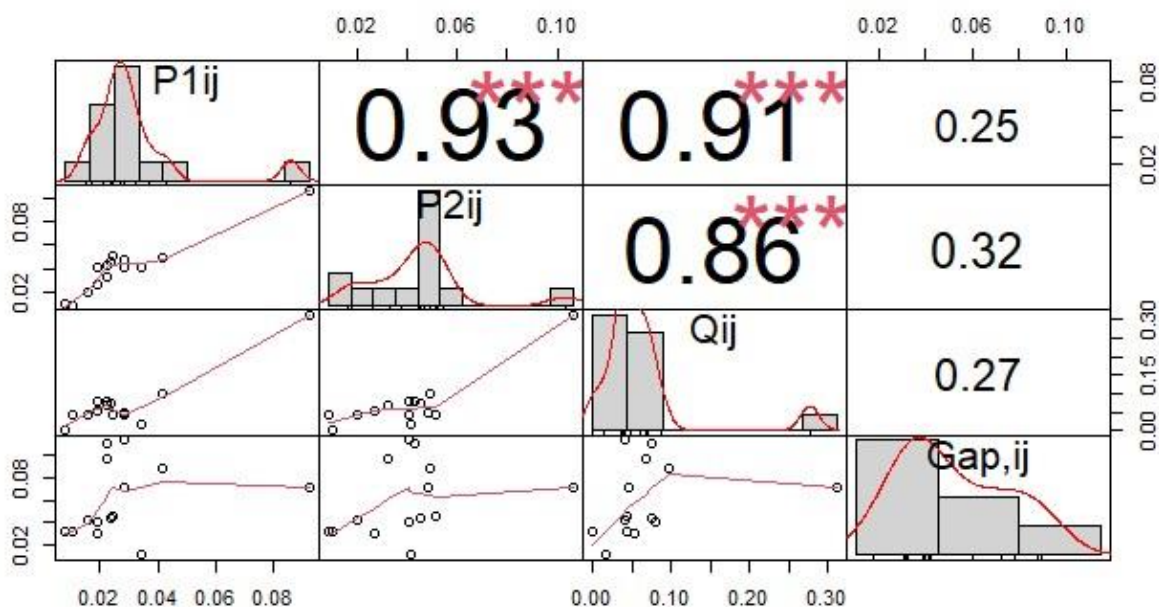


Figura 19. Resultados obtenidos de la correlación de Pearson para la frecuencia de cambio de purinas, pirimidinas y gaps, realizada en Rstudio® para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.

En la figura 19 se muestran las correlaciones para las frecuencias de cambio. Se resaltan 2 valores (valores con asterisco) que representan una correlación positiva fuerte, estos casos son:

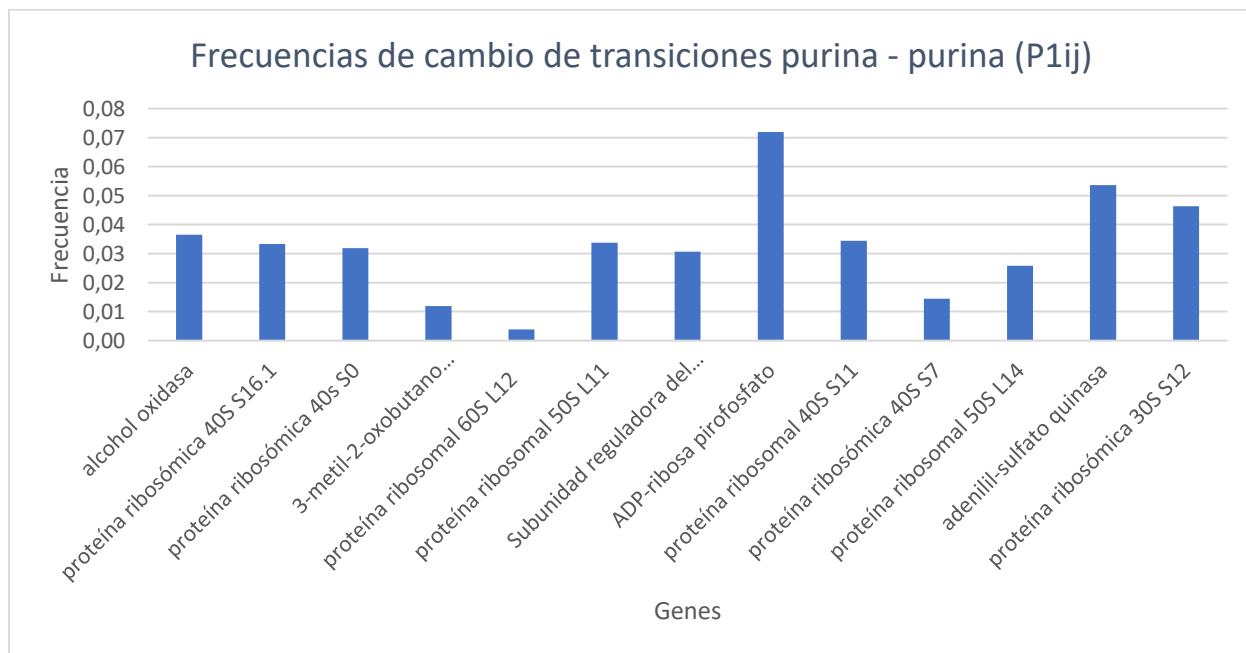
- Frecuencia de transiciones purina-purina y frecuencia de transiciones pirimidina - pirimidina, con un valor de significancia de 0,93.
- Frecuencia de transiciones purina-purina y frecuencia de transversiones, con un valor de significancia de 0,91.
- Frecuencia de transiciones pirimidina-pirimidina y frecuencia de transversiones, con un valor de significancia de 0,86

A continuación, en la tabla 10 se muestran las frecuencias cambio obtenidas para los análisis realizados con 13 microsecuencias y 3 especies de *Fusarium*.

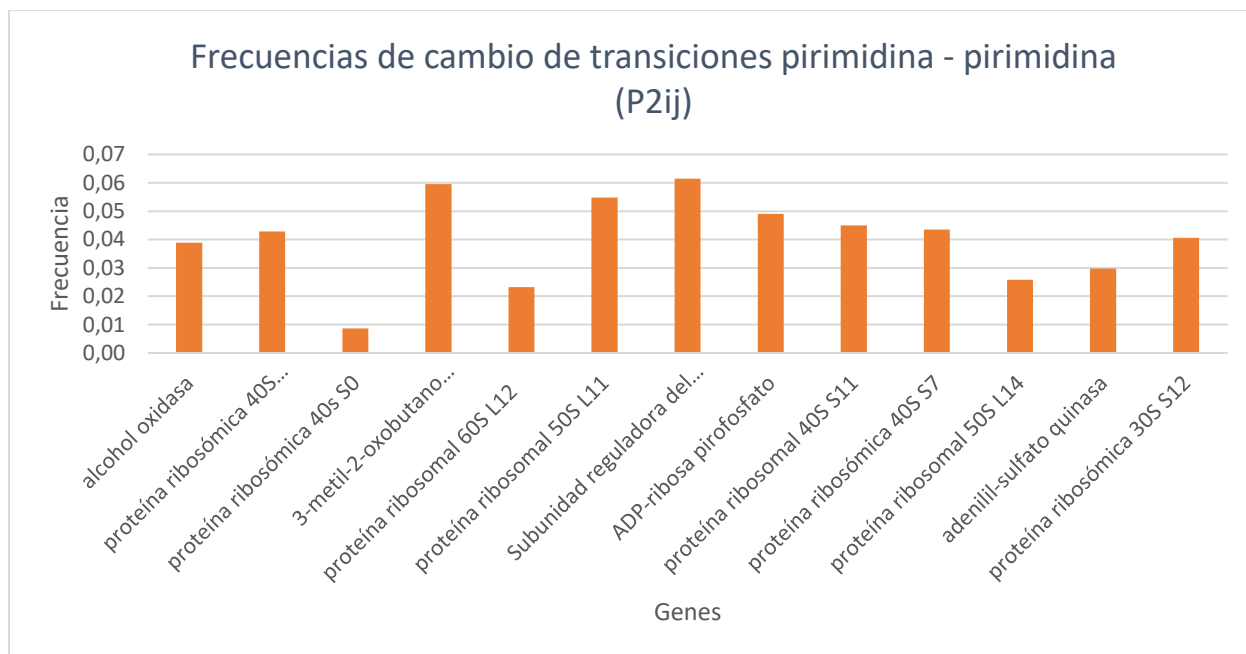
Tabla 10. Frecuencias de frecuencias de cambio calculadas para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.

Genes	P1ij	P2ij	Qij	Gap,ij
alcohol oxidasa	0,03650	0,03893	0,05596	0,09976
proteína ribosómica 40S S16.1	0,03333	0,04286	0,02381	0,25714
proteína ribosómica 40s S0	0,03188	0,00870	0,02609	0,07536
3-metil-2-oxobutano hidroximetiltransferasa	0,01190	0,05952	0,07738	0,06548
proteína ribosomal 60S L12	0,00388	0,02326	0,03876	0,17054
proteína ribosomal 50S L11	0,03376	0,05485	0,05485	0,02954
Subunidad reguladora del proteosoma 26S 6B	0,03070	0,06140	0,04386	0,00439
ADP-ribosa pirofosfato	0,07190	0,04902	0,11765	0,01634
proteína ribosomal 40S S11	0,03439	0,04497	0,06614	0,01852
proteína ribosómica 40S S7	0,01449	0,04348	0,05314	0,09662
proteína ribosomal 50S L14	0,02582	0,02582	0,04460	0,11972
adenilil-sulfato quinasa	0,05357	0,02976	0,04167	0,08333
proteína ribosómica 30S S12	0,04638	0,04058	0,04638	0,01739

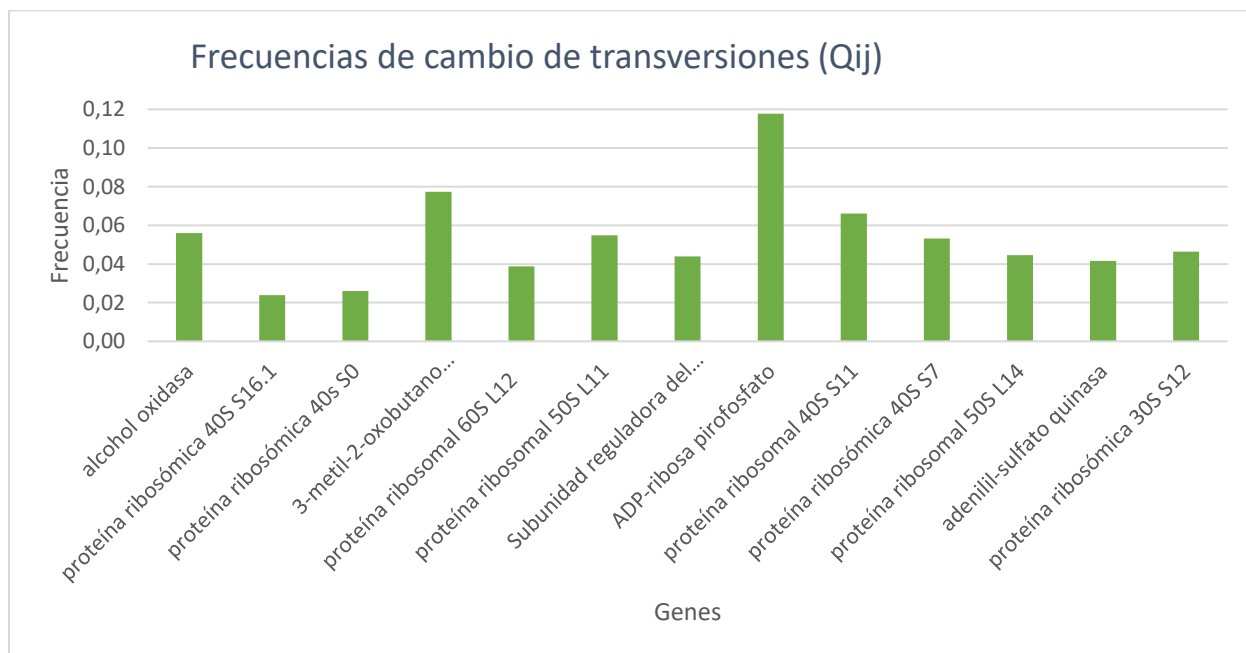
A continuación, se muestran las representaciones graficas de las proporciones de cambio para cada secuencia génica según los valores mostrados en la tabla 10.



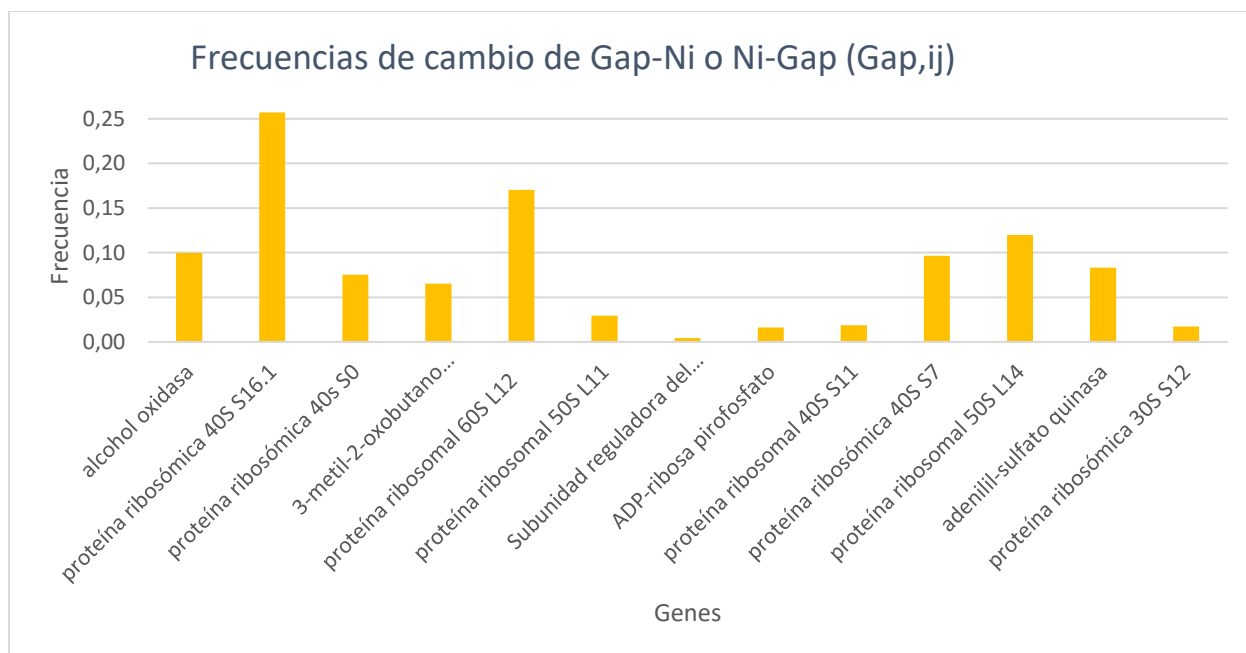
Grafica 26. Frecuencias de cambio de las transiciones purina-purina (P1ij) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.



Grafica 27. Frecuencias de cambio de las transiciones pirimidina-pirimidina (P2ij) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.

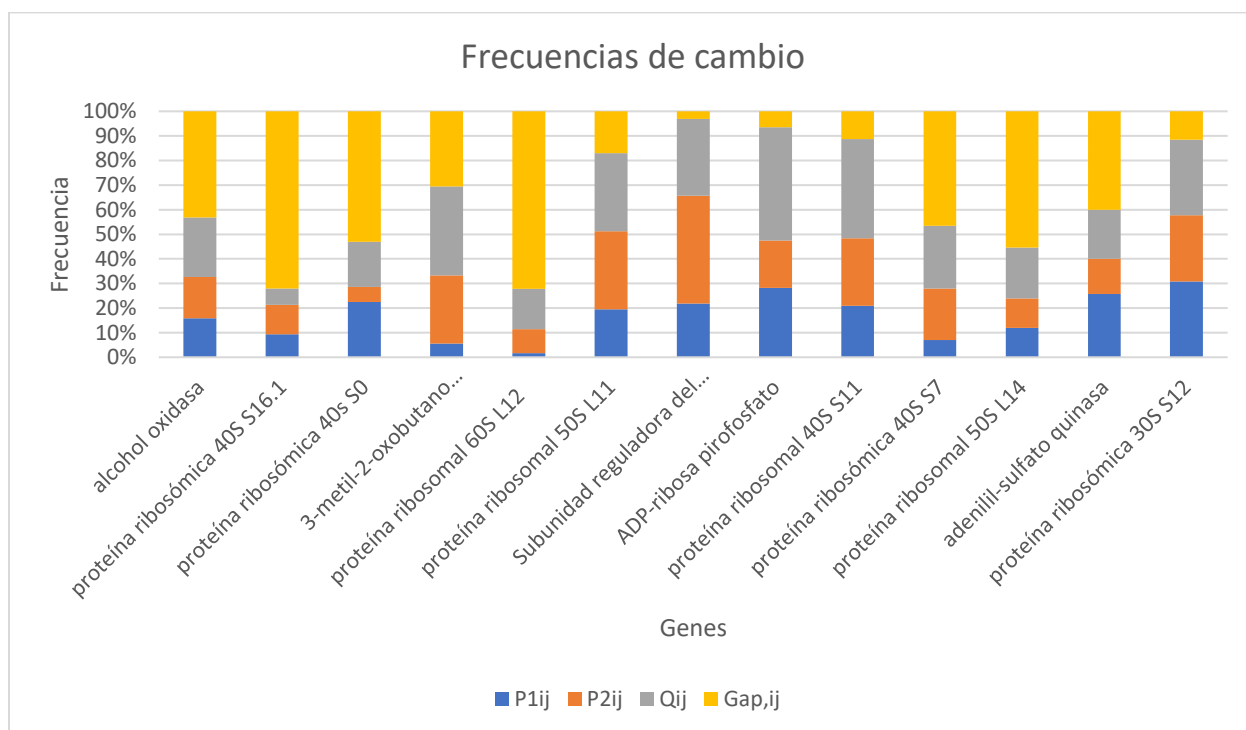


Grafica 28. Frecuencias de cambio de las transversiones (Qij) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.



Grafica 29. Frecuencias de cambio de las gap-nucleótido y nucleótido-gap (Gap,ij) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.

A continuación, se muestra la gráfica que recopila las frecuencias de cambio para las 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.



Grafica 30. Representación en porcentaje de las frecuencias de cambio de purina a purina (P1ij), frecuencia de cambio de pirimidina a pirimidina (P2ij), frecuencia de cambio de purina a

pirimidina y viceversa (Q_{ij}) y frecuencia de cambio de gap a nucleótido y viceversa (Gap_{ij}) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.

4.5.4 Tasas de transiciones vs transversiones

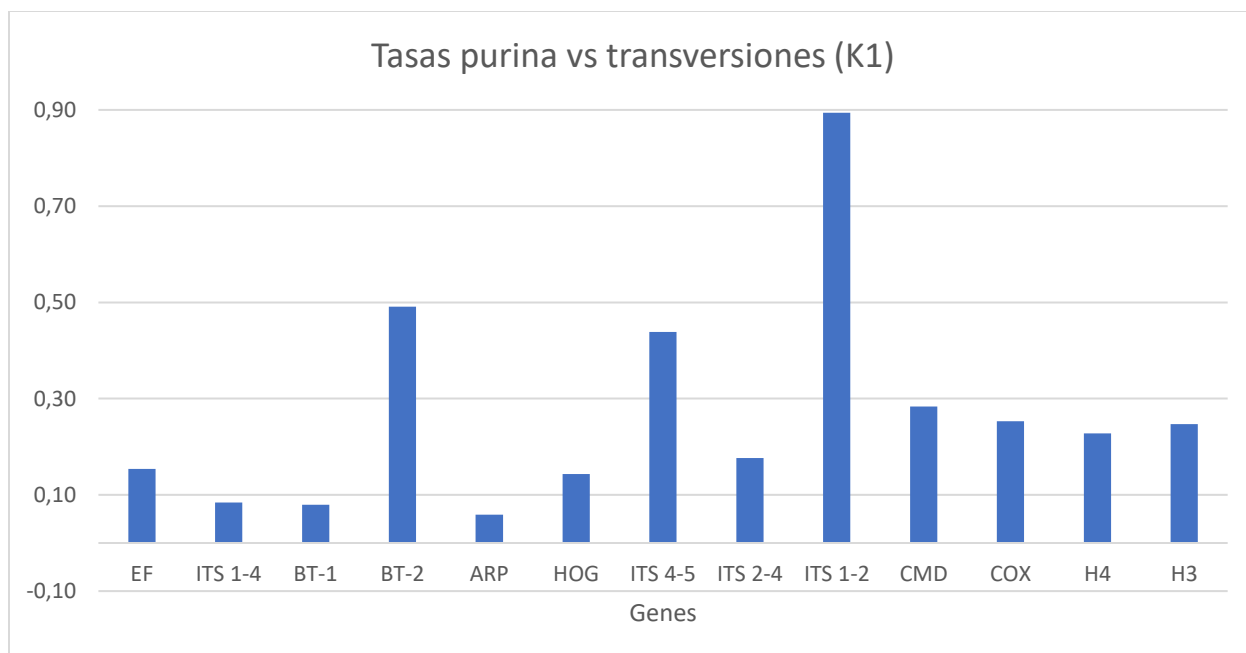
En la tabla 8 se encuentran los valores obtenidos para las tasas de las transversiones, transiciones y gaps.

Tabla 11. Valores obtenidos para las tasas de purina vs purina (K1), pirimidina vs transversiones (K2), transversiones (Bij) y gaps (K3) para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.

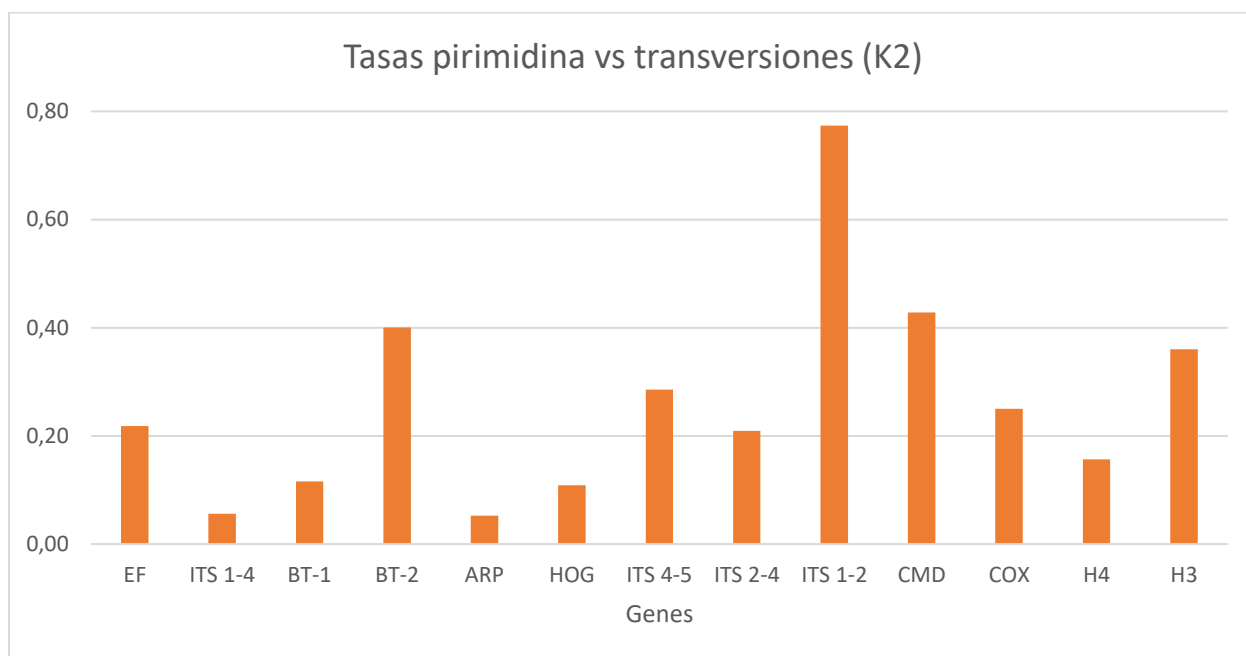
Genes	K1	K2	Bij	K3
EF	0,15374	0,21825	0,00042	0,00061
ITS 1-4	0,08381	0,05585	0,00018	0,00013
BT-1	0,07947	0,11595	0,00028	0,00015
BT-2	0,49119	0,40055	0,00027	0,00075
ARP	0,05857	0,05225	0,00088	0,00020
HOG	0,14342	0,10859	0,00028	0,00040
ITS 4-5	0,43869	0,28568	0,00064	0,00038
ITS 2-4	0,17670	0,20930	0,00021	0,00022
ITS 1-2	0,89391	0,77364	0,00040	0,00063
CMD	0,28340	0,42821	0,00004	0,00002
COX	0,25312	0,25000	0,00034	0,00019
H4	0,22773	0,15679	0,00048	0,00044
H3	0,24689	0,36009	0,00021	0,00022
mtSSU	0,00000	0,00000	0,00000	0,00021

En la tabla 11 se muestran los valores obtenidos para las tasas de cambio, se observa que para la secuencia génica de la subunidad pequeña ribosomal (mtSSU) los valores de K1, K2 y Bij son 0 debido a que la microsecuencia no se encontraron transversiones, debido a esto se toma la decisión de no graficar estos datos ya que generan ruido en las gráficas.

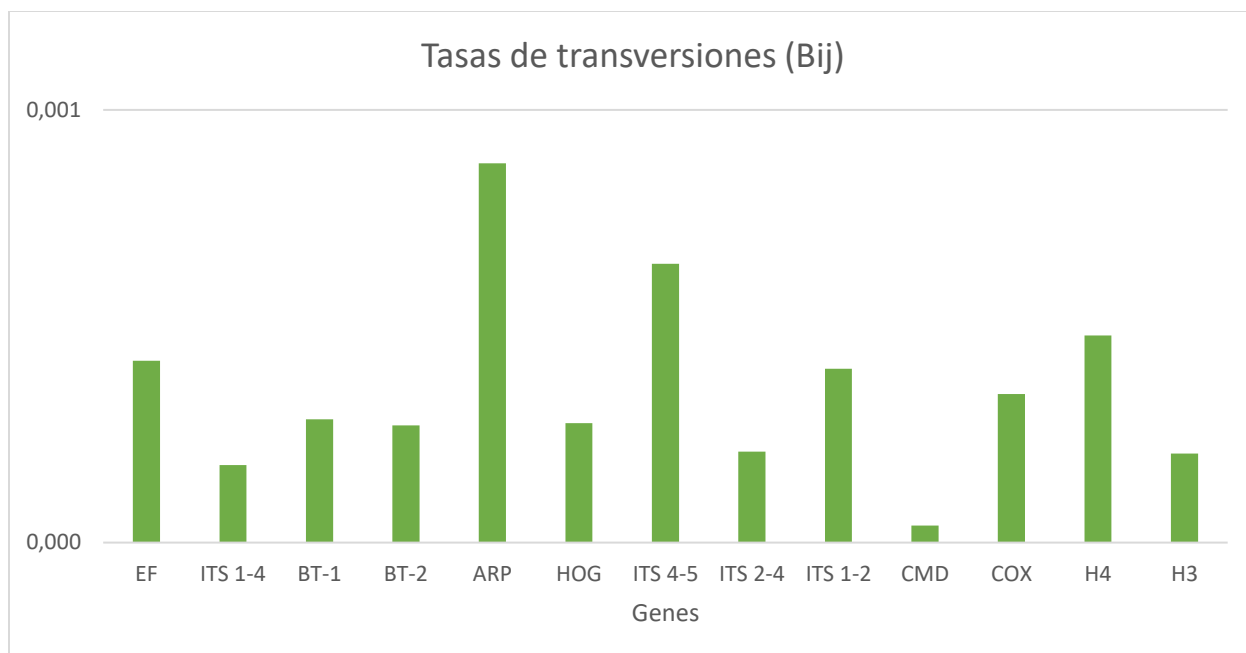
A partir de los valores mostrados en la tabla 11 se realizaron las respectivas graficas de cada tasa de cambio para 13 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.



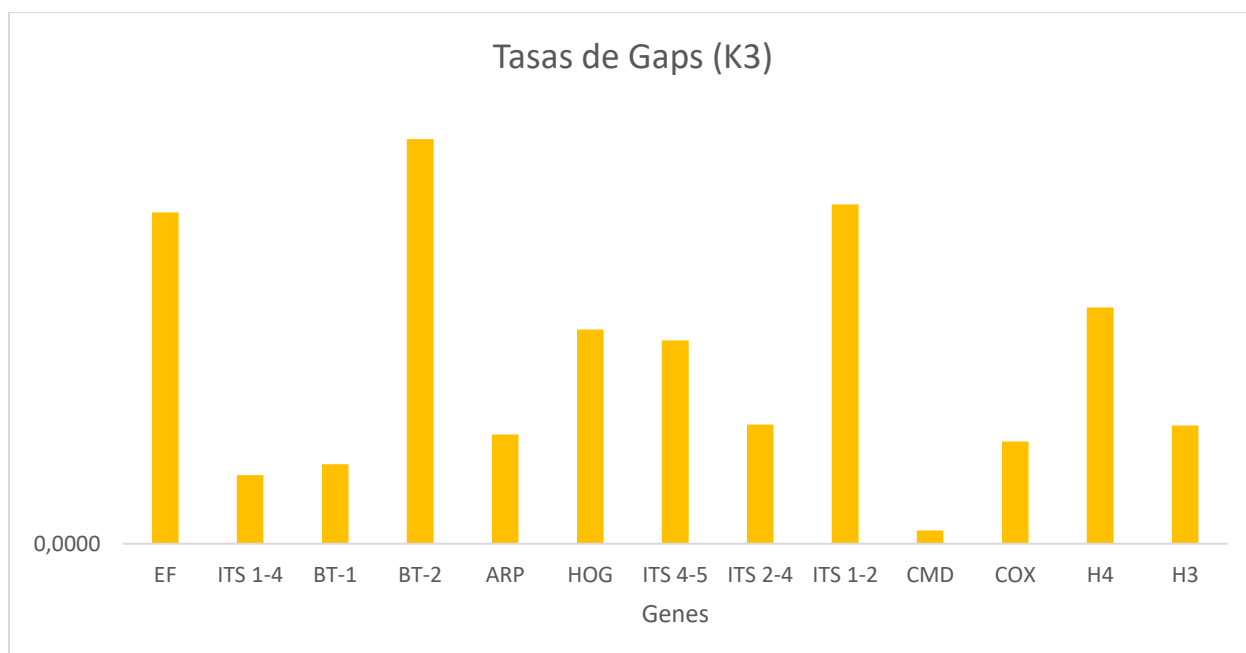
Grafica 31. Tasas de purinas vs transversiones (K1) para 13 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.



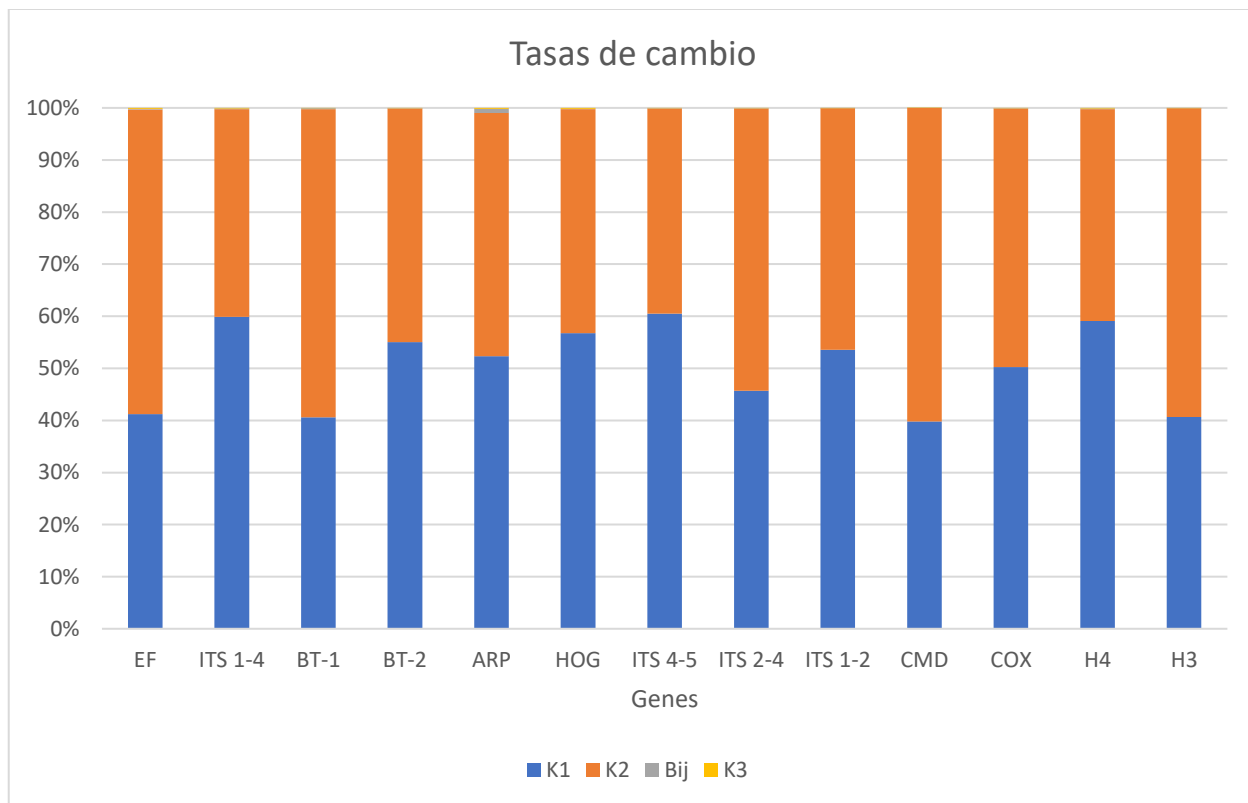
Grafica 32. Tasas pirimidina vs transversiones (K2) para 13 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.



Grafica 33. Tasas transversiones (Bij) para 13 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.



Grafica 34. Tasas Gaps (K3) para 13 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*. El valor máximo de la gráfica es 0,0008.



Grafica 35. Representación en grafica de barras de las tasas de cambio para 13 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.

En la gráfica 35 se observa que las tasas de cambio de las transiciones son mucho más altas que las tasas de transversiones y la tasa de los gaps, esto se puede observar a detalle en la tabla 11 donde se muestra los valores de las tasas para cada secuencia génica.

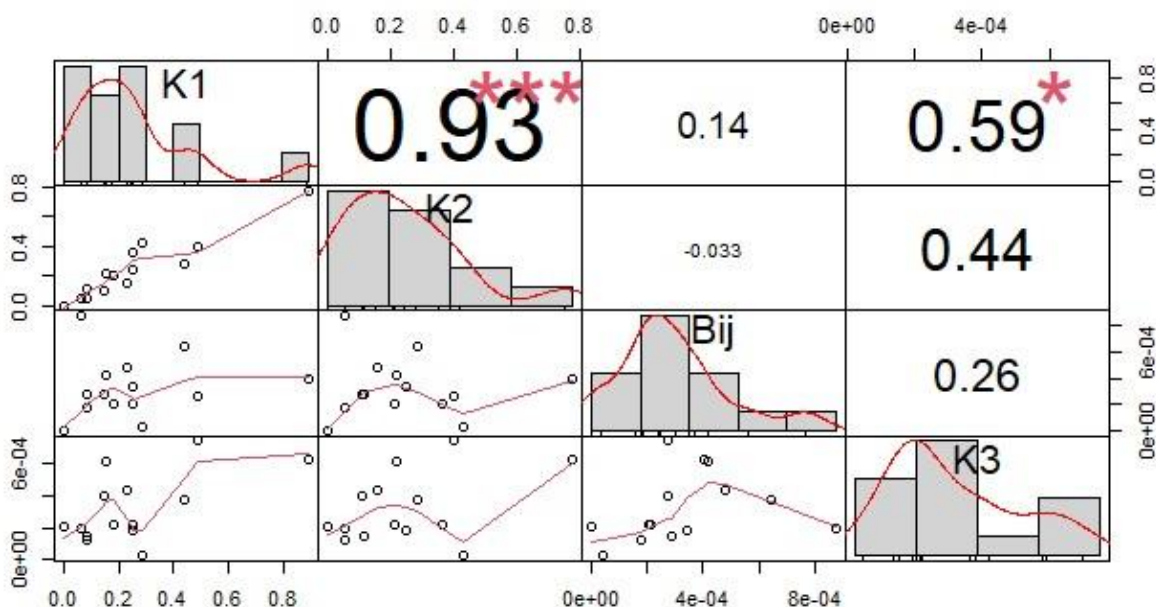


Figura 20. Resultados obtenidos de la correlación de Pearson para la tasa de transiciones, transversiones y gaps realizada en Rstudio® para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.

En la figura 20 se muestran las correlaciones para las tasas de cambio. Se resaltan 2 valores (valores con asterisco) que representan una correlación positiva significativa, estos casos son:

- Tasas purina-purina y tasas pirimidina - pirimidina, con un valor de significancia de 0,93.
- Tasas purina-purina y tasas de gaps, con un valor de significancia de 0,59.

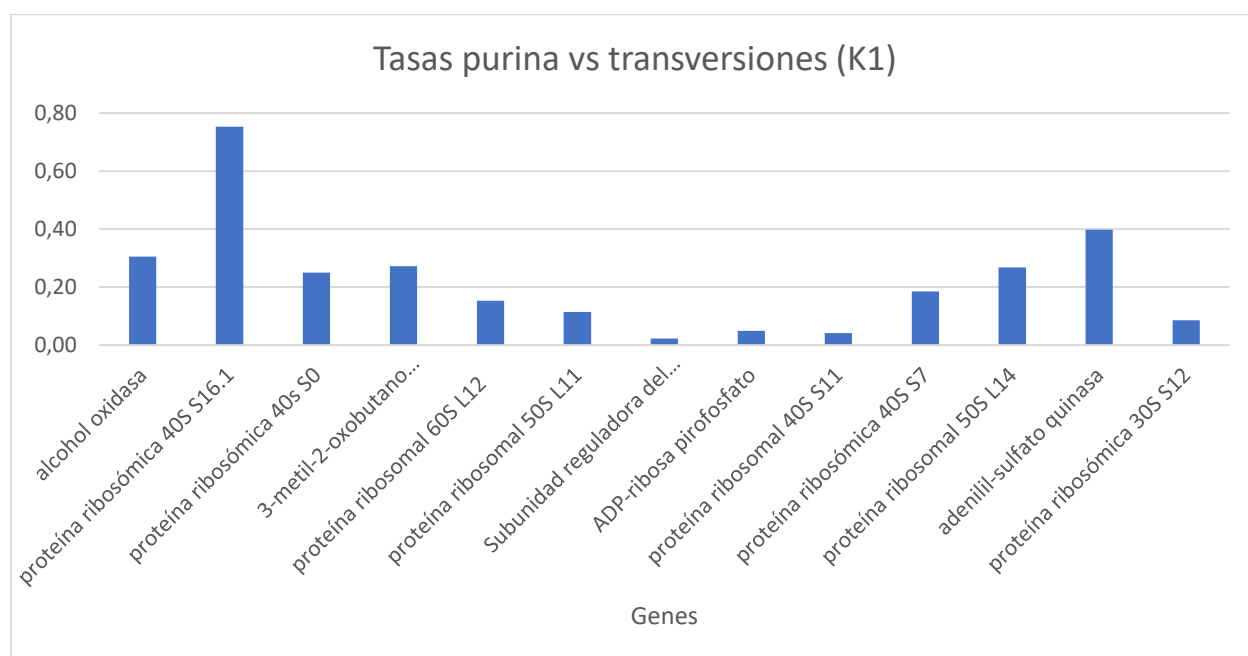
A continuación, en la tabla 12 se muestran los valores obtenidos para las tasas de cambio para 13 microsecuencias analizadas para 3 especies de *Fusarium*.

Tabla 12. Valores obtenidos para las tasas de purina vs purina (K1), pirimidina vs transversiones (K2), transversiones (Bij) y gaps (K3) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.

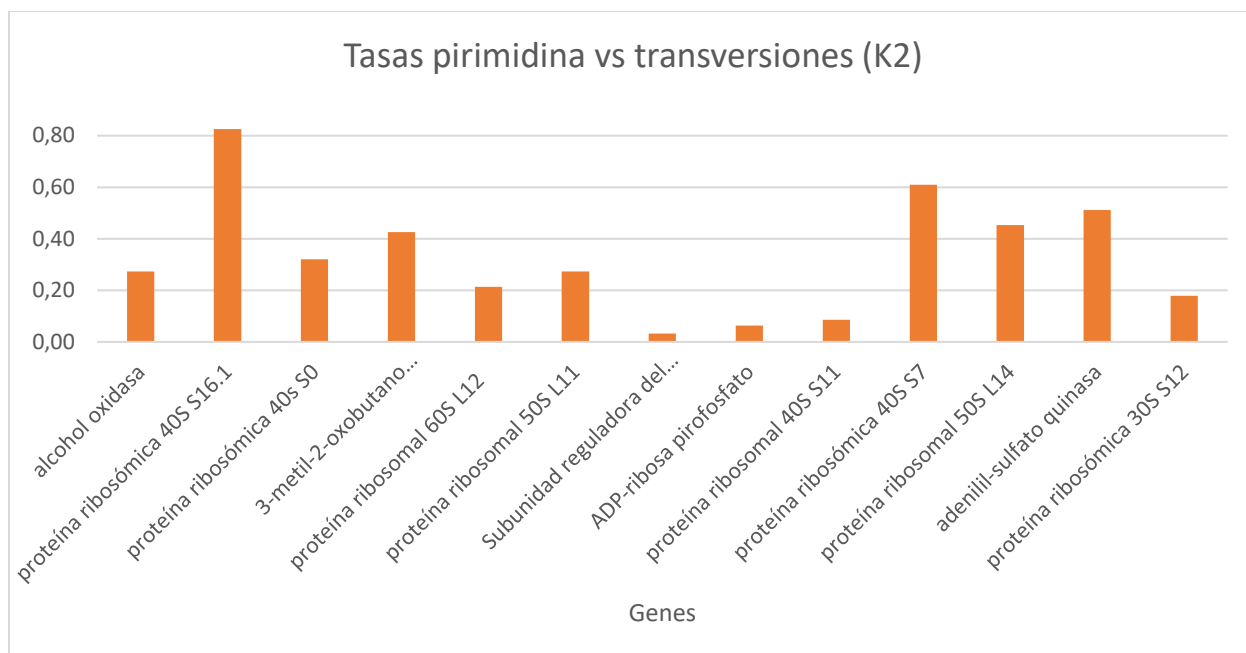
Genes	K1	K2	Bij	K3
alcohol oxidasa	0,30547	0,27354	0,00029	0,00052
proteína ribosómica 40S S16.1	0,75330	0,82524	0,00015	0,00157
proteína ribosómica 40s S0	0,25021	0,31987	0,00012	0,00035
3-metil-2-oxobutano hidroximetiltransferasa	0,27269	0,42587	0,00021	0,00017
proteína ribosomal 60S L12	0,15315	0,21400	0,00025	0,00112
proteína ribosomal 50S L11	0,11439	0,27292	0,00017	0,00009

Subunidad reguladora del proteosoma 26S 6B	0,02245	0,03187	0,00001	0,00000
ADP-ribosa pirofosfato	0,04878	0,06283	0,00018	0,00002
proteína ribosomal 40S S11	0,04139	0,08530	0,00008	0,00002
proteína ribosómica 40S S7	0,18461	0,60922	0,00038	0,00069
proteína ribosomal 50S L14	0,26726	0,45342	0,00034	0,00090
adenilil-sulfato quinasa	0,39830	0,51108	0,00022	0,00043
proteína ribosómica 30S S12	0,08617	0,17946	0,00008	0,00003

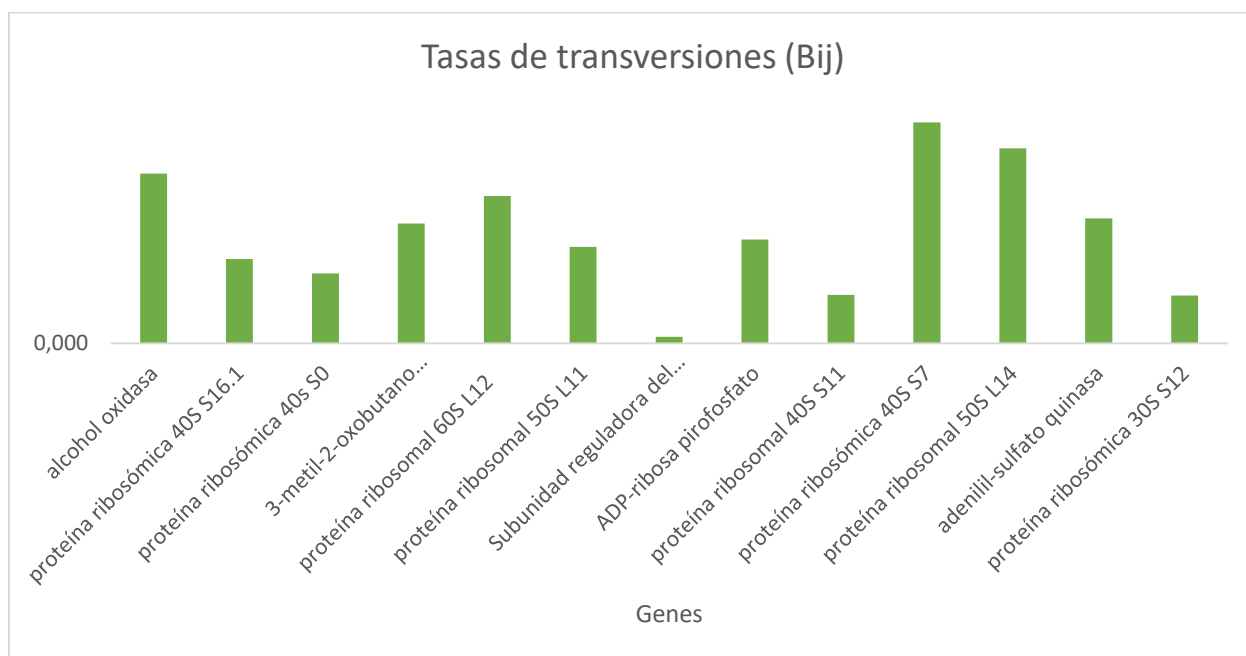
A partir de los valores mostrados anteriormente en la tabla 12 se realizaron las respectivas graficas.



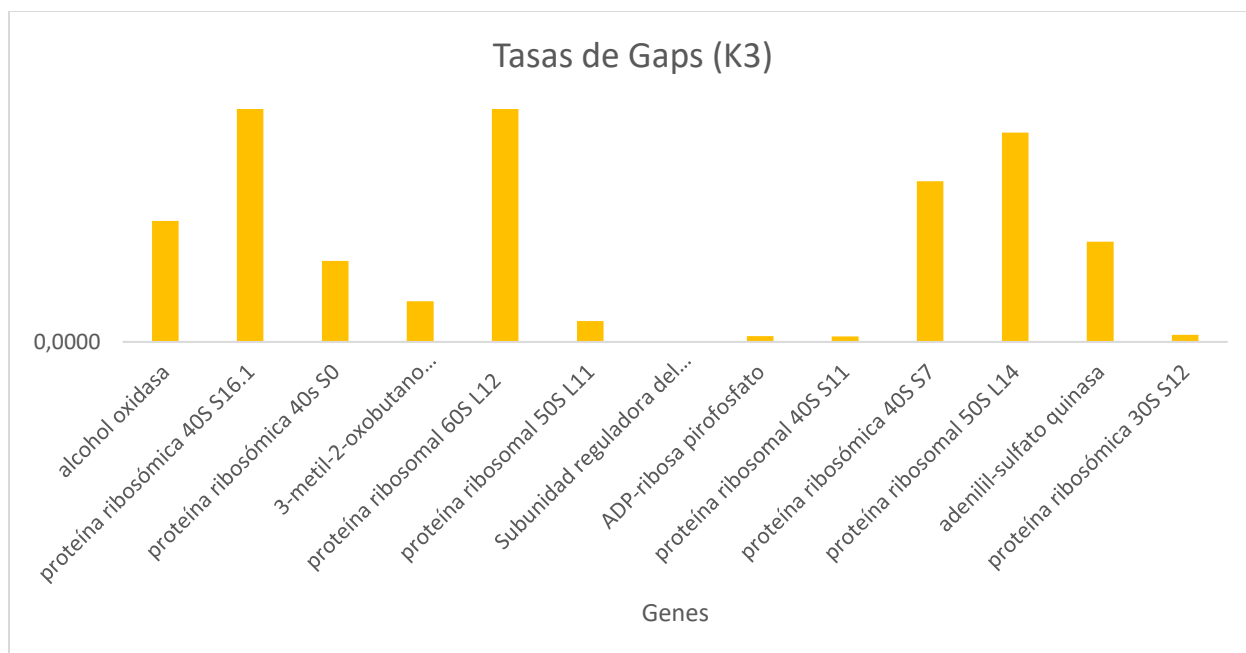
Grafica 36. Tasas de purinas vs transversiones (K1) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.



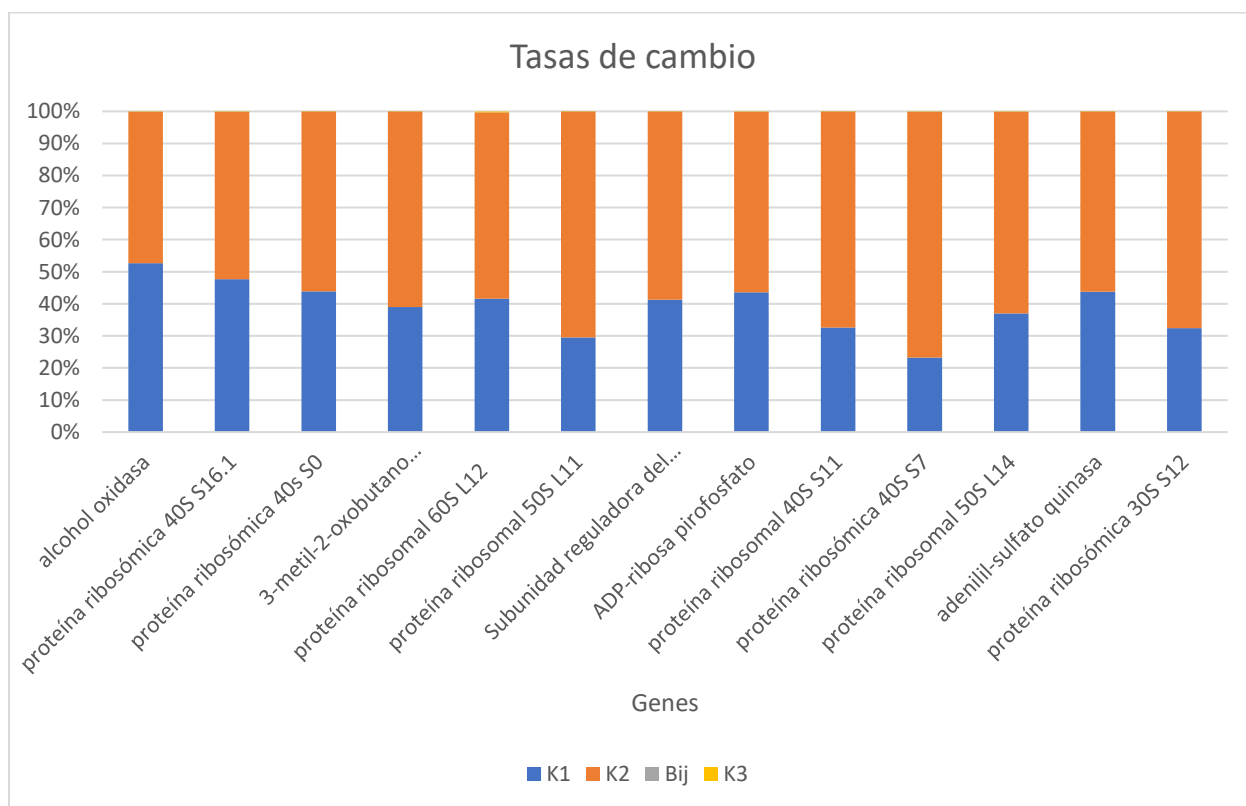
Grafica 37. Tasas de pirimidina vs transversiones (K2) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.



Grafica 38. Tasas de transversiones (Bij) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*. El valor máximo de la gráfica es 0,0008.



Grafica 38. Tasas de transversiones (Bij) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*. El valor máximo de la gráfica es 0,001.



Grafica 39. Tasas de gaps (K3) para 13 microsecuencias de 3 especies de *Fusarium*.

En la gráfica 39 se observa que las tasas de cambio de las transiciones son mucho más altas que las tasas de transversiones y la tasa de los gaps.

4.5.5 Proporciones iniciales de las frecuencias de todos los genes

Tabla 13. Proporciones iniciales obtenidas a partir de las frecuencias de 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*.

Genes	RP1	RP2	RQ	Rgap
EF	0,00082409	0,00157755	0,00282546	0,00412046
ITS 1-4	0,00040127	0,00032101	0,0016452	0,00116368
BT-1	0,00071225	0,00151947	0,00294397	0,00151947
BT-2	0,00105924	0,00149755	0,00153408	0,00423698
ARP	0,0034188	0,00394112	0,01153846	0,00265907
HOG	0,00082183	0,00120535	0,00252027	0,00361604
ITS 4-5	0,00088739	0,00168138	0,0028023	0,00163467
ITS 2-4	0,00058441	0,00073051	0,00149755	0,0015706
ITS 1-2	0,00105519	0,00179382	0,0016883	0,00263797
CMD	0,00127714	0,00152274	0,00063857	0,00039297
COX	0,00069976	0,00099965	0,0019993	0,00109962
H4	0,00153756	0,00180889	0,00361778	0,00330123
H3	0,00090498	0,00191051	0,00160885	0,0017094
mtSSU	0,00030309	0,0003637	0	0,00115172

4.5.6 Proporciones finales

Por último, la tabla 14 muestra las proporciones finales obtenidas a partir de la suma de las proporciones iniciales para los diferentes tipos de cambio.

Tabla 14. Proporciones finales de las sumas de las proporciones iniciales para 14 microsecuencias de 13 especies de *Fusarium*. Donde Rt1 corresponde a las proporciones de transiciones purina-purina, Rt2 proporciones de transiciones pirimidina -pirimidina, Rt3 transversiones y Rt4 gaps.

Genes	Rt1	Rt2	Rt3	Rt4
EF	0,007229219	0,01383879	0,09974811	0,220403023
ITS 1-4	0,009318182	0,00745455	0,15375	0,164772727
BT-1	0,008723404	0,01860993	0,14510638	0,113475177
BT-2	0,010429825	0,01474561	0,06078947	0,254385965
ARP	0,013004405	0,01499119	0,17662996	0,061674009
HOG	0,008255034	0,01210738	0,10187919	0,22147651
ITS 4-5	0,010386667	0,01968	0,132	0,116666667

ITS 2-4	0,010933333	0,01366667	0,11275	0,179166667
ITS 1-2	0,012058824	0,0205	0,07764706	0,183823529
CMD	0,027333333	0,03258974	0,055	0,051282051
COX	0,011958333	0,01708333	0,1375	0,114583333
H4	0,012281938	0,01444934	0,11629956	0,160792952
H3	0,012098361	0,02554098	0,08655738	0,139344262
mtSSU	0,013666667	0,0164	0	0,316666667

A partir de los valores obtenidos de realizaron las gráficas correspondientes para observar los patrones de cambio para cada microsecuencia. Las gráficas fueron agrupadas según la similitud en los patrones de cambio de las microsecuencias.

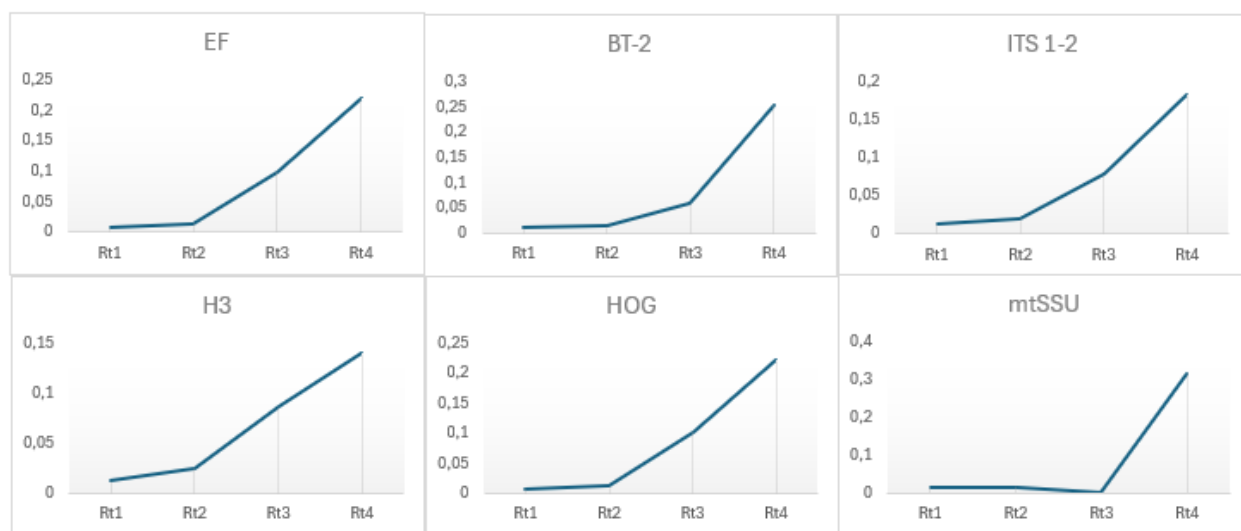


Figura 21. Proporciones acumuladas para los diferentes tipos de cambio.

Dónde: Rt1=transiciones purina-purina

Rt2= transiciones pirimidina-pirimidina

Rt3= transversiones

Rt4= Gaps

En la figura 21 se observan las proporciones acumuladas de 6 secuencias génicas con un patrón de cambio similar, en donde el Rt4 es el mayor valor para cada una.

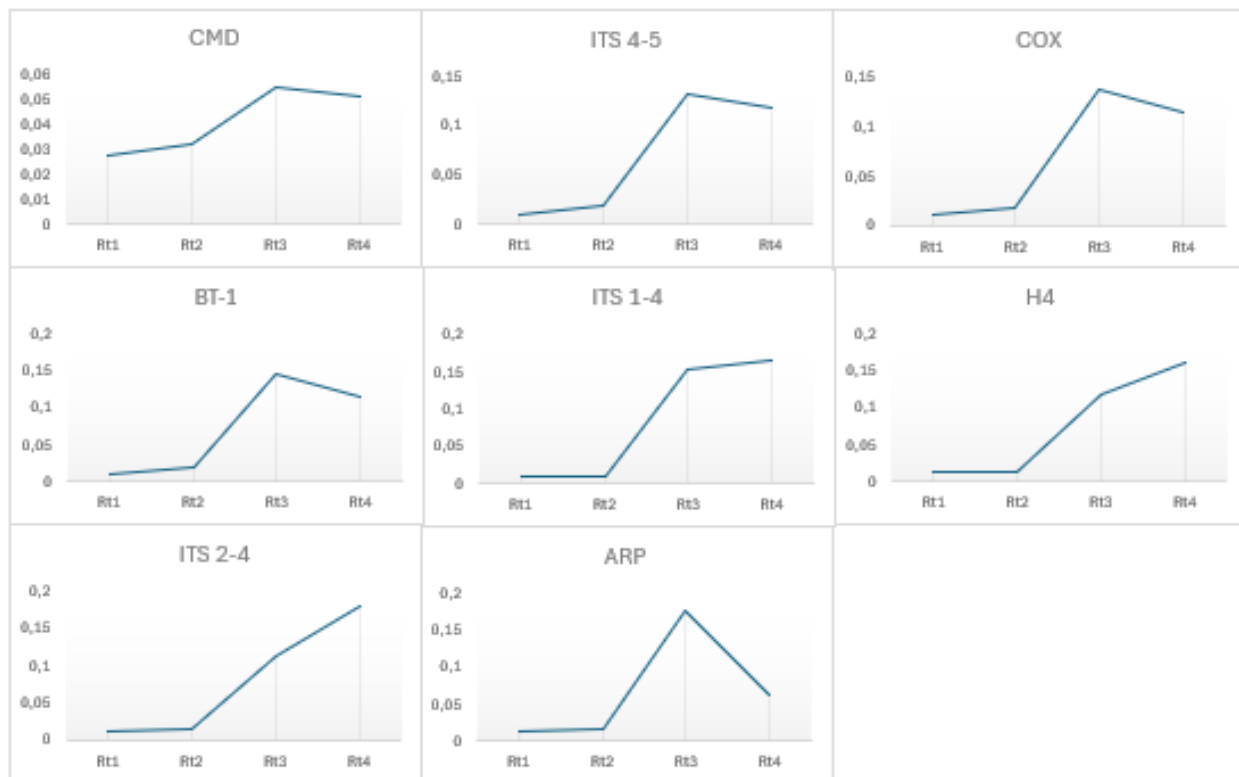


Figura 22. Proporciones acumuladas para los diferentes tipos de cambio.

4.6 Secuencias de comparación

A continuación, se muestran los géneros y genes usados para comprar entre sí y con el género *Fusarium*.

Tabla 11. Géneros, especies y genes usados para el análisis de las secuencias de comparación.

Géneros	Especies	Genes		
<i>Malassezia</i>	<i>M. sympodialis</i>	Calmodulina (CMD)	Factor de elongación (FE)	ITS
	<i>M. globosa</i>			
	<i>M. restricta</i>			
	<i>M. pachydermatis</i>			
<i>Falco</i>	<i>F. sparverius</i>	Citocromo oxidasa (COX1)	NADH deshidrogenasa 1 (ND1)	
	<i>F. tinnunculus</i>			
	<i>F. peregrinus</i>			
	<i>F. femoralis</i>			
	<i>F. cenchroides</i>			
	<i>F. longipennis</i>			
	<i>F. fasciinuca</i>			
<i>Drosophila</i>	<i>D. simulans</i>	Citocromo oxidasa (COX1)	NADH deshidrogenasa 2 (ND2)	
	<i>D. melanogaster</i>			

	<i>D. albomicans</i>		
	<i>D. formosana</i>		
	<i>D. incompacta</i>		
	<i>D. littoralis</i>		
	<i>D. mercatorum</i>		
	<i>D. yukaba</i>		
<i>Felis</i>	<i>F. nigripes</i>	Citocromo oxidasa (COX1)	Citocromo oxidasa 2 (COX2)
	<i>F. chatus</i>		
	<i>F. margarita</i>		
	<i>F. silvestris</i>		
	<i>F. chatus</i>		
<i>Aspergillus</i>	<i>A. homomorphus</i>	Citocromo oxidasa (COX1)	Histona 4 (H4)
	<i>A. japonicus</i>		
	<i>A. uvarum</i>		
	<i>A. aculeatinus</i>		
<i>Bacillus</i>	<i>B. anthracis</i>	ARN ribosomal 16S (RNA 16S)	ARN ribosómico 23S (RNA 23S)
	<i>B. thuringiensis</i>		
	<i>B. mycoides</i>		
	<i>B. cereus</i>		
	<i>B. pumilus</i>		
	<i>B. infantis</i>		
	<i>B. subtilis</i>		

Para los géneros anteriores se realizaron los mismos cálculos matemáticos con el fin de realizar una comparación entre sí y con el género *Fusarium*.

A continuación, se muestran las proporciones acumuladas de dichos géneros para cada secuencia génica.

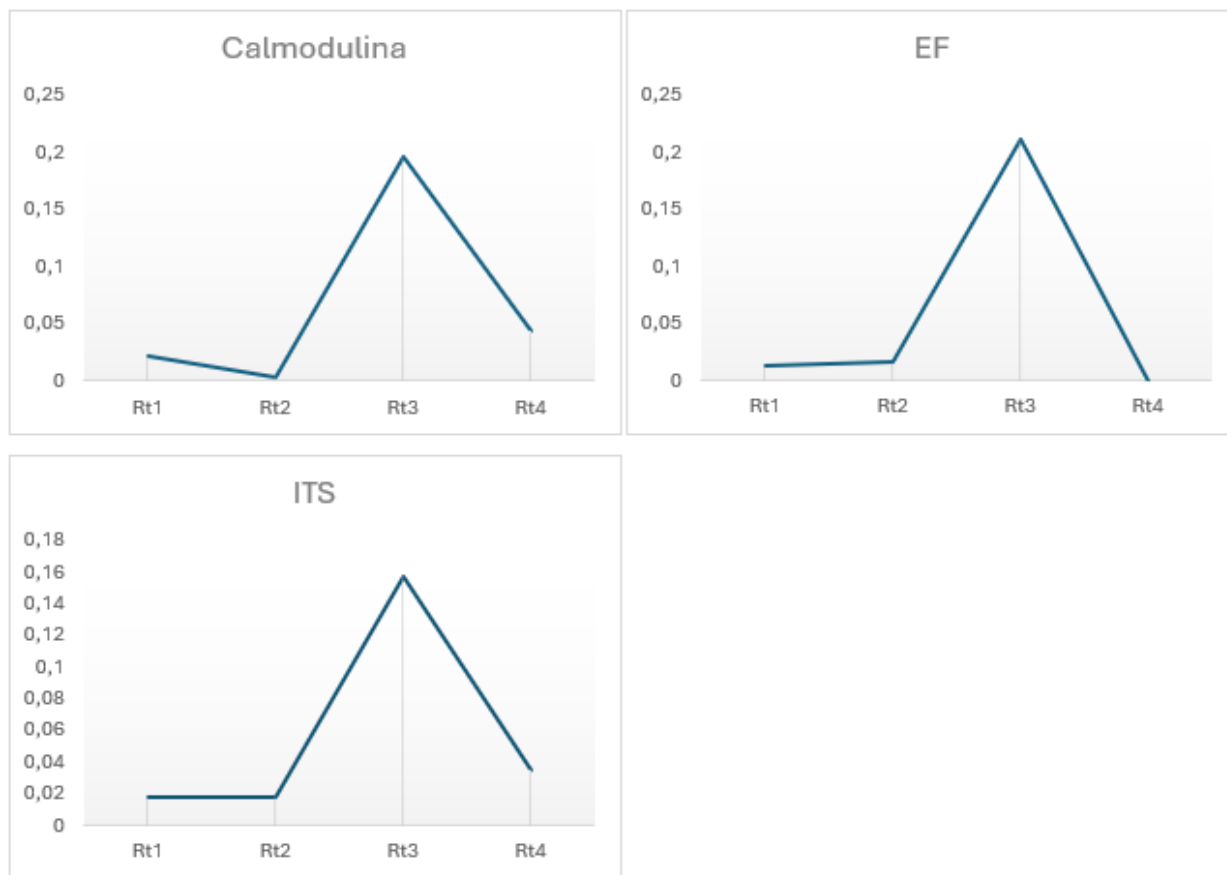


Figura 23. Proporciones acumuladas en las microsecuencias para el género *Malassezia*.

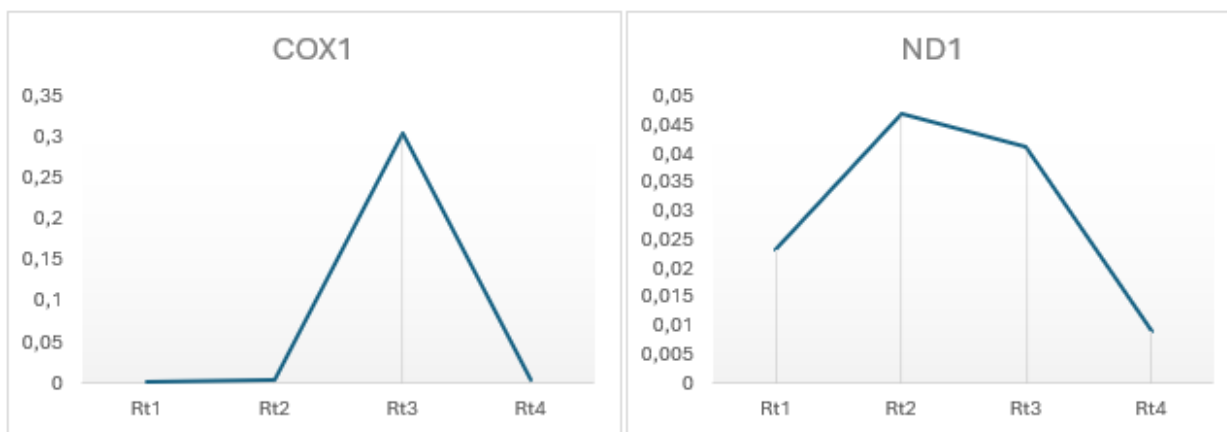


Figura 24. Proporciones acumuladas en las microsecuencias para el género *Falco*.

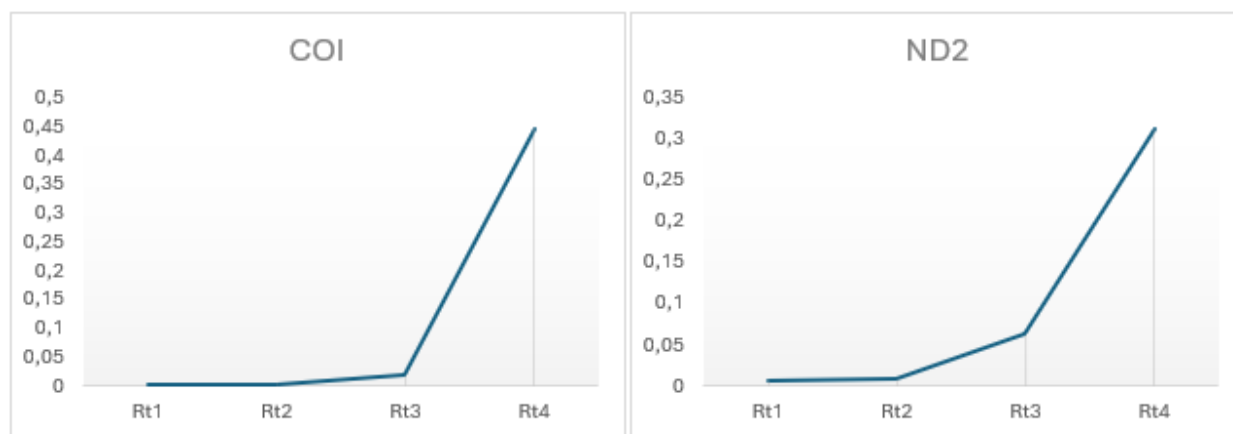


Figura 25. Proporciones acumuladas en las microsecuencias para el género *Drosophila*.

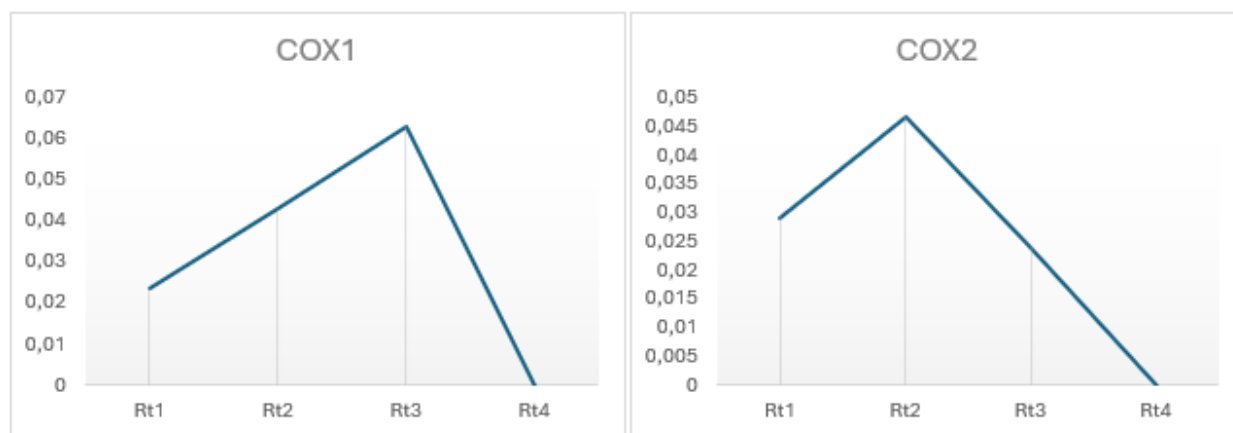


Figura 26. Proporciones acumuladas en las microsecuencias para el género *Felis*.

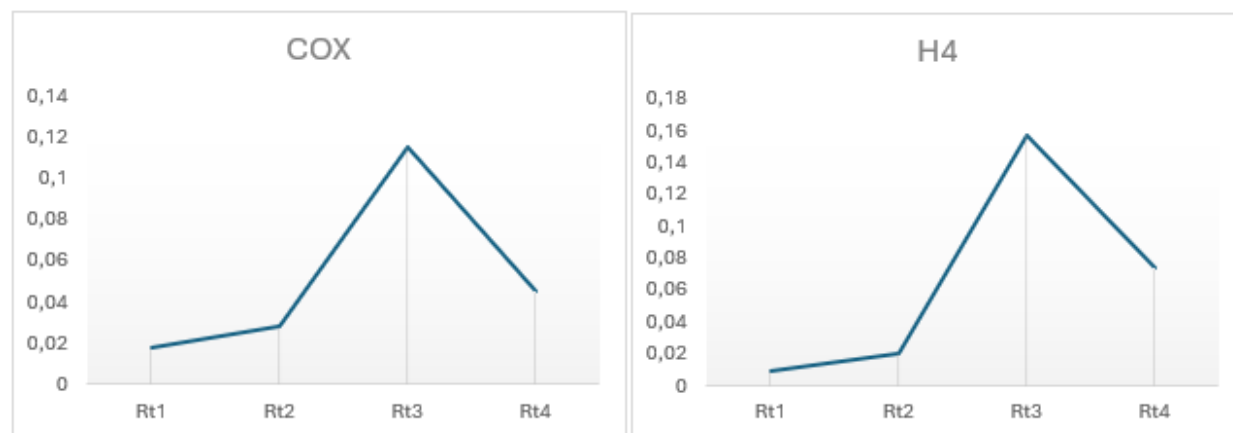


Figura 27. Proporciones acumuladas en las microsecuencias para el género *Aspergillus*.

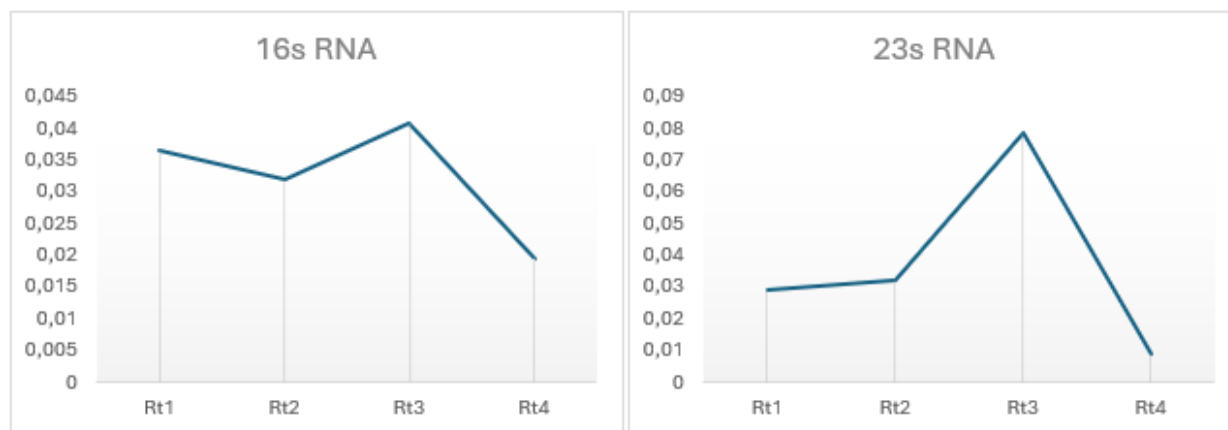


Figura 28. Proporciones acumuladas en las microsecuencias para el género *Bacillus*.

5 Discusión

Para realizar la comparación de las secuencias génicas y detectar homologías en las diferentes composiciones genéticas de los diferentes organismos analizados es necesario hacer uso de los genes compartidos en las diferentes especies, estos son los llamados genes ortólogos; ya que son los que evolucionan a partir de un ancestro en común, en donde su función se preserva, pero la similitud en las secuencias no (Grigoryev *et al.*, 2004; Fernández, 2012). Esto es debido a que los organismos son diferentes unos a otros y esa diferencia en las secuencias es debido al cambio en las bases nitrogenadas en el ADN. A esto se le conoce como variabilidad génica. Estos cambios en las bases nitrogenadas en el ADN se presentan como consecuencia a cambios o mutaciones que suceden “al azar” pero aun así suelen ser heredables (Meda *et al.*, 2011). Sin embargo, gracias a la ciencia se ha podido llegar a conocer y comprender mejor los diferentes fenómenos que ocurren a diario y a partir de esto se pueden establecer leyes que permiten conocer los efectos de los fenómenos físicos, con el fin de manejar dichas situaciones y obtener resultados deseados según lo que se está estudiando y analizando, además de poder predecir diferentes eventos biológicos, descartando la idea de que dichas mutaciones son “al azar” (Ramírez y Tello, 2006); y así poder conocer cómo evolucionan los diferentes genes en un grupo de organismos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo contradicen la teoría de que las mutaciones son al azar.

Uno de los problemas en la biología molecular es encontrar una asociación entre el número de purinas y el número de pirimidinas encontradas en una hebra individual de una secuencia génica, sin embargo, se han realizado estudios en secuencias conservadas para poder entender este problema (Nandy, 2009). En el presente trabajo, realizando un análisis con microsecuencias se puede observar una relación positiva entre la frecuencia de purinas y la frecuencia de pirimidinas mostrada en la Figura 18, también se observa en la gráfica de dispersión una dispersión estrecha ya que los puntos se encuentran más cercanos a la línea de tendencia. Esto sugiere una relación entre la frecuencia de purinas y la frecuencia de pirimidinas contenidas en las microsecuencias.

Adicional a lo anterior la gráfica 16 es un elemento útil para realizar estudios de filogenia molecular ya que a partir de estas se pueden observar las similitudes entre las diferentes secuencias génicas, contribuyendo así al estudio de la relación de la aparición de las cuatro bases nitrogenadas en hebras individuales (Nandy, 2023).

En la figura 21 y 22 se muestra que para el género *Fusarium* entre las microsecuencias de secuencias génicas analizadas existe un patrón de cambio similar. La mayoría de las secuencias génicas analizadas pertenecen a genes ribosomales, la explicación a estos patrones de cambio podría deberse a los varios factores evolutivos y genéticas que afectan a las secuencias. Se observó que estas microsecuencias varían entre la frecuencia de los nucleótidos, sin embargo, al ser ribosomales comparten características funcionales similares y así mismo es probable que las presiones selectivas para conservar ciertos patrones de nucleótidos sean similares (Ling *et al.*, 2019). Además de analizar genes ribosomales también se cuenta con genes que interactúan con proteínas reguladoras, como lo es el gen histidina quinasa (HOG), para este caso es probable que las presiones selectivas para conservar los patrones sean similares a los genes ribosomales debido a la evolución concertada, ya que esta implica que estos dos tipos de genes (ribosomales y proteínas reguladoras) evolucionan de manera coordinada, donde se intercambia información de secuencia entre ellos a lo largo del tiempo evolutivo (Julián, 2010; Jimenez, 2014).

Adicional a lo mencionado anteriormente, con los resultados obtenidos en el presente trabajo se demuestra que las microsecuencias son herramientas valiosas para los análisis genéticos que también pueden ser usadas para análisis taxonómicos. Cabe resaltar que estos análisis con microsecuencias de genes ortólogos genera análisis menos vulnerables a diferentes fenómenos como se explica en el trabajo de Rincón, 2014. Además de esto se ha demostrado que las microsecuencias son herramientas importantes y útiles para resolver problemas de filogenia molecular y clasificación taxonómica en *Fusarium*, ya que estas eliminan homoplasias y reducen los errores de la clasificación taxonómica (Rincón, 2014).

A partir de los análisis con microsecuencias también se demuestra la forma de evolución y variabilidad genética de las diferentes especies del género *Fusarium* y para otro tipo de organismos, esto se puede observar en las gráficas de las proporciones finales tanto en *Fusarium* como en los diferentes géneros usados para la comparación, en donde se muestra un patrón de cambio en la variabilidad genética. En el caso de *Fusarium* se muestra una mayor proporción en la variabilidad en las transversiones y gaps (inserciones o deleciones), eso quiere decir que para la mayoría de los genes usados la mayor variabilidad es presentada en transversiones y deleciones o inserciones. Estos análisis podrían dar una explicación de la adaptación evolutiva y la respuesta a factores ambientales de este género, y así mismo ayudar con la clasificación taxonómica del género ya que dentro del género *Fusarium* existen especies con complejos de especies, variedades y formas especiales haciendo esto una complejidad con la identificación precisa de las especies de *Fusarium*.

Por otro lado, se podría entender estos cambios por medio de las leyes de la termodinámica; en los últimos años se ha propuesto la teoría de que los diferentes sistemas termodinámicos evolucionan hacia estados de menor energía y así mismo esto contribuye a la entropía del universo. Comparado a esto, se tiene la evolución de los sistemas biológicos explicado por la evolución biológica, sin embargo, esta no incluye los principios de la termodinámica. Por lo que a través de los años se ha venido desarrollando una teoría termodinámica de la evolución biológica debido a que los organismos biológicos se rigen por las leyes termodinámicas y se esperaría que estos sigan la misma evolución, pero debido a que los sistemas son tan complejos se explicaron por medio de la teoría de la evolución (Rabanal, 2019).

Existe una hipótesis basada en la segunda ley de la termodinámica y el principio de mínima acción, en esta se incluye el concepto EDGE (eficiencia en la degradación de gradientes energéticos), donde este es la velocidad de transformación de sistemas abiertos con energía de potencial alta de sus alrededores en sistemas abiertos con menor energía potencial. De acuerdo con esta hipótesis es posible afirmar que el tiempo que le tomaría a un organismo en evolucionar es el mínimo. Esto es relacionado con el surgimiento de resistencia a los antimicrobianos y la presencia de regiones de ADN no codificantes. Por lo que esta presencia de ADN no codificante podría ser una ventaja evolutiva, ya que puede llevar a una mayor probabilidad de adquirir una mayor capacidad de degradar gradientes energéticos a futuro.

6 Conclusiones

Con base en los resultados se puede concluir que el análisis bioinformático de las microsecuencias de genes ortólogos para el género *Fusarium* es una herramienta eficiente para identificar y analizar patrones en la variabilidad y evolución genética. Este trabajo muestra que las microsecuencias proporcionan información detallada de la diversidad genética dentro de *Fusarium*.

Los análisis matemáticos como el cálculo de las frecuencias, proporciones y tasas facilitan la comparación entre especies y genes ortólogos, permitiendo identificar patrones en la variabilidad genética. Lo que ayuda a la mejora de la clasificación taxonómica y así mismo comprender la evolución y la adaptación de *Fusarium*.

Adicional, estos análisis podrían contribuir a la construcción de modelos que predicen cómo las secuencias pueden cambiar con el tiempo.

Finalmente, estos resultados pueden ser utilizados para el desarrollo de métodos más precisos para el diagnóstico y control de enfermedades causadas por *Fusarium*, mejorando así la productividad agrícola.

7 Referencias bibliográficas

1. Arbelaez, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía colombiana*, 17(1-3), pp. 11-16. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21538>
2. Baldwin, B. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae., 1(1), pp. 3-16. Disponible en: [10.1016/1055-7903\(92\)90030-K](https://doi.org/10.1016/1055-7903(92)90030-K)
3. Benadof, D. (2010). *Fusarium* especie. *Revista chilena de infectología*, 27(4), pp. 327-328. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182010000500007>
4. Carpenter, J. (1999). Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in Hymenoptera. *Zoologica Scripta*, 28(1-2), pp. 251-260.
5. Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina, 118, pp. 20. Disponible en: <https://acortar.link/kr5krB>
6. Desjardins, A. (2006). *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology*. American Phytopathological Society (APS Press).
7. Efron, B., Halloran, E., & Holmes, S. (1996). Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(14), pp. 7085-7090.
8. Escobar, C., Murillo, L., & Soto, J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et technica*, 3(49), pp. 116-121. Disponible en: <https://doi.org/10.22517/23447214.1491>
9. Fernández, M. (2012). *Herramientas computacionales para la comparación de genomas y detección de genes ortólogos con un enfoque de grafo bipartido* (Doctoral dissertation, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Facultad de Matemática, Física y Computación. Departamento de Computación). Disponible en: <http://dspace.uclv.edu.cu:8089/handle/123456789/8609>
10. Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., & Blaxter, M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular ecology*, 11(4), pp. 839-850.
11. Guadet, J., Julien, J., Lafely, J., & Brygoo, Y. (1989). Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large subunit rRNA sequence comparison. *Molecular Biology and Evolution*, 6(3), pp. 227-242.
12. Grigoryev, D., Ma, S., Irizarry, R., Ye, S., Quackenbush, J., & Garcia, J. (2004). Orthologous gene-expression profiling in multi-species models: search for candidate genes. *Genome Biology*. 5(5), pp. 34. Disponible en: [10.1186/gb-2004-5-5-r34](https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-5-r34)
13. Hennequin, C., Laverde, V., Poirot, J., Rabodonirina, M., Datrys, A., Aractingi, J., Dupouy, J., Caillot, D., Granja, F., Kures, L., Morin, O., Lebeau, B., Bretaña, S., Guiden, C., & Grillot, R. (1997). Invasive *Fusarium* infections: a retrospective survey of 31 cases. *Medical Mycology*, 35(2), pp. 107-114.
14. Herron, D., Wingfield, M., Wingfield, B., Rodas, C., Marincowitz, S., & Steenkamp, E. (2015). Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from Pinus spp. *Studies in mycology*. 80, pp. 131-150. Disponible en: [10.1016/j.simyco.2014.12.001](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.001)

15. Holmes, S. (2003). Bootstrapping phylogenetic trees: theory and methods. *Statistical Science*, 18(2), pp. 241-255.
16. Jara, J., & Saquipay, N. (2023). Evaluación y comparación de técnicas bioinformáticas para el análisis de expresión diferencial en NGS. *Tesis de pregrado*.
17. Jimenez, A. (2014). Analisis estructural y funcional de la proteína ribosomica L19e en *Saccharomyces cerevisiae*. *Tesis Doctoral*.
18. Jukes, T., & Cantor, C. (1969). Evolution of Protein Molecules. *Mammalian protein metabolism*. 3, pp. 21-132. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7>
19. Julián, P. (2010). Caracterización estructural de complejos ribosomales de iniciación y de pre-translocación mediante microscopia electrónica. *Tesis Doctoral*.
20. Keith, E. (2010). The Jukes-Cantor Model of Molecular Evolution, 20(5), pp. 438-445. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10511970903487705>
21. Kim, J., Lee, Y., & Yu, S. (1995). Sambutoxin-producing isolates of *Fusarium* species and occurrence of sambutoxin in rotten potato tubers. Disponible en: [10.1128/aem.61.10.3750-3751.1995](https://doi.org/10.1128/aem.61.10.3750-3751.1995)
22. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16(2), pp. 111-120. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
23. Leslie, J., & Summerell, B. (2008). The *Fusarium* laboratory manual. *John Wiley & Sons*. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Yu3cBAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&dq=The+Fusarium+laboratory+manual&ots=3L294PQj0p&sig=l-Xs5qhchpIK1HZwK2HQWyu3OuU#v=onepage&q=The%20Fusarium%20laboratory%20manual&f=false>
24. Ling, X., Zhaobin, D., Lu, F., Yongjiang, L., Zhaoyuan, W., Hailong, G., Guoqing, Z., Yong Q, G., Coleman, D., Qingyou, X., & Yi, W. (2019). OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Research*. 47, pp. 52–58. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz333>
25. Meda, B., Perez, A., & Parada, M. (2011). Polimorfismos de ADN y huella genética. *Biología molecular*, pp. 171-180. Disponible en: https://www.academia.edu/41719202/Fundamentos_y_aplicaciones_en_las_ciencias_de_la_salud_BIOLOG%C3%8DA_MOLECULAR?auto=citations&from=cover_page
26. Nandy A (2009) Empirical Relationship between Intra-Purine and Intra-Pyrimidine Differences in Conserved Gene Sequences. *PLoS ONE*, 4(8). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006829>
27. Nei, M. (1996). Análisis filogenético en genética evolutiva molecular. *Revisión anual de genética*, 30(1), pp. 371-403.

28. Nelson, P., Dignani, M., & Anaissie, E. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical microbiology reviews*, 7(4), pp. 479-504. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/CMR.7.4.479>
29. Nicolaisen, M., Justesen, A., Thrane, U., Skouboe, P., & Holmstrøm, K. (2005). An oligonucleotide microarray for the identification and differentiation of trichothecene producing and non-producing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *Journal of Microbiological Methods*, 62(1), pp. 57-69.
30. O'Meara, B. (2012). Inferencias evolutivas de filogenias: una revisión de métodos. *Revisión anual de ecología, evolución y sistemática*, 43, pp. 267-285.
31. Pagel, M. (1999). Inferir los patrones históricos de la evolución biológica. *Nature*, 401(6756), pp. 877-884.
32. Rabanal, J. (2019). Contribución a la teoría termodinámica de la evolución biológica. *Momento*, (58), pp. 35-45. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/mo.n58.66345>
33. Ramírez, J. & Tello, C. (2006). Termodinámica y evolución biológica, ¿amigos o enemigos?. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Jesus-Mora-Ramirez/publication/257237034_Thermodynamics_and_Organic_Evolution_friends_or_enemies/links/00b49524b0cf37a56c000000/Thermodynamics-and-Organic-Evolution-friends-or-enemies.pdf
34. Rincón, C. (2014). Modelos de evaluación para resolver problemas de filogenia molecular en el género *Fusarium*, basado en los análisis de microsecuencias de ADN de multilocus conservados. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/75190>
35. Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), pp. 406-425.
36. Schroers, H., O'Donnell, K., Lamprecht, S., Kammeyer, P., Johnson, S., Sutton, D., & Summerbell, R. (2009). Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia*, 101(1), pp. 44-70.
37. Shewaramani, S. (2015). Effects of aerobic and anaerobic environments on bacterial mutation rates and mutation spectra assessed by whole genome analyses. Disponible en: [10.13140/RG.2.1.1979.5600](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1979.5600)
38. Skovgaard, K., Rosendahl, S., O'Donnell, K., & Nirenberg, H. I. (2003). *Fusarium commune* is a new species identified by morphological and molecular phylogenetic data. *Mycologia*, 95(4), pp. 630-636. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833067>
39. Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G., Grimont, P., Kämpfer, P., Maiden, M. C., & Whitman, W. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), pp. 1043-1047.
40. Stocco, M., Lampugnani, G., Abramoff, C., Zuluaga, M., Stenglein, S., Acciaresi, H., & Mónaco, C. (2018). *Fusarium oxysporum*, potencial agente de control biológico para

- Sorghum halepense en Argentina. *Revista de la facultad de Agronomía, La Plata*, 117(1), pp. 61-67. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/102690>
41. Summerell, B. (2019). Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. *Annual Review of Phytopathology*, 57, pp. 323-339. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100204>
 42. Summerell, Brett & Laurence, Matthew & Liew, E.C.Y. & Leslie, John. (2010). Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: A review. *Fungal Divers.* 44(1), pp. 3-13. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-010-0060-2>
 43. Snyder, W., & Hansen, H. (1945). The Species Concept in *Fusarium* with Reference to Discolor and Other Sections. *American Journal of Botany*, 32(10), pp. 657-666.
 44. Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30), pp. 11030-11035.
 45. Tinaut, A., & Ruano, F. (2017). Capítulo 17: Biodiversidad, Clasificación y Filogenia. *Sistemática y Filogenética*, pp. 293-306.
 46. Torres, G. A. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Universidad Nacional de Colombia, *Agronomía colombiana*, 17(1-3), pp. 11-16. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/34305>
 47. Verli, H. (2014). Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular. Disponible en: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/166105/001012172.pdf?sequence=1>
 48. Woese, C. (2000). Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), pp. 8392-8396.
 49. Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature reviews genetics*, 13(5), pp. 303-314.