



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO FUNCIONAL DEL GEN *NTH1* QUE
CODIFICA LA TREHALASA NEUTRA EN EL HONGO
FITOPATÓGENO *Ustilago maydis*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ALONSO LÓPEZ CABRERA

DIRIGIDA POR

DR. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2015.

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO FUNCIONAL DEL GEN *NTH1* QUE CODIFICA LA
TREHALASA NEUTRA EN EL HONGO FITOPATÓGENO
Ustilago maydis”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ALONSO LÓPEZ CABRERA

DIRIGIDA POR

Dr. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ

SINODALES

Dr. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ
DIRECTOR

Dr. ALDO AMARO REYES
ASESOR INTERNO

Dr. EDGARDO ULISES ESQUIVEL NARANJO
SINODAL

Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR
SINODAL

“Las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma.”

—Julio Cortázar

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyarme en este proceso, en especial a mi mamá, a Daniela y David. A mis amigos “los matemáticos” Angelush, la Maldita, el Venao, la Wera, Cabral, Ale y el Toño. A mis amigos de la licenciatura Isaac, Pokemon, las Luna Nueva. A mis compañeros de laboratorio Edda, Eve, Panchis, la Nirvana wee.

Quiero dejar plasmado en estas letras la gratitud que le tengo al Dr. Antonio por ser tan paciente, al Dr. Ulises por todos sus consejos y correcciones, al Dr. Aldo por su apoyo en el proceso y al Dr. Ramiro.

Por ultimo pero no menos importante quiero dar gracias al Promep. Por la beca otorgada, proyecto número: UAQ-PTC-227 Promep 103.5/13/7028 y a CONACyT con el proyecto CB-2011-01; clave 165844. Al Dr. Horacio Guzmán e I.I. Isela Flores del INIFAP Bajío por permitirnos utilizar su HPLC.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 La trehalosa	1
1.1.1 Funciones de la trehalosa	2
1.1.2 Metabolismo de la trehalosa	3
1.1.2.1 Anabolismo de la trehalosa	3
1.1.2.2 Catabolismo de la trehalosa	3
1.2 Función de la trehalosa en hongos	5
1.3 <i>Ustilago maydis</i>	7
1.3.1 Ciclo de vida de <i>U. maydis</i>	7
1.4 Justificación	9
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 General	11
3.2 Específicos	11
4. METODOLOGÍA	12
4.1 Materiales	12
4.1.1 Material biológico	12
4.2 Métodos	12
4.2.1 Curvas de crecimiento y ensayos de estrés	12
4.2.2 Secreción de polisacáridos	13
4.2.3 Reacción de apareamiento prueba de “Fuzz”	13
4.2.4 Cuantificación de trehalosa	14
4.2.5 Extracción de ADN	15
4.2.6 Extracción de ARN	15

4.2.7 Amplificación de ADN	16
4.2.8 Síntesis de ADNc	17
4.2.9 Crecimiento en forma de hifa	18
4.2.10 Pruebas de patogenicidad	18
5. RESULTADOS	20
5.1 Ruta de síntesis y degradación de trehalosa propuesta para <i>U. maydis</i>	20
5.2 Identificación el gen <i>UmNTH1</i>	21
5.4 Confirmación de las mutantes $\Delta nth1$ por RT-PCR	23
5.5 Cuantificación de trehalosa	24
5.5.2 Acumulación intracelular de trehalosa en respuesta a estrés oxidativo	26
5.6 Análisis fenotípico de las mutantes $\Delta nth1$	27
5.6.1 Curvas de crecimiento	27
5.6.2 Ensayos de respuesta a condiciones de estrés	27
5.7 Secreción de Polisacáridos	31
5.8 Reacción de apareamiento prueba de “Fuzz”	32
5.9 Crecimiento en forma de hifa	33
5.10 Expresión del gen <i>UmNTH1</i>	35
5.11 Pruebas de patogenicidad	36
6. DISCUSIÓN	39
6.1Perspectivas	42
7. CONCLUSIONES	44
8. BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tabla de cebadores utilizados	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema en forma de silla de la trehalosa	2
2	Estructura tridimensional de la trehalasa neutra Nth1 <i>S. cerevisiae</i>	5
3	Ciclo de vida en <i>U. maydis</i>	8
4	Metabolismo de la trehalosa propuesto en <i>Ustilago maydis</i>	20
5	Dendograma de alineamiento	21
6	Alineamiento de secuencias UmNth1 de hongos	22
7	Confirmación de mutantes Δ nth1 por RT-PCR	24
8	Cromatograma de estándar de trehalosa	25
9	Cuantificación intracelular de trehalosa por HPLC	26
10	Curvas de crecimiento de las cepas Δ nth1 contra silvestre	29
11	Respuesta a condiciones de estrés	30
12	Secreción de polisacáridos	31
13	Peso seco polisacárido	32
14	Reacción de apareamiento entre cepas de <i>U. maydis</i>	33
15	Crecimiento en forma de hifa	34
16	RT-PCR estrés osmótico	35
17	RT-PCR estrés oxidativo	36
18	Gráficas de ensayo de patogenicidad	37
19	Ensayos de infección en plantas	37
20	Sintomatología en ensayos de patogenicidad	38

RESUMEN

La trehalosa es un disacárido no reductor (α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosido) comúnmente presente en plantas, bacterias, insectos y hongos. Este disacárido cumple la función de reserva de energía, crioprotector, osmoprotector, termoprotector y así mismo brinda protección contra especies reactivas de oxígeno. Todas estas cualidades se deben a que la trehalosa se le ha considerado como una chaperona protegiendo la integridad de los biopolímeros que forman a la célula, principalmente aquellos presentes en la membrana celular. El metabolismo de la trehalosa está centrado en las enzimas trehalosa-6-fosfato sintasa, trehalosa-6-fosfato fosfatasa, para su síntesis y las trehalasas ácidas o neutras para su hidrólisis. En este trabajo nos centramos en estudiar qué papel tiene la posible acumulación endógena de la trehalosa en el hongo fitopatógeno de maíz *Ustilago maydis*, considerando la importancia de este proceso en hongos patógeno de humanos como es el caso de *Candida albicans* y de los escasos estudios realizados en hongos fitopatógenos como *Magnaporthe grisea* y *Botrytis cinerea*. Para ello se estudió las respuestas fisiológicas del hongo ante condiciones de estrés posterior a la eliminación del gen que codifica la trehalasa neutra Nth1 (Um11661.2.) en *U. maydis*, se cuantificó por HPLC la concentración intracelular de trehalosa en estrés oxidativo, del fitopatógeno, así mismo su relación al fenómeno de la virulencia en plantas y en el dimorfismo. Se comprobó que las cepas mutantes son más virulentas en plantas de maíz, en comparación a las cepas parentales, *in vitro* las mutantes fueron más resistentes a condiciones reductoras, de estrés de pared y estrés oxidante. La concentración intracelular de trehalosa fue mayor en las mutantes comparadas a las silvestres, tanto estrés oxidativo y en condiciones normales de laboratorio.

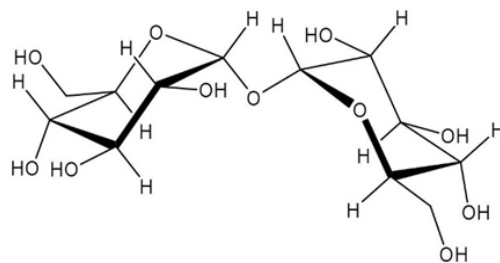
1. ANTECEDENTES

1.1 La trehalosa

Los primeros registros indirectos relacionados con la posible función de la trehalosa se encontraron en el cornezuelo, un hongo fitopatógeno del arroz y de otros cereales, que afectó los cultivos en la antigüedad quedando el dato histórico registrado en la literatura griega y en la biblia. En 1832 H. A. L. Wiggers estudió la composición química del cornezuelo, concluyendo que está mayoritariamente compuesto por algún tipo de azúcar. En el año de 1858 M. Berthelot encontró el mismo azúcar descrito por Wiggers en el capullo del coleóptero *Larinus maculata* llamado comúnmente trehala, el cual era utilizado con propósitos medicinales en la antigua Persia y es por esta razón Berthelot decidió llamar trehalosa a dicho carbohidrato (Teramoto y col., 2008). La trehalosa (α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor, compuesto de dos moléculas de glucosa unidas por un enlace glucosídico (Figura 1).

El isómero α , α de la trehalosa que se encuentra en la naturaleza es el de mayor abundancia, sin embargo, existe los isómeros α , β y β , β que han sido sintetizados por procesos químicos. El isómero α , α fue dilucidado por cristalografía de rayos X en el año 1972 por Taga y col (1972) se sabe que este isómero es el de menor energía estérica y por ende es más estable que los isómeros α , β y β , β (Figura 1).

Las propiedades más importantes de la trehalosa son, que es un disacárido no reductor, esto debido a que el grupo acetal de las dos moléculas están unidos por el carbono 1, 1 formando el enlace glucosídico, imposibilitando así la reducción del disacárido. Otro factor de suma importancia es que es uno de los disacáridos naturales más estables, dado que la energía del enlace glucosídico que une a las dos hexosas es muy bajo (menor de -4.2 kJ mol^{-1}), esto es fácilmente comprobable ya que una solución de 4 % de trehalosa no se degrada a pH 3.5 y es estable a temperaturas de 10 a 100 °C por 24 h, es inerte con aminas, aminoácidos y proteínas



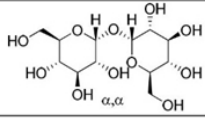
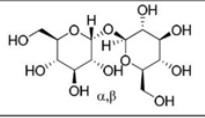
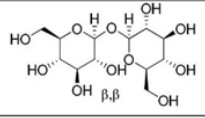
Isómeros de trehalosa			
<i>Es (kJ/mol)</i> ¹	92.532	98.844	110.54

Figura 1. Esquema de silla de trehalosa. Se muestran los isómeros de trehalosa y energía estérica, tomado de Teramoto y col., 2008.

y por último la trehalosa es resistente a la caramelización a diferencia de la sacarosa (Teramoto y col., 2008). Es por estos motivos que no es de sorprender que la trehalosa se encuentre presente en diversos seres vivos incluyendo a los hongos.

1.1.1 Funciones de la trehalosa

Este compuesto se puede aislar de hongos, plantas, insectos, bacterias, más nunca se ha demostrado su presencia en mamíferos. La trehalosa tiene una función protectora ante situaciones de estrés, esto determinado por sus propiedades fisicoquímicas destacando entre otras: la capacidad de reemplazar agua en biomoléculas, que es de gran ayuda para la estabilidad en la membrana celular, la formación de cristales no higroscópicos y por su estabilidad química. También se le atribuye la cualidad de reserva de energía ya que en presencia de la enzima trehalasa es fácilmente hidrolizable a dos moléculas de glucosa, las cuales pueden ser metabolizadas vía la glucólisis, de esta forma la trehalosa cumple una doble función dependiendo la etapa de vida en el organismo.

Se sabe que en hongos la trehalosa está presente en esporas, cuerpos fructíferos, donde su concentración en peso seco llega a ser de hasta un 7 % en *Dictyostelium mucoroides* y hasta 10 % en las ascosporas de *Neurospora tetrasperma* (Teramoto y col., 2008). Debido a las cualidades antes mencionadas la trehalosa es también utilizada como preservador para alimentos ya que es considerado como un agente químico “GRAS” (por sus siglas en inglés Generally Recognized as Safe) (Iturriaga y col., 2009; Luyckx y Baudouin, 2011).

1.1.2 Metabolismo de la trehalosa

1.1.2.1 Anabolismo de la trehalosa

El anabolismo de la trehalosa varía dependiendo del organismo en cuestión, actualmente se conocen cinco rutas de síntesis en bacterias, mientras que en eucariontes de manera general sólo está presente la vía trehalosa-6-fosfato sintasa (Tps1) seguida de la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (Tps2) (Eleutherio y col., 2014).

La biosíntesis de la trehalosa en hongos comienza con una molécula de glucosa unida a uridindifosfato que se condensa con una molécula de glucosa-6-fosfato, formando la trehalosa-6-fosfato por acción de la enzima Tps1. El siguiente paso de la síntesis es catalizado por la fosfatasa Tps2, que como lo indica su nombre la enzima desfosforila el disacárido formando así la trehalosa más un fosforo inorgánico ver Figura 4 (Puttikamonkul y col., 2010).

En *Saccharomyces cerevisiae* existen las proteínas Tps3p y su homóloga Tsl1p las cuales los autores concluyeron que desarrollan un papel de regulación donde Tps3p puede ser fosforilada por la proteína cinasa A “PKA”, interviniendo así vías de señalización en respuesta a estrés. Mientras a Tsl1p tiene un efecto estructural en la enzima Tps1 (Trevisol y col., 2013).

1.1.2.2 Catabolismo de la trehalosa

El catabolismo de la trehalosa se hace a través de la enzima trehalasa (EC 3.2.1.28) la cual hidroliza el enlace α,α -1, 1-glucosídico que une a las dos moléculas de

glucosa, quedando disponibles para entrar a otra ruta metabólica (Macakova y col., 2013).

En *S. cerevisiae* se han identificado tres trehalasas denominadas Nth1, Nth2 y Ath1 (Eleutherio y col., 2014). Se ha determinado que las trehalasas Nth1 y Nth2 tienen su actividad máxima a pH neutro, razón por la cual se denominan trehalasas neutras, y normalmente se les encuentra en el citosol, se sabe que el gen *NTH1* se encuentra regulado por la ausencia de glucosa, estrés térmico, oxidativo u osmótico y sustancias tóxicas (Zähringer y col., 1998). El promotor de *NTH1* contiene diversos elementos de respuesta a estrés denominados STREs, (por sus siglas en inglés stress responsive elements). Este tipo de elementos activan la transcripción en genes que lo poseen, por mencionar algunos, *CTT1*, *TPS2*, *HSP12* y *DDR2*, dichos elementos de respuesta a su vez están ligados a los factores transcripcionales Msn2/Msn4, específicamente en *S. cerevisiae* estos últimos regulan la expresión basal de *NTH1* de un 30 a 50 % (Zähringer y col., 2000). En la levadura, la trehalasa neutra Nth1 se encuentra embebida en el citosol y es regulada es por la proteína Bmh1 la cual fosforila los residuos de Ser20, Ser21, Ser60 y Ser83 que activan los dominios de calcio y provocan un cambio estructural en el sitio activo de la enzima, Figura 2 (Macacova y col., 2013). A pesar de que las dos trehalasas neutras tienen una similitud del 77 % entre sí, se desconoce la función de la Nth2 (Eleutherio y col., 2014), estudios en *S. cerevisiae* arguyen que regula la actividad de Nth1 (Garre y col., 2009) ya que la mutante *nth1Δ* mostró mayor concentración intracelular de trehalosa que la doble mutante *nth1Δ nth2Δ*. Sin embargo, en el hongo *Cryptococcus neoformans* que también posee dos trehalasas neutras (Nth1 y Nth2), la mutante *nth2Δ* mostró un incremento en la virulencia en ratones, en comparación a las cepas silvestres y con la mutante *nth1Δ*, a pesar de que la concentración intracelular de trehalosa era menor en la mutante *nth2Δ* que en la mutante *nth1Δ* (Botts y col., 2014). Respecto a la enzima Ath1, ésta tiene su actividad máxima a pH ácido, con base a ensayos de localización vía la proteína verde fluorescente, se ubicó en la vacuola y en la pared celular de *S. cerevisiae* (Garre y Matallana, 2009; He y col., 2009). Las mutantes del gen *ATH1* en *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis* y *Metarhizium acridum* en medio de cultivo suplementado con trehalosa como única

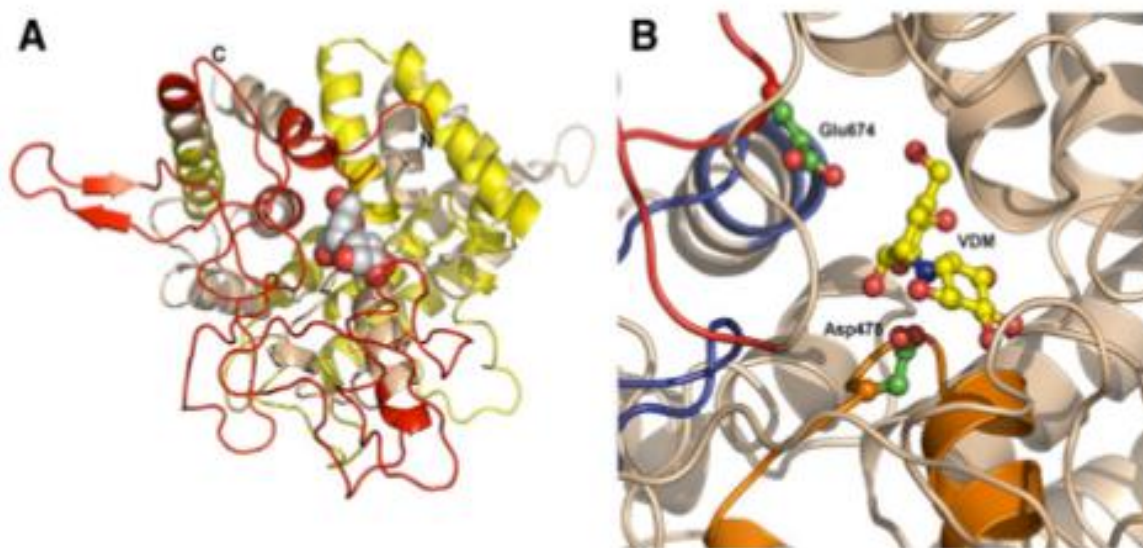


Figura 2. Estructura tridimensional de la trehalasa neutra Nth1 de *S. cerevisiae*. En rojo se muestra el sitio activo de la enzima, dilucidada por cristalografía de rayos X tomada de Macakova y col., 2013.

fuentes de carbono no son capaces de crecer, confirmando así que Ath1 es esencial para la degradación extracelular de trehalosa (Jules y col., 2004; Sánchez-Fresneda y col., 2015; Jin y col., 2015). Por otro lado, la acumulación del glúcido confirió mayor tolerancia ante situaciones de estrés oxidativo, térmico y choque osmótico en *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *M. acridum*. Un dato interesante es el hecho de que las mutantes *ath1Δ* de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *M. acridum* mostraron una clara disminución en la virulencia.

1.1.3 Función de la trehalosa en hongos

La trehalosa desempeña una función muy importante en los hongos ya que por sus múltiples cualidades, desarrolla un rol muy dinámico, se han realizado estudios en diferentes especies modelo centrándose en cada paso de su metabolismo tanto en su síntesis como en su hidrólisis. Se ha demostrado que la síntesis de la trehalosa tiene gran importancia en *S. cerevisiae*, el estudio de cepas mutantes carentes en el gen *TPS1* mostraron un crecimiento menor a su contraparte silvestre (Van-Dijck y col., 1995). En el caso de *C. albicans* se demostró que en la ausencia de trehalosa

tuvo como resultado la reducción de la elongación celular hasta en un 75 % a la temperatura corporal en humanos (37 °C), disminuyendo así la virulencia del patógeno (Serneels y col., 2012). Al igual en el hongo *C. gatti*, la ausencia del gen *TPS1* generó una disminución en el crecimiento a 37 °C, así mismo el hongo mostró disminución en la síntesis de melanina y cápsula, ambos considerados factores de virulencia en este patógeno de humanos, dado los resultados se concluyó que dichas características conllevan a deficiencias en el apareamiento, secreción de proteínas, integridad de la pared celular, teniendo la trehalosa una función central en la virulencia de este hongo (Ngamskulrungron y col., 2009). La información relacionada con la función de la trehalosa en hongos fitopatógenos es escasa, recientemente en *U. maydis* se reportó su importancia durante la respuesta a estrés osmótico y térmico, considerando el aumento en la concentración de la trehalosa intracelular (Salmerón y col., 2011).

Como ya se mencionó, la catálisis de la trehalosa ha sido ampliamente estudiada en hongos modelo o patógenos de humanos como son: *S. cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *C. albicans* o *C. neoformans* (Van-Dijck y col., 1995; Svanström y col., 2012; Serneels y col., 2012). Mientras que los estudios encaminados a entender la función fisiológica de la hidrólisis de este disacárido en hongos fitopatógenos es casi nula. A la fecha, conocemos el caso del hongo patógeno del arroz *Magnaporthe grisea*. En este organismo se identificó la presencia de un único gen denominado *NTH1* y se dilucidó que esta trehalasa neutra tiene un rol importante al momento de colonizar el tejido de la planta, así como durante la esporulación. Estudios en la mutante $\Delta nth1$ mostraron menor número de lesiones en comparación a la cepa parental (Foster y col., 2003).

Otro fitopatógeno estudiado en este aspecto es *Botrytis cinerea*, el cual ataca aproximadamente a 230 especies de plantas, las mutantes $\Delta nth1$ son más resistentes al estrés térmico, aunque la capacidad para colonizar la planta disminuyó, finalmente la virulencia fue similar a lo observado en la cepa silvestre (Doehlemann y col., 2006). Recientemente en el hongo entomopatógeno *M. acridum* se observó

que aunque las mutantes en el gen de la trehalasa neutra (*Δnth1*) son más tolerantes al estrés térmico no hubo cambios en la virulencia (Leng y col., 2011).

1.2 *Ustilago maydis*

Los ustilaginales son un grupo de hongos fitopatógenos pertenecientes a los basidiomicetos, los cuales tienen más de 50 géneros y 1200 especies que infectan aproximadamente a 400 especies de plantas monocotiledóneas pertenecientes a 75 familias distribuidas en todo el mundo, y son comúnmente llamados “carbones”. Los carbones impiden la formación apropiada del grano de la planta la que parasitan, ya que atacan los ovarios de las plantas formando sacos de teliosporas de color oscuro, razón por la cual generan pérdidas económicas a nivel mundial, y es por este síntoma característico que se les da el nombre de carbones (Agrios, 2008). Entre los géneros que más importantes de los ustilaginales fitopatógenos encontramos: *Tilletia*, *Sphacelotheca*, *Uromyces*, *Neovossia* y *Ustilago* (Ruiz-Herrera, 2012). Particularmente, dentro del género *Ustilago* destaca *U. maydis* que es patógeno de maíz y del teocintle, está catalogado dentro de los 10 hongos fitopatógenos de importancia a nivel mundial (Dean y col., 2012).

1.2.1 Ciclo de vida de *U. maydis*

En México la enfermedad producida por *U. maydis* comúnmente es llamada huitlacoche. Este hongo tiene dos fases importantes dentro de su ciclo de vida, una saprófita y otra patogénica. En la forma saprófita *U. maydis* crece en forma de levaduras haploides o esporidias las cuales se reproducen por gemación, la cual se desarrolla en los extremos de la célula formando la célula hija con un ángulo de 30° a 40° con respecto a la célula madre (Ruiz-Herrera, 2008).

La fase patogénica de este hongo comienza cuando dos levaduras haploides que son sexualmente compatibles se reconocen, este proceso está dado por la presencia de feromonas (reguladas por el *locus a*), que codifica el receptor de la feromona, dichas moléculas inhiben la formación de esporidias y propician la diferenciación de tubos de conjugación dirigidos hacia su contraparte vía quimiotropismo (Ruiz-Herrera

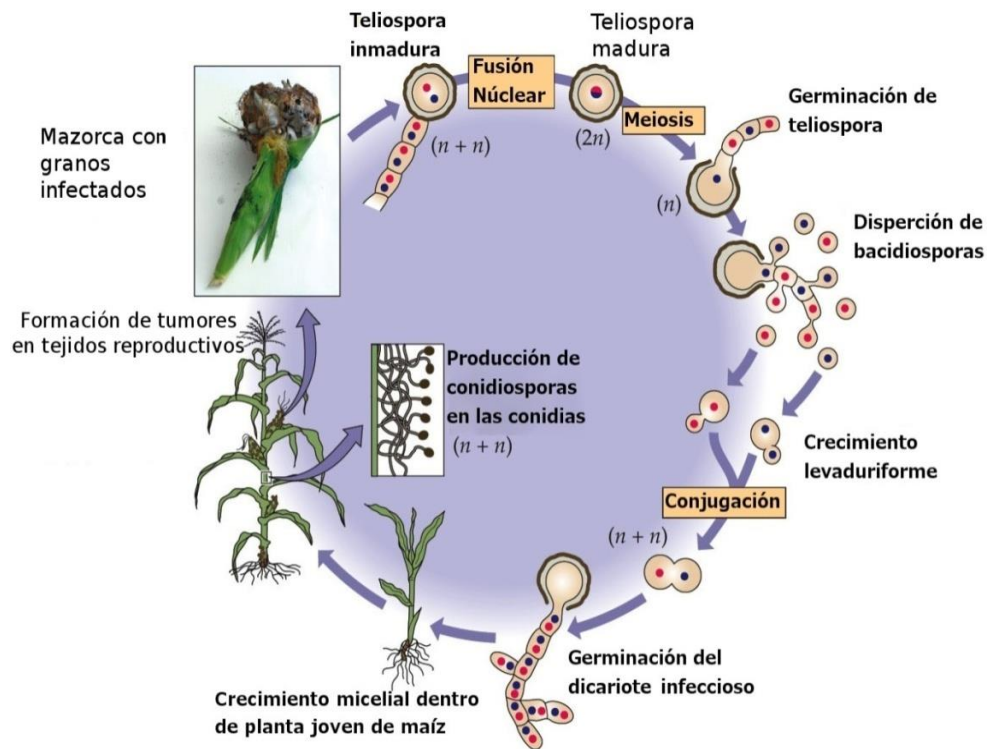


Figura 3. Ciclo de vida de *U. maydis*. Tomado de Godde, 2008.

, 2008; Brefort y col., 2009; Djamei y Kahmann, 2012). Una vez que los tubos de conjugación se fusionan, a partir de ellos emerge la hifa dicariótica, la cual constituye la forma infecciosa de *U. maydis*, capaz de colonizar la planta por medio de las aberturas naturales de ésta como son los estomas, o bien a través de los órganos florales o en su defecto la hifa dicariótica experimenta un proceso de diferenciación formando un apresorio Figura 3. Esta parte del proceso es regulada por la función del *locus b*, que produce un heterodímero de proteínas y activa la transcripción de genes implicados en la patogenicidad del hongo, esto ocurre en respuesta a señales específicas que provienen de la planta (Brefort y col., 2009).

El crecimiento de *U. maydis* dentro de la planta ocurre de manera intracelular y normalmente se desarrolla en los tejidos meristemáticos concluyendo con la formación de tumores o agallas que reemplazan el contenido del fruto por teliosporas. Las teliosporas, dan el color negro característico del huitlacoche, su diferenciación

se da cuando las hifas dicarióticas forman irregularidades hasta fragmentarse por citocinesis, una vez separadas, forman una capa equinulada pigmentada hasta tener una forma esferoide concluyendo su madurez con la cariogamia, Figura 3 (Ruiz-Herrera, 2008; Brefort y col., 2009; Djamei y Kahmann, 2012). Cuando las teliosporas se encuentran fuera de las agallas y tienen las condiciones idóneas para desarrollarse formará el promicelio, el núcleo diploide se transporta al promicelio para entrar en mitosis formando cuatro células que más tarde formarán las basidiosporas y a su vez las basidiosporas formarán las esporidias cerrando el ciclo de vida de *U. maydis* (Figura 3).

1.4 Justificación

Considerando que la eliminación del gen *UmNTH1* en otros organismos produce mutantes que muestran resistencia a condiciones de estrés, y que se observa alteraciones en el fenómeno de patogenicidad, ya que en *M. grisea* la eliminación del gen *UmNTH1* afecta la virulencia pero en *Botrytis cinerea* no, consideramos interesante dilucidar los efectos que puede tener la eliminación del gen *UmNTH1* en *U. maydis* tomando en cuenta que es un modelo de los Ustilaginales, los cuales generan grandes pérdidas económicas. Siendo factible estudiar la función de este gen en este fitopatógeno y posteriormente extrapolar el conocimiento a otros patógenos más agresivos en los que los protocolos de transformación genética no están del todo establecidos como es el caso de *Ustilago hordei* o *Puccinia tritici*. Aunado a ello, resulta interesante el hecho de que en este hongo exista solamente un gen que codifica la trehalasa neutra, en comparación con *C. neoformans* o *S. cerevisiae*.

2. HIPÓTESIS

Las cepas mutantes de *U. maydis* $\Delta nth1$ acumularán mayor concentración intracelular de trehalosa que la cepa parental, afectando las respuestas fisiológicas del hongo ante situaciones de estrés y durante el proceso de patogenicidad.

3. OBJETIVOS

3.1 General

- Estudiar el efecto de la acumulación de la trehalosa en *Ustilago maydis* en respuesta a condiciones de estrés y la virulencia en plantas de maíz.

3.2 Específicos

- Caracterizar el fenotipo de las mutantes $\Delta nth1$ en respuesta a condiciones de estrés físico y químico.
- Determinar el efecto de la mutación en el gen *UmNTH1* en la transición dimórfica de *Ustilago maydis*.
- Determinar la virulencia de las mutantes $\Delta nth1$ en plantas de maíz.
- Analizar la expresión del gen *UmNTH1* en respuesta a estrés oxidativo y osmótico.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Material biológico

- Se utilizaron las cepas silvestres de *U. maydis* FB1 (a1b1) y FB2 (a2b2) (Flora Banuett Universidad de California) y las cepas $\Delta nth1$ 64, 68 (a1b1) y 255, 257 (a2b2). Las cepas se conservaron a -80 °C y se recuperaron en cajas de medio completo (MC) a 28 °C (Holliday, 1961), suplementadas con higromicina B (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) o carboxina (3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) según sea el caso.
- Para realizar los estudios de patogenicidad se utilizaron semillas de maíz variedad “cacahuazintle” cultivadas en invernadero (Facultad de Ciencias Naturales, Campus Juriquilla).

4.2 Métodos

4.2.1 Curvas de crecimiento y ensayos de estrés

La capacidad de las cepas mutantes para utilizar diferentes fuentes de carbono en comparación con las cepas silvestres se realizó en medio mínimo pH 3 y medio mínimo pH 7 (MM pH 3, pH 7), el pH fue ajustado con HCl o NaOH respectivamente (Holliday, 1961), la fuente de carbono se suplementó al 2 %. Para ello las cepas de interés previamente crecidas (18-24h en MC), se determinó su densidad óptica (D.O.) (600 nm espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 105-Uv-Vis). Posteriormente, el MM suplementado con la fuente de carbono se inoculó a 0.005 unidades de D.O., los tubos inoculados se incubaron a 28 °C en agitación (150 revoluciones por minuto; rpm), se tomaron alícuotas cada 24 h por un periodo de 96 h para medir la D.O. a 600 nm. Las lecturas obtenidas se analizaron con la prueba de t de Student de la cepa silvestre contra las cepas mutantes teniendo triplicados por cada muestra con el software libre R 3. 2. 2 “Fire Safety”, tomando $\alpha = 0.05$.

Para las pruebas de estrés se creció la cepa de interés en MC líquido durante 18-24 h. Se centrifugó el cultivo a 3,000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante (SN) y las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril, el número de

células se determinó usando la cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de 1×10^7 células ml^{-1} , se prepararon diluciones decimales de cada una de las cepas de interés y se inocularon 10 μl de cada dilución (1×10^7 hasta 1×10^3) en placas de MM pH7 (Tris HCl 30 mM). Los agentes estresantes fueron adicionados al medio de cultivo y las condiciones ensayadas fueron: estrés oxidativo, estrés de pared celular y estrés ácido, de acuerdo con lo reportado por Cervantes-Chávez y col., (2010). Las cajas se incubaron a 28°C y el crecimiento fue monitoreado cada 24 h durante 5 días. Posteriormente las cajas fueron fotografiadas usando la cámara fotográfica Canon EOS 600D, las fotografías fueron editadas con el software libre GIMP 2.8.

4.2.2 Secreción de polisacáridos

Se determinó la secreción de polisacáridos al medio de cultivo ajustado a diferente pH, para ello se siguió el protocolo descrito por Aréchiga-Carvajal y Ruiz-Herrera, (2005). Las cepas previamente crecidas en MC líquido durante 18-24 h en agitación constante de 150 rpm, se midió la D.O. del cultivo a 600 nm. Después se inocularon 50 mL de MM pH 7 o MM pH3 ajustado con NaOH o HCl respectivamente (Holiday, 1961) con el volumen de células necesario de tal manera que la D.O. inicial fuera de 0.01 unidades de D.O.. Los cultivos así preparados se incubaron durante 40 h a 28°C con agitación (150 rpm). Posteriormente por centrifugación se recuperó el SN y se conservó en un matraz Erlen Meyer, se agregaron 50 ml de etanol frío. Se mezcló y se incubó a 4°C por 12 h. Una vez precipitado el polisacárido se recuperó con ayuda de una pipeta Pasteur y se procedió a secar la muestra en estufa a 80°C por 48 a 50 h, para posteriormente pesar la muestra. El MM pH 7 se ajustó con NaOH, el MM pH 3 con HCl. También se usó tampón de citratos pH7 o pH 3, a una concentración final de 30 mM.

4.2.3 Reacción de apareamiento prueba de “Fuzz”

Esta prueba se realizó en MC suplementado con carbón activado al 1% (Banuett y col., 1989). Para ello se inocularon las cepas de interés en MC líquido durante 18-24 h en agitación constante (150 rpm) a 28°C . Posteriormente en condiciones de esterilidad se depositó una gota de 10 μL de la cepa haploide (a1b1) y sobre esta se

agregó una gota de 10 μ L de la cepa sexualmente compatible (a2b2), se realizaron las combinaciones mutante x mutante, silvestre x mutante y como control silvestre x silvestre, cepas parentales FB1 x FB2. Se permitió que las gotas se secaran en la campana de flujo laminar y posteriormente los cultivos se incubaron a temperatura ambiente durante 24-36 h, a este tiempo las cajas fueron fotografiadas utilizando la cámara Canon EOS 600D. Las imágenes fueron editadas con el software libre GIMP 2.8.

4.2.4 Cuantificación de trehalosa

La extracción de trehalosa se realizó según el protocolo descrito por Ferreira y col (1996), para ello las cepas de interés se crecieron en MC líquido durante 18 h a 28 °C en agitación constante a 150 rpm. Posteriormente los cultivos se concentraron por centrifugación a 3,000 rpm por 5 min. Se eliminó el SN y el paquete celular se lavó dos veces con agua destilada estéril. Después 100 mL de MM pH7 (Tris-HCl pH 7, 30 mM), se inocularon con el volumen necesario para que la D.O., se ajustara a 0.02 unidades. El medio, inoculado, se incubó de 18-24 h a 28 °C con agitación constante (150 rpm), se agregó el agente estresante peróxido de hidrogeno (H_2O_2) a la concentración 25 mM, se continuó la agitación durante 3 h manteniendo las mismas condiciones de incubación. A continuación se concentraron las células por centrifugación, la pastilla obtenida se congeló en nitrógeno líquido. Esta pastilla se molió hasta polvo fino en un mortero y pistilo estéril evitando la descongelación de la muestra, estas una vez molidas se pesaron directamente en un matraz Erlen-Meyer de 50 mL y se adicionaron 30 mL de etanol grado HPLC. La muestra se sometió a un proceso de ebullición (baño maría) hasta la evaporación total del solvente. Ya que las muestras estuvieran bien secas se adicionó 1 mL de la mezcla de acetonitrilo:agua (1:2) ambos grado HPLC, para con ello disolver la trehalosa presente en la muestra. La suspensión así obtenida se pasó a tubos Eppendorf y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, y el sobrenadante se recuperó en tubos nuevos. Previo a la cuantificación por HPLC la muestra se filtró a través de una membrana de 0.2 μ m de tamaño de poro. Para cuantificar la trehalosa se utilizó una columna Agilent Zorbax Carbohydrate 4.6 X 250 mm 5 μ m con una precolumna aminada, la

fase móvil fue de 75 % acetonitrilo 25 % agua y su flujo de 1.2 mL min⁻¹, el detector que se utilizó fue de índice refracción (IR) y el aparato de HPLC fue un Agilent 1100 series. La curva de calibración se preparó con D-(+)-Trehalosa de Sigma-Aldrich®.

4.2.5 Extracción de ADN

Se inocularon 10 mL de MC con la cepa de interés de *U. maydis*, suplementado con el antibiótico de selección. Se creció durante 18-24 horas a 28 °C en agitación constante a 150 rpm. El cultivo se centrifugó a 3,500 rpm durante 5 minutos y se desechó el SN. Se agregaron 200 µL de tampón TE (10 mM Tris HCl pH 8, 1mM EDTA) para suspender la pastilla celular, ya que la muestra fue homogénea se adicionó un volumen de 400 µL de tampón de lisis TSNTTE (2 % Tritón X 100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA). Después se adicionaron 400 µL de fenol-cloroformo, y se mezcló el tubo en un agitador por 5 min en presencia de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro, ¼ del tubo Eppendorf). Posteriormente se centrifugó la muestra a 12,000 rpm por 10 min, se recuperó el SN colocándolo en un tubo Eppendorf nuevo, se adicionaron 3 µL de RNAsa (10 mg mL⁻¹), y se incubó a 37 °C por 20 min. Se adicionaron 300 µL de cloroformo, se mezcló con ayuda vortex (1 min) y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, este paso se repitió una vez más. El ADN presente en el SN se precipitó adicionando 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y dos volúmenes de etanol absoluto frío para incubarlo a -20 °C por media hora, transcurrido el tiempo se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, el SN se descartó y la pastilla obtenida se lavó con 350 µL de etanol 70 %, se centrifugó. El SN se eliminó, la pastilla se dejó secar invirtiendo el tubo sobre un papel absorbente por 5 min, finalmente la pastilla se disolvió con ± 50 µL de agua grado biología molecular.

4.2.6 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se prepararon 120 mL de MC líquido el cual se inoculó con la cepa de interés, se incubó de 18-20 h, 28 °C a 150 rpm. Transcurrido este tiempo se centrifugó el cultivo a 3,000 rpm por 5 min, se descartó el SN y se lavó dos veces con agua destilada estéril agitando en vortex y se centrifugó para después dividirlo en alícuotas de 10 mL, cada alícuota se inoculó en uno de los cinco matraces

(cinética de expresión), que contenían la cantidad necesaria para preparar 40 mL de MM pH 7 (Tris.HCl 30 mM) considerando siempre el volumen necesario para incluir el agente estresante. Una vez listo el medio de cultivo con las células en cuestión este se incubó a 28 °C, 150 rpm. Las células se recuperaron por centrifugación (5 min 3,000 rpm) y se descartó el SN, los tiempos de recolección de la muestra se indican en cada experimento. La pastilla así obtenida se congeló en nitrógeno líquido.

La pastilla se molió con ayuda de un pistilo y mortero previamente esterilizados y congelados. El ARN total se purificó mediante el método de TRIzol® (Invitrogen®), utilizando reactivos y consumibles libres de RNAsas. En un tubo Eppendorf se homogenizaron las células molidas (aproximadamente 100 mg) con 1 mL de TRIzol®, se incubó el tubo por 5 min a temperatura ambiente (TA). Se agregaron 200 µL de cloroformo mezclándolo por inversión durante 1 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C por 15 min, el SN se transfirió a otro tubo libre de RNAsas. Se realizó una purificación empleando 500 µL de cloroformo se agitó en vortex durante 5 min. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4 °C, el SN se recuperó en otro tubo. El ARN se precipitó adicionando 600 µL de isopropanol y 500 µL de la mezcla de cloruro de sodio 1.2 M y citrato de sodio 0.8 M, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C y se descartó el SN. La pastilla así obtenida se lavó con 500 µL de etanol al 70 %, se centrifugó y ésta se dejó secar durante 5 a 10 min. Finalmente la pastilla se disolvió con 50 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1 %. La calidad y concentración del ARN se determinó en el Nanodrop (Thermo scientific Nano Drop 200 spectrophotometer®).

4.2.7 Amplificación de ADN

La reacción en cadena de la polimerasa o “PCR” se realizó en el termociclador BioRad® T100. Para ello se utilizó la enzima Taq ADN Polimerasa recombinante de Invitrogen, siguiendo las instrucciones de esta casa comercial. La temperatura de alineamiento de cada par de oligonucleótidos se determinó de manera experimental y se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tabla de cebadores utilizados.

Nombre del primer	Secuencia 5'-3'	Gen que amplifica	Sentido	Tm °C
2032	AACCATAGCGTTCGAGACCA	<i>UmNth1</i>	R	61
2086	GTGTACGAGAGTGTCACCTC		D	
2035	CTTCCTGACGGACAGGTGAT	<i>Umactina</i>	D	61
2036	CTCGGGAGGAGCAACAATC		R	
Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT			42
TAZ-2F	GAGGATCAAGACAAGGCGACG	<i>UmNth1</i> ORF	R	62
TAZ-2R	GTGAGGTTGAGGGAAGGACGCTCC	<i>UmNth1</i> ORF	D	62

R=reverso, D=directo. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la casa comercial Sigma-Aldrich®.

4.2.8 Síntesis de ADNc

Se utilizaron 2 µg de ARN total el cual se trató con la enzima DNasa Thermo Scientific® (1 u por 1 µg de ARN). La reacción se incubó a 37 °C por 35 min, pasado el tiempo se detuvo la reacción con 2 µL de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 50 mM, se adicionó el oligo dT a 100 pmol, dNTPs (10 mM), buffer de reacción y, la mezcla se incubó a 42 °C por 50 min utilizando 200 u de la enzima de transcriptasa reversa (Thermo Scientific®). Posteriormente se analizó la expresión del gen *UmNTH1* con oligonucleótidos 2032 y 2086 (banda de amplificación de 250 pb) ver Cuadro 1, el producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1.2 % con 0.6 ng mL⁻¹ de bromuro de etidio, la electroforesis se realizó durante 20 min a 100 V utilizando tampón TAE (Tris HCl, ácido acético y EDTA). Como control se amplificó un fragmento de 200 pb del gen de la actina con los oligonucleotidos 2035 y 2036 (Cuadro1). La imagen del gel se digitalizó utilizando el transiluminador de Biorad® Gel Doc XR.

4.2.9 Crecimiento en forma de hifa

La capacidad para crecer en forma de hifa de las mutantes *Anth1* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Holliday, (1961). Para ello las cepas de interés se crecieron en MC durante 18 h a 28 °C en agitación constante a 150 rpm. Posteriormente los cultivos se concentraron por centrifugación a 3,000 rpm por 5 min. Se eliminó el SN y el paquete celular se lavó dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente las células se suspendieron en el volumen original del cultivo utilizando agua destilada estéril, la concentración celular se ajustó a 1×10^7 células mL^{-1} utilizando la cámara de Neubauer. A continuación, las células se ayunaron por un periodo de 4 h a 28 °C a 150 rpm de agitación. Transcurrido el tiempo las células se incubaron a 4 °C por 3 h. Posteriormente 50 μL de estas células se inocularon en 10 mL de: MM pH 7 (ajustado con NaOH) en el cual induce el crecimiento en forma de levadura y MM pH 3 (ajustado con HCl) en el cual induce el crecimiento en forma de hifa. Los cultivos se incubaron a 28 °C, agitación constante (150 rpm) durante 12-15 h. Las células teñidas con azul de algodón se observaron al microscopio (Leica DM750) y se fotografiaron con la cámara Leica ICC50 HD, acoplada al microscopio.

4.2.10 Pruebas de patogenicidad

La capacidad infectiva de las cepas mutantes *Anth1* se estudió en plantas de maíz de la variedad “cacahuazintle” (condiciones de invernadero Facultad de Ciencias Naturales, Campus Juriquilla). Para preparar el inóculo se crecieron las cepas de interés en MC líquido durante 18-24 h en agitación constante a 28 °C. Las células se colectaron por centrifugación y se contaron en la cámara de Neubauer. En un volumen final de 8 mL de agua destilada estéril se prepararon mezclas a una concentración de 1×10^8 células mL^{-1} de las cepas de sexo complementario, mutante x mutante, y los controles silvestres FB1 x FB2. De esta mezcla se inocularon 300 μL en la base del tallo de plantas de maíz de 10 días de edad. Las plantas fueron inyectadas al azar, y se inocularon 20 plantas por mezcla. Los síntomas de la enfermedad se evaluaron semanalmente a lo largo de un mes, observando el desarrollo de síntomas (clorosis, deformación de las hojas, disminución del tallo y

formación de tumores) reportado por Chavan y col., (2013). Los experimentos de inoculación se realizaron por triplicado.

5. Resultados

5.1 Ruta de síntesis y degradación de trehalosa propuesta para *U. maydis*

En nuestro grupo de trabajo realizamos una búsqueda *in silico* de los genes que participan en el metabolismo de la trehalosa (MUMDB: <http://mips.gsf.de/genre/projects/ustilago>) (Kämper y col., 2006). Con base a la homología con secuencias de hongos implicadas en esta ruta metabólica previamente caracterizadas y reportadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), identificamos los genes que participan en la síntesis de la trehalosa como son: la trehalosa fosfato sintasa Um00429 (*UmTPS1*), la trehalosa fosfato fosfatasa Um10650 (*UmTPS2*), así mismo en relación a las trehalasas fue posible identificar el gen que codifica la trehalasa neutra Um11661 (*UmNTH1*) y la

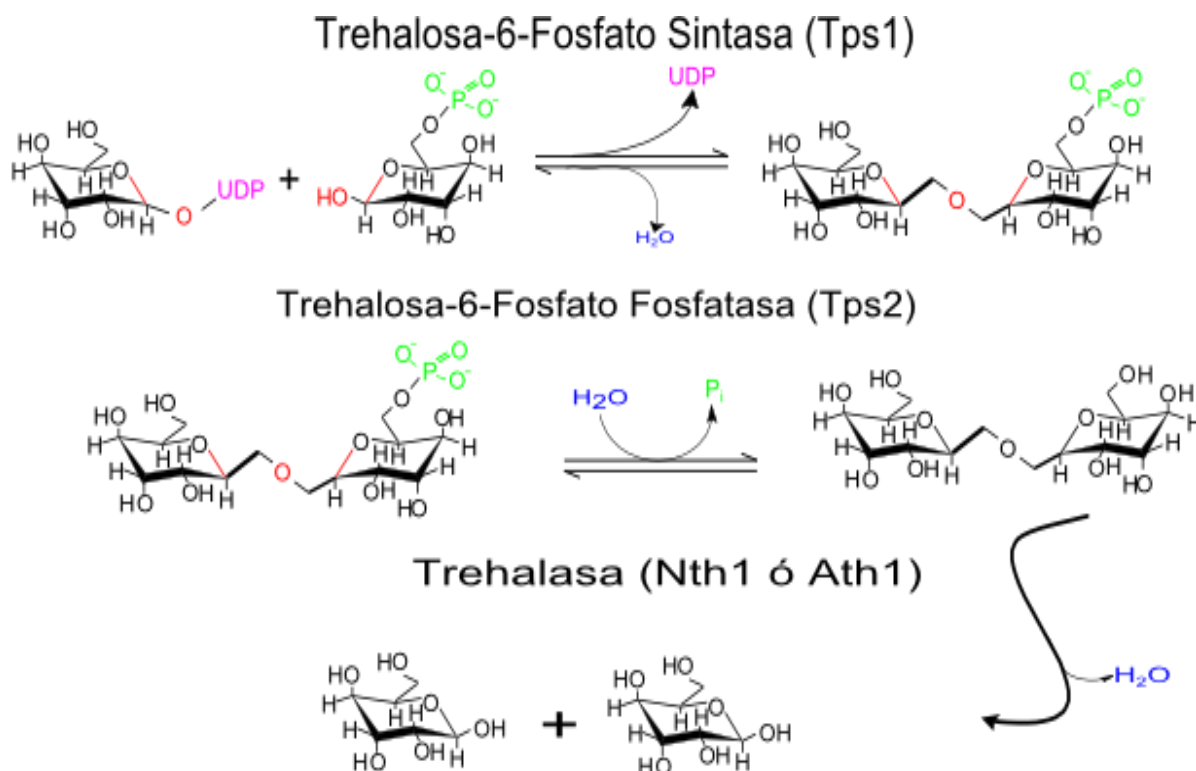


Figura 4. Metabolismo de la trehalosa propuesto en *Ustilago maydis*. El catabolismo de la trehalosa se da por las enzimas Nth1 y Ath1 produciendo dos moléculas de glucosa (Kämper y col., 2006).

trehalasa ácida Um02212 (*UmATH1*). Con esta información se propone la ruta de síntesis y degradación de trehalosa en *U. maydis* Figura 4.

5.2 Identificación el gen *UmNTH1*

El gen *UmNTH1* de *U. maydis* se encuentra ubicado en el cromosoma 3 de su genoma, abarca la posición 60163 a la 62811 dando un total de 2648 pares de bases que constituyen el marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés), este gen no cuenta con intrón alguno. Codifica la enzima trehalasa neutra de 882 aminoácidos, la cual pertenece a la familia 37 glucósido hidrolasas (EC 3.2.1.28) y a su vez de la gran familia de las O-glucosil hidrolasas (EC 3.2.1-), esta enzima se encuentra altamente conservada en una gran variedad de hongos. Entre las semejanzas que tienen las secuencias de la trehalasa neutra, coincide un fragmento N-terminal significativamente largo, el cual se relaciona con la regulación vía AMPc dependiente de la fosforilación por la proteína cinasa A “PKA”. Otro fragmento altamente conservado es el motivo dependiente de Ca^{2+} 14-3-3 (Macakova y col., 2013).

Las secuencias proteicas de trehalasas neutras de diferentes hongos fueron obtenidas de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En la Figura

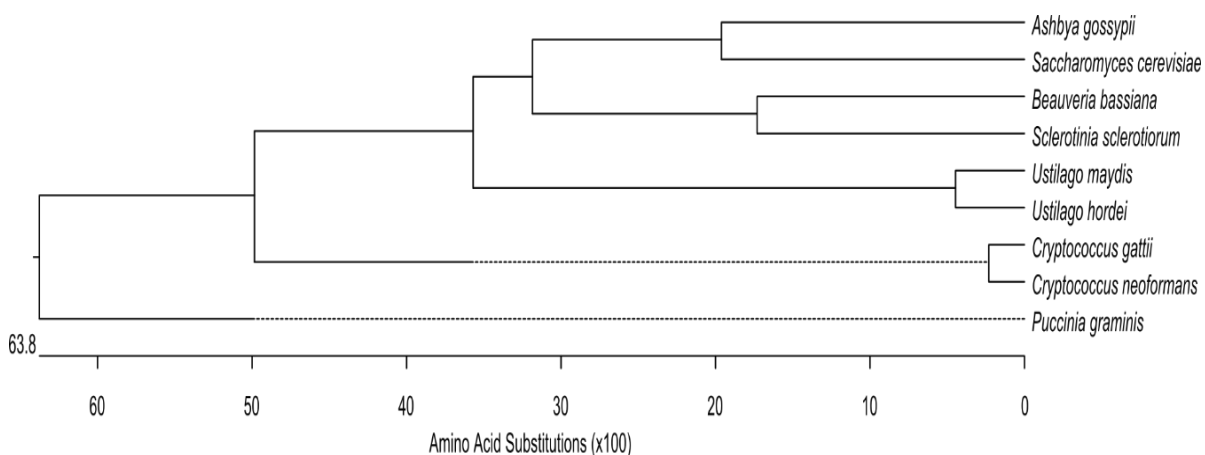


Figura. 5. Dendrograma de alineamiento. Las secuencia de aminoácidos de la proteína UmNth1 en hongos. El dendrograma se realizó con el programa Lasergen versión 7.1.0 (44), utilizando el método Crustal W.

5 se muestra el dendograma realizado con dichas secuencias de aminoácidos de diferentes proteínas Nth1, donde podemos identificar que la secuencia más semejante es la que corresponde a la de *U. hordei*. Así mismo, existe cercanía con aquellas secuencia de *C. gattii* y *C. neoformans* los cuales también son basidiomicetos. Posteriormente realizamos un alineamiento de los aminoácidos de las trehalasas neutras para algunas especies de hongos seleccionadas, los segmentos, para *U. maydis* y *U. hordei*, son muy similares entre sí, encontramos que la zona más conservada corresponde al dominio catalítico de la enzima, denominado

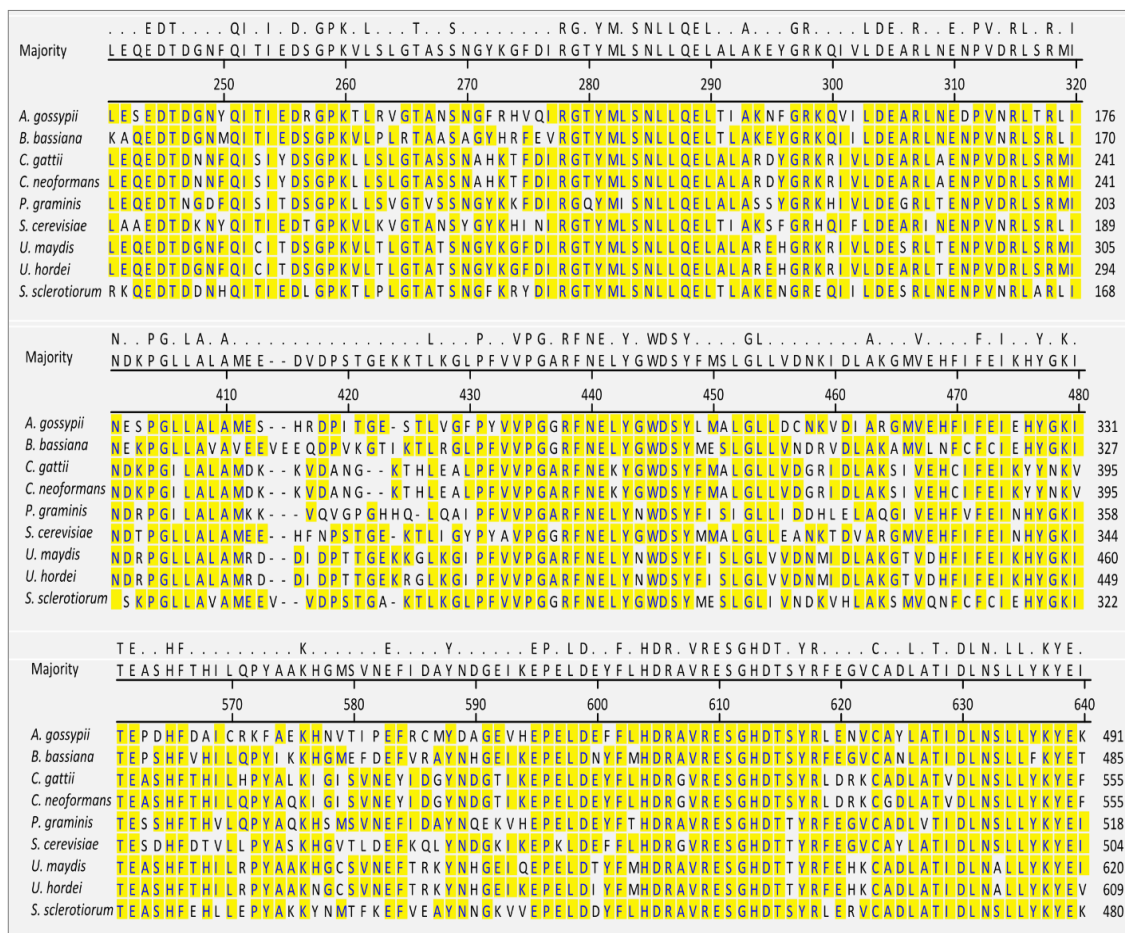


Figura 6. Alineamiento de las secuencias UmNth1 de hongos. En amarillo se muestra los aminoácidos conservados entre las diferentes secuencias. Se muestra la porción más conservada (sitio activo). El alineamiento se hizo con el programa Lasergene versión 4.1.0 (44) método Crustal W.

TreA, y que abarca en el caso de *U. maydis* de los aminoácidos 275 al 850, Figura 6.

5.3 Deleción del gen *UmNTH1*

Para crear las cepas mutantes se procedio a construir un cassette de interrupción por la técnica del DelsGate (García-Pedrajas y col., 2008). Para ello, se diseñaron pares de oligonucleótidos que permitieron eliminar el marco de lectura del gen *UmNTH1*. Por PCR con los oligonucleótidos específicos se amplificaron las regiones 5' UTR (oligonucleótidos 1648-D y 1649-R, pareja 1) y 3' UTR (1704-D y 1705-R, pareja 2) del gen, los productos de amplificación obtenidos correspondieron con el tamaño esperado de 1138 pb y 772 pb para el extremo 5' y el extremo 3' UTR,

Posteriormente se realizó la reacción de recombinación *in vitro* entre los productos de amplificación con el plásmido pDONR higromicina B utilizando la enzima BP clonasa. A continuación, se transformaron células competentes de *E. coli*, las transformantes se recuperaron en medio LB (Luria, Bertani) suplementado con kanamicina. Después de purificar el DNA plasmídico de algunas transformantes, la identificación de aquellas colonias que portaban la construcción esperada, denominando al plásmido que porta el cassette de interrupción, 1320. Con este plásmido se transformaron protoplastos de *U. maydis*, se obtuvieron algunas transformantes, identificando en este trabajo las mutantes *Δnth1*.

5.4 Confirmación de las mutantes *Δnth1* por RT-PCR

Como se mencionó en antecedentes, el gen *UmNTH1* fue previamente deletado en nuestro grupo de trabajo. Para determinar la correcta deleción del gen *UmNTH1* se utilizó un ensayo de expresión RT-PCR. Para ello se purificó el RNA total de la cepa silvestres FB1 y FB2 así como de las cepas mutantes *Δnth1* a confirmar. Utilizando el par de oligos TAZ-2F y TAZ-2R los cuales amplifican un fragmento de 716 pb correspondiente al marco de lectura abierto del gen *UmNTH1*. Como se muestra en la Figura 7, solamente se observó producto de amplificación en las muestras de las

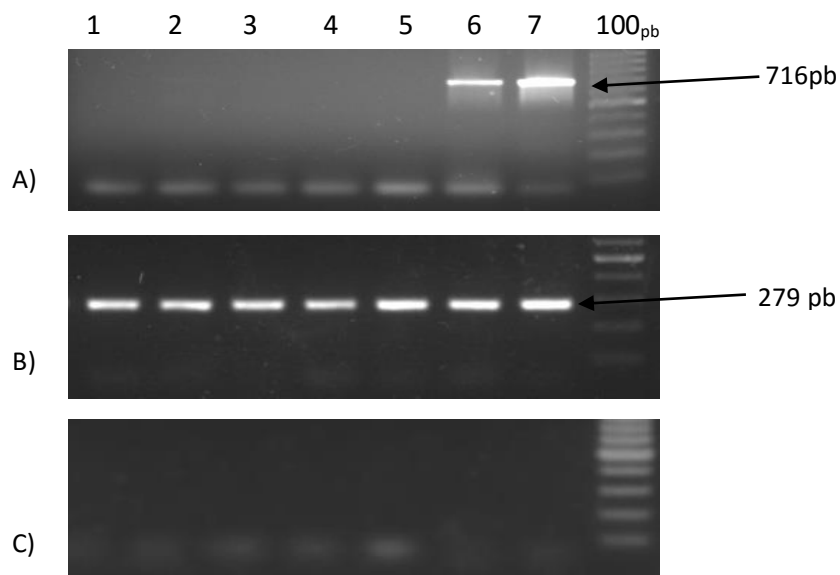


Figura 7. Confirmación de mutantes *Anth1* por RT-PCR. A) Amplificación correspondiente a un fragmento del ORF del gen *UmNTH1* Carriles 1-4 cepas *Anth1* 64, 68, 255 y 257 respectivamente, carriles 6 y 7 cepas FB1 y FB2. B) control +RT con amplificación mRNA de actina, C) Control sin enzima -RT, para comprobar la ausencia de DNA genómico.

cepas silvestres, mientras que en las muestras de ARN que corresponden a las cepas mutantes no hay producto de amplificación, de estamanagera, se demostró la ausencia del gen *UmNTH1*, a partir de este dato, seleccionamos a las mutantes 64, 68, 255 y 257 para realizar los análisis fenotípicos correspondientes.

5.5 Cuantificación de trehalosa

Para determinar si las mutantes *Anth1* acumulan mayor cantidad de trehalosa intracelular en comparación con la cepa silvestre y así determinar si el gen que fue eliminado codifica para la trehalasa neutra, procedimos a determinar el contenido de este disacárido por HPLC. Para preparar la curva estándar utilizamos D-(+)-Trehalosa de Sigma-Aldrich®, 5 mg mL⁻¹, 4 mg mL⁻¹, 3 mg mL⁻¹, 2 mg mL⁻¹, 1 mg

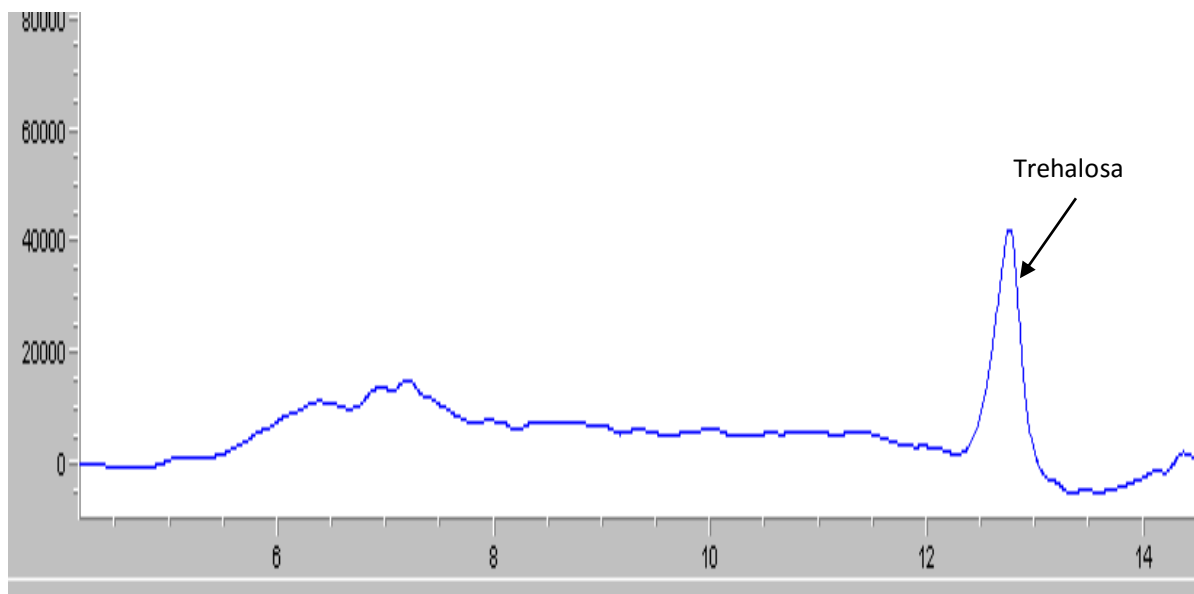


Figura 8. Cromatograma de estándar de trehalosa. Se muestra el cromatograma del estándar de D)-(+)-Trehalosa de Sigma-Aldrich® 5 mg/mL.

mL⁻¹, 0.9 mg mL⁻¹, 0.8 mg mL⁻¹, 0.7 mg mL⁻¹, 0.6 mg mL⁻¹, 0.5 mg mL⁻¹. De esta manera determinamos que la trehalosa mostró un tiempo de retención de 12 min, con este dato procedimos a cuantificar la trehalosa de las muestras. El coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.9899 y la ecuación de la recta fue la siguiente: Absorbancia = 140048.368 * concentración – 1959.8856. Figura 8.

5.5.1 Concentración intracelular de trehalosa en las mutantes *Δnth1*

Los cultivos de las cepas de interés fueron preparados como se mencionan en el apartado de metodología. El disacárido se extrajo según lo reportado por Ferreira y col (1996). Procedimos a determinar la presencia de trehalosa intracelular en la colección de cepas mutantes, para ello las células se crecieron en condiciones estándar (28 °C en agitación de 150 rpm, por 18 h), de acuerdo con los datos obtenidos por HPLC observamos que las mutantes *Δnth1* acumularon mayor concentración intracelular de trehalosa a diferencia de las cepas parentales (datos representativos Figura 9). Este dato indica que el gen *UmNTH1* efectivamente

codifica la trehalasa neutra en *U. maydis*, puesto que tenemos como resultado el incremento de la concentración de este disacárido.

5.5.2 Acumulación intracelular de trehalosa en respuesta a estrés oxidativo

Como se mencionó en el apartado de antecedentes, el gen *NTH1* en *S. cerevisiae* es regulado por la ausencia de glucosa, estrés térmico, oxidativo y osmótico (Zähringer y col., 1998), es por esta razón que se cuantificó la concentración intracelular de trehalosa en respuesta a estrés oxidativo. En este ensayo retamos a las células con la presencia de 25 mM de H₂O₂ por un periodo de tres horas, posteriormente se extrajo la trehalosa, para su determinación por HPLC. Observamos mayor concentración del disacárido en las cepas mutantes sometidas al estrés oxidativo en comparación de la condición control (sin estrés) como se puede apreciar en la Figura 9, arguyendo que en presencia de H₂O₂ la célula acumuló la trehalosa por su efecto protector, ya que la cepa parental, en condiciones estándar, acumuló menos trehalosa comparada con la que estuvo sometida a estrés oxidativo.

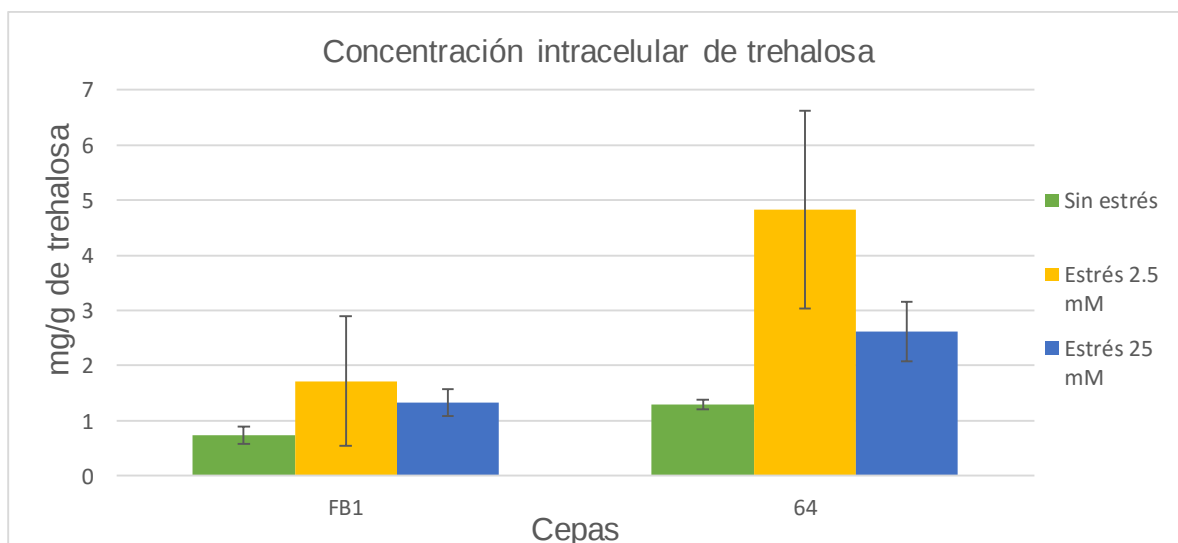


Figura 9. Cuantificación intracelular de trehalosa por HPLC. En el eje Y se muestra los mg de trehalosa por gramo de peso fresco, en el eje X las cepas FB1 y las mutante *Δnth1* 64. Las barras de error representan la desviación estándar.

5.6 Análisis fenotípico de las mutantes *Anth1*

Para conocer el comportamiento de las cepas carentes del gen *NTH1* estudiamos varias condiciones fisiológicas, entre ellas analizamos la capacidad de las cepas mutantes *Anth1* para metabolizar diferentes fuentes de carbono tanto en medio de cultivo MM pH 3 y MM pH 7, además la capacidad de crecer en respuesta a condiciones de estrés como fue; de pared celular, oxidativo, térmico, de radiación ultravioleta (UV), térmico, osmótico y ácido acético, la capacidad para llevar a cabo el apareamiento y finalmente patogenicidad en plantas de maíz.

5.6.1 Curvas de crecimiento

Utilizamos diferentes fuentes de carbono adicionadas al 2 %, entre ellas tenemos: acetato de sodio, etanol, fructosa, glicerol, glucosa y sacarosa, tanto fuentes fermentativas como no fermentativas. Considerando los datos que arrojó el análisis estadístico observamos diferencia significativa donde nuestro valor de α fue mayor a p cuando la fuente de carbono fue glicerol tanto en MM pH 3 como MM pH 7, las de 0.95 de D.O. a las 96 h, mientras que en glucosa al mismo tiempo la D.O. máxima obtenida fue de 1.5. En el resto de las fuentes de carbono probadas como glucosa y sacarosa no hubo diferencia significativa Figura 10. Cabe mencionar, que en el caso de etanol además de que no hubo diferencia significativa, el crecimiento fue de: 0.75, mientras las cepas parentales mostraron menor crecimiento en comparación a las mutantes especialmente en MM pH 7, además cabe mencionar que esta fuente de carbono fue la segunda menos asimilada por *U. maydis*, puesto que se obtuvo un 96 h de incubación valor máximo comparado con las fuentes de glucosa donde la mayor D.O. fue de 1.5 (datos no mostrados).

5.6.2 Ensayos de respuesta a condiciones de estrés

Para determinar la posible participación de una concentración mayor de trehalosa intracelular en la respuesta a estrés, procedimos a estudiar el comportamiento de las

cepas mutantes *Anth1* ante algunas condiciones de estrés, comparando la respuesta de la cepa silvestre, para ello utilizamos el “método de gota”. Entre los tratamientos de estrés aplicados a las células, tenemos estrés oxidativo, de pared celular, ácida y osmótico. Para ello se prepararon cajas de Petri de MM pH7 (Tris HCl pH7 30 mM), condición en la cual no existe diferencia en el crecimiento entre las cepas silvestres y las mutantes cuando las cajas son incubadas a 28 °C, estableciendo esta como nuestra condición control. Dicho medio de cultivo se suplementó con el agente estresante indicado en cada experimento. En la Figura 11 se muestran los resultados más interesantes obtenidos de estos ensayos. Encontramos que las cepas mutantes *Anth1* tuvieron mayor crecimiento comparado con la cepa parental, cuando las células fueron irradiadas con luz UV, a una dosis de 40,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$. En lo que respecta a agentes oxidantes como, menadiona a una concentración de 5 μM , o el ter-butil hidroperóxido a una concentración de 62 μM ; observamos que para menadiona hubo un crecimiento mayor en la cepa 68, comparándola con la cepa parental, mientras que en ter-butil hidroperóxido el crecimiento fue mayor en las cepas mutantes *Anth1*. Figura 11 (datos representativos). Considerando la importancia de la pared celular en los hongos, puesto que es la primera parte de la célula en establecer contacto con el medio ambiente, procedimos a determinar posibles alteraciones en dicha estructura. Para ello, utilizamos como agentes estresantes de pared, el rojo congo a una concentración de 0.03 mg ml^{-1} y el dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.004 % así mismo, también estudiamos la respuesta ante el rosa de bengala a una concentración de 0.10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, encontrando que las mutantes son más resistentes al estrés impuesto por SDS, sin embargo las diferencias son mínimas en presencia de rojo de congo al comparar las cepas *Anth1* con la parental (Figura 11 datos representativos). Por otro lado, también probamos la respuesta de la cepa a la presencia de ácido acético 5.2 mM, en este caso las cepas mutantes *Anth1* mostraron mayor crecimiento con respecto de lo observado en las cepas silvestres, sugiriendo así el papel protector que tiene la trehalosa en *U. maydis*.

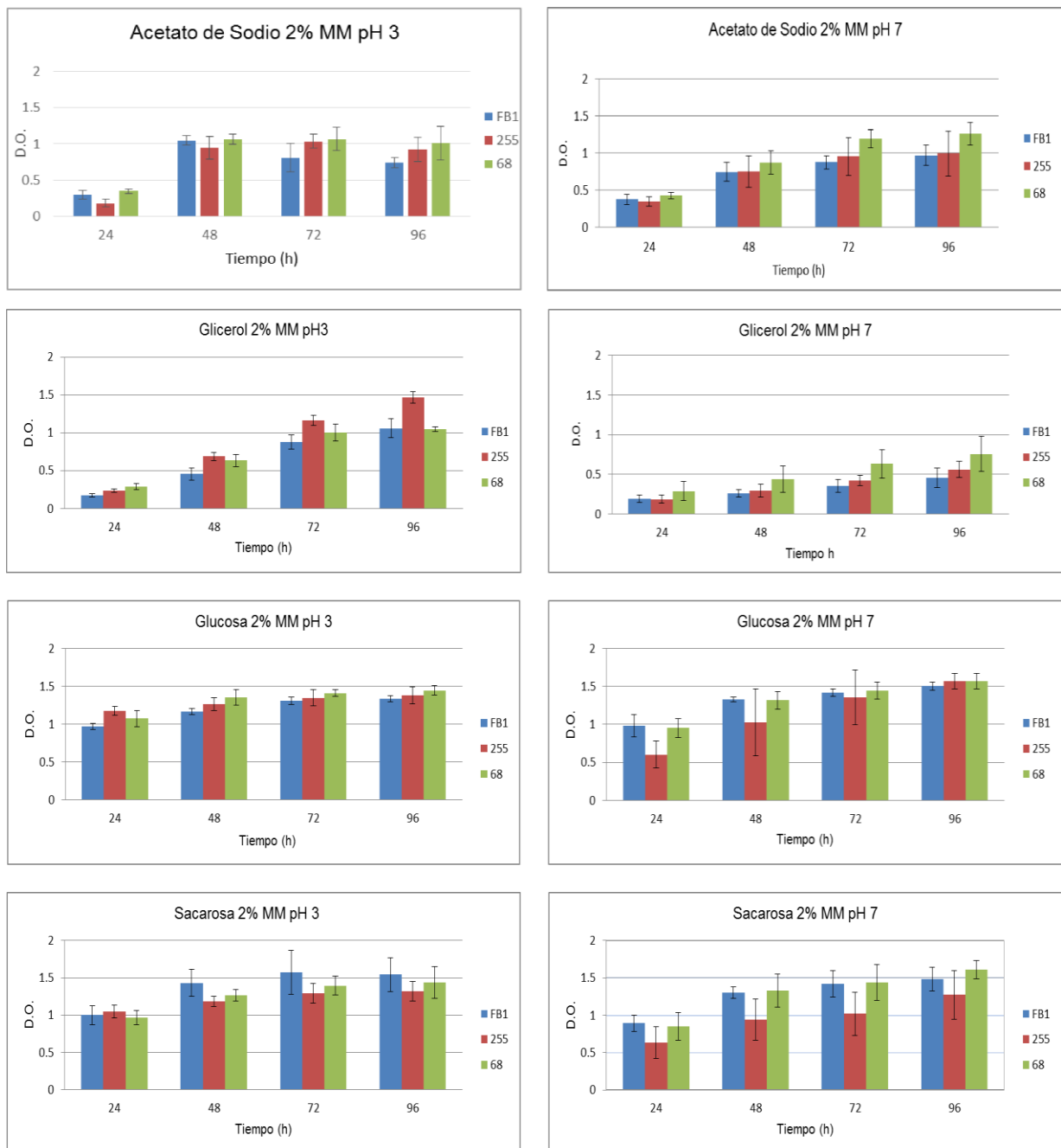


Figura 10. Curvas de crecimiento de las cepas *Anth1* en comparación con las cepas silvestres. Se utilizaron MM pH 3 y MMp H7 suplementado con la fuente de carbono al 2 %, La D.O. a 600 nm se midió cada 24 h durante un periodo de 96 h. Las barras de error representan la desviación estandar.

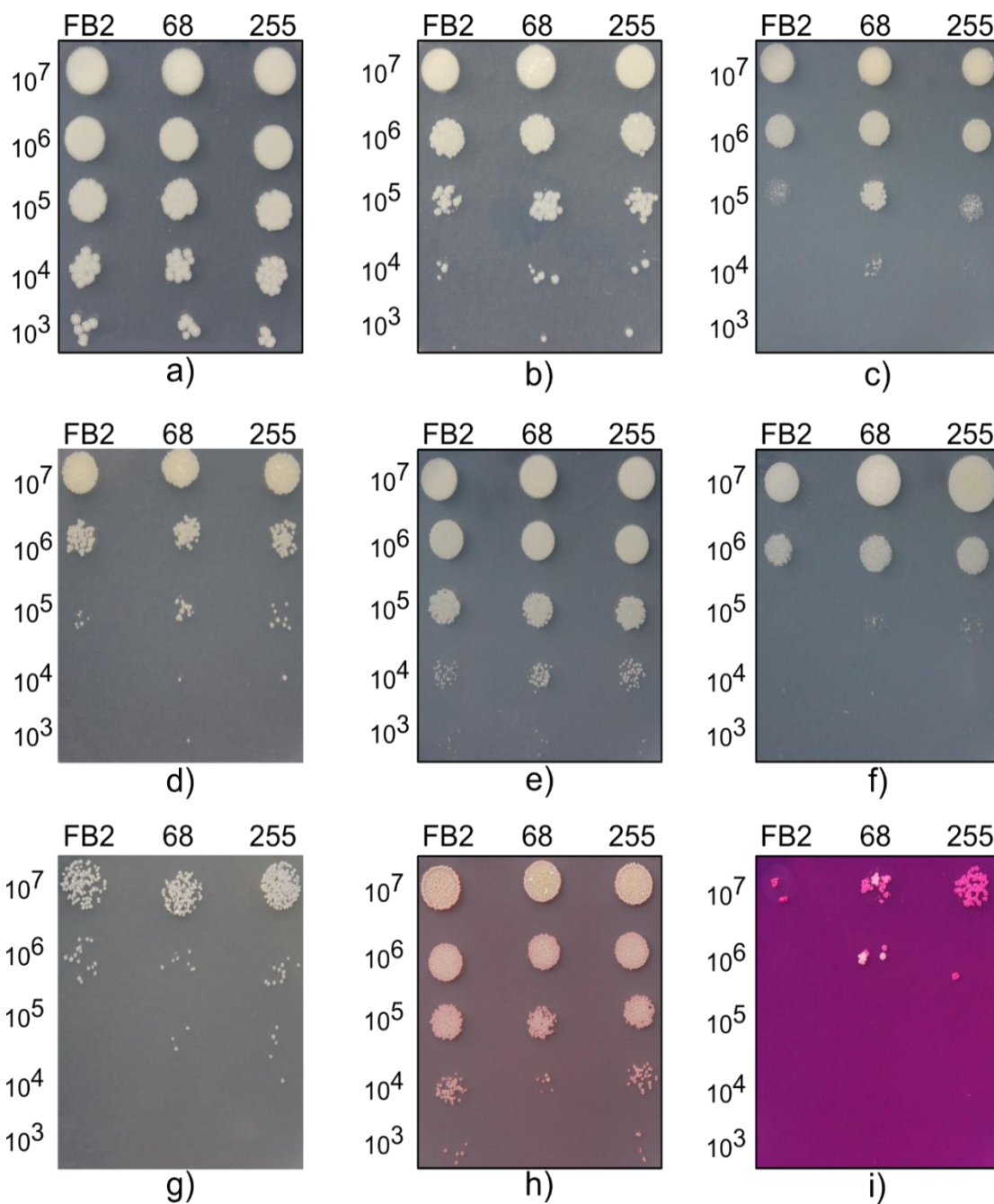


Figura 11. Respuesta a condiciones de estrés: a) control, b) luz UV 40000 $\mu\text{J cm}^{-2}$, c) 5 mM ácido acético, d) H_2O_2 10 mM, e) ter-butil hidroperóxido 62 μM , f) menadiona 5 μM , g) SDS 0.004 %, h) rojo congo 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, i) rosa de bengala 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.7 Secreción de Polisacáridos

Para determinar la capacidad de secreción de polisacáridos al medio de cultivo por parte de las cepas *Anth1* seguimos inicialmente el protocolo descrito por Aréchiga Carvajal y Ruiz Herrera, 2005, para lo cual ajustamos el pH del medio de cultivo a pH 3 o 7 con HCl o NaOH respectivamente, sin la adición de ningún tampón. Por experimentación encontramos que al usar tampón de citratos a una concentración final de 30 mM pH 3 o pH 7 las cepas silvestres secretaron mayor polisacárido al medio de cultivo; fue por ello que procedimos a determinar el comportamiento de las cepas mutantes bajo estas condiciones.

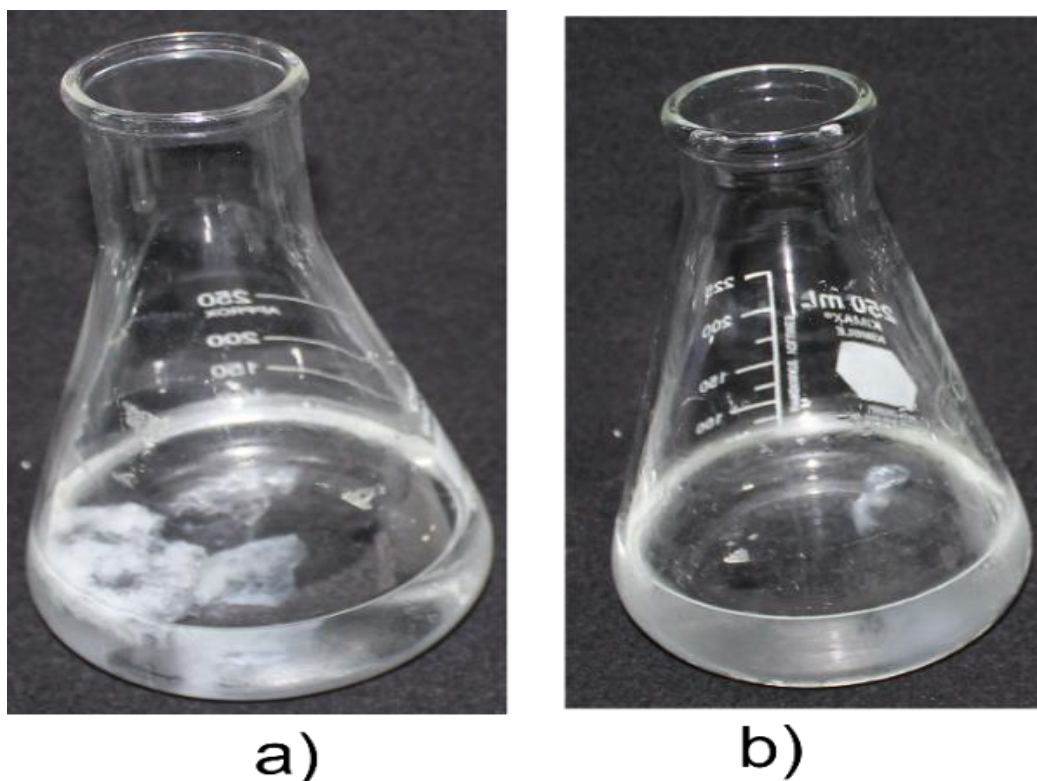


Figura 12. Secreción de polisacárido. Ensayo en MM pH 7 con tampon de citratos
El polisacáridos se precipitó con etanol 50 %, a) Cepa FB2 y b) cepa 64.

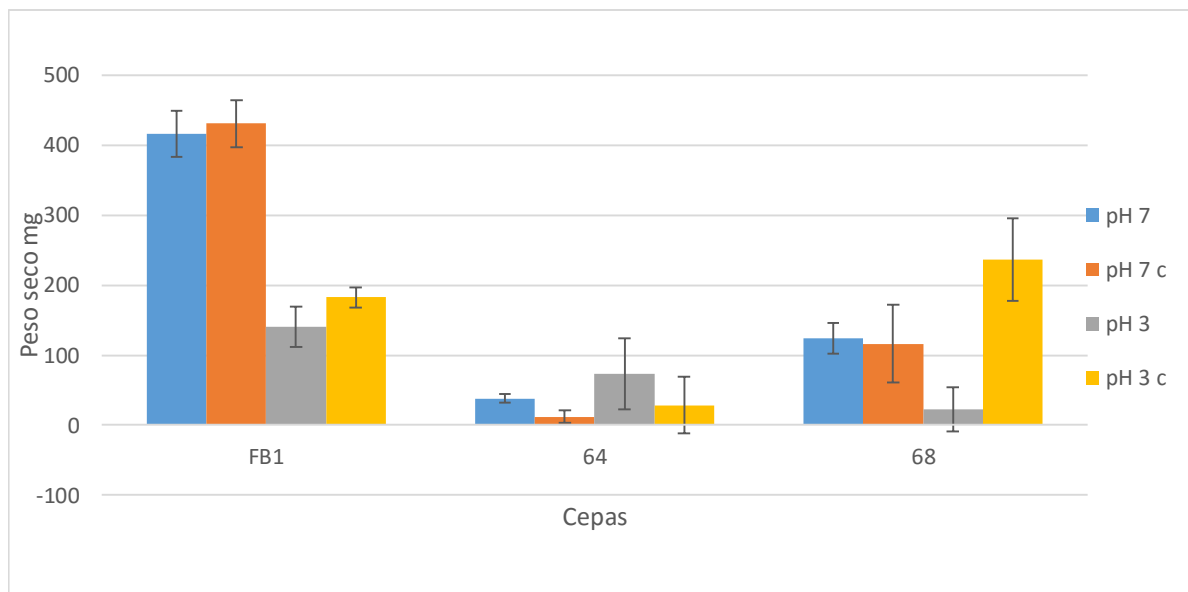


Figura. 13. Peso seco de polisacárido. En el eje Y se muestra el peso final de los polisacáridos, las barras de error indican la desviación estándar. Las barras de color naranja y amarillo muestran el medio con solución tampón de citratos y en el eje X se muestra las cepas utilizadas.

corroborado posteriormente al cuantificar el peso seco del polisacárido secretado, tenemos que la cepa silvestre secreta hasta 200 mg de este compuesto en MM pH 7 con tampón de citrato, mientras que bajo esta condición la mutante 64 secretó una cantidad considerablemente menor, siendo esta de 15 mg, Figura 13.

5.8 Reacción de apareamiento prueba de “Fuzz”

El apareamiento es el primer fenómeno que debe de ocurrir en la naturaleza para que *U. maydis* sea capaz de infectar a la planta de maíz. Para determinar si la carencia del gen *NTH1* afectó la capacidad de apareamiento entre las cepas $\Delta nth1$ de sexo complementario (a1b1; a2b2) se prepararon cajas de MC (sólido) suplementado con 1 % de carbón activado (Banuett y col., 1989). Para ello, se cruzaron las cepas: silvestres; FB1 (a1b1), FB2 (a2b2) como control; las cepas $\Delta nth1$ 64, 68 (a1b1), con las cepas $\Delta nth1$ 255, 257 (a2b2) Figura. 14. Una vez realizadas

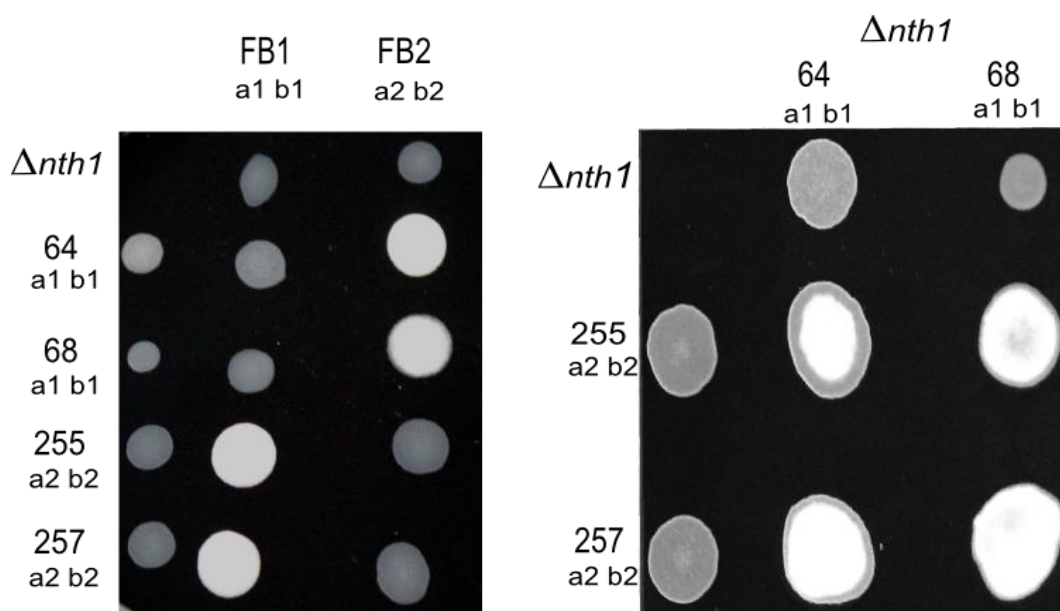


Figura 14. Reacción de apareamiento entre cepas de *U. maydis*. Reacción Fuzz positiva, aspecto algodonoso, reacción negativa crecimiento color gris.

las mezclas correspondientes y posterior a ser incubadas las cajas, observamos en todos los casos la reacción Fuzz positiva, la cual consiste en que la colonia tiene un aspecto algodonoso; esto debido a la presencia del micelio aéreo característico del crecimiento filamentoso Figura 14. Este dato indica que no existe alteración alguna en la capacidad de las cepas mutantes $\Delta nth1$ para llevar a cabo el apareamiento, siendo este un paso de suma importancia puesto que es aquí en dónde se forma la hifa dicariótica, la cual es la única forma infectiva que puede penetrar la planta de maíz y desencadenar el proceso infeccioso (Brefort y col. 2009). Posterior a conocer este dato, procedimos a realizar los ensayos de infección en planta.

5.9 Crecimiento en forma de hifa

El dimorfismo es un proceso de diferenciación celular en el que un hongo que crece en forma de levadura, radicalmente, cambia a la forma de crecimiento micelial, esto en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo (Ruiz-Herrera y León-Ramírez.,

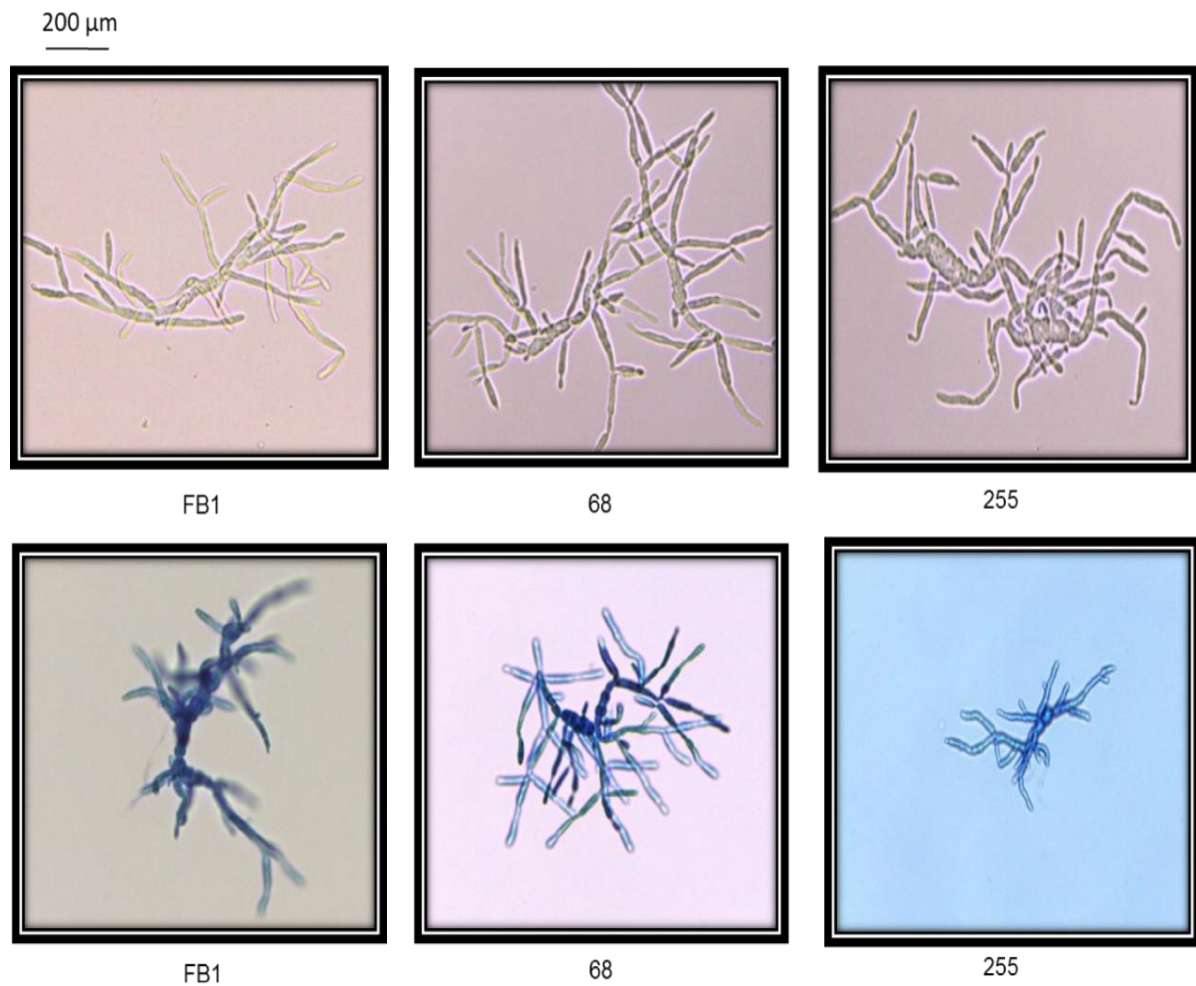


Figura 15. Crecimiento en forma de hifa. Panel superior Preparación en fresco, panel inferior tinción con azul de algodón.

2012) al igual que en otras especies de hongos patógenos en *U. maydis* la forma micelial es considerado un factor de virulencia siendo imprescindible para poder infectar la planta de maíz. Con la finalidad de conocer si la carencia del gen *NTH1* afecta la capacidad para crecer en forma de hifa en *U. maydis*, procedimos a realizar el ensayo *in vitro* por cambios en el pH del medio de cultivo según lo reportado por Holiday (1961). Observamos que las cepas mutantes forman hifas al igual que las cepas silvestres, indicando que el gen *UmNTH1* no está relacionada con este proceso de diferenciación celular Figura15 datos representativos.

5.10 Expresión del gen *UmNTH1*

Para determinar si en *U. maydis* el gen *UmNTH1* se regula a nivel transcripcional por condiciones de estrés, se procedió a realizar un ensayo de expresión RT-PCR. Para ello utilizamos la cepa silvestre FB2 sometida a condiciones de estrés osmótico y oxidativo. Los resultados de este ensayo fueron diferentes para cada tipo de estrés, inicialmente en la condición control observamos una expresión del gen a las 0.5 h, la cual va disminuyendo en función del tiempo, aunque se mantiene baja hasta las 6 h. de la misma forma, cuando se aplicó el 0.5 M de NaCl, el nivel de expresión fue similar a lo observado en la condición control, sin embargo, en respuesta a 1M NaCl observamos mayor expresión a la 1 y 2 h de exposición al estrés osmótico Figura 16.

Por otro lado, cuando estudiamos la expresión del gen *UmNTH1* en las células sometidas a estrés oxidativo con H₂O₂, observamos un comportamiento diferente, ya

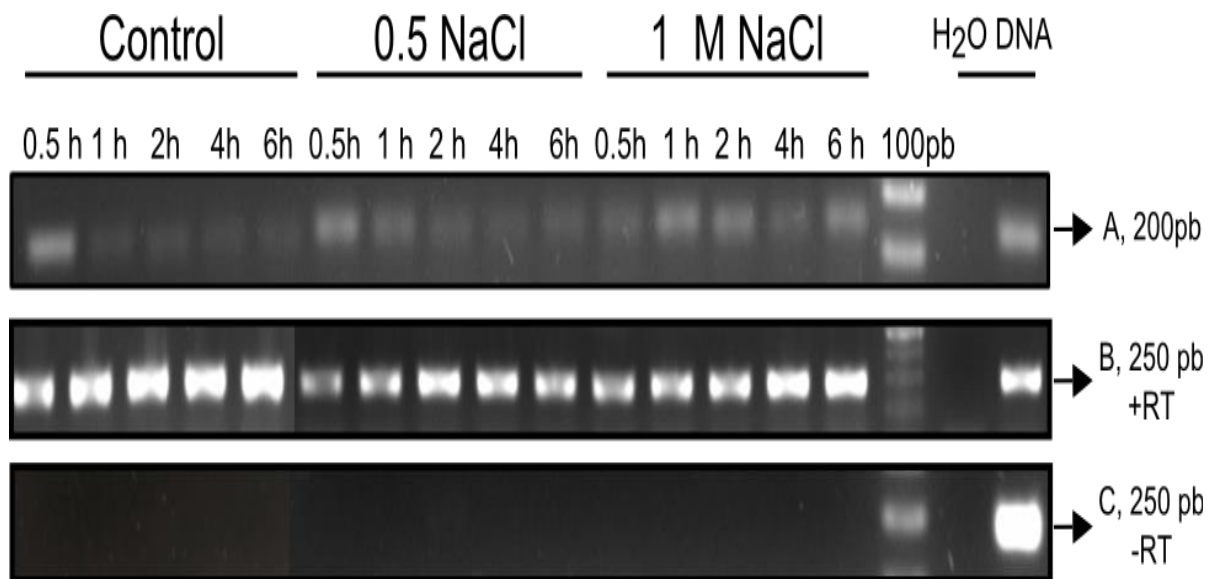


Figura 16. RT-PCR estrés osmótico. A) Gen *UmNTH1*, B) Control gen de actina +RT, C) control -RT. Como control positivo se incluyó DNA genómico de la cepa FB2, como control negativo H₂O con 22 ciclos de amplificación.

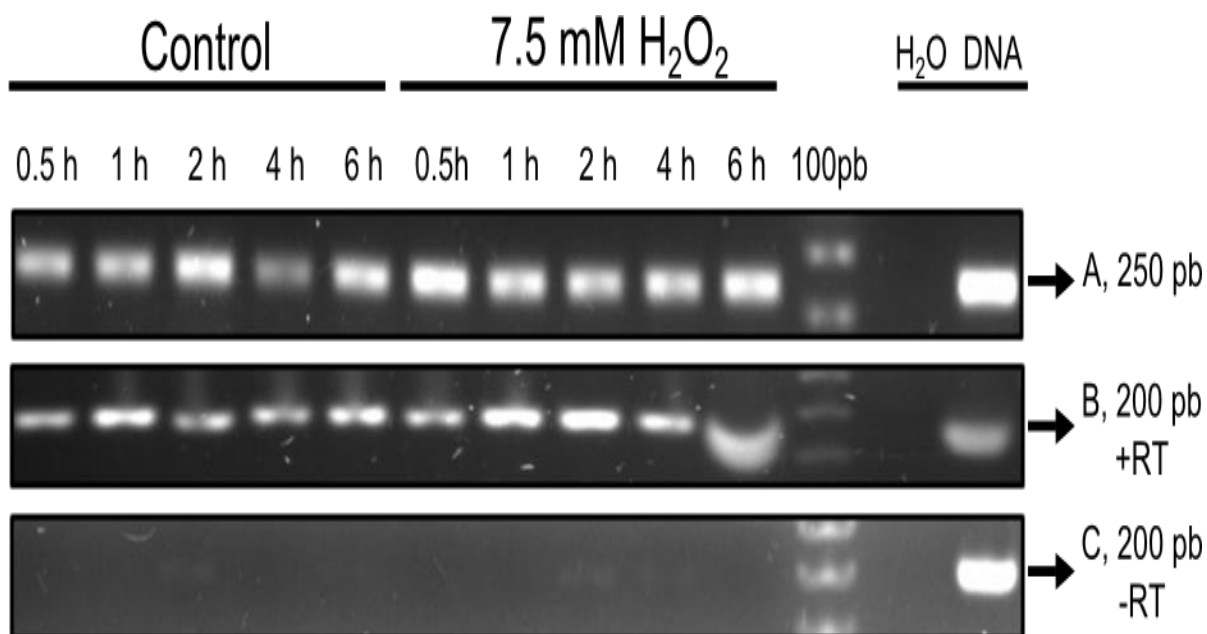


Figura 17. RT-PCR estrés oxidativo. A) gen *UmNTH1*, B) Control de actina +RT, 22 ciclos, C) Control -RT. Como control positivo se incluyó DNA genómico de la cepa FB2, como control negativo H₂O. Amplificación 25 ciclos.

que su expresión en un inicio fue más alto que el control, pero posteriormente se comportó de manera similar a lo largo del tiempo en comparación al control como se muestra en la Figura. 17.

5.11 Pruebas de patogenicidad

Con la finalidad de determinar si la capacidad infectiva de las mutantes *Anth1* se afectó debido a la carencia del gen *UmNTH1*, procedimos a inocular plantas de maíz. Para ello, se siguió lo reportado por Chavan y col., 2013. Para determinar el grado de a sintomatología desarrollada se evaluaron los parámetros I, II, III, IV y V donde; I: plantas sin síntoma, II: plantas con clorosis en las hojas, III: plantas con pequeños tumores y clorosis, IV: tumores que doblan la planta y V: muerte de la planta. Los datos obtenidos se analizaron con el test no paramétrico Kruskal-Wallis para determinar si existe diferencia estadísticamente representativa con una $N= 180$, tomando $\alpha= 0.05$. Se obtuvo un valor de $X^2 < H$, aceptando la hipótesis alternativa Figura 18, Figura 19, Figura 20.

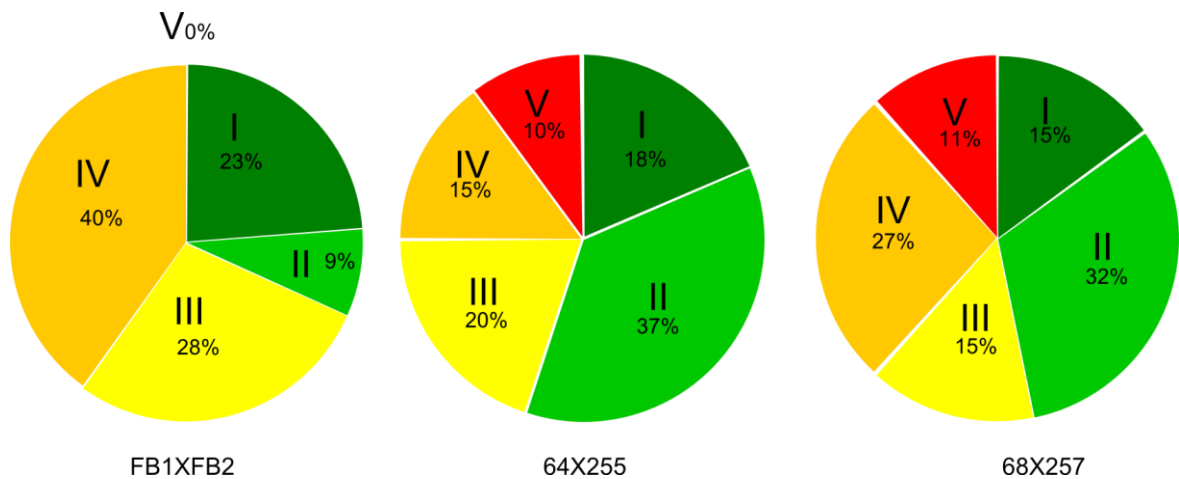


Figura 18. Gráficas de ensayos de patogenicidad. Se tomó una $N=180$ por cada experimento (FB1XFB2, 64X255 y 68X257) tomando como control negativo plantas inoculadas con agua destilada estéril.



Figura 19. Ensayos de infección en plantas. Se muestran síntomas de plantas donde: A, es una planta infectada con las cepas 68 X 257, B es una planta control a la que se le inoculo agua destilada estéril, C es una planta control de las cepas FB1 X FB2.



FB1XFB2



68X257



FB1XFB2



68X257

Figura 20. Sintomatología en ensayos de patogenicidad. En las imágenes inferiores se muestran los síntomas con mayor detalle donde se muestran los síntomas en hoja y tallo de las cepas parentales FB1 XFB2 y las cepas mutantes 68 X 255.

6. DISCUSIÓN

La trehalosa es una molécula de interés científico por las múltiples cualidades descritas, como su participación en respuesta a condiciones de estrés en diferentes hongos, y finalmente la relevancia que tiene la acumulación de trehalosa en la virulencia de hongos patógenos tanto de plantas como de humanos (Matthew y col., 2008). Es por ello que consideramos importante estudiar la catálisis de la trehalosa en este trabajo.

Según lo descrito en la base de datos del genoma de *Ustilago maydis*, este hongo posee una solo gen que codifica una enzima con actividad de trehalasa neutra, con el número de acceso Um11661, y en este trabajo denominado *UmNTH1* siguiendo la nomenclatura de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Por ensayos de RT-PCR determinamos la ausencia del mensajero del gen *UmNTH1*, comprobando así la mutación correspondiente.

Una de las preguntas más importantes planteadas en esta investigación es si la eliminación del gen *UmNTH1* en *U. maydis* conduciría al aumento de la concentración de trehalosa intracelular en el hongo y de ser así qué efectos fenotípicos se observarían en las mutantes. Como ha sucedido en *S. cerevisiae*, *M. grisea*, *B. cinerea*, *C. albicans* y *C. neoformans* (Foster y col., 2003; Doehlemann y col., 2006; Pedreño y col., 2006; Garre y matallana, 2009; Botts y col., 2009)

Nuestros resultados de la medición de trehalosa por HPLC en las mutantes *Δnth1* indican que el producto del gen *UmNTH1* está involucrado en la hidrólisis de este disacárido en este hongo, puesto que encontramos que la cantidad de trehalosa se incrementa en las cepas mutantes en comparación de la cepa silvestre. Este resultado es similar a lo observado en *Candida albicans*, *Magnaporthe grisea* y *Botrytis cinerea*, en los cuales solamente existe un gen que codifique una trehalasa neutra y cuyas mutantes muestran un contenido de trehalosa superior al de la cepa silvestre (Foster y col., 2003, Doehlemann y col., 2006, Eck y col., 1997). Sin embargo, un escenario diferente fue observado recientemente en el hongo patógeno de humanos *Cryptococcus neoformans*, y anteriormente en la levadura *S. cerevisiae*,

en los cuales existen dos genes que codifican trehalasas neutras, denominados *NTH1* y *NTH2*, y se determinó que el máximo contenido de trehalosa intracelular se obtiene cuando se generan las doble mutantes (Garre y Matallana, 2009, Botts y col., 2014), este dato muestra la importancia de la trehalosa en hongos.

Respecto a la capacidad de las mutantes *Anth1* para metabolizar diferentes fuentes de carbono, las curvas de crecimiento que se realizaron arrojaron resultados interesantes cuando la fuente de carbono fue glicerol, donde las mutantes registraron un crecimiento mayor en comparación a la cepa silvestre. Respecto a otras fuentes de carbono utilizadas (glucosa, fructosa, acetato de sodio, etanol y sacarosa) no hubo diferencia significativa entre el crecimiento observado en las cepas mutantes y las silvestres, este dato es similar a lo reportado en *M. grisea*, a excepción del crecimiento en acetato de sodio, en el que las mutantes *Anth1* de *M. grisea* crecen menos que la cepa silvestre (Foster y col. 2003).

Cuando evaluamos la respuesta ante condiciones de estrés por parte de las mutantes *Anth1*, observamos que dichas mutantes son más resistentes a la presencia de ácido acético, este dato coincide con lo reportado en *S. cerevisiae*, (Yoshiyama y col. 2014). Así mismo, las mutantes *Anth1* de *U. maydis* mostraron resistencia a condiciones de estrés oxidativo, como es la respuesta a menadiona, ter-butil hidroperóxido, peróxido de hidrógeno y rosa de bengala resultados que coinciden con lo previamente reportado en *C. albicans* y *S. cerevisiae*, (Alvarez-Peral y col., 2002, Herdeiro y col., 2006), lo que sugiere que la trehalosa tiene funciones similares en los seres vivos.

Un dato interesante fue que las mutantes *Anth1* de *U. maydis* acumulan mayor cantidad de trehalosa en respuesta a la presencia de H₂O₂. En este sentido, observamos que el transcrito de *UmNTH1* tiene una expresión un poco más alta en comparación con la condición control (sin estrés), indicando una posible regulación transcripcional de *UmNTH1* en respuesta a este estrés oxidativo; de igual forma los efectos de regulación a nivel postraducciona no son descartados, este dato asemeja lo observado en *S. cerevisiae*, en los que se observa que el gen *UmNTH1* se expresa

abundantemente ante situaciones de estrés oxidativo con H₂O₂ (Zähringer y col., 1997), probablemente este dato nos da una pista de que la trehalosa es más un agente protector que una fuente de carbono.

El fenotipo más sobresaliente fue lo observado en los experimentos de patogenicidad. En el caso de los basidiomicetos, un prerequisite para llevar a cabo el proceso de infección, consiste en la capacidad de realizar el apareamiento entre cepas de sexo opuesto, en este caso, la carencia del gen *UmNTH1*, no repercutió con dicho proceso, según lo observado en nuestros experimentos en placas de carbón activado; puesto que la prueba de “Fuzz” fue positiva en un grado similar al de las cepas silvestre. En el caso de *C. gattii* que al ser un basidiomiceto debe llevar a cabo el apareamiento, en las mutantes *Δnth1* de este hongos no se reportaron defectos en el apareamiento (Ngamskulrungrroj y col. 2009). Otro aspecto importante a analizar en *U. maydis* es la capacidad de cambiar de un crecimiento levaduriforme a uno en forma de hifa, fenómeno conocido como dimorfismo y el cual es un aspecto necesario para llevar a cabo el proceso de patogenicidad (Brefort y col. 2009). *In vitro*, podemos estudiar este proceso utilizando medio mínimo ajustado a pH 3 (MM pH 3), bajo estas condiciones experimentales, encontramos que dicha característica no fue afectada por la eliminación del gen *UmNTH1*, Figura 15. Es por ello que realizamos los experimentos en planta, y como se muestra en la Figura 19 las cepas *Δnth1* lograron producir un porcentaje mayor de infección en las plantas de maíz, este dato es interesante, puesto que las mutantes *Δnth1* de *M. grisea* estas son menos virulentas en comparación con la cepa silvestre (Foster y col. 2003), mientras que las mutantes *Δnth1* de *Botrytis. cinerea*, *C. albicans*, *C. neoformans* y *C. gattii* no mostraron ninguna alteración en la virulencia (Doehlemann y col., 2006; Ngamskulrungrroj 2009; Petzold y col 2006, Sneerless y col. ,2012). Sin embargo, recientemente se demostró que en mutantes *C. neoformans* la carentes del gen *NTH2*, que son hipervirulentas (Botts y col. 2014), resultado similar al observado en las cepas *Δnth1* de *U. maydis*.

Cabe mencionar que las mutantes *Δnth1* de *U. maydis* mostraron mayor resistencia a la presencia de SDS, éste compuesto es utilizado como un marcador de estrés en

la pared celular. Respecto a la pared celular sabemos, que es una estructura dinámica, y constituye el primer contacto del hongo con la planta a atacar, así como las interacciones que se llevan a cabo dentro de la planta (Dejamie y Kahmann, 2012), una de las posibles explicaciones a la mayor virulencia detectada en la mutantes *Anth1* puede deberse a cambios en la composición de la pared. En base a ello, Botts y col. 2014, argumentan que la hipervirulencia observada en las mutantes *nth2* de *C. neoformans*, puede deberse a alteraciones en la composición o estructura de la pared celular, que conllevan a cambios en las interacciones que de manera normal se da con el sistema inmune en ratón. Dado que las mutantes *Anth1* de *U. maydis* son más resistentes al estrés oxidativo, otra posibilidad es que estas mutantes resisten más el mecanismo de defensa que presentan las plantas al formar una explosión oxidante, facilitando así una mejor colonización del hospedero, (Lehmann y col., 2015)

Es importante recordar el fenotipo observado en las mutantes *Anth1* de *U. maydis*, el cual consiste en secretar muy poca cantidad de polisacárido al medio de cultivo, en comparación con la cepa silvestre. Este dato puede estar relacionado con alguna posible alteración en la arquitectura de la pared celular. Es por ello, que será necesario realizar otros experimentos que pongan de manifiesto alteraciones de la pared celular.

Así mismo la resistencia observada ante agentes oxidantes mostrada por las mutantes *Anth1*, puede contribuir al mayor índice de virulencia, puesto que existe evidencia que indica que las plantas producen H_2O_2 como mecanismo de defensa (Lehmann y col., 2015). Aunado a ello, en el caso de *U. maydis*, las mutantes *yap1* que son incapaces de soportar la presencia de H_2O_2 son menos virulentas (Molina y Kahmann 2007).

6.1 Perspectivas

Analizando nuestros datos y los reportados en la literatura es interesante resaltar el hecho de que en los diferentes hongos hasta ahora estudiados, las mutantes afectadas en la hidrólisis de trehalosa muestran un fenotipo distinto tanto en

condiciones in vitro como lo relacionado con la virulencia, por lo cual consideramos necesario estudiar otros organismos modelo, para poder entender la participación que puede tener en la fisiología de la célula altas concentraciones de trehalosa.

En futuros trabajos se podría comprobar la hipótesis de cambios en la composición y estructura de la pared celular, donde se podría utilizar microscopía electrónica y de fluorescencia aunado a técnicas espectrofotométricas para tener una idea de las proporciones de los compuestos que forman la pared celular en *U. maydis*.

Para conocer el panorama general de la importancia de la hidrólisis de trehalosa, tanto intracelular como extracelular, es necesario conocer el fenotipo de las mutantes que no hidrolizan la trehalosa extracelular “*ath1*”, puesto según lo reportado en la base de datos del genoma de *U. maydis* existe, un gen que codifica para la trehalasa ácida Um02212, así como la posible función de un transportador de trehalosa, previamente descrito en *S. cerevisiae* denominado Atg1, puesto que existe un posible homólogo en *U. maydis* UMAG_05972.

7. CONCLUSIONES

- 1.- La ausencia del transcrito de *UmNTH1* en las cepas *Anth1* comprobó la carencia del gen.
- 2.- Procesos fisiológicos como el dimorfismo y el apareamiento no son afectados por la carencia del gen *UmNTH1*.
- 3.- Las mutantes *Anth1* son resistentes a condiciones de estrés in vitro.
- 4.- El estrés oxidativo incrementa la cantidad de trehalosa intracelular y la expresión del gen *UmNTH1*.
- 4.- Las mutantes *Anth1* son más virulentas en plantas de maíz comparación con la cepa silvestre.
- 5.- La mayor virulencia observada en las cepas *Anth1* puede deberse a la resistencia a estrés oxidativo y a alteraciones en la pared celular desplegada por estas mutantes.

8. BIBLIOGRAFÍA

Agrios NG. Plant pathology. 5ª. Edición. Inglaterra. Esditorial Elsevier, **2008**;vol1:77-79.

Aréchiga-Carvajal E, Ruiz-Herrera J. The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. E C ASM. **2005**;4(6): 999-1008.

Banuett F, Herskowitz I. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary formaintenance of filamentous growth but not for meiosis.Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **1989**;86,5878-82.

Botts R M, Huang M, Borchardt K M, Hulli M C. Developmental cell fate and virulence are linked to trehalose homeostasis in *Cryptococcus neoformans*. E C ASM. **2014**;13:1158-1168.

Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, Reissmann S, Djamei A, KahmannR. *Ustilago maydis*as as a pathogen. Anual.Rev.Phytopathol. **2009**;47:423-45.

Cervantes-Chávez JA, Ortiz-Castellanos L, Tejeda-Sartorius M, Gold S, Ruiz-Herrera J. Functional analysis of the pH responsive pathway Pal/Rim in the phytopathogenic basidiomycete *Ustilago maydis*. Fungal Genet Biol. **2010**;47(5):446-57.

Chavan, S, Smith S M. . A rapid and efficient method for assessing pathogenicity os *Ustilago maydis* on maize and teosinte lines.J.Vis.Exp. **2014**;(83),e50712.DOI 10.3791/50712

Dean R, Van-Kan JA, Pretorius AZ, Hammond-Kosack EK, Pietro A, Spanu P, Jason J, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant. Pathol. **2012**;13:414-430.

Djamei A, Kahmann R. *Ustilago maydis*: dissecting the molecular interface between pathogen and plant. Plos Pathogens.[serie en internet] 2012[consultado 16 noviembre] ;8:[aprox 4 pp]. Disponible en: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1002955>

Doehlemann G, Berndt P, Hahn M. Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea*. Mic. **2006**;152:2625-2634.

Eleutherio E, Panek A, De Mesquita J F, Trevisol E, Magalhães R. Revisiting yeast trehalose metabolism. Curr Genet. **2014**;61:263-274.

Ferreira C J, Paschoalin M F V, Panek D A, Trugo C L. Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts. Food Chem. **1997**;60:251-254.

Foster J A, Jenkinson J, Talbot J N. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. EMBO J. **2003**; 22(2): 225-235.

García-Pedrajas M, Nadal M, Kapa B L, Perlin HM, Andrews LD, Gold SE. DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method. Fungal. Genet Biol. **2008**;45:379-388.

Garre E, Matallana E. The three trehalases Nth1p, Nth2p and Ath1p participate in the mobilization of intracellular trehalose required for recovery from saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology. **2009**; 155:3092-3099.

Godde. Eukaryotic microbes. Department. Monm. Biology [serie en internet]2008 [consultado 2013 noviemvbre 2]:[aprox 20 pp] disponible en <http://department.monm.edu/biology/godde/courses/EukaryoticMicrobes.htm#slide0043.htm>.

He S, Bystricky K, Leon S, François M J, Parrou L. The *Saccharomuces cerevisiae* vacuolar trehalase is targeted at the cell surface for its physiological function. FFBSJ. **2009**; 276: 5432-5446.

Holliday R. The genetics of *Ustilago maydis*. Genet. **1961**. 2:204–230.

Iturriaga G, Suárez R, Nova-Franco B. Trehalose Metabolism: From osmoprotection to signaling. Int J Mol SCI. **2009**; 10:3793-3810.

Jin K, Peng G, Liu Y, Xia Y. The acid trehalase, ATM1, contributes to the *in vivo* growth and virulence of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*. Fungal genet Biol. **2015**; 77: 61-67.

Jules M, Guillou V, François G, Parrou J L. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. AEM. **2004**; 70(5): 2771-2778.

Kämper J, Kahmann R, Bölker M, *et al.* Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*. **2006**;444:97-101.

Lehmann S, Serrano M, L' Haridon F, Tjamos E S, Metraux J P. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochem*. **2015**;112: 54-64.

Leng Y, Peng G, Cao Y, Xia Y. Genetically altering the expression of neutral trehalase gene affects conidiospore thermotolerance of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. *BMC Microbiology*. [serie en internet]2011[Consultado 17 noviembre]11[aprox 8pp] disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/32>

Luyckx J, Baudouin C. Trehalose: an intriguing disaccharide with potential for medical application in ophthalmology. *Clinical ophthalmology*. **2011**;5:577-581.

Macakova E, Kopecka M, Kukucka Z, Veisova D, Novak P, Man P, Obsil T, Obsilova V. Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochim Biophys Acta*. **2013**;1830:4491-4499.

Molina L. Kahmann. An *Ustilago maydis* Gene Involved in H₂O₂ Detoxification Is required for virulence. *Plant Cell*. **2007**; 19:2293-2309.

Ngamskulrungroj P, Himmelreich U, Breger J, Wilson C, Chayakulkeeree M, Krockenberger M, Malik R, Heide-Marie D, Toffaletti D, Djordjevic J, Mylonakis E, Meyer W, Perfect J. The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gatti*. *Infect Immun*. **2009**;77:4584-4596.

Puttikamonkul S, Willgwe S, Granl N, Perfect J, Movahed N, Bothner B, Park S, Paderu P, Perlin D, Cramer R. Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for cell wall integrity and fungal virulence but not trehalose biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol*. **2010**;77:891-911.

Ruiz-Herrera J, Leon, C, Guevara-Olvera L, Carabez-Trejo A. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology*. **1995**;141:695–703.

Ruiz-Herrera J, León-Ramírez. *Dimorphic Fungi. Their Importance as Models for Differentiation and Fungal Pathogenesis*, México: Bentham Science Publishers **2012**, 105-116

Ruiz-Herrera J. *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico.[serie en internet]2008[consultado septiembre 15];1:[aprox 17 pp] Disponible en: <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=203315665007>

Ruiz-Herrera J. Viaje al asombroso mundo de los hongos.1ª. edición. México: Fondo de Cultura Económica, **2012**;vol.1:99.

Salmerón K, Pardo P, Flores O, Mendozá G, Miranda M, Guerra G. Response to osmotic stress and temperature of the fungus *Ustilagomaydis*. Arch Microbial. **2011**;193:701-709.

Sánchez-Fresneda R, Martínez-Esparza M, Maicas S, Argüelles J C. In *Candida parapsilosis* the ATC1 gene encodes for an acid trehalase, involved in trehalose hydrolysis, stress resistance and virulence. PLOS One. **2014**; 9(6) e99113.

Savanström A, Melin P. Intracellular trehalase activity is required for development, germination and heat-stress resistance of *Aspergillusniger* conidia. Res Microbiol. **2012**;164:1-9.

Serneels J, Tounu H, Van-Dijck P. Tight control of trehalosa content is required for efficient heat-induced cell elongation in *Candida albicans*. J Biol Chem. **2012**;44:36873-36882.

Taga t, Senma M, Osaky k. The cristal and molecular structure of trehalose dehydrate. Acta Crystallogr Sect B Sci. **1972**;3145-3158.

Teramoto N, Sachinvala N, Shibata M. Trehalose and trehalose-based polymers for environmentally benign, biocompatible and bioactive materials. Molecules. **2008**;13:1773-1816.

Trevisol E T V, Panek D A, Mesquita F D J, Eleutherio C A E. Regulation of the yeast trehalose-synthase complex by cyclic AMP dependent phosphorylation. Biochem Biophys Acta. **2013**;1840:164-1650.

Van-Dijck, Colavizza D, Smet P, Thevelein J M. Differential importance of in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae*.Appl environ microbiol. **1995**;61: 109-115.

Zähringer H, Holzer H, Nwaka S: Stability of neutral trehalase during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the activity of the catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase, Tpk1 and Tpk2. Eur. J. Biochem. **1998**; 255: 544-551.

Zähringer H, Thevelein J, Nwaka S. Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. Mol Microbiol. **2000**;32(2):397-406.

ANEXOS

Medio mínimo (MM)

Elementos trazas para 500 mL

- 30 mg Ácido Bórico
- 70 mg Cloruro de Magnesio
- 200 mg Molibdato de Sodio Dihidratado
- 50 mg Cloruro de Hierro
- 200 mg Sulfato de Cobre

Solución de Sales para 1000 mL

- 16 g Fosfato de Potasio Monobásico
- 4 g Sulfato de Sodio
- 8 g Cloruro de Potasio
- 2 g Sulfato de Magnesio Heptahidratado
- 1 g Cloruro de Calcio Dihidratado
- 8 mL Elementos traza

Medio Mínimo pH 3 (MM pH 3) 1000 mL

- 1 % (m v^{-1}), Glucosa
- 3 g Nitrato de Potasio
- 62.5 mL Solución de Sales

Medio Mínimo pH 7 (MM pH 7) 1000 mL

- 1 % (m v^{-1}), Glucosa
- 3 g Nitrato de Amonio
- 62.5 mL Solución de Sales

Medio Completo (MC) 1000 mL

- 5 g Peptona

- 1.5 g Nitrato de Amonio
- 10 g Extracto de Levadura
- 62.5 mL, Solución de Sales`
- 10 g Glucosa

Azul de Algodón

- 5 g Fenol
- 10 g Glicerina
- 5 mL Ácido Láctico
- 12.5 mL Anilina

Tris EDTA (TE)

- Tris HCl pH 8, 10 mM
- EDTA, 1 mM

Tris Ácido Acético EDTA (TAE)

- 0.04 M Ácido Acético
- 0.04 M Tris HCl pH 8
- 0.001 M EDTA

TSNTE

- 1 % (m v⁻¹) Tritón X 100
- 1% (m v⁻¹) SDS
- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris HCl pH 8
- 1 mM EDTA