



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO FENOTÍPICO DE LA MUTACIÓN EN EL GEN DE
UNA PROTEASA ASPÁRTICA EN EL HONGO
FITOPATÓGENO *Ustilago maydis*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO AGRÍCOLA

PRESENTA

FRANCISCO JAVIER CÓRDOBA ANDRADE

DIRIGIDA POR

Dr. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2018

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

**"EFECTO FENOTÍPICO DE LA MUTACIÓN EN EL GEN DE
UNA PROTEASA ASPÁRTICA EN EL HONGO
FITOPATÓGENO *Ustilago maydis*"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO AGRÍCOLA

PRESENTA

FRANCISCO JAVIER CÓRDOBA ANDRADE

DIRIGIDA POR

Dr. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ

SINODALES

Dr. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ

DIRECTOR

Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR

ASESOR INTERNO

Dr. EDGARDO ULISES ESQUIVEL NARANJO

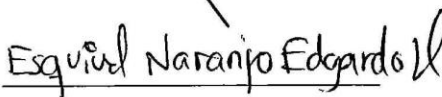
SINODAL

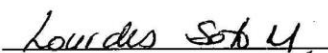
Dr. LOURDES SOTO MUÑOZ

SINODAL









Agradecimiento:

Por la beca otorgada para la realización de éste proyecto de Tesis, bajo el financiamiento FONDO PARA EL FORTALECIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN (FOFI-UAQ 2015), el proyecto denominado “Alteraciones fisiológicas ante condiciones de estrés y virulencia en cepas de *Ustilago maydis* incapaces de hidrolizar la treahalosa”. Con número de registro FNB 201605, clave 11695.

Apoyo parcial por uso de equipo, proyecto 165844, Sep-Conacyt. Ciencia Básica.

Agradecimientos

A la profesora Eva Andrade Lora, mi inversionista, mi amiga y madre, sin ti nada de esto hubiera sido posible, por creer en mi cuando ni yo lo hacía.

Y a mi familia en general mi padre y mis hermanos, mis tíos y mis abuelos.

A mi abuelita Epifanía por enseñarme el amor al campo, a la tierra y al café.

A mis compañeros del LAMIMO, Evelia y Alonso los escandalosos (de los cuáles aprendí las cosas más básicas de biología molecular que ignoraba) y a los Trichoderms. En especial al Doctor José Antonio Cervantes Chávez porque no he conocido a un profesor tan paciente con alumnos como nosotros. A mis profesores revisores Doctores Ramiro, Ulises y Lourdes.

A mis amigos que fueron pieza clave en mis últimos años en la facultad, a mi amiga Verónica Sáenz Fonseca y a su familia por la confianza que me brindaron. A mi amiga y compañera de exámenes y almuerzos Marisol Martínez Martínez por permitirme ser parte de su familia y en especial a mi "Tía Laura".

A mis amigos de la facultad Paulina y Laura. A mi carnal Edgardo Becerra Becerra que me ha demostrado que la familia no siempre es de sangre.

Un verdadero amigo no te deja solo jamás. Está cuando ríes y cuando lloras. Te critica en tu cara y te defiende a tus espaldas.

.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Proteasas Aspárticas	1
1.1.1. Estructura	1
1.1.1.1. Estructura primaria	1
1.1.2. Función biológica	2
1.1.3. Clasificación de las péptidasas	2
1.1.4. Mecanismo de reacción de las proteasas aspárticas	2
1.2. El rol de las proteasas aspárticas en las plantas	3
1.2.1. Estructura primaria de las péptidasas vegetales	3
1.2.2. Estructura secundaria de las péptidasas vegetales	4
1.3. Importancia de las proteasas aspárticas en los hongos	4
1.3.1. Efecto homeostático de las PAs en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.3.2. Importancia de las proteasas en la virulencia de un fitopatógeno	6
1.3.3. Hongos de importancia económica y científica	6
1.3.3.1. <i>Botrytis cinerea</i>	7
1.3.3.2. <i>Magnaporthe oryzae</i>	9
1.4. <i>Ustilago maydis</i>	11
1.4.1. Ciclo de vida de <i>U. maydis</i>	12
1.4.2. Genoma de <i>U. maydis</i>	13
2. HIPOTESIS	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. General	16

3.2. Específicos	16
4. METODOLOGIA	17
4.1. Métodos	17
4.1.1. Edición del genoma de <i>Ustilago maydis</i>	17
4.1.1.1. Estrategia de delección del gen Um02178	17
4.1.1.2. Extracción de ADN Genómico	19
4.1.1.3. Extracción de ARN total	20
4.1.1.4. Síntesis de cADN	21
4.1.2. Ensayo de estrés en placa	22
4.1.3. Pruebas de virulencia	23
4.1.4. Reacción fuzz	23
4.1.5. Crecimiento en forma de hifa	23
5. RESULTADOS	25
5.1. Identificación in silico del gen <i>Um02178</i>	25
5.2. Escrutinio de mutantes por PCR	28
5.3. Metabolismo de diferentes fuente de carbono	30
5.4. Respuesta a condiciones de estrés.	33
5.5. Reacción fuzz	42
5.6. Crecimiento en forma de hifa	43
5.7. Pruebas de virulencia	44
6. DISCUSIÓN	47
7. CONCLUSIONES	528. PERPECTIVAS
	53
9.REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO

1	Cepas mutantes de proteasa aspártica	20
2	Oligonucleótidos utilizados	22

INDICE DE FIGURAS

Figura

1	Mecanismo de reacción de una proteasa aspártica.	3
2	Estructura cuaternaria de la proteasa aspártica 2JXR	5
3	Síntomas de infección por <i>B. cinerea</i> .	8
4	Infección en arroz y avena.	10
5	Interacción arroz- <i>M. oryzae</i> .	11
6	Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> .	13
7	Estrategia de delección.	18
8	Alineamiento de aminoácidos usando en el método Jotun Hein	26
9	Dendograma de alineamiento.	27
10	Producto de PCR	28
11	Productos de RT-PCR.	29
12	Metabolismo de diferentes fuentes de carbono al 2 % a pH 7.	31
13	Metabolismo de diferentes fuentes de carbono al 2% y a pH 3.	32
14	Diferentes concentraciones de tert-Butil hidroperóxido.	34
15	Diferentes condiciones de estrés oxidativo.	36
16	Diferentes condiciones de estrés osmótico .	37
17	Diferentes condiciones de estrés.	38
18	Estrés con rosa de bengala y rojo Congo.	39
19	rosa de bengala y rojo Congo	40
20	Cafeína y Calcofluor.	41
21	Ensayo en gelatina.	42
22	Reacción fuzz.	43
23	Transición dimórfica.	44
24	Síntomas de patogenicidad.	45
25	Histograma entre variables de virulencia	46
26	Diagramas de Caja	46

RESUMEN

Ustilago maydis es un hongo fitopatógeno que pertenece al orden de los *Ustilaginales* el cual afecta únicamente al cultivo de maíz y a su ancestro común el Teocinle (*Zea perennis*); se ha convertido en el organismo modelo para estudios moleculares en la interacción patogénica hongo-planta. En el presente trabajo con técnicas de biología molecular (PCR, RT-PCR, etc) y microbiología se caracterizó fenotípicamente la mutante nula sencilla (472 y 476) del gen *Um02178* que codifica para una probable proteasa aspártica, se evaluaron parámetros de virulencia en plántulas de maíz (tamaño de tumor y formación de antocianos), y se estudió la participación de esta proteasa en la capacidad para utilizar algunas fuentes de carbono (fructosa, sacarosa, glucosa, glicerol, acetato de sodio y etanol) y la respuesta a algunas condiciones de estrés (tert-butilhidroperóxido y peróxido de hidrógeno) en este basidiomiceto. Se encontró que la delección de dicha proteasa aspártica no afecta la morfología estructural de pared celular, ni el grado de virulencia en el hospedero, sin embargo cuando las mutantes nulas son crecidas en un ambiente oxidativo en un medio suplementado con Rosa Bengala (9.8 μM y 15 μM) éstas muestran mayor capacidad para formar colonias, por lo que posiblemente la proteína *Um02178* podría estar involucrada en un mecanismo de inhibición frente a estrés oxidativo; el genoma de *U. maydis* codifica para 4 proteasas aspárticas adicionales a la deletada (*um02597*, *um05097*, *um11569* y *um11908*), por lo que al no encontrar un fenotipo diferente respecto a la cepa silvestre, es posible que éstas proteasas adicionales soportan la pérdida, a través de redundancia de funciones.

Palabras Clave: *Ustilago maydis*, proteasa aspártica, rosa de bengala, estrés oxidativo.

1. ANTECEDENTES

1.1. Proteasas Aspárticas.

El conocimiento de las enzimas de un organismo permite entender las interacciones y las respuestas de éste ante su entorno. Existe una gran cantidad de procesos enzimáticos así como la clasificación de las enzimas involucradas, en este caso las proteasas aspárticas también conocidas como péptidasas aspárticas, son enzimas hidrolíticas que están presentes en muchos organismos tanto eucariontes como procariontes; desde vertebrados, hongos y plantas así como en retrovirus; además debido a su alta actividad y estabilidad a pH ácido se han utilizado en la industria alimenticia, principalmente en lácteos, como agentes coagulantes o para mejorar el sabor de ciertos alimentos (Mandujano-González y col., 2016).

1.1.1. Estructura.

En todos los vertebrados y muy probablemente en los hongos, las proteasas aspárticas son sintetizadas como zimógenos, en donde el extremo N-terminal es escindido y separado conllevando así a la activación enzimática (Davies, 1990).

1.1.1.1. Estructura primaria.

En la mayoría de los mamíferos, plantas y hongos, estas enzimas tienen un peso promedio de 35 KDa, con aproximadamente 327 aminoácidos (Davies, 1990), la característica principal de este polipéptido es que tiene dos dominios homólogos internos, cada uno de los cuales poseen un residuo catalítico de Aspartato, ubicado en un motivo D-T/S-G (Aspartato-Treonina/Serina-Glicina) en el sitio activo (Revuelta y col. 2014). Cada uno de estos residuos es seguido por una secuencia hidrofóbica-hidrofóbica-Gli: estos residuos forman una estructura llamada bucle-psi ψ (Cooper y col. 1990).

El dominio N-terminal contiene un residuo estrictamente conservado de Y₇₅ localizado en la horquilla beta del bucle y que sobresale del sitio activo, y por lo general contiene un residuo de Triptófano en la posición 39 (Revuelta y col. 2014).

1.1.2. Función biológica.

Al igual que en otras familias de péptidasas, la función individual que desempeñan es muy variada; existen peptidasas aspárticas muy bien caracterizadas como es el caso de la pepsina, gastricsina y la quimosina (rennina) las cuales se encuentran involucradas en el proceso de la digestión en seres humanos; en el caso de los hongos se cree están involucradas en el proceso de esporulación (Hofmann, 1989).

Aunque se han producido industrialmente proteasas aspárticas (PAs, proteasas aspárticas) secretadas por hongos, como la aspergillopepsina (Cho y col. 2001), mucorpepsina (Newman y col. 1993), la penicillopepsina (Fraser y col. 1992) que incluso se han caracterizado bioquímicamente; muy poco se conoce de las funciones fisiológicas. Se sabe que las PAs fúngicas pueden localizarse en las vacuolas o estar asociadas a la membrana celular o a la pared a través de una unión mediada por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Revuelta y col. 2014).

1.1.3. Clasificación de las péptidasas.

Las PAs, pertenecen a una de las ocho grandes clases de proteínas degradadoras de enzimas, las cuales se dividen en cinco clanes o súper familias (AA, AC, AD, AE y AF) y 16 familias, el clan AA incluye a la familia A1 de las PAs eucariotas (Revuelta y col. 2014).

1.1.4. Mecanismo de reacción de las proteasas aspárticas.

El mecanismo generalmente aceptado es una reacción ácido-base que involucra la coordinación de una molécula de agua entre dos residuos de ácido aspártico; en uno de los residuos, el oxígeno se encuentra protonado formando un puente de hidrógeno con el oxígeno carboxílico del polipéptido. El otro oxígeno del residuo desprotonado abstrae un protón del agua, activando el grupo hidroxilo, el cual es una especie altamente reactiva, permitiendo un ataque nucleofílico al carbono carboxílico, formando un intermediario tetrahídrico. Dicha forma al ser inestable experimenta un re-arreglo permitiendo la protonación del átomo de nitrógeno,

generando así la formación de una amida y un ácido carboxílico, ver Figura. 1 (MACiE data base, 2016).

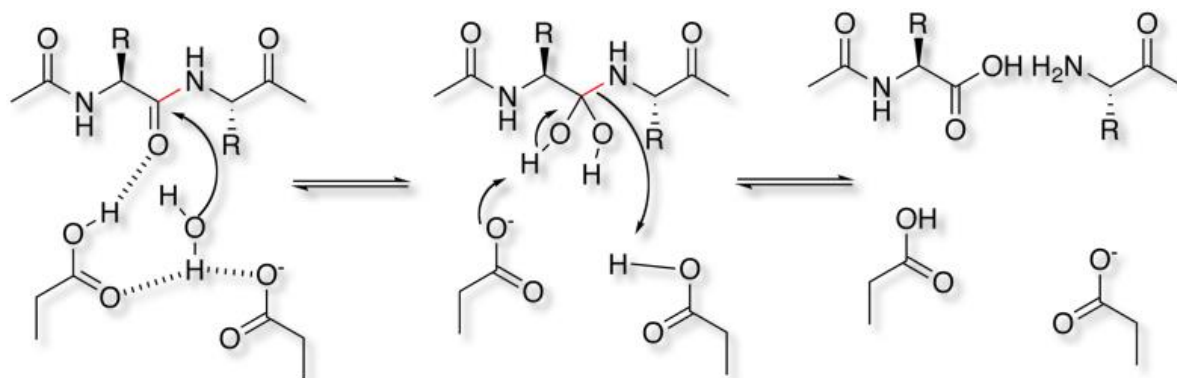


Figura 1. Mecanismo de reacción de una proteasa aspártica. (Cambridge MedChem, 2016).

1.2. El rol de las proteasas aspárticas en las plantas.

Las péptidasas de la familia A1 predominan en las plantas, y son activas a un pH ácido, son inhibidas por pepstatina A, con dos residuos de ácido aspártico el cual es indispensable para su actividad catalítica. La mayoría de las péptidasas aspárticas de las plantas son sintetizadas con un predominio y después son maduras en dos cadenas enzimáticas (Simões y Faro, 2004).

1.2.1. Estructura primaria de las péptidasas vegetales.

De igual forma que en otros organismos, las péptidasas vegetales comparten similitudes muy bien conservadas, son activas a pH ácido y presentan un prosegmento de alrededor de 40 aminoácidos, que será escindido para activar el zimógeno; sin embargo, su característica principal es la presencia de una secuencia de aproximadamente 100 aminoácidos denominada inserto específico vegetal o PSI por sus siglas en inglés (plant specific insert); dicha secuencia es muy similar a las saposinas y a las proteínas tipo saposinas (Simões y Faro, 2004). Este tipo de proteínas poseen dos secuencias catalíticas, Asp-Tre-Gli (DTG) y Asp-Ser-Gli (DSG) (Simões y Faro, 2004).

1.2.2. Estructura secundaria de las péptidasas vegetales.

A lo largo de la estructura secundaria predominan las láminas beta, con hélices alfa cortos, la molécula es bilobulada con el sitio catalítico localizado en una gran hendidura, entre dos dominios beta, cada uno de los cuales contribuye con un motivo catalítico (DTG/DSG). Tres puentes disulfuro estabilizan la molécula, además de que las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno mantienen juntas las cadenas polipeptídicas. Al igual que en otras PAs, contiene una sección flexible conocida como capucha, la cual se proyecta hacia afuera de la hendidura y acerca sus substratos e inhibe el sitio activo (Simões y Faro, 2004).

El inserto específico vegetal o PSI experimenta diversos procesamiento proteolíticos para producir una o dos cadenas maduras de la enzima. El procesamiento proteolítico inicia con la remoción de la secuencia señal hasta la translocación a él lumen del retículo endoplasmático, seguido de un rompimiento del prosegmento o la parcial remoción del PSI (Davies, 1990). En el caso de la procariosina A, el precursor de la cardiosina A es completamente removido, probablemente por una peptidasa aspártica antes que el prosegmento, esta conversión en su forma activa ocurre dentro de la vacuola, cuando la proteína es acumulada (Ramalho-Santos y col., 1998); un mecanismo similar autocatalítico experimenta la centroprosina, una proteasa aspártica de *Centaurea calcitrapa* (Domingos y col. 2000) y la proteasa recombinante oryzasina 1 del arroz (Asakura y col. 2000).

1.3. Importancia de las proteasas aspárticas en los hongos.

1.3.1. Efecto homeostático de las PAs en *Saccharomyces cerevisiae*.

En *S. cerevisiae* se ha demostrado la importancia que tienen las PAs en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, específicamente en la homeostasis de glucano. *S. cerevisiae* cuenta con 5 diferentes genes que codifican para proteasas aspárticas (*YPS1*, *YPS2*, *YPS3*, *YPS6* y *YPS7*), dichos genes se expresan cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés, la expresión del gen *YPS1* aumenta hasta doce veces cuando la célula es sometida a un cambio

abrupto de temperatura de 30° a 37 °C; en las mutantes nulas simples, no se ve afectado el crecimiento, no así en dobles mutantes, se demuestra que dichas proteasas pueden tener función redundante, las mutaciones en esos genes comprometen la integridad de la pared celular, lo que demuestra que las PAs están relacionadas con el efecto homeostático de 1,3- y 1,6 β -glucano, así como la retención e incorporación de este polímero a la pared celular (Krysan y col., 2005).

La proteasa aspártica de *S. cerevisiae* codificada por el gen *YPS1*, es una proteína bilobulada. En la Figura 2, panel A, podemos apreciar la hendidura, lugar donde se encuentra el sitio activo, con los residuos Asp-Tre-Gli en rojo, en el panel B se aprecian las láminas β en la base de la proteína.

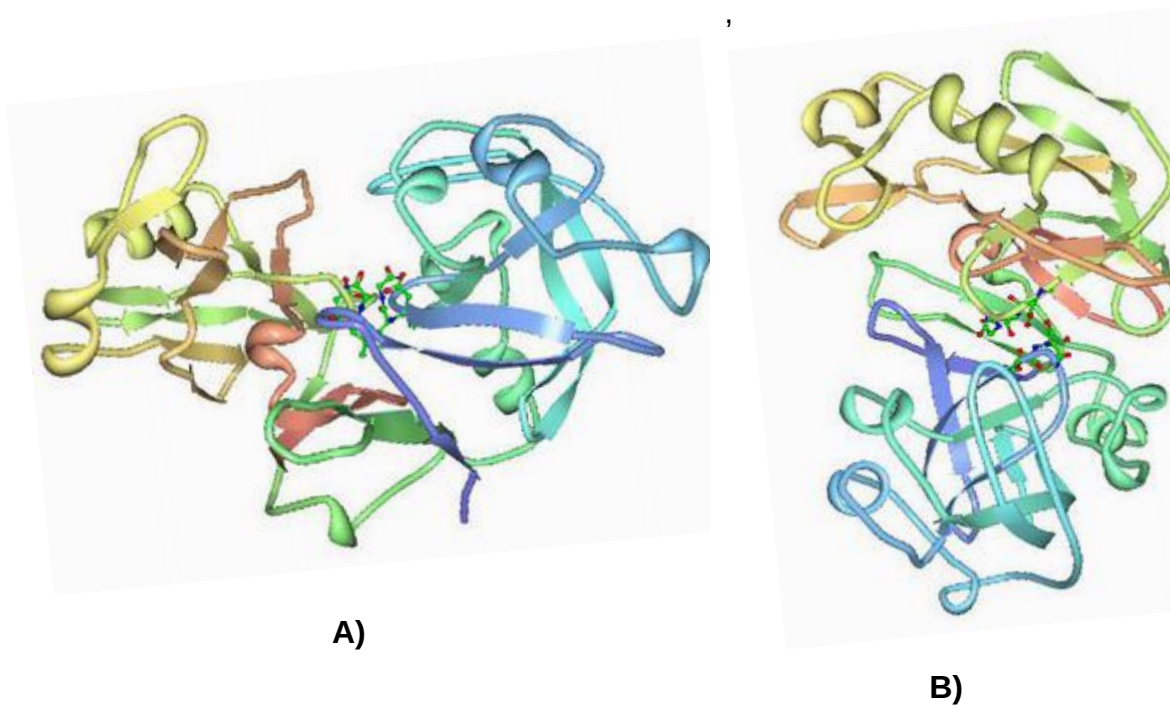


Figura 2. Estructura cuaternaria de la proteasa aspártica (2JXR) de *S. cerevisiae*, donde los aminoácidos Asp 32 y Asp 215 del sitio activo se muestran en átomos verdes, donde el extremo amino terminal se encuentra de color dorado, y el extremo carboxilo terminal en azul A) Vista lateral, B) Vista inferior (MEROPS, 2016).

1.3.2. Importancia de las proteasas en la virulencia de un fitopatógeno.

Se han estudiado diversas proteasas aspárticas extracelulares de fitopatógenos y en particular, como éstas participan en los procesos de colonización, penetración y degradación de proteínas estructurales de la pared celular vegetal (Mandujano-González y col., 2015). La pared celular de un posible hospedero es la principal barrera que tiene que vulnerar un hongo, aunque su composición cambia considerablemente, comparten moléculas estructurales en las que se enfocan las enzimas degradadoras de pared celular o CWDE por sus siglas en inglés (Cell Wall Degrating Enzyme; Kubicek P. C. y col., 2014), todas las plantas contienen microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de pectina, hemicelulosa, lignina y proteínas estructurales (Cosgrove, D. 2005; Rose J. y col., 2004), y el éxito para degradar estos compuestos depende de la capacidad de producir estas enzimas hidrolíticas (Geiser y col., 2017).

1.3.3. Hongos de importancia económica y científica.

La existencia de hongos fitopatógenos es muy amplia y diversa, sin embargo, sólo algunos se consideran de mayor importancia, ya sea por su amplio rango de cultivos a los que puede afectar, por su difícil erradicación, o porque por su genoma y herramientas de biología molecular, microscopía, etcétera, se han vuelto organismos modelo en el estudio interacción hongo-planta (*Ustilago maydis* y *Melampsora lini*). Por su reporte en la literatura, se han tomado en cuenta un conjunto de 10 hongos patógenos (Ralph Dean y col., 2012):

- *Magnaporthe oryzae*
- *Botrytis cinerea*
- *Puccinia* spp.
- *Fusarium graminearum*
- *Fusarium oxysporum*
- *Blumeria graminis*
- *Mycosphaerella graminicola*
- *Colletotrichum* spp.
- *Ustilago maydis*
- *Melampsora lini*

Los mecanismos moleculares, por el cual un fitopatógeno logra vulnerar la barreras físicas y químicas de la planta, se encuentran codificados en el genoma de dicho hongo a través de herramientas obtenidas y perfeccionadas a través de una coevolución con su hospedero; *Botrytis cinerea* y *Magnaporthe oryzae* destacan por su importancia en el daño económico que pueden causar; *M. oryzae* produce la enfermedad conocida como la quema del arroz (rice blast disease, piriculariosis, quemazón, el 'fallat de l'arròs', el 'cucat' o añublo) el problema más recurrente en las regiones productoras (Dean y col., 2012), los cálculos recientes estiman una pérdida anual equivalente a las necesidades calóricas de 212 y 742 millones de personas (Fisher y col., 2012).

1.3.3.1. *Botrytis cinerea*.

B. cinerea, es un ascomiceto, fitopatógeno de vida libre necrotrófico, el cual presenta gran plasticidad genética contra mucha clase de fungicidas, altamente destructivos en tejidos seniles o maduros en dicotiledóneos, causa pérdidas masivas en cultivos en campo abierto e invernadero (Williamson y col. 2007).

Dentro de una amplia lista de hospederos, incluyen, flores, frutos, hojas, tallos y órganos de almacenamiento radical (papas o zanahorias). Los cultivos más afectados son los vegetales (como por ejemplo repollo, lechuga, brócoli y frijol), y los de frutos pequeños (ejemplo uva, fresa, frambuesa y mora) (Williamson y col. 2007).

Los síntomas que normalmente se presentan son pudriciones, seguido de un colapso en el tejido de parénquima, y una aparición de masas grises de conidios (tal como se muestra en la figura 3), principalmente en hojas y frutos suaves (Williamson y col. 2007).

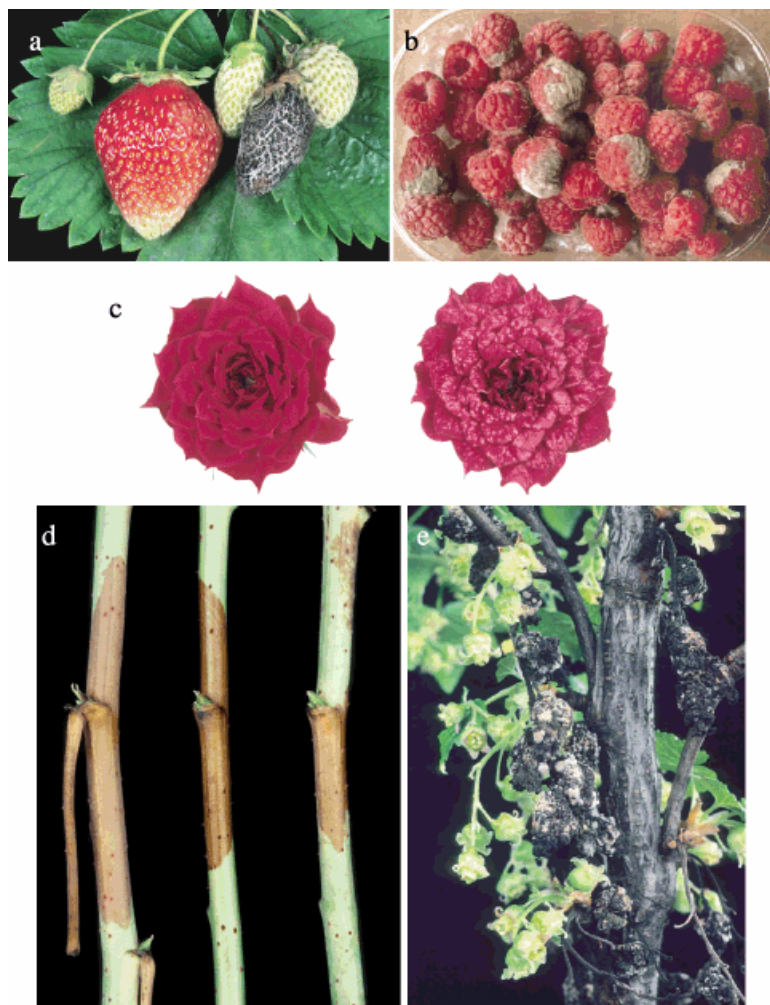


Figura 3. Síntomas de infección por *B. cinerea*. A) Pudrición gris en fresa. B) Pudrición gris en frambuesa. C) Manchas de pétalos de rosa (derecha). D) Lesión en los entrenudos después de una infección en hojas de frambuesa. E) Frutos de grosella unidos al tallo, previo a la liberación de conidios. (Imagen tomada de Williamson y col., 2007).

El patógeno *B. cinerea* muestra una gran adaptabilidad a los hospederos susceptibles, cerca de 200 especies vegetales (Ralp Dean y col., 2012), debido a la cantidad de herramientas bioquímicas que secreta en el momento de colonizar; en gran medida para poder sortear las barreras físicas y químicas, dichas proteínas han sido clasificadas en cuatro clases funcionales (González-Fernández, y col. 2015):

- Enzimas degradadoras de pared celular, como pectinesterasas y endopoligalacturonasas
- Proteínas involucradas en la degradación de proteínas hospederas, tales como proteasas aspárticas
- Proteínas relacionadas con daño oxidativo como glioxaloxidasa
- Proteínas que inducen respuesta hipersensible como proteínas con dominio ceratoplatanina.

Las proteínas secretadas por el patógeno *B. cinerea* se expresan dependiendo del tipo de tejido del huésped al que está en contacto; en frutos maduros, donde las células tienen pH ácido y una cantidad considerable de proteínas de defensa; la proteasa aspártica BcAP8, (una α -amilasa 1) y BcPIs1 juegan un papel importante para la colonización, ya que permiten a *B. cinerea*, obtener aminoácidos para su crecimiento, ablandar la pared celular (para la penetración de la hifa), y degradar proteínas de defensa (González-Fernández, y col. 2015).

Sin embargo, cuando se deleta el gen que codifica para BcAP8, las cepas mutantes no muestran una disminución en la virulencia, ya que la pérdida de actividad se compensa por la expresión de otros genes que pertenecen a la familia BcAP8, lo que demuestra que *B. cinerea* es un patógeno con una gran adaptabilidad ya que posee un arsenal de herramientas moleculares capaces de colonizar el hospedero con éxito (González-Fernández, y col. 2015).

1.3.3.2. *Magnaporthe oryzae*

M. oryzae es un hongo ascomiceto filamentoso, el cual es el principal agente causal de las enfermedades en arroz. Todos los tejidos de la planta son susceptibles, por ejemplo la infección en la panícula (Figura 4) representa la total pérdida de granos. A la fecha el desarrollo de cultivares resistentes es la principal estrategia para controlar esta enfermedad, aunque *M. oryzae* supera rápidamente dicha resistencia en un periodo de 2 o 3 años (Ralp Dean y col., 2012).



Figura 4. Infección en arroz y avena. A) Infección en la panícula de arroz, infección en todo el tejido foliar. B) En avena la infección se limita a la panícula, a menudo el síntoma puede confundirse con *F. graminearum*. (Imagen tomada de Ralph Dean y col., 2012).

El ciclo de vida de éste ascomiceto consiste en una etapa de infección hemi-biotrófico y otra de reproducción asexual (si bien se ha descrito el ciclo sexual, raramente se encuentra en la naturaleza), en el caso de la reproducción sexual es necesario que los fondos genéticos MAT1-1 y MAT1-2 se encuentren en el hospedero para que se desarrollen los cuerpos fructíferos. Durante la fase asexual son producidas tres células llamadas conidias que son esparcidas por las gotas del rocío. Un tubo germinativo emerge adhiriéndose a la superficie de las hojas en una fase conocida como “enganche” (Hooking), señales como la hidrofobicidad, la dureza superficial, y propias de la planta así como los monómeros de cutína, favorecen la formación de una estructura conocida como apresorio, el cual por fuerza mecánica es capaz de atravesar la cutícula de las hojas (Pérez-Nadales y col., 2014).

Durante la interacción entre la planta de arroz y *M. oryzae*, son secretadas por la planta un conjunto de moléculas asociadas a patógenos (PAMPs), ejemplo: son las especies reactivas de oxígeno (ROS), metabolitos (como fitoalexinas, fenilpropanoides, lignina y algunos flavonoides), y una amplia variedad de enzimas

hidrolíticas, por su parte el patógeno también responde con un armamento proteico codificado en su genoma; enzimas hidrolíticas de pared celular, peptidasas, toxinas, enzimas oxido-reductoras, y efectores apoplásticos, los cuales juegan un papel crucial para su invasión (Gon-Kim y col., 2013).

Cuando se analizó el secretoma involucrado en la interacción entre arroz y *M. oryzae* (Gon-Kim y col., 2013) por identificación multidimensional de proteínas (MudPIT analysis), se encontraron un total de 708 proteínas expresadas durante la interacción hongo-planta, 283 y 425 respectivamente con distintos procesos biológicos y funciones moleculares; en el caso del hongo se encontraron una amplia familias de proteínas, 54 Glicosilhidrolasas, 25 proteasas, 14 esterasas, 3 glicosilesterasas y 2 nucleasas, en la figura 5 es posible apreciar que algunas poseen un péptido señal, lo cual sugiere distintas rutas metabólicas (Gon-Kim y col., 2013).

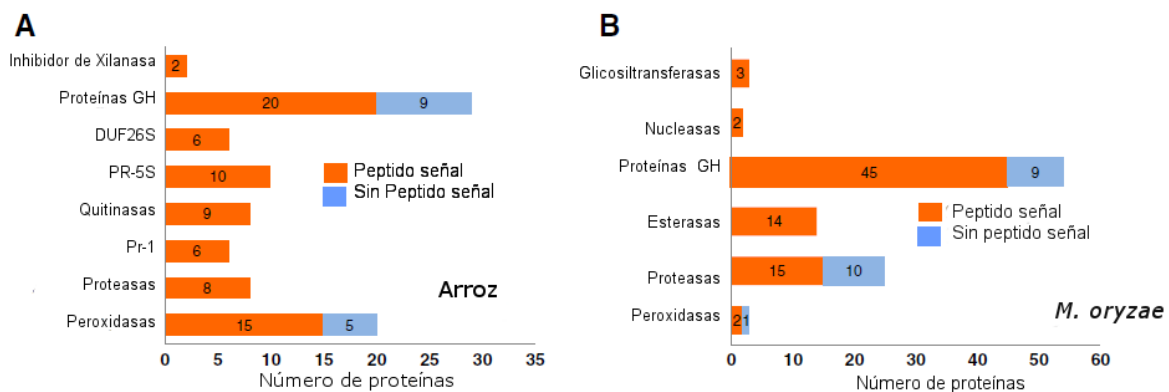


Figura 5. Interacción arroz-*M. oryzae*. A) En planta hay mayor expresión de proteínas Glicohidrolíticas (GH) y peroxidasas. B) En *M. oryzae* el número de proteínas tipo GH es mayor, y una mayor expresión de proteasas para poder colonizar la planta (modificado de Gon-Kim y col., 2013).

1.4. *Ustilago maydis*

U. maydis es un hongo basidiomiceto fitopatógeno que infecta al cultivo de maíz (*Zea mays*) y a su ancestro el teocintle, (Kämper y col. 2006; Dean y col. 2010),

se trata de un hongo dimórfico, cuyas células haploides crecen como levaduras saprofitas, o bien como hifa una vez que infecta al maíz (Ruiz-Herrera, 2012)

U. maydis forma parte de la lista de los 10 hongos fitopatógenos de mayor importancia tanto económica como científica; a diferencia de los otros hongos que poseen un amplio rango de hospederos, este basidiomiceto al ser huésped estricto del maíz y el teocintle posee cualidades que lo hacen único. Su genoma ha sido secuenciado y es de libre acceso en su base de datos, (MUMDB; <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>); (Kämper, 2006), su genoma comparte algunas similitudes con los humanos en algunas proteínas y procesos celulares como puede ser el sistema de recombinación homóloga (Banuett y col., 2008; Holloman, 2011; Steinberg y Pérez-Martin, 2008).

1.4.1. Ciclo de vida de *U. maydis*.

El ciclo de vida de este basidiomiceto está regulado por dos *loci* sexuales, el *a* con dos alelos *a1* y *a2*, y por el locus *b* el cual es multialélico (Ruiz-Herrera, 2012), la fase haploide saprofita no infectiva se caracteriza por que crecen en forma de levadura de 12 a 18 μm de largo y un ancho de 4 a 5 μm (Holliday, 1974). Cuando dos células haploides sexualmente compatibles se encuentran lo suficientemente cerca, se fusionan formando una estructura tubular, llamada tubo de conjugación. A continuación, los núcleos de las células originales migran a esta hifa dando origen a la fase dicariótica del hongo (Ruiz-Herrera y col. 2012) la cual se caracteriza por el crecimiento filamentoso; dicha fase del ciclo de vida es la única capaz de invadir la planta por medio de una estructura llamada apresorio; aunque el hongo haya invadido la planta, no hay aparente respuesta de ésta en esta fase, manteniéndose los tejidos vegetales vivos, es hasta la fase infectiva tardía, que ocurre el crecimiento de la hifa en los tejidos vegetales experimenta procesos de alteraciones morfológicas, tales como ramificaciones, formación de material mucilaginoso, desarrollo de células osmóticamente sensibles previo a la formación de las

teliosporas, es aquí donde sucede la cariogamia con la formación del estado diploide (Vollmeister y col., 2012)). A partir de la teliospora se forma un tubo germinativo denominado promicelio donde posteriormente migrará el núcleo ocurriendo la meiosis, formándose cuatro basidiosporas en posición acropétala las cuales geman reiniciando el ciclo de vida del hongo (Ruiz-Herrera, 2008), ver Figura 6.

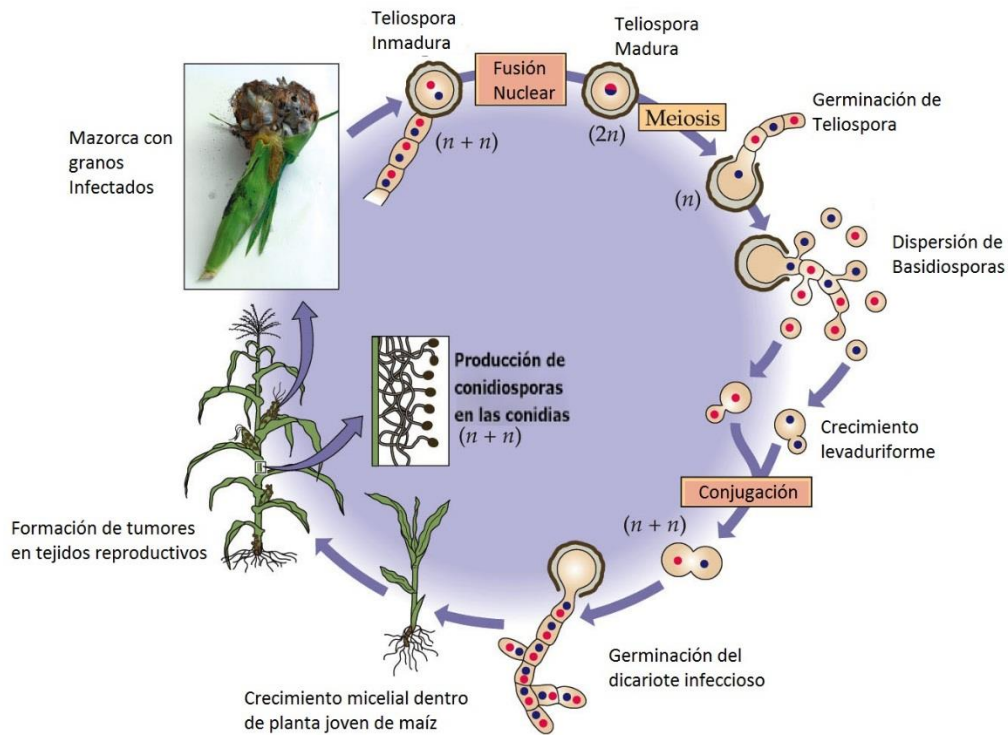


Figura 6. Ciclo de vida de *U. maydis*. Tomado de Godde, 2008.

1.4.2. Genoma de *U. maydis*

El análisis del genoma de este basidiomiceto, en la cepa haploide 521, tiene un tamaño de 20.5 Mb (millones bases) organizado en 23 cromosomas (Kämper J. y col. 2006). La base de datos MIPS de *U. maydis* enlista 6902 genes, el cual resulta muy pequeño si es comparado con otros hongos fitopatógenos. *U. maydis* posee una cantidad reducida de intrones, 0.46 intrones por gen, con un 70% de genes sin intrones, otros basidiomicetos como *Cryptococcus neoformans*, *Coprinus cinereus* y *Phanerochaete chrysosporium* contienen en promedio 5.3, 4.5 y 2.6 intrones por gen

respectivamente (Loftus y col.2005). La reducida cantidad de intrones en *U. maydis* podría ser consecuencia de un sistema de recombinación homóloga muy eficiente (Holliday, R., 2004; Kämper, J. 2006).

2. HIPÓTESIS

La delección del gen *Um02178* que codifica una proteasa aspártica afecta la virulencia y la fisiología del hongo *Ustilago maydis*.

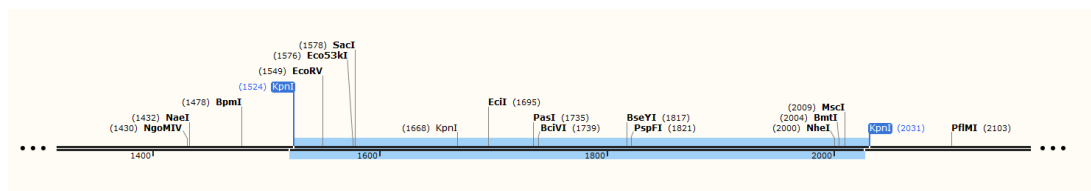
3. OBJETIVOS

3.1. General

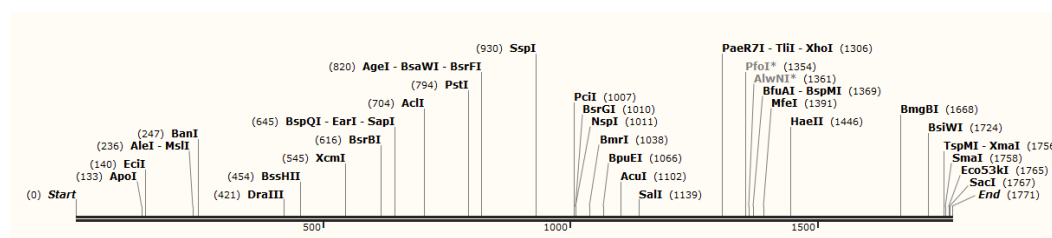
- Estudiar la función del gen *Um02178* que codifica para una proteasa aspártica, en la fisiología del fitopatógeno *Ustilago maydis* con énfasis en la virulencia.

3.2. Específicos

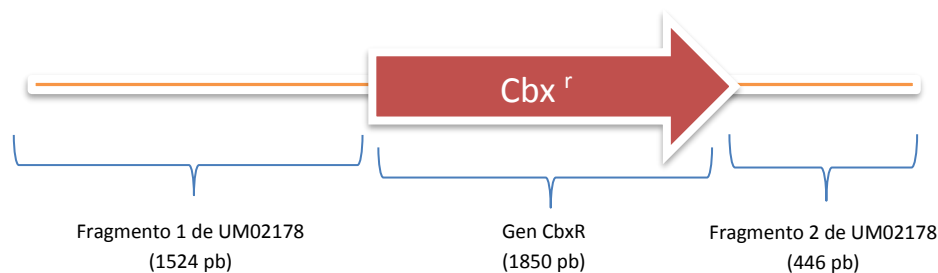
- Analizar la capacidad de las mutantes en el gen de la proteasa aspártica para metabolizar diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno.
- Estudiar la respuesta a estrés osmótico y oxidativo de las mutantes nulas en el gen que codifica la proteasa aspártica.
- Evaluar la participación del gen que codifica para la proteasa aspártica en la virulencia en plántulas de maíz.



C) Utilizando la enzima KpnI se elimina parte del Marco de Lectura (507 pb) y en su lugar se inserta el gen de resistencia a Carboxina.



D) Marco de Lectura del gen de Resistencia a Carboxina (CbxC de 1771 pb y extremos da un fragmento de 1850 pb).



E) Construcción clonada por PCR que se utilizó para hacer la transformación de U. maydis.

Figura 7. Estrategia de delección. En el panel A) puede apreciarse el gen en estado nativo flanqueado por los oligos PRACA para ser clonado. Panel B y C) el inserto en el vector pGEM el cuál es digerido con las enzimas KpnI eliminando parte del marco de lectura (507 pb). Panel D) Marco de Lectura del gen de resistencia a carboxina Cbxr. E) Construcción utilizada para la transformación de las cepas parentales FB1 y FB2.

4.1.1.2. Extracción de ADN Genómico.

Se llevó la extracción de ADN genómico de las cepas de *U. maydis* mutantes resistentes a carboxina y de las cepas silvestres FB1 y FB2 (colección del laboratorio de Microbiología Molecular, cuadro 1), previamente inoculadas en tubos cónicos de 50 mL, en 10 mL de medio completo líquido (MC) con una concentración de carboxina de 4 µg/mL (cepas mutantes). Los cultivos se incubaron a 28 °C en agitación a 150 revoluciones por minuto por un periodo de 24 horas.

Pasadas las 24 horas, se concentraron las células, por centrifugación a 3500 rpm (en una centrifuga Thermo Scientific ST40R) durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se recuperó la pastilla de células concentradas en el fondo del tubo cónico. Se añadieron 200 µL de solución TE, dicha mezcla se transfirió a tubos eppendorf, a continuación se agregaron 400 µL de solución TSNTe y 400µL de solución Fenol-Cloroformo (1:1), y se agitó durante 5 minutos utilizando un agitador vortex. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por espacio de 10 minutos, se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y se le agregaron 3 µL de ARNase (10 mg/mL), se aplicó una breve agitación con vortex. La mezcla se incubó a 37 °C durante 20 minutos.

Terminada la incubación se agregaron 300 µL de cloroformo, y se aplicó una agitación en vortex durante 3 minutos y nuevamente se aplicó una centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf nuevo.

Al tubo con sobrenadante se le agrego un décimo de volumen de acetato de Sodio 3M y 2 volúmenes de etanol puro (frío), y se mantuvo a una temperatura de -20 °C durante 30 min para favorecer la precipitación de ADN.

Cuando finalizó el tiempo de incubación, se centrifugo a 12000 rpm durante 10 min, terminado el tiempo de incubación, se desechó el sobrenadante, se formó una pastilla blanquecina que consiste de ADN, se agregaron 350 µL de etanol 70% para limpiar la muestra. El tubo se centrifugo durante 5 min a 13,000 rpm, se desechó el

sobrenadante, el tubo se colocó boca abajo y se dejó secar la pastilla de ADN durante 10 min, al final la pastilla se suspendió en un volumen aproximado de 50 µL de agua desionizada estéril (grado biología molecular).

4.1.1.3. Extracción de ARN total.

Se llevó a cabo la extracción de ARN total tanto de la cepa silvestre FB2, como de las cepas mutantes (Δ praca), nombradas como 472, 473, 475 y 476 (cuyos fondos genéticos se encuentran en el cuadro 1).

Cuadro 1 Cepas mutantes de proteasa

Fondo Genético	a1b1	a2b2	a2b2	a2b2	a1b1	a1b1
Cepa	FB1	FB2	472	473	475	476

Las cepas se inoculan en medio MC líquido durante 24 horas, pasado este tiempo, las células se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se guardaron en congelación a una temperatura de -80 °C. La pastilla de células se molió en mortero, pistilo en nitrógeno líquido, evitando la descongelación de la muestra. El polvo fino obtenido, se colectó en tubos eppendorf de 2 mL (200 µL aproximadamente de muestra), y se almacenó hasta su uso a -80°C. Posteriormente se adicionó 1 mL de trizol a cada muestra, y se aplicó agitación en vortex durante 2 minutos. Se dejó la muestra a temperatura ambiente durante 5 min, y después se agregaron 400 µL de cloroformo, por cada mL de trizol utilizado, se agitó por 15 segundos con la mano, y se dejó a temperatura ambiente por 3 minutos, los tubos se centrifugaron a 12000 rpm a 4 °C por 10 minutos, y se recuperó el sobrenadante a tubos eppendorf nuevos.

EL ARN se precipitó adicionando 600 µL de una mezcla de citrato de sodio 0.8 M y NaCl 1.2 M, más 700 µL de isopropanol frío, se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasado el tiempo se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó con etanol al 75%, y se le aplicaron

ligeros golpeteos, y se volvió a aplicar una centrifugación a 13000 rpm durante 5 min a 4°C, se decantó y se dejó secar. La pastilla de ARN se disolvió con 50 µL a 100 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato 1% (DEPC), incubar a 55°C por 5 min. Una vez disuelto el ARN se determinó su concentración utilizando el nanodrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC). Se consideró ARN de buena calidad si se obtuvo una relación 260/280 cercana a 2 (lectura en el espectro).

4.1.1.4. Síntesis de cADN.

En tubos Eppendorf de 2 mL se prepararon soluciones de trabajo de ARN de las cepas FB2 y las mutantes nulas del gen de la proteasa aspártica 472, 473, 475 y 476 a una concentración final de 400 ng/µL en un volumen de 30 µL. Se tomó una alícuota de 5 µL de cada solución trabajo, las cuales fueron tratadas con 2 µL de enzima ADNsa I (Thermo SCIENTIFIC), 2 µL de amortiguador de la enzima MgCl₂ 10X y 11 µL de agua DEPC, todo en tubos para PCR en un volumen final de 20 µL, se incubaron a una temperatura de 37°C durante 35 min, pasado dicho tiempo se detuvo la reacción añadiendo 2 µL de EDTA 50 mM, y se incubaron por 10 min a 65 °C. A continuación, a 10 µL de ARN tratado con ADNsa I se le agregaron 1 µL de oligo (dT) y 1.5 µL de agua DEPC y se incubaron por 5 minutos a una temperatura de 65°C, terminada la incubación se agregaron los siguientes reactivos 4 µL de amortiguador 5X, 0.5 µL de RiboLock (inhibidor de ARNsas), 2 µL de la mezcla de dNTPs (10 mM) y 1 µL de la enzima Transcriptasa Reversa (RT), en un volumen final de 20 µL. Se llevaron a cabo controles con enzima RT (transcriptasa reversa) y sin RT por cada muestra. Dicha reacción se llevó a cabo a 42°C por 60 minutos, seguido de 72°C durante 10 min, en el termociclador (BIORAD T100). Una vez sintetizado el cADN se determinó la expresión del gen que codifica la proteasa aspártica (Cuadro 2, oligonucleótidos 2120 y 2123) por medio de PCR de punto final, en las cepas FB2 y correspondientes mutantes. Como control se amplificó un fragmento del gen de actina *Um11232*. El resultado de la amplificación se observó en geles de agarosa al 1.2 % teñidos con Bromuro de Etidio y marcador de peso molecular de 100 pb.

Cuadro 2 Oligonucleótidos utilizados.

Nombre de Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Gen que amplifica	Sentido	Tm °C
2120	TCTGTTGTTTCAGCAGCTGTA	<i>Um02178</i>	D	65
2123	ATCGAAGGGCCTTGTAACCT	Parte del marco de lectura abierto	R	
2035	CTTCCTGACGGACAGGTGAT	<i>UmActina</i>	D	61
2036	CTCGGGAGGAGCAACAATC		R	
Praca 5'	CGTGCTGATACCGGTGAA	<i>Gen Um02178</i>	D	62
Praca 3'	GATGCCACTCACTAGCGG		R	

4.1.2. Ensayo de estrés en placa.

Se inocularon 7.5 mL de MC con la cepa de interés y se incubaron durante 24 horas en agitación constante a 28°C. Posteriormente las células se lavaron con agua destilada estéril. Las células se resuspendieron en 5 mL de agua destilada estéril y se ajustó la concentración a 1×10^8 células/mL. Posteriormente se realizaron diluciones decimales de 10^7 a 10^3 células/mL.

El ensayo de estrés se realizó en medio mínimo (MM) sólido pH 7 (30 mM Tris-HCl) con 2% de glucosa como control, suplementado con el agente estresante. Las células se sometieron a diferentes tipos de estrés; estrés oxidativo (Menadiona, Peróxido, tert-Butil hidroperóxido, rosa de bengala), estrés de pared celular (rojo Congo, Calcofluor Blanco, dodecil sulfato sódico-SDS y cafeína), estrés osmótico (KCl, NaCl, Manitol, Sorbitol). Cada caja se inoculó con 10 µL de cada dilución de células desde 10^{-3} hasta 10^{-7} , método de ensayo por goteo “spot assay” para cada cepa (Cervantes-

Chávez y col. 2010) y se incubaron por 28 °C durante 72 horas. Transcurrido ese tiempo, se tomaron fotografías. Los ensayos se realizaron por triplicado.

4.1.3. Reacción Fuzz.

Para poder conocer la compatibilidad sexual entre cepas de *U. maydis* se procedió a inocular las cepas parentales y mutantes, en medio MC (Medio Completo) suplementado con carbón activado al 1 %; acomodadas en cuadrícula, de tal manera que cuando se mezclan cepas sexualmente compatibles, éstas den positiva la reacción de Fuzz, la cual representa crecimiento micelial de aspecto blanco y algodonoso (Banuett y Herskowitz, 1989).

4.1.4. Crecimiento en forma de hifa.

Para dicho análisis, las cepas mutantes y parentales se crecieron en 10 mL MC durante 18 h a 28 °C en agitación constante a 150 rpm. Posteriormente los cultivos se concentraron por centrifugación a 3000 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se lavó dos veces con agua destilada estéril (10 mL). 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 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 en hielo. Posteriormente 50 µL de éstas células se inocularon en 10 mL de: MM a pH 7 (ajustado con NaOH) en el cual se induce el crecimiento en forma de levadura y en MM pH 3 (ajustado con HCl) en el cual se induce el crecimiento en forma de hifa. Los cultivos se incubaron a 28 °C, en agitación constante (150 rpm) durante 12-15 h. Las células se tiñeron con azul de algodón y se observaron al microscopio (Leica DM750); se fotografiaron con la cámara Leica ICC50 HD, acoplada al microscopio.

4.1.5. Pruebas de virulencia.

Para analizar el efecto de la delección del gen de la proteasa aspártica en la virulencia de las cepas mutantes de *U. maydis*, se comparó con las virulencia de cepas

parentales FB1 y FB2 en plantas de maíz. Para ello, se inocularon plántulas de maíz de la variedad “Cacahuazintle” de 10 a 12 días de edad en condiciones controladas. Para esto se preparó un pre inóculo de las cepas de interés en 5 mL de MC y se incubaron por un periodo de 18 a 24 horas 28°C en agitación. Después se inocularon 25 mL de MC con 500 µL del preinóculo, y se incubó a 28 °C durante 24 horas; pasado este tiempo se determinó la concentración de las células en la cámara de Neubauer, se preparó una solución a una concentración de 1×10^8 células/mL, con esta solución se inyectó a cada planta con 300 µL (mezcla de células sexualmente compatibles). La sintomatología de las plantas se evaluó periódicamente durante 2 a 3 semanas, clasificando los síntomas como: tamaño de tumor, producción de antocianinas y muerte de planta según lo reportado por Chavan y col. (2013). Las plantas fueron fotografiadas con una cámara Canon EOS Rebel T3i.

5. RESULTADOS

5.1. Identificación *in silico* del gen *Um02178*.

Para estudiar la importancia que tiene un gen en el ciclo de vida del basidiomiceto *U. maydis* existen diferentes estrategias, una de ellas es crear organismos a los que se les elimine la función de algún gen, y de esta manera determinar las características fenotípicas. Para construir una mutante es necesario conocer con antelación la secuencia del gen en cuestión, el genoma de *U. maydis* se encuentra disponible en <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>, haciendo una búsqueda *in silico* en esta base de datos, se identificó el gen UMAG_02178 localizado en el cromosoma 5, en las posiciones 437522 y 438880, codifica una proteína de 452 aminoácidos (MIPS, 2016), dando un total de 1359 pares de bases que constituyen el marco de lectura abierto este gen que carece de intrones. Este gen se encuentra flanqueado por el gen *Um02177* que codifica para la proteína deaminasa RIB2 (río arriba) y por el gen *Um02179* (río abajo) una proteína de 452 aminoácidos la cual no ha sido caracterizada. El gen *Um02178* codifica para una proteína que pertenece a la familia de las aspartato proteasas (EC:3.4.23.-), se trata de un péptido monomérico con dos dominios, cada uno de estos dominios poseen un sitio activo cuyo sitio catalítico es un residuo de aspartato.

Cuando se comparó la homología de los aminoácidos del gen *Um02178* en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2016), el resultado arrojó que ésta comparte homología (figura 8) con 100 organismos en diferente porcentaje entre los que destacan, con mayor identidad fueron:

Pseudozyma hubeiensis 84%, *Sporisorium scitamineum* 81%, *Kalmanozyma brasiliensis* 79%, *Sporisorium reilianum* 79%, *Melanopsichium pennsylvanicum* 77%, *Moesziomyces antarcticus* 72%, *Ustilago hordei* 71%, y *Moesziomycesaphidis* 67%.

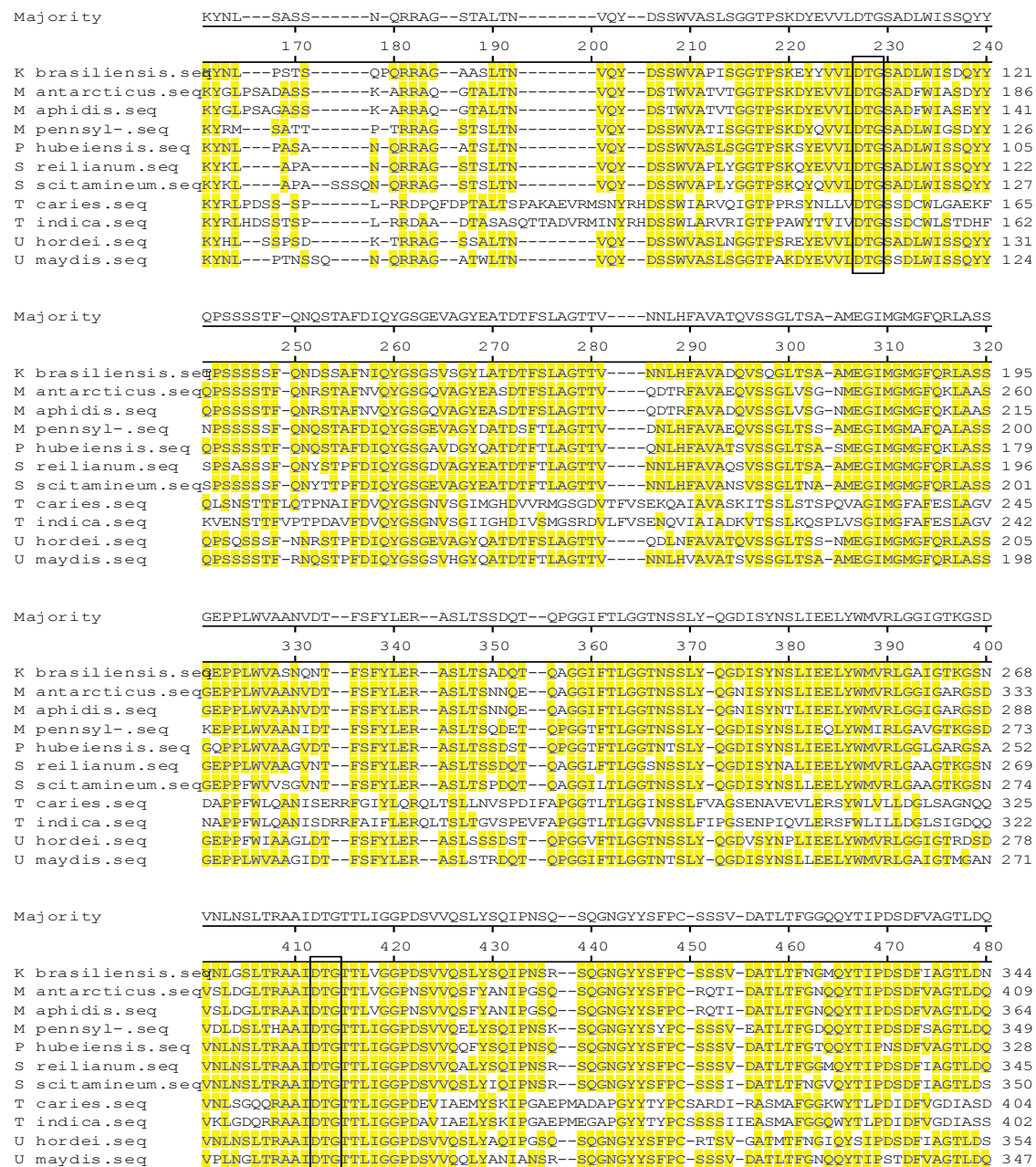


Figura 8. Alineamiento de aminoácidos usando en el método Jotun Hein en el programa MegAlign. En amarillo se muestran los aminoácidos conservados entre dichas secuencias; el recuadro en gris muestra el sitio activo de la proteína, el motivo DTG (Aspartato- Treonina- Glicina) está conservado en todas las proteasas aspárticas mostradas. *Kalmanozyma brasiliensis*, *Melanopsichium pennsylvanicum*, *Moesziomyces antarcticus*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Sporisorium reilianum*, *Sporisorium scitamineum*, *Ustilago hordei*, *Ustilago maydis*.

A partir de las secuencias de aminoácidos de las diferentes proteínas con las que comparte homología la proteína de *U. maydis*, se realizó un dendograma Figura 9. En este se observó, la cercanía filogenética que existen entre la proteína de *U. maydis* y *P. hubeiensis*, y su relación con las proteínas de los otros organismos. La proteasa de *U. maydis* muestra un mayor grado de homología con la proteína de organismos *Ustilaginales* como el caso del basidiomiceto *P. hubeiensis*, un microorganismo utilizando industrialmente para la producción de diferentes biosurfactantes (homología con el gen PHSY_002086, <http://www.uniprot.org/uniprot/R9P0A5#sequences>) y con *Sporisorium scitamineum* causante del carbón de la caña de azúcar (Barnabas y col., 2016).

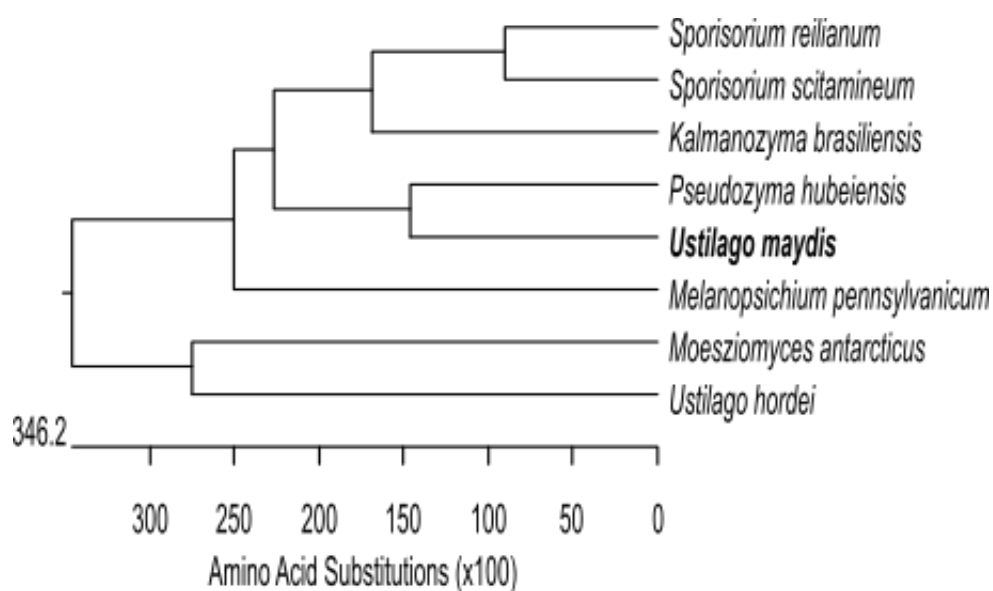


Figura 9. Dendograma de alineamiento. Comparación en la secuencia de aminoácidos en la proteasa aspártica UM02178 de *U. maydis* con la reportada en otros hongos. Dendograma realizado con el programa Larsegen 7.1.0 (44), utilizando el método Jotun Hein.

Es importante resaltar que el análisis de alineación de proteína mostró un 79% de identidad con la proteína CBQ72732.1 de *Sporisorium reilianum* un hongo biotrófico muy cercano a *U. maydis* y que también tiene la capacidad de infectar sorgo y maíz, si bien existe poca investigación en cuanto a su ciclo de vida; se sabe que las basidiosporas haploides al germinar en teliosporas éstas crecen en forma de filamentos alrededor de las raíces de la planta, utilizando apresorios (al igual que *U. maydis*) para invadir la planta (Schirawski y col., 2005).

5.2. Escrutinio de mutantes por PCR

Previamente, en colaboración con el Dr. José Ruiz Herrera y Dr. Ulises Esquivel Naranjo (Cinvestav-Irapuato) se contaba con una colección de mutantes para el gen *Um02178*, resistentes al antifúngico carboxina. De esta colección se realizó el escrutinio de algunas de ellas utilizando la reacción en cadena de la polimerasa “PCR”. Utilizando los iniciadores 2121 y pCBX, los cuales amplifican un fragmento de 1600 pb indicando que el cassette de interrupción se integró en el *locus Um02178* (Figura 10), considerando a estas cepas como Δ Um02178.



Figura 10. Producto de PCR. Cepa parental FB2, , control negativo agua, cepas Δ praca 472, 473, 475 y 476. Iniciadores utilizados 2121 y pCBX, que amplifican una banda de 1600pb.

Como se mencionó, a las cepas Δ Um02178 previamente se les eliminó parte del ORF; para comprobar dicha eliminación, se realizó un ensayo RT-PCR, con este experimento se confirmó la ausencia del mRNA del gen *Um02178*. Para ello se purificó el ARN total tanto de la cepa parental FB2 (control), así como de las cepas mutantes 472, 473, 475 y 476. Se utilizaron el par de oligonucleótidos 2120 y 2123, que amplifica un fragmento de 295 pb correspondiente al ORF.

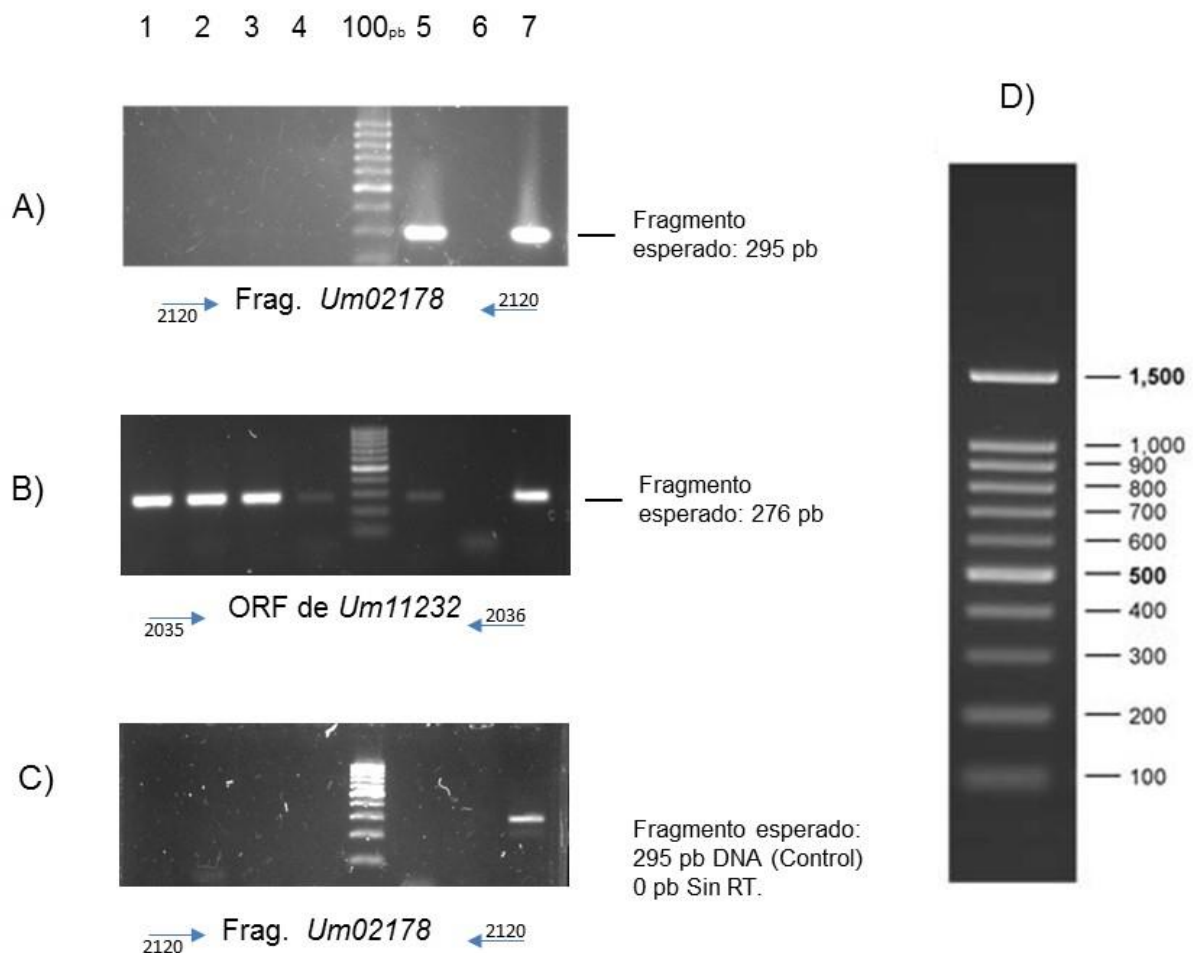


Figura 11. Productos de RT-PCR. Carriles 1 a 4 cepas mutantes 472, 473, 475 y 476 respectivamente, carril 5 cepa parental FB2, carril 6 control negativo (sin DNA), carril 7 control positivo ADN genómico (FB2). A) Amplificación del fragmento del ORF del gen *Um02178*. B) Amplificación de fragmento de gen de actina *Um11232*.

C) Amplificación de gen de actina sin RT. D) Marcador de peso molecular comercial.

Como se puede observar en la Figura 11 A, el producto de PCR se obtuvo solamente en las cepas silvestres, lo que demuestra que el mRNA correspondiente al gen *Um02178* no se está expresando en las cepas mutantes Δ Um02178, confirmando así la delección del gen. Como control se amplificó un fragmento de 276 pb del gen de actina *Um11232* con los oligonucleótidos 2035 y 2036 (Figura 11B). Adicionalmente, se incluyó el control sin la enzima RT (Transcriptasa reversa), con la finalidad de comprobar que no existe DNA genómico como contaminante.

5.3. Metabolismo de diferentes fuentes de carbono.

Una vez identificadas las cepas mutantes, realizamos pruebas para determinar la capacidad de metabolizar diferentes fuentes de carbono, tanto a pH 7 como a pH 3, comparando a las cepas mutantes 472 y 476 con las cepas parentales FB1 y FB2; y de esta manera apreciar si la delección del gen *Um02178* tiene un efecto en su crecimiento, en relación a la fuente de carbono utilizada.

Como podemos apreciar en la figura 12, la capacidad para asimilar diferentes fuentes de carbono en medio sólido, es apreciablemente semejante en medio ajustado a pH 7 entre las cepas parentales y las mutantes, podemos observar que el crecimiento se ve disminuido cuando la fuente de carbono es etanol, sin embargo, dicho comportamiento es el mismo tanto en las cepas parentales como en las mutantes 472 y 476.

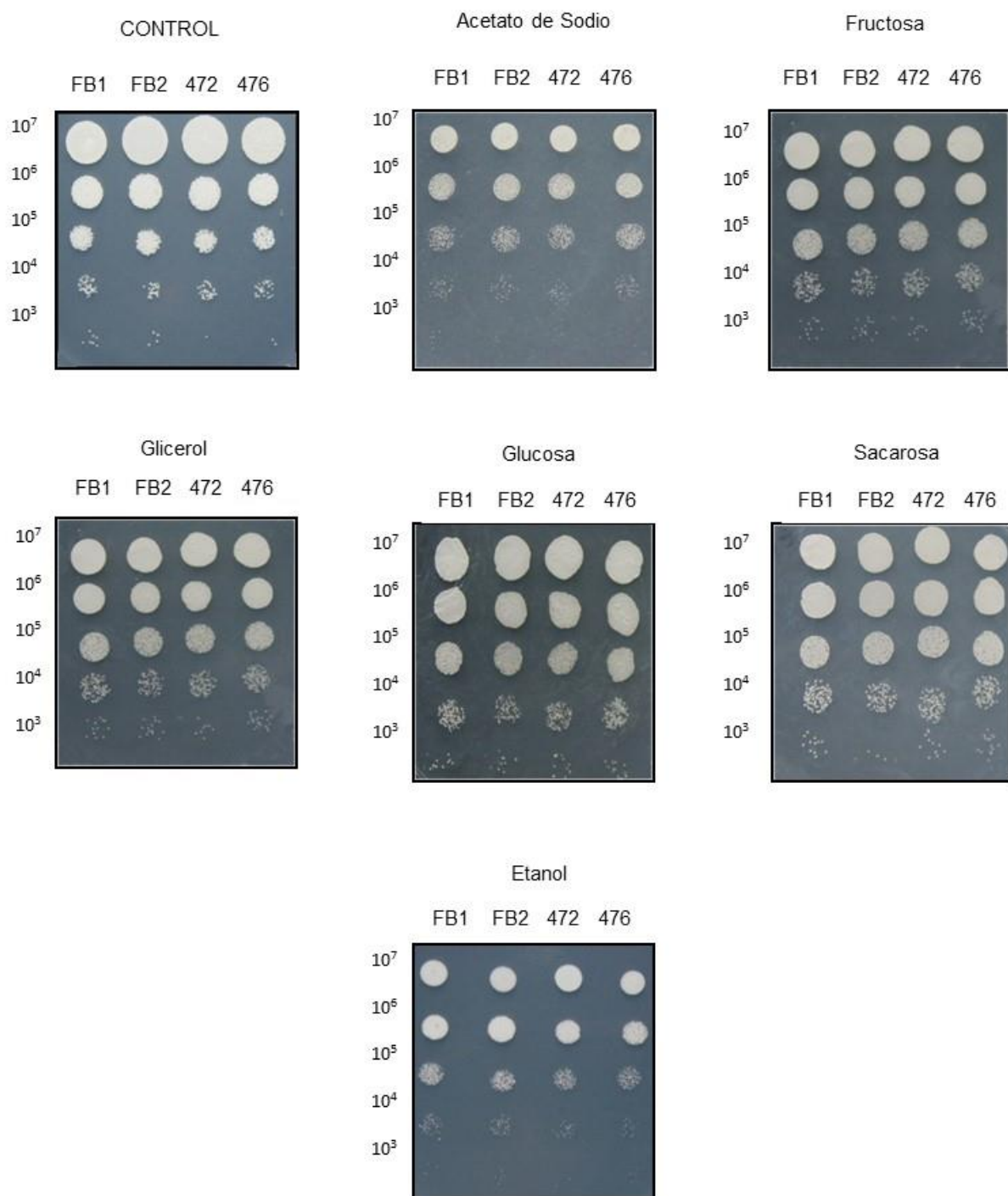


Figura 12. Metabolismo de diferentes fuentes de carbono al 2 % a pH 7.

También se realizó el mismo ensayo, pero cambiando el pH del medio de cultivo, de neutro a pH 3, ya que se ha reportado que en medio ácido se lleva la transición dimórfica (Ruiz-Herrera y León-Ramírez, 2012), por lo que la captación de nutrientes podría verse afectada en su desarrollo respecto a las cepas silvestres.

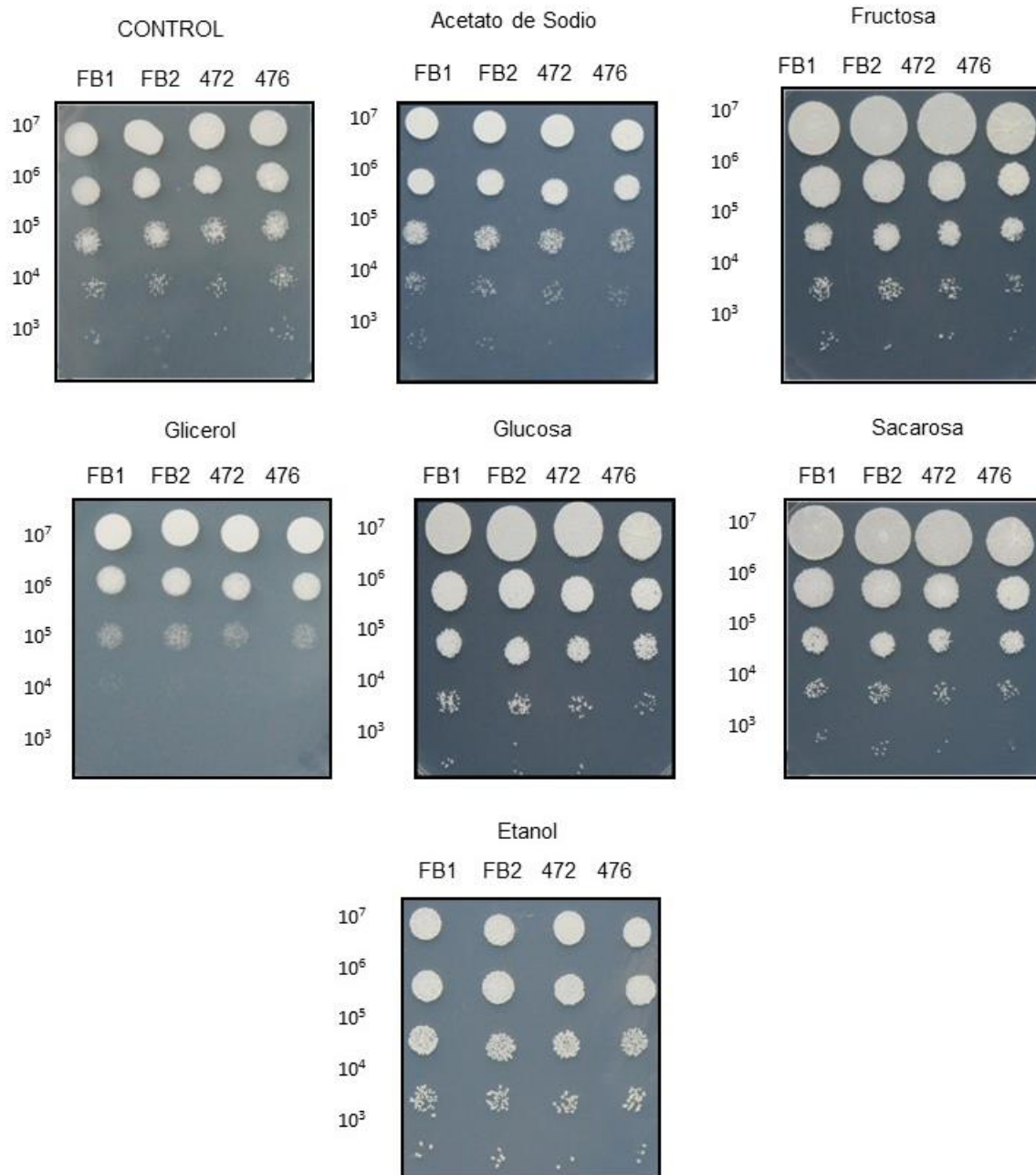


Figura 13. Metabolismo de diferentes fuentes de carbono al 2% y a pH 3.

En la figura 13 podemos apreciar que no hay diferencia, entre las diferentes fuentes de carbono respecto a las cepas silvestres, no obstante, el desarrollo es diferente entre las distintas fuentes, por ejemplo, hay un mejor desarrollo cuando la fuente de carbono es un carbohidrato, respecto a la fuente carbono acetato de sodio, etanol y glicerol.

Existe una clara diferencia cuando la fuente de carbono es acetato de sodio pues el desarrollo de la colonia es menor cuando se compara con sacarosa.

5.4. Respuesta a condiciones de estrés.

Para estudiar el efecto que tiene el gen *Um02178* en el crecimiento de las células (parentales y mutantes) en condiciones de estrés, éstas se inocularon por el método “spot assay” en medio de cultivo con diferentes agentes estresantes.

Cuando las cepas son crecidas en medio suplementado con tert-butil hidroperóxido, las mutantes no muestran una diferencia respecto a las cepas parentales, en la figura 14 se puede apreciar que conforme va disminuyendo la concentración de tert-Butil en el medio, las colonias pueden desarrollarse con mayor facilidad.

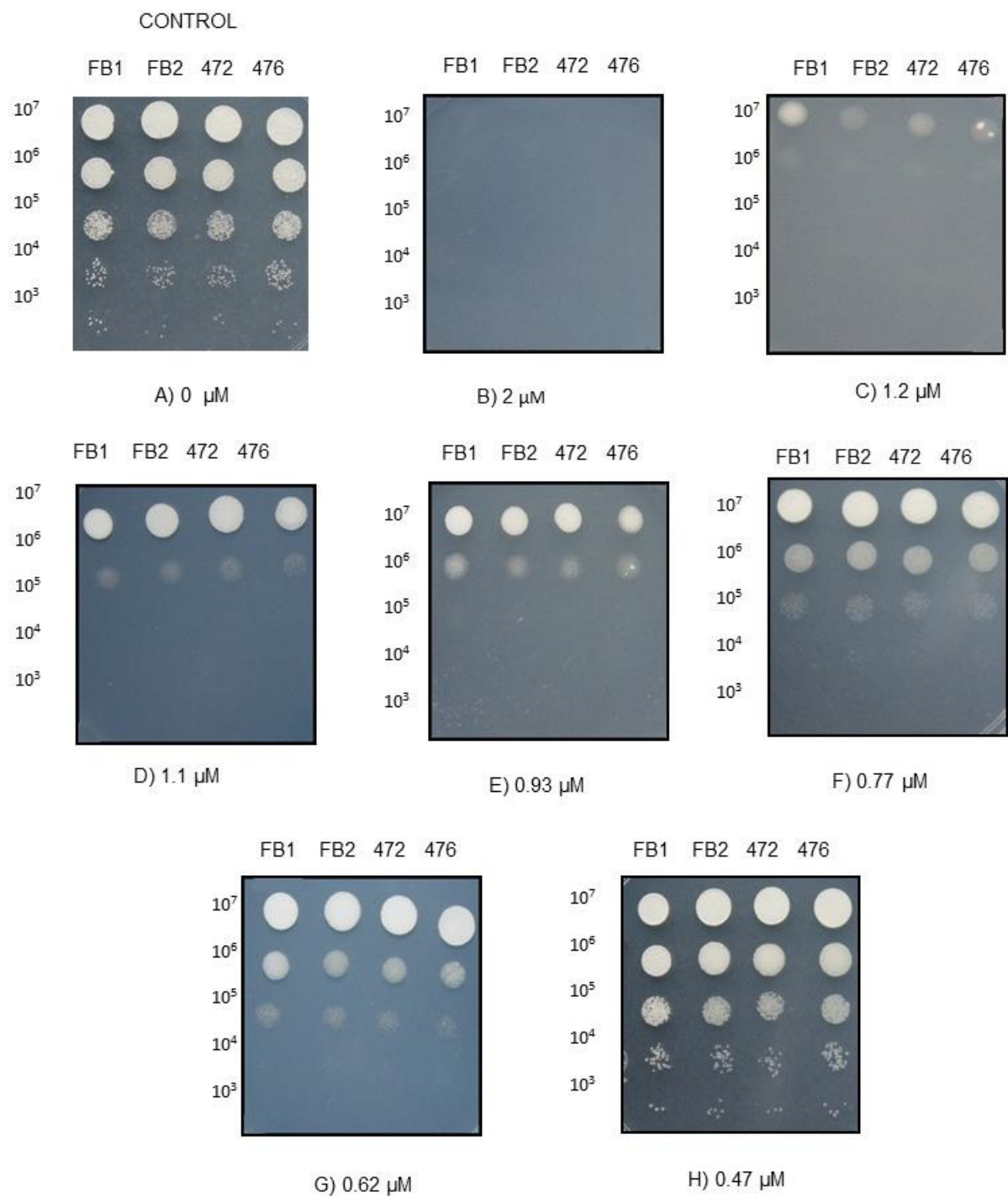


Figura 14. Diferentes concentraciones de tert-butil hidroperóxido.

Además del agente estresante tert-butil, también se utilizaron otros agentes oxidantes. En la figura 15 podemos apreciar un comportamiento similar al tratamiento anterior; existe un aumento gradual en el tamaño de las colonias, tanto parentales como mutantes conforme disminuye la concentración de menadiona (panel B al F), al igual que en el caso de las cajas suplementadas con peróxido de hidrógeno.

En la figura 15 podemos apreciar la formación de colonias en las concentraciones 1×10^{-7} y 1×10^{-6} en ambos ambientes oxidantes.

En el ensayo de estrés osmótico mostrado en la figura 16, el tamaño de las colonias es reducido respecto al observado en las colonias control; en dicho ensayo se utilizaron las sales NaCl y KCl; sin embargo, el aspecto de la colonia es similar entre parentales y mutantes; excepto en los paneles D y F donde las cepas mutantes muestran una ligera disminución en el tamaño de la colonia respecto a las cepas parentales.

Para complementar el ensayo de estrés osmótico también se llevaron a cabo pruebas (figura 17) con carbohidratos, como manitol (panel C) y sorbitol (panel D), de manera interesante, podemos observar en ambos estreses que existe un ligero decremento en el tamaño de las colonias mutantes. Indicando cierta incapacidad para responder apropiadamente ante este tipo de estrés osmótico.

En la misma figura también se puede apreciar el ensayo de estrés para estudiar la respuesta a agentes que dañan o ponen de manifiesto alteraciones en la estructura de la pared celular. Para ello se utilizó el detergente SDS (figura 17) a las concentraciones 0.004 % y 0.05 % panel E y F respectivamente en donde el tamaño de las colonias de las cepas mutantes se ve claramente afectado por la presencia del detergente, esto en comparación con las cepas silvestres.

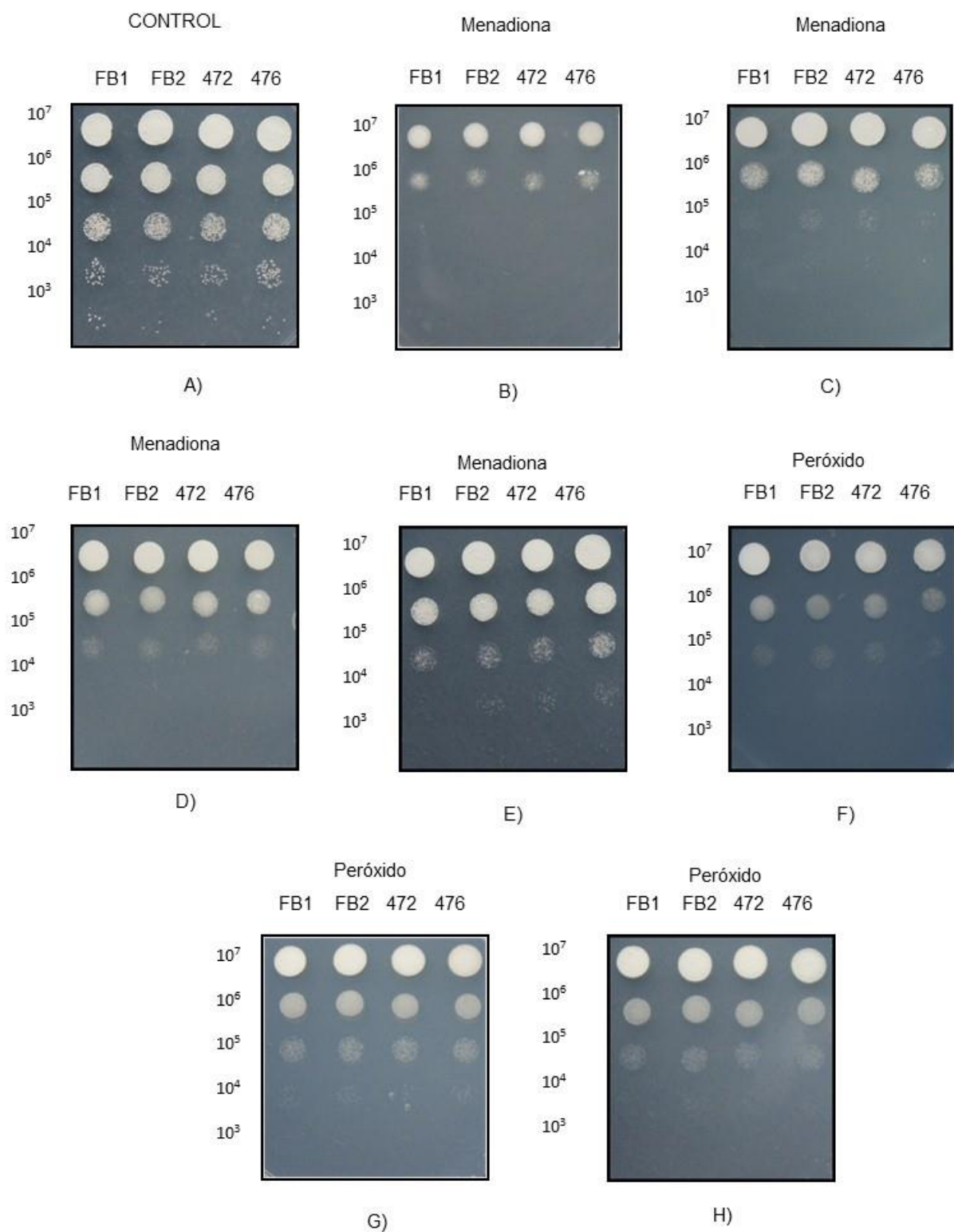


Figura 15. Diferentes condiciones de estrés oxidativo. A) Menadiona 5.0×10^{-3} mM. B) Menadiona 3.6×10^{-3} mM C) Menadiona 3.0×10^{-3} mM D) Menadiona 2.4×10^{-3} mM. E) H₂O₂ 3 μ L. F) H₂O₂ 2.5 μ L. G) H₂O₂ 1 μ L. H) H₂O₂ 0.5 μ L.

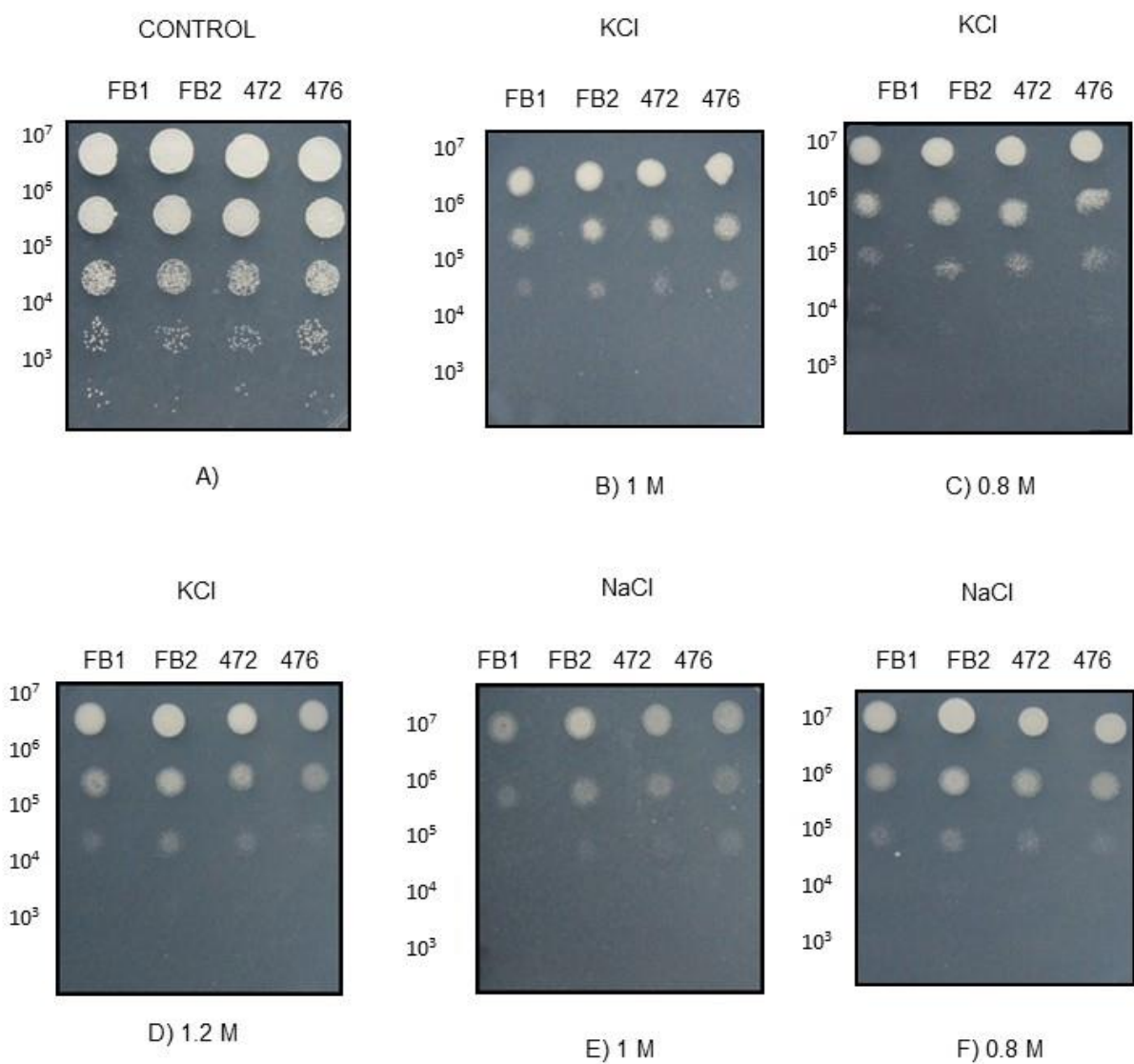


Figura 16. Diferentes condiciones de estrés osmótico. A) Control B) KCl 1M, C) KCl 0.8 M D) KCl 1,2M. E) NaCl 1M. F) NaCl 0.8 M.

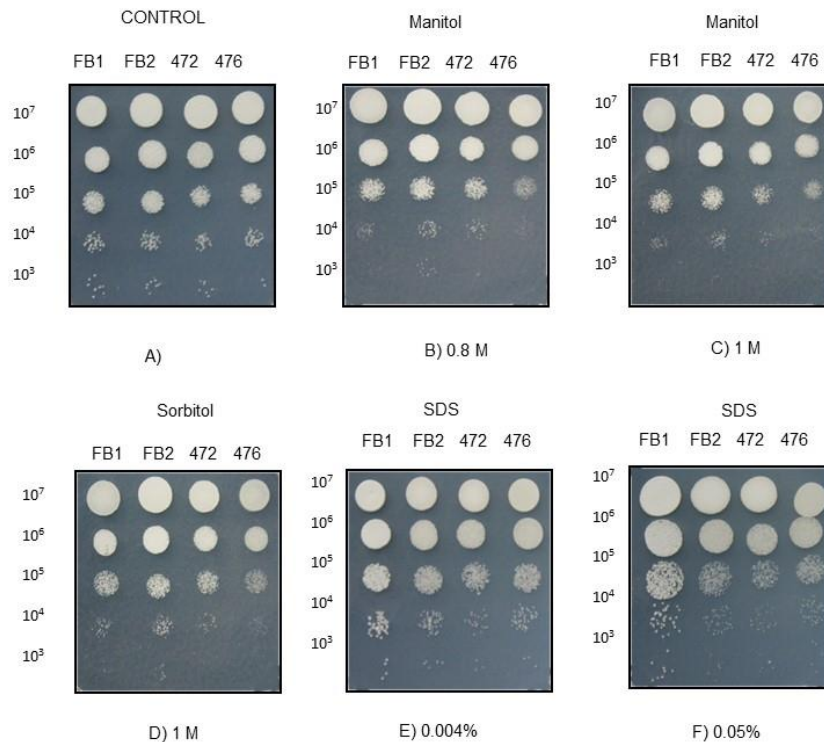


Figura 17. Diferentes condiciones de estrés A) Control B) Manitol 0.8 M C) Manitol 1M D) Sorbitol 1M E) SDS 0.004 % F) SDS 0.05%.

Para completar el estudio de la respuesta a estrés en pared celular se utilizaron los reactivos rojo Congo y rosa de bengala, sin embargo, éste último a dos condiciones experimentales; en luz y en obscuridad, pero a temperatura ambiente, cabe mencionar que el rosa de bengala es un agente que impone también un reto oxidativo.

Dicho experimento arrojó resultados interesantes; cuando el medio fue suplementado con rosa de bengala las cepas mutantes pudieron desarrollarse mejor, comparado con las parentales FB1 y FB2, las cuales incluso no mostraron formación de colonias tal como se muestra en la figura 18 panel C, por otro lado cuando el agente estresante fue rojo Congo el resultado fue inverso, pues el ensayo mostró disminución en el crecimiento de las cepas mutantes, tal como se muestra en el panel G de la figura 18, en donde existe una apreciable formación de colonias en la concentración 1×10^5 células/mL.

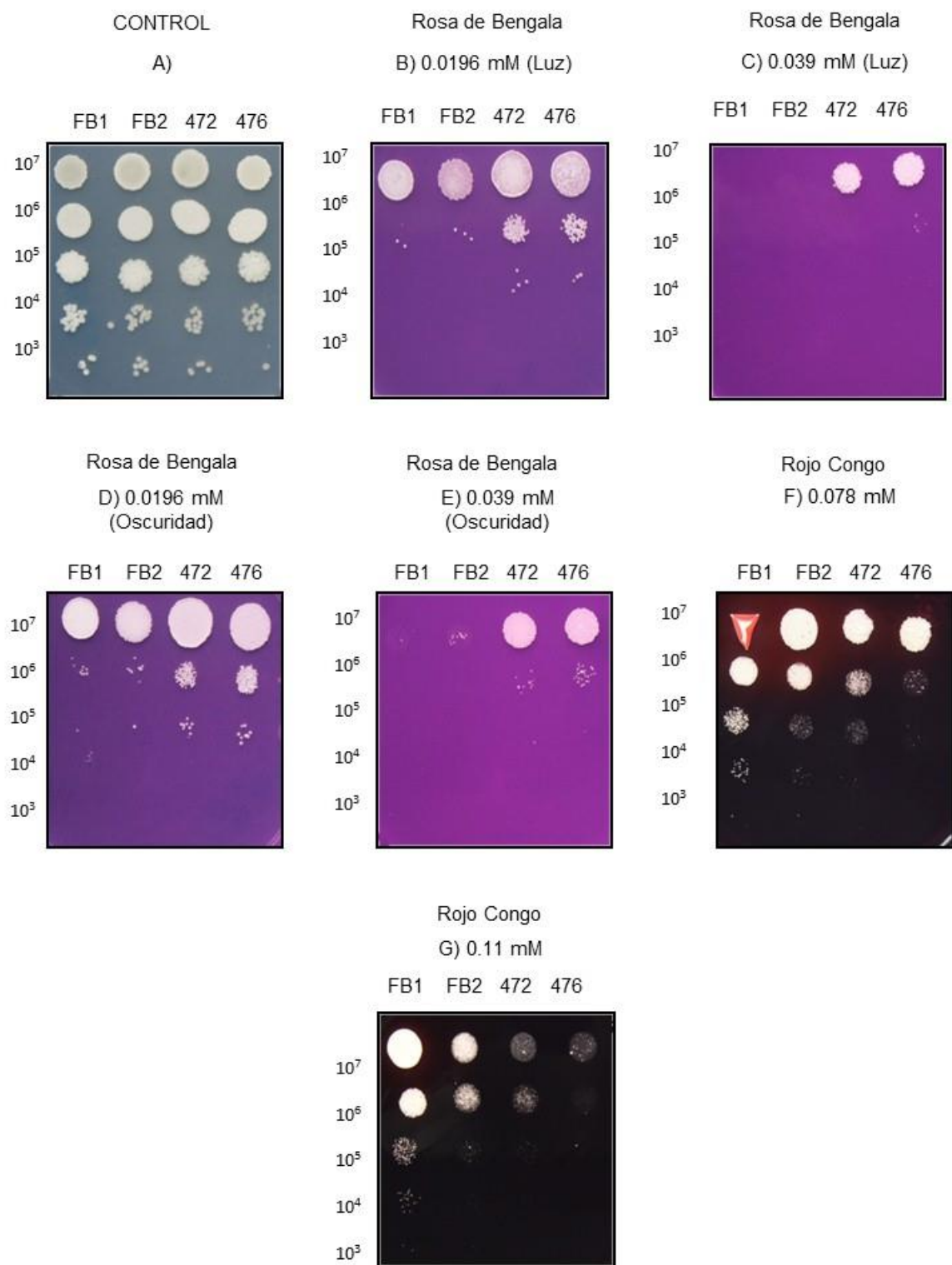


Figura 18. Estrés con rosa de bengala y rojo Congo.

Debido a la respuesta observada ante estos agentes, decimos realizar un segundo ensayo (Figura 19) utilizando concentraciones menores (para el reactivo rosa de bengala, 9.8 μM y 15 μM en condiciones de luz y oscuridad y para el reactivo rojo Congo: 9.8 μM , 19 μM y 29 μM), observando que este fenómeno se repite, corroborando así los resultados del experimento anterior.

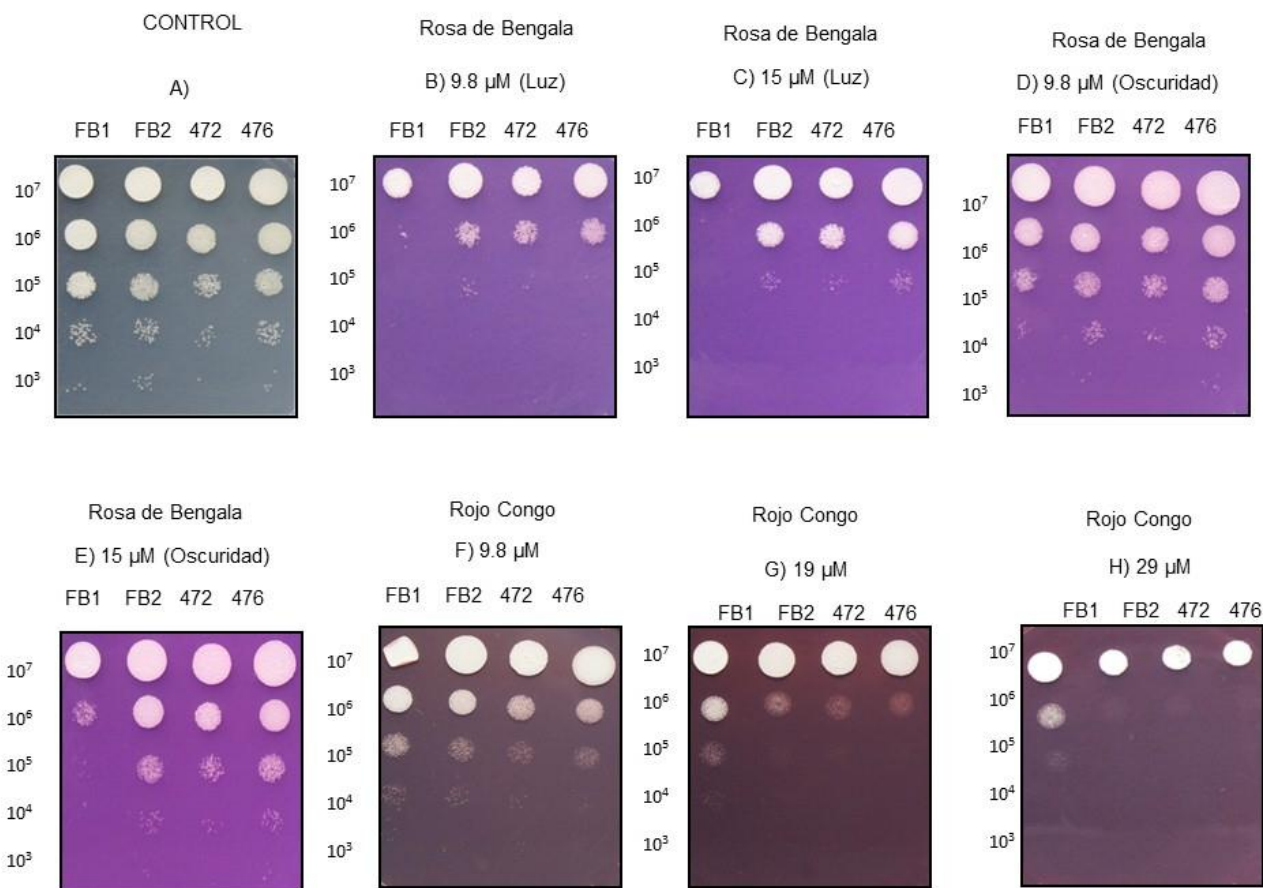


Figura 19. rosa de bengala y rojo Congo a bajas concentraciones.

Otros agentes que en donde se aprecian defectos por su suplementación o alteraciones en el establecimiento de la pared celular son el Calcofluor blanco y la cafeína. Al probar el efecto de estos agentes observamos que no hubo diferencias apreciables entre tratamientos, en el panel B y C de la figura 20 se utilizó una concentración a 4 mM y 2 mM respectivamente; en el panel D, E y F se utilizaron concentraciones 100 μ M, 200 μ M y 400 μ M de calcofluor blanco respectivamente, en dichos ensayos se puede apreciar una mayor tendencia a formar colonias conforme disminuye la concentración de calcofluor.

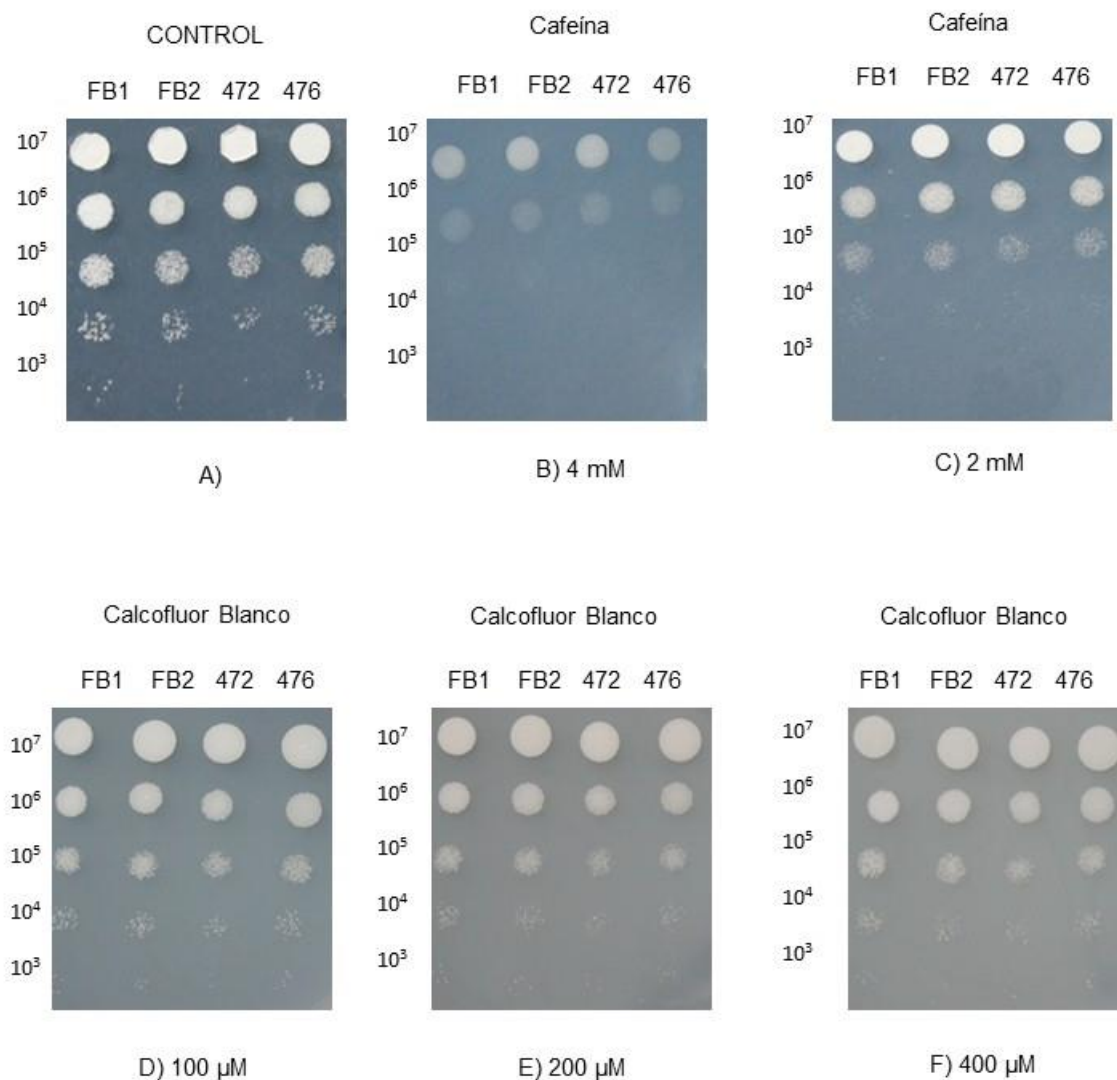


Figura 20. Cafeína y Calcofluor.

En un ensayo se pusieron a crecer cepas parentales y mutantes en un medio con gelatina al 2% y agar al 1% (a 28° C durante 48 horas), con la finalidad de usar la gelatina como única fuente de carbono y de nitrógeno; los cuatro fondos genéticos (FB1, FB2, 472 Y 476) mostraron fenotipos iguales.



Figura 21. Ensayo en gelatina. Las cepas se pusieron a crecer en un medio gelatina 2% y agar 1%, puso una gota de 20 μL a una concentración de 1×10^8 células/mL, se incubó a 28 °C durante 48 horas, se tiñó con azul de coomasie, sin mostrar diferencia entre las colonias.

5.5. Reacción Fuzz

Con la finalidad de determinar si las cepas mutantes están afectadas en su capacidad para llevar a cabo el apareamiento, se realizó la prueba de Fuzz. Como podemos observar las cepas mutantes dan reacción de Fuzz positiva en un grado similar a lo observado en las cepas silvestre. Demostrando de esta manera que no existe defecto en el proceso de apareamiento.

En la figura 22 puede apreciarse la compatibilidad sexual de la cepa mutante 472, con la cepa FB1 y 476 pues se forma una colonia blancuzca de aspecto algodonosa, comprobando que su fondo genético es a2b2 y al mismo tiempo se demuestra que 476 es compatible con FB2.

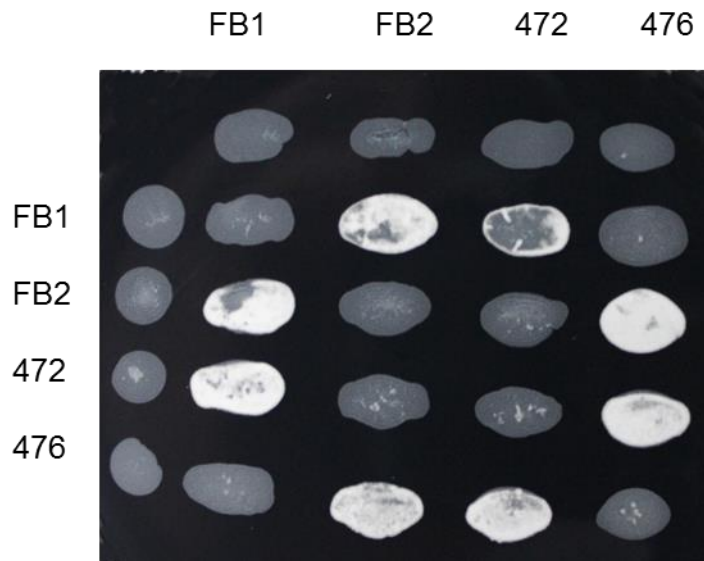


Figura 22. Reacción fuzz. Ensayo de apareamiento en el que cepas sexualmente compatibles muestran un aspecto blanco algodonoso.

5.6. Crecimiento en forma de hifa

La transición dimórfica de levadura a hifa en *U. maydis* puede ser inducida cuando se cambia el pH del medio de cultivo. De tal manera que a un pH 7 se obtiene el crecimiento en forma de levadura, mientras que cuando el pH del medio se regula a 3, se obtiene el crecimiento filamentososo. Por lo que comprobar que la delección del gen *Um02178* esté implicada en dicha transición, podría suponer que se afecta su capacidad infectiva.

Los resultados arrojaron que no se ve afectada la transición levadura-hifa tal como se puede apreciar en la figura 23; entre las cepas mutantes y las silvestres, lo que

demuestra que dicha proteína no está involucrada en procesos de diferenciación celular, un punto crítico en la fase infectiva:

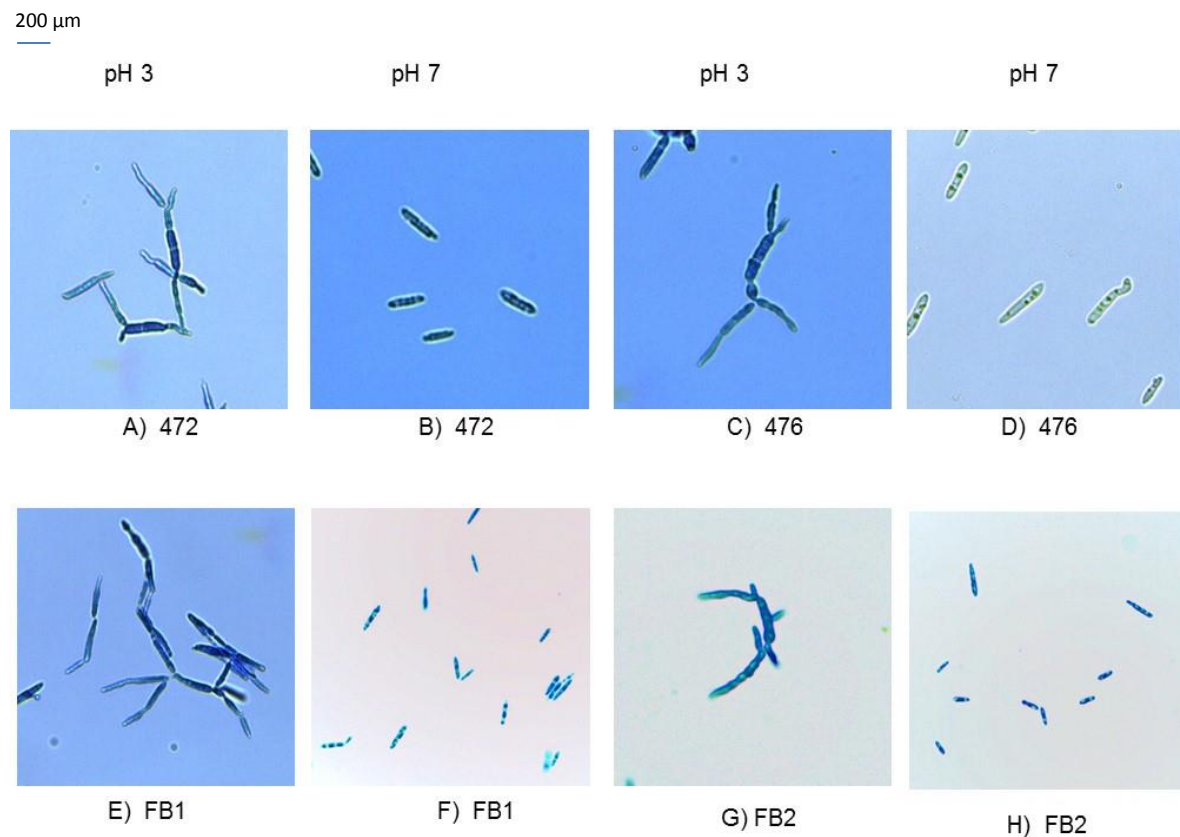


Figura 23 Transición dimórfica. Las cepas mutantes muestran crecimiento micelia a un pH ácido, de la misma manera que las cepas parentales. Del panel A a E, G se utilizó el objetivo 40x, panel F y H utilizó objetivo 10x.

5.7. Pruebas de virulencia

Para determinar la posible participación de este gen *Um02178*, en el proceso de virulencia, procedimos a infectar plántulas de maíz con las cepas parentales FB1 x FB2 como control, y las cepas mutantes 472 x 476, cepas sexualmente compatibles; se monitorearon las plantas, y se hizo un análisis estadístico no paramétrico a partir de los signos de enfermedad tal como lo sugiere Chavan 2013, como son tumores grandes, medianos y pequeños, además de la producción de antocianas, así como plantas muertas (secas), tal como puede apreciarse en la figura 23. Dado que la

presencia de cada uno de los síntomas no es mutuamente excluyente, se consideró cada uno de dichos síntomas como variables aditivas ordinales (Esto es asignar un valor arbitrario a cada una de las variables observadas). En la figura 23 puede observarse cada uno de los síntomas que se presentan cuando una plántula de maíz es infectada y en la figura 24 se compara cada uno de los síntomas por separado tanto de las cepas silvestres y las cepas mutantes.

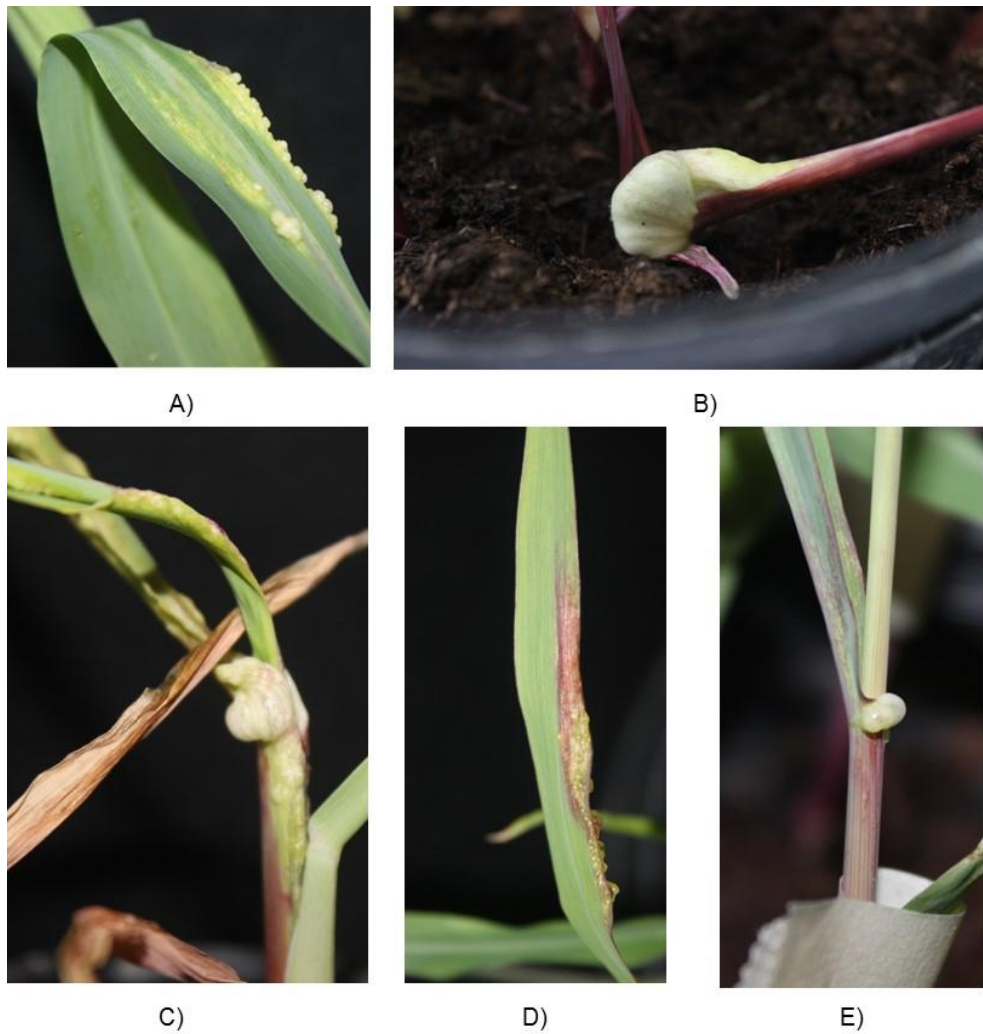


Figura 24. Síntomas de patogenicidad con las cepas 472 y 476. A) Tumores pequeños B) Tumores grandes C) Tumores medianos D) Presencia de antocianas E) Tumor pequeño en tallo.

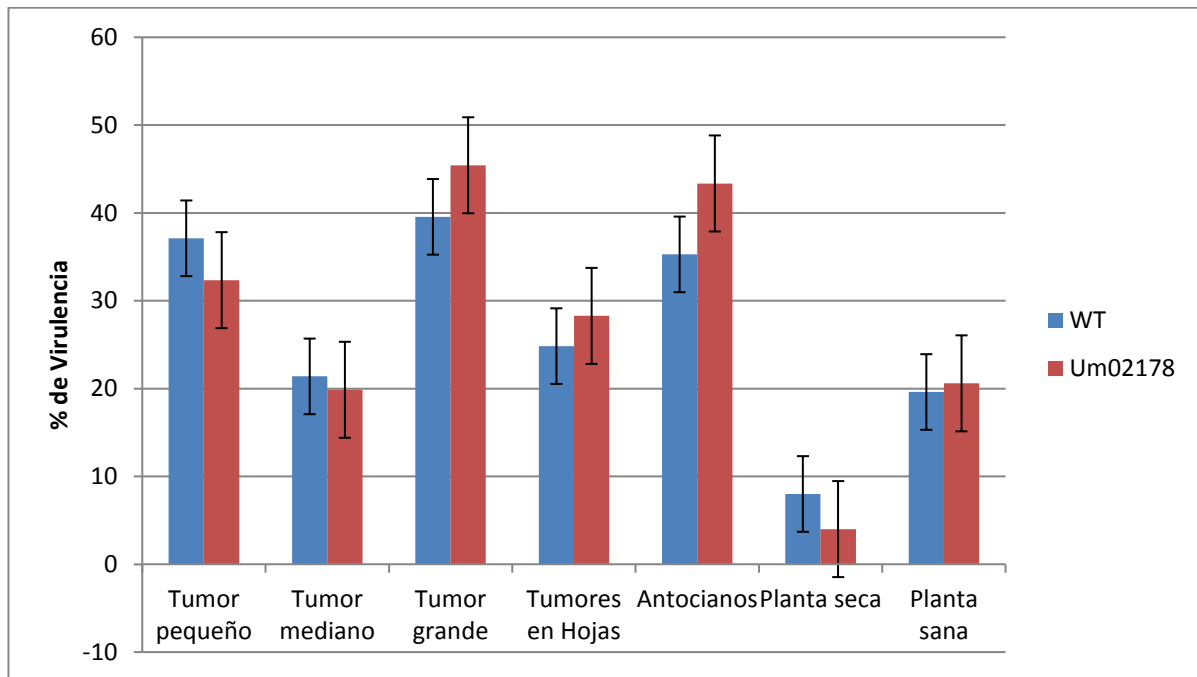


Figura 25. Histograma entre variables de virulencia

Se encontró por medio de la prueba de U de Man-Whitney que no hay diferencia significativa con un $p=0.4109$ (con un nivel de significancia de 0.05, ver figura 26) entre la virulencia de las cepas silvestres en plántulas (FB1 con FB2 y las cepas mutantes de proteasa (472 con 476), hecho que se puede apreciar en la figura 25, la similitud entre tratamientos:

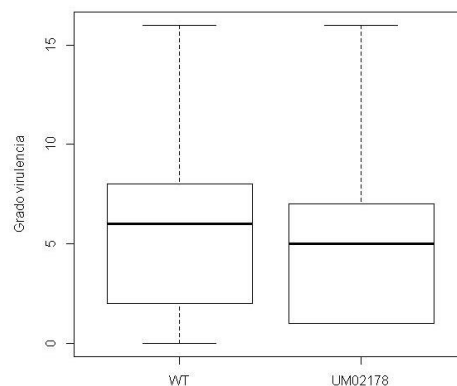


Figura 26 Diagramas de Caja, que muestra la similitud entre los tratamientos WT (Fb1XFb2) y UM02178 (472x476) en plántulas de maíz.

6. DISCUSIÓN

Las proteasas presentes en un organismo, involucran todo un conjunto de funciones fisiológicas, que incluyen división celular, traducción de señales, esporulación, digestión, (Louwrens W. Theron y Benoit Divol, 2014), patogenia y estabilidad del pH ácido, en una regulación postranscripcional (Mandujano-González y col. 2016). En un análisis previo del sistema proteolítico en *U. maydis*, se encontró que la delección de la proteasa vacuolar aspártica Pra (gen *pep4*), afecta considerablemente la virulencia del basidiomiceto *U. maydis*, además de que se reportó una sobreexpresión del gen *um02178* en la transición dimórfica levadura-hifa (Soberanes-Gutiérrez y col. 2015). Por lo que conocer el papel de *um02178* en la virulencia del basidiomiceto cuando éste se elimina aporta información importante en la interacción planta-patógeno.

U. maydis posee una gran cantidad de proteasas extracelulares codificadas en su genoma, las cuales incluyen metaloproteasas, aspartil proteasas, carboxi y amino proteasas, endo/exo proteasas y peptidil peptidasas. En un análisis *in silico* se encontró que *U. maydis* posee 5 proteasas aspárticas codificadas por los genes *um02178*, *um02597*, *um05097*, *um11569* y *um11908* (Mueller y col. 2008).

Debido a este robusto sistema proteolítico identificado *in silico*, es que procedimos a la interrupción del gen *Um02178*. Para verificar dicha mutación se realizó un ensayo por RT-PCR comprobándose la ausencia del gen refiriéndose a las cepas 472 y 473, 475 y 476 como mutantes nulas resistentes a carboxina; Y determinamos que el gen se expresa en condiciones de cultivo axénico, esto por la técnica de RT-PCR.

Sabemos que las proteasas extracelulares juegan un papel primordial para la toma de nutrientes del medio, en la hidrólisis y absorción de nutrientes proteínicos (Theron y Divol, 2014), sin embargo las mutantes nulas mostraron un comportamiento similar a las cepas parentales, se ha encontrado que la inhibición de las proteasas pumA y pumB, la aminopeptidasa pumAPE y la dipeptidilaminopeptidasa pumAPE por parte del inhibidor específico de proteasas aspárticas pepstatin A afecta considerablemente la transición dimórfica levadura-micelio y por tanto su ciclo de

vida e indirectamente su colonización en planta (Mercado-Flores y col., 2003). Además la proteólisis juega un papel importante en respuesta frente a estrés, por lo que en el presente trabajo las cepas parentales y mutantes fueron sometidas a estrés nutricional, al ser crecer colonias en medios ricos en carbono (glucosa por ejemplo) o en fuentes reducidas en carbono, sin embargo el análisis estadístico de los experimentos en planta y las morfologías de las colonias no arrojó una diferencia significativamente distinta (con un nivel de confianza del 95%). por lo que se considera que la proteasa aspártica *UM02178* podría estar involucrada en un proceso diferente a la toma de nutrientes, cabe señalar también que debido a diferentes genes con función putativas de proteasa aspártica, exista cierta redundancia entre ellos.

Se sabe que la pared celular es un componente esencial para las células fúngicas, manteniendo la homeostasis y rigidez de esta estructura en el hongo. La mayoría de las proteínas de pared, son proteínas ancladas a través de un motivo glicosil-fosfaditil-inositol (GPI por sus siglas en inglés); en el caso de *S. cerevisiae* se predice cerca de 60 proteínas-GPI, dentro de las cuales están incluidas proteasas aspárticas conocidas inicialmente como yapsinas, las cuales se ha confirmado que son requeridas para mantener la integridad de la pared celular. (Guan y col. 2012).

La proteasa *um02178* ha sido reportada previamente (Mueller y col., 2008) como una proteasa que posee un péptido señal con un motivo GPI, por lo que se llevaron a cabo experimentos de estrés de pared, para comprobar su posible participación en el proceso de mantenimiento de pared.

Los resultados mostraron fenotipos interesantes; en la figura 16, existe una ligera disminución en crecimiento de las mutantes (paneles D y E) cuando el estrés es impuesto con KCl y NaCl respectivamente, dicha disminución frente a estrés osmótico, quizá sea debido a que la delección, compromete la integridad de la pared celular, ya que las aspartil proteasas fúngicas están involucradas en la incorporación y retención de $\beta(1,3)$ -D-glucano en la pared celular (Krysan y col., 2005).

Las cadenas de $\beta(1,3)$ -D-glucano cuya principal función en las células fúngicas es mantener la elasticidad de la pared celular la cual se puede adaptar, dependiendo de las condiciones a las que se enfrenta (Gao y col., 2014), sin embargo dicha elasticidad quizá no se la óptima, puesto que el contenido de $\beta(1,3)$ -D-glucano no es el ideal (debido a la mutación); además si la proteasa UM02178 con péptido señal GPI se encuentra asociada a la pared, ésta cumple un papel enzimático secundario en la remodelación de ésta.

Cuando las células se someten a crecer en un medio con detergente SDS (0.004% y 0.005%) las colonias mutantes (Figura 17 panel E y F) mostraron una disminución en su crecimiento, lo que demuestra que la integridad de la pared se ve comprometida, pero que además la mutación también compromete la integridad de la membrana plasmática (Carbó y Pérez-Martín, 2010).

Un dato interesante fue lo observado cuando las cepas mutantes y silvestres se someten a estrés por la presencia de los colorantes rosa de bengala (estrés oxidativo) y rojo Congo (estrés de pared). El reactivo de Rosa Bengala es utilizado como un foto-sensor exógeno, en una reacción de tipo II (transferencia de energía de excitación del foto sensor a oxígeno molecular) en donde se genera el superóxido, 1O_2 ; cuando dicho reactivo se expone a luz en el rango visible induce un estrés foto oxidativo (Fischer y col. 2004). En el presente trabajo, se encontró que las cepas mutantes nulas (472 y 476), mostraron mayor capacidad de crecer cuando las células se crecieron en un medio suplementado a diferentes concentraciones del reactivo rosa de bengala, por lo que la proteasa UM02178 podría estar involucrada en alguna ruta de inhibición de respuesta a estrés oxidativo (es decir mantener la célula sin proliferación cuando ésta se encuentra frente a estrés oxidativo, lo cual explica una mayor capacidad de crecimiento en rosa de bengala-luz, mientras que cuando no hay un estrés oxidativo Rosa Bengala-Oscuridad parentales y mutantes muestran un comportamiento similar), dato que resulta de suma importancia, puesto que el hongo se enfrenta a un estrés oxidativo tiempo después de que ha tenido éxito en penetrar a la planta (Molina y Kahman 2007). Por otro lado, el reactivo rojo Congo inhibe el ensamble de β -1,3-glucano en la pared celular. En un estudio previo se encontró que

U. maydis, es susceptible al inhibidor de pared, rojo Congo (Nikolaou y col. 2009); bajo las concentraciones utilizadas en el presente trabajo, se observó que las cepas parentales mostraron un mejor crecimiento comparado con las cepas mutantes lo que puede reforzar las predicciones *in silico* (Mueller y col. 2008) de que se trata de una proteasa estructural involucrada en el mantenimiento de pared o membrana celular.

Respecto a los ensayos de fitopatogenicidad, se utilizaron plántulas de maíz de la variedad “Cacahuazintle” por ser una variedad susceptible a la infección producida por este hongo, los resultados mostraron que la delección del gen *Um02178* no afecta la capacidad infectiva de *U. maydis*. En dicho ensayo se consideraron como síntomas de enfermedad, la producción de antocianinas (*U. maydis* sobre estimula la expresión de leucoantocianidina dioxigeanasa *Zm62.1*, una enzima clave en la síntesis de antocianinas; Doehlemann y col., 2008), la formación de tumores, considerando tres tamaños, pequeños medianos y grandes, hecho que puede deberse a la capacidad de penetración del apresorio y las proteasas que favorecen el rompimiento de la cutícula en la epidermis de la planta

En un estudio realizado por el grupo de Krysan con *S. cerevisiae* (Krysan y col. 2005), se construyeron mutantes sencillas, dobles y múltiples de 5 proteasas aspárticas (*yps*) predichas en su genoma, las construcciones mostraron que algunas proteasas mostraban sobrelapamiento de función (proteasas *YPS1* y *YPS2*), lo cual podría explicar un fenotipo similar entre las cepas mutantes y parentales de *U. maydis*, ya que la proteasa *UM02178* presenta una homología del 45% con la proteasa *YPS2* (de *S. cerevisiae*), por lo que es posible que la delección de una proteasa podría estar soportada por otra proteasa presente en el genoma de *U. maydis* (ya antes mencionadas).

La transición de levadura a tipo micelio se indujo en cepas mutantes y parentales, no habiendo diferencia en los fenotipos mostrados, lo que demuestra, que la proteína *UM02178*, no se encuentra involucrada en la remodelación de la pared celular, o en su defecto está soportada por otra proteasa con similares funciones, que puede

operar durante la transición dimórfica; como es el caso de la proteasa ácida PrA codificada por el gen *Pep4*, cuyas mutantes nulas fueron incapaces de hacer el cambio transitorio levadura-micelio cuando las cepas $\Delta pep4$ se sometieron a cambios de pH.

Previo a llevar a cabo los ensayos de virulencia verificamos que las cepas mutantes son capaces de llevar a cabo la reacción de apareamiento, la delección de la proteasa *Um02178* no afectó dicho proceso, el cual es indispensable para llevar a cabo la formación de la hifa dicariótica (Banuet y col.,1995).

En mutantes nulas de genes que pertenecen al cluster 19A (Brefort y col., 2014), se encontró que las delecciones de genes individuales tienen un efecto menor o estadísticamente no significativo en la virulencia de *U. maydis*, no así en la delección del *cluster* completo (el cual codifica para 24 proteínas secretadas) demostrando que la virulencia puede ser debida a efectos aditivos.

Así mismo, cabe recalcar que las mutantes de la proteasa UM02178 son resistentes a rosa de bengala, el cual impone un estrés oxidativo. Es posible esta capacidad de resistencia ante el rosa de bengala, se pueda ver reflejada en la capacidad para soportar el estrés oxidativo como una de las barreras de defensa iniciales que utiliza el maíz en contra de este patógeno (Molina y Kahmann 2007).

7. CONCLUSIONES

1.- *Ustilago maydis* posee cinco proteasas aspárticas *um02178*, *um02597*, *um05097*, *um11569* y *um11908* cuatro de ellas identificadas *in silico*.

2.- La delección del gen *UM02178* afecta los fenotipos mostrados respecto a las silvestres, cuando dichas cepas son retadas con agentes estresantes. Las cepas mutantes crecen menos en un medio estresante osmótico de KCl y NaCl respecto a las parentales.

3.-. El cambio más notorio en las mutantes fue utilizando los reactivos rosa de bengala (con una mayor crecimiento que las cepas parentales) y rojo Congo (cuyo desarrollo de colonia se vió disminuido respecto a las cepas silvestres) , por lo la proteasa *Um02178* podría estar involucrada en una ruta de inhibición frente a estrés oxidativo.

4.- La ausencia del gen *Um02178* no afecta la capacidad para llevar a cabo la transición levadura micelio ni el apareamiento.

5.- La mutación de esta proteasa no compromete la virulencia de *U. maydis* en plantas de maíz.

8. PERSPECTIVAS

1. Para poder evaluar si hay una relación entre las distintas proteasas aspárticas y su capacidad infectiva, es necesario crear mutantes dobles, simples, triples, y así hasta eliminar en totalidad las proteasas del genoma, al carecer este organismo de la maquinaria de RNA de interferencia, no es posible utilizar una estrategia masiva para reprimir la expresión de estos genes en un solo paso.
2. Si la delección del gen *pep4* (Soberanes-Gutiérrez y col. 2015) mostró una sobreexpresión de *Um02178*, será de igual manera interesante medir la sobreexpresión de *pep4* en el fondo genético *Um02178*.
3. Determinar si existe un cambio en el contenido de β ,1-3 glucano entre cepas mutantes y cepas parentales.

9. REFERENCIAS

Asakura T, Matsumoto I, Funaki J, Arai S, Abe K. The plant aspartic proteinase-specific polypeptide insert is not directly related to the activity of oryzasin. Eur J. Biochem. **2000**; 267:5115-5122.

Banuett F, Herskowitzl. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. Proc Natl AcadSci USA. **1989**; 86:5878–5882.

Banuett F, Quintanilla R, R.H. Jr, Reynaga-Peña C. The machinery for cell polarity, cell morphogenesis, and the cytoskeleton in the Basidiomycete fungus *Ustilago maydis* - a survey of the genome sequence. Fungal Genet. Biol. **2008**; 45(Suppl. 1):S3-S14.

Bauer R, Oberwinkler F, Vanky K. Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa. Can J Bot. **1997**;75:1273–1314.

Carbó N y Pérez-Martín J. Activation of the Cell Wall Integrity Pathway Promotes Escape from G2 in the Fungus *Ustilago maydis*. PLoS Genet. **2010** 6(7): e1001009. doi:10.1371/journal.pgen.1001009

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 of *Ustilago maydis* on Maize and Teosinte Lines. J. Vis. Exp. **2014**. (83), e50712, doi:10.3791/50712

Cho S, Kim N, Choi M, Shin W. Structure of aspergillopepsin I from *Aspergillus phoenicis*: variations of the S1'-S2 subsite in aspartic proteinases. Acta Crystallogr D BiolCrystallogr. **2001**;. 57:948–956.

Copper J, Khan G, Taylor G, Tickle I, Blundell T. X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution. J Mol Biol. **1990**; 214:199-222.

Cosgrove D. Growth of the plant cell wall. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2005**; 6:850–61.

Davies D. The structure and function of the aspartic proteinases. Biophys. Chem. **1990**; 19:189-215.

Doehlemann G, Wahl R, Horst R, Voll L, Usadel B, Poree F, Stitt M, Pons-Kühnemann J, Sonnewald U, Kahmann R, Kämper J. Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. Plant J. **2008**; 56, 181-195.

Domingos A, Cardoso P, Xue Z, Clemente A, Brodelius P, Pais M. Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. Eur. J. Biochem. **2000**; 267:6824-6831.

Fischer B, Krieger-Liskay A, Eggen R. Oxidative stress induced by the photosensitizers neutral red (type I) or rose bengal (type II) in the light causes different molecular responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant S. 168 **2005**, 747–759.

Fisher, M. C., Henk, D. a, Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L. & Gurr, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. Nature. Nature Publishing Group. **2012**; 484, 186–94

Fraser M, Strynadka N, Bartlett P, Hanson J, James M. Crystallographic analysis of transition-state mimics bound to penicillopepsin: phosphorus-containing peptide analogues. **1992**; Biochemistry 31:5201–5214.

Godde. Eukaryotic microbes. Department.Monm.Biology [serie en internet] 2008 [consultado 2017 mayo]:[aprox 20 pp] disponible en <http://department.monm.edu/biology/godde/courses/EukaryoticMicrobes.htm#slide0043.htm>

Gon-Kim S, Wang Y, Hee-Lee K, Yong-Park Z, Park J, Wu J, Jae-Kwon S, Yong-Hwan L, Agrawal G, Rakwal R. In-depth insight into in vivo apoplastic secretome of rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. J. Proteomics Elsevier. **2013**;10.029

González-Fernández R, Valero-Galvan J, Gómez-Gálvez F J, Jorrión-Novo J. Unraveling the in vitro secretome of the phytopathogen *Botrytis cinerea* to understand the interaction with its hosts. Front. Plant Sci. **2015**; 6:839.

Guan B, Lei J, Su S, Chen F, Duan Z, Chen Yu, Gong X, Li H y Jin J. Absence of Yps7p, a putative glycosylphosphatidylinositol linked aspartyl protease in *Pichia pastoris*, results in aberrant cell wall composition and increased osmotic stress resistance. FEMS Yeast Res. **2012**; 12 (8): 969-979.

Helmholtz M. MIPS *Ustilago maydis* database [serie en internet] 2015 [consultado 2016 mayo 3]; Disponible en: <http://www.helmholtz->

muenchen.de/en/ibis/institute/groups/fungal-microbial-genomics/resources/mumdb/index.html

Hofmann T, Allen B, Bendiner M, Blum M, Cunningham A. Biochemistry **1989**; 27:1140-46.

Holliday G, Andreini C, Fischer J, Asad-Rahman. MACiE Mechanism Annotation and Classification in Enzymes [serie en internet] **2007** [consultado 2016 mayo 3] Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/MACiE>

Holliday R. Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. DNA Repair. **2004**; 3:671-682.

Holliday R. Handbook of Genetics. Ed. Plenum. New York. **1974**; Vol 1:575-595

Holloman. W. Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. Nat. Struc. Mol. Biol. **2011**; 18:748-754.

Kämper J. A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. Mol. Genet. Genomics. **2004**; 271:103-110.

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

Krysan D, Ting E, Abeijon C, Kroos L, Fuller R. Yapsins Are a Family of Aspartyl Proteases Required for Cell Wall Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. Eucaryotic Cell. **2005**; 1364-1374.

Kubicek C, Trevor L, Lojuse-Glass N. Plant Cell Wall–Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. Annu. Rev. Phytopathol. **2014**; 52:427-451.

Loftus B. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. Science. **2005**; 307:1321–1324.

Louwrens W. Theron y Benoit Divol. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. Appl Microbiol Biotechnol (**2014**) 98:8853–8868.

Mandujano-González V, Téllez-Jurado A, Anducho-Reyes MA, Arana-Cuenca A, Mercado-Flores Y. Purification and characterization of the extracellular aspartyl protease *APSm1* from the phytopathogen fungus *Stenocarpella maydis*. Protein Expr. Purif 30 (**2015**) 30:30.

Mercado-Flores Y, Hernandez-Rodriguez C, Ruiz-Herrera J, Villa-Tinaca. Proteinases and exopeptidases from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*.

Mycologia. , 95(2), 2003, pp. 327–339.**Mueller** O, Kahmann R, Aguilar G, Trejo-Aguilar G, Wu A, P. De Vries R. The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. Fungal Genet Biol. 2008; 45: S63-S70.

Newman M. X-ray analyses of aspartic proteinases. V. Structure and refinement at 2.0 Å resolution of the aspartic proteinase from *Mucor pusillus*. J Mol Biol. **1993**; 230:260–283.

Nikolaou E, Agrafioti I, Stumpf M, Quinn J, Stansfield I, Brown A. Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. BMC Evolutionary Biology 2009, 9:44

Perez-Nadales E, Almeida Nogueira M, Baldin C, Castanheira S, El Ghalid M, Grund E, Lengeler K, Machegiani E, Vinod-Mehrotra P. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. Fungal Genetics and Biology 70 (**2014**) 42–67.

Qiuqiang G, Liang-Chun L, Qun R, Xiaoming B y Zhaojie Salt stress causes cell wall damages in yeast cells lacking mitochondrial DNA. **2014**; Microbial Cell 1(3): 94-99.

Ralph D, Van Kan J, Pretorius Z, Hammond-Kosak K, Di Pietro A, Spanu P, Ruud J, Dickman M, Kahman R, Ellis J, Foster G. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant P. **2012**; 13(4), 414–430.

Ramalho-Santos M, Verissimo P. Cortes L, Samyn B, Van Beeumen J, Pires E, Faro C. Identification and proteolytic processing of procarnosin A. Eur. J. Biochem. **1998**; 255:133-138.

Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res 42, D503-D509 [consultado 2016 mayo 3]. Disponible en: <https://merops.sanger.ac.uk>

Revuelta M, van Kan J, Kay J, ten Have A. Extensive Expansion of A1 Family Aspartic Proteinases in Fungi Revealed by Evolutionary Analyses of 107 Complete Eukaryotic Proteomes. Genome Biol. Evol. **2014**; 6(6):1480-1494.

Rose J, Saladie M, Catala C. The plot thickens: new perspectives of primary cellwall modification. Curr. Opin. Plant Biol. **2004**; 7:296-301.

Ruiz-Herrera J, León-Ramírez C, Development and Dimorphism of the Phytopathogenic Basidiomycota *Ustilago maydis*. Dimorphic Fungi. **2012**; 23:105-106.

Ruiz-Herrera J, Ortiz-Castellanos L, Martínez A, León-Ramírez C, Sentandreu R. Analysis of the protein involved in the structure and synthesis of the cell wall of *Ustilago maydis*. Fungal Genet Biol **2008**; 45: 571-576.

Schirawski J, Heinze B, Wagenknecht M y Kahmann R. Mating Type Loci of *Sporisorium reilianum*: Novel Pattern with Three *a* and Multiple *b* Specificities. Eukaryotic cell. **2005**; p. 1317–1327.

Simões I, Faro C. Structure and function of plant aspartic proteinases. J. Biochem. **2004**; 271:2067-2075.

Soberanes-Gutierrez C, Juarez-Montiel M, Olguin-Rodriguez O, Hernandez-Rodriguez C, Ruiz-Herrera J, Villa-Tanaca L. The *pep4* gene encoding proteinase A is involved in dimorphism and pathogenesis of *Ustilago maydis*. Mol Plant Pathol. **2015** 16(8), 837–846.

Steinberg G y Perez-Martin J. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. TrendsCell Biol. **2008**;18:61-67.

Theron L y Divol B. Microbial aspartic protease: current and potential applications in industry. Appl Microbiol Biotechnol 2014 98:8853–8868

Tucker S, Talbot N, .Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. Annu Rev Phytophatol. **2001**, 39:385-417.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van-Kan J. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Mol. Plant Pathology. **2007**; 8(5), 561-580.