

Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Biología



## **COMPLEMENTACIÓN FUNCIONAL DE LAS MUTANTES $\Delta tps2$ DE *Ustilago maydis* AFECTADAS EN LA SÍNTESIS DE TREHALOSA**

### **Tesis Individual**

Que como parte de los requisitos para obtener el Título de Licenciada en Biología

#### **Presenta:**

Edda Hurtado Santiago

#### **Dirigido por:**

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

### **SINODALES**

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

\_\_\_\_\_  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime

\_\_\_\_\_  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

\_\_\_\_\_  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

\_\_\_\_\_  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre, 2014  
**México**

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.

*“Toda la Escritura es inspirada por Dios, y útil para enseñar, para redargüir, para corregir, para instruir en justicia, a fin de que el hombre de Dios sea perfecto, enteramente preparado para toda buena obra.”*

2ª TIMOTEO 3:16-17.

## RESUMEN

**Palabras clave:** *U. maydis*, *S. cerevisiae*, trehalosa,  $\Delta tps2$ , estrés.

*Ustilago maydis* es un hongo basidiomiceto perteneciente al grupo de los ustilaginales y culturalmente importante en México, produce en la planta de maíz la enfermedad conocida como “huitlacoche” o “carboncillo del maíz”. En este trabajo se destaca la importancia que tiene la síntesis de la trehalosa sobre la virulencia del hongo en la planta de maíz, así mismo ante la respuesta a diferentes condiciones de estrés en ensayos realizados *in vitro*. Se diseñaron dos plásmidos que posteriormente se utilizaron para transformar las mutantes  $\Delta tps2$  de *U. maydis* afectadas en la producción de trehalosa. El primer plásmido diseñado AC94 porta el gen homólogo *UmTPS2* de *U. maydis* y el segundo plásmido EH205 porta el gen heterólogo quimérico *ScTPS2* de *S. cerevisiae*, ambos plásmidos derivados de pNEBU-H, portan el gen de resistencia a higromicina B, como marcador de selección. Una vez que se obtuvieron las cepas complementadas, se realizaron ensayos *in vitro* con varios agentes estresantes, los cuáles miden la respuesta del hongo ante la desecación, temperatura, radiación ultravioleta y estrés oxidativo. En seguida, de acuerdo con el ciclo de vida de *U. maydis*, se inocularon las plantas de maíz con las cepas  $\Delta tps2$  sexualmente compatibles, complementadas con el gen endógeno o heterólogo quimérico de manera independiente, como control positivo las cepas silvestres FB1xFB2, para analizar el comportamiento fenotípico de las cepas  $\Delta tps2$  complementadas y a su vez compararlas con la cepas mutantes  $\Delta tps2$ , observando la participación de este gen en la virulencia y la respuesta ante condiciones de estrés en este hongo fitopatógeno.

## SUMMARY

**Key words:** *U. maydis*, *S. cerevisiae*, trehalose,  $\Delta tps2$ , stress.

*Ustilago maydis* is a basidiomycete fungus, member of Ustilaginales group this fungus is culturally important in Mexico. In corn it produces the disease named the “huitlacoche” or “charcoal corn”. In this work, we suggested the importance of trehalose biosynthesis related with the virulence of *U. maydis* on the corn, likewise to the response on stress conditions *in vitro* assays. We constructed two plasmids to complemented *U. maydis*  $\Delta tps2$  mutants affected in the trehalose production. The first plasmid designed bear the homologue *U. maydis*’ *UmTPS2* gene was named AC94, and the second one harbours a quimeric heterologous of *S. cerevisiae*’s *ScTPS2* gene and was named EH205. Both plasmids are derived from pNEBU-H plasmid having a hygromycin B resistance gene as a selection marker. Once the complemented strains were obtained we did *in vitro* assays using several stress agents to measure response to dessication, temperature, ultraviolet radiation and oxidative stress. According to the cycle life of *U. maydis*, corn plants were inoculated with sexual compatible strains. Each plant was inoculated with a mixture of: mutant  $\Delta tps2$  strains; complemented strains harbouring the endogenous or the quimeric heterologous gene; and as a control the mixture of wild type FB1xFB2 strains, likewise to analyze the fenotipic behavior of  $\Delta tps2$  complemented strains, in comparison with mutant  $\Delta tps2$  strains, we observed the participation of this gene for virulence and response to stress in this important phytopatogenic fungus.

## DEDICATORIA

*A mis padres Ángeles y Erasto.*

*A mí Dios.*

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del proyecto ciencia básica 165844 “Análisis de la Función de la Trehalosa y la Metacaspasa Mac1 en la respuesta a estrés y la muerte celular en *Ustilago maydis*”. Proyecto FOFI-UAQ FNB201209, Complementación heteróloga funcional de las mutantes  $\Delta tps2$  de *Ustilago maydis* afectadas genéticamente en la síntesis de trehalosa. A las instituciones CONACYT y CONCYTEQ por los apoyos otorgados.

A mi *alma mater* la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), que me ha formado desde la preparatoria. A la Licenciatura en Biología, de la Facultad de Ciencias Naturales. A todos y cada unos de mis profesores. Al grupo académico del LANGEBIO, CINVESTAV en el que realice mi primer verano de la ciencia, con el cual aprendí mucho. A todo el LAMIMO. Al Dr. José Antonio Cervantes Chávez por el apoyo brindado, toda su paciencia y enseñanza otorgada. A mis sinodales el Dr. Fidel Landeros Jaime por su apoyo y confianza, al Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo y el Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar por su apoyo, comentarios y sugerencias bien recibidas.

Al principal pilar en mi vida que es mi familia. A mi mamá, mi “Chata” por todo su amor y apoyo incondicional, porque siempre ha confiado en mí. A mi papá, por enseñarme el grandioso hábito de la lectura y que el estudio es lo único que nos queda. A Eliut, por enseñarme que la ciencia es maravillosa y que ser científico va mas allá de tener un grado académico y de pertenecer a una institución y sobre todo, por ayudarme a entender que el árbol tiene más de un solo ángulo para ser observado. A Edna, por motivarme y elogiarme siempre. A Habib, por toda la alegría y energía que posee. Y sobre todo, a mí misma, porque representa una meta cumplida, un ciclo cerrado, un logro más en mi vida y el inicio de mi profesión.

A todas mis amistades, por todos los buenos y gratos momentos. Los que me acompañaron, los que aún siguen y los que vendrán. Gracias.

## ÍNDICE

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumen .....                                                             | 3  |
| Summary .....                                                             | 4  |
| Dedicatoria .....                                                         | 5  |
| Agradecimientos .....                                                     | 6  |
| Índice .....                                                              | 7  |
| Índice de tablas .....                                                    | 10 |
| Índice de figuras .....                                                   | 11 |
| 1. Introducción .....                                                     | 12 |
| 2. Revisión de literatura.....                                            | 15 |
| 2.1. Hongos.....                                                          | 15 |
| 2.2. Trehalosa.....                                                       | 15 |
| 2.2.1. Ruta biosintética de la trehalosa .....                            | 16 |
| 2.2.2. Función protectora de la trehalosa.....                            | 19 |
| 2.2.3. Función de la trehalosa en hongos .....                            | 20 |
| 2.2.4. Estrés y relación con la trehalosa .....                           | 22 |
| 2.2.5. Tipos de estrés abiótico .....                                     | 22 |
| 2.3. Modelo de estudio <i>Ustilago maydis</i> .....                       | 25 |
| 2.3.1. Ciclo de vida.....                                                 | 25 |
| 2.4. Antecedentes de la función de la trehalosa en <i>U. maydis</i> ..... | 28 |
| 3. Justificación .....                                                    | 31 |
| 4. Hipótesis.....                                                         | 33 |
| 5. Objetivo .....                                                         | 34 |
| 5.1. Objetivos específicos .....                                          | 34 |
| 6. Material y métodos.....                                                | 35 |
| 6.1 Análisis bioinformático .....                                         | 35 |
| 6.1.1. Secuenciación y análisis .....                                     | 35 |
| 6.2. Cepas empleadas .....                                                | 35 |
| 6.3. Manipulación de ácidos nucleicos.....                                | 37 |
| 6.3.1 Extracción de ADN genómico.....                                     | 37 |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.3.2. Electroforesis en gel de agarosa.....                                                     | 37 |
| 6.3.3. Cuantificación del ADN en nanodrop .....                                                  | 38 |
| 6.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....                                            | 38 |
| 6.3.5. Extracción del ADN de plásmido.....                                                       | 39 |
| 6.3.6. Digestión enzimática de plásmido.....                                                     | 40 |
| 6.3.7. Preparación de células electrocompetentes .....                                           | 40 |
| 6.3.8. Extracción de plásmido de <i>U. maydis</i> para la transformación en <i>E. coli</i> ..... | 40 |
| 6.4. Transformación genética de <i>U. maydis</i> .....                                           | 41 |
| 6.4.1. Formación de protoplastos.....                                                            | 41 |
| 6.4.2. Transformación genética de <i>U. maydis</i> en hielo .....                                | 42 |
| 6.4.3. Construcción del gen heterólogo quimérico: plásmido EH205 .....                           | 42 |
| 6.4.4. Construcción del gen homólogo: plásmido AC94 .....                                        | 44 |
| 6.5. Análisis fenotípico .....                                                                   | 44 |
| 6.5.1. Diluciones seriadas en placa .....                                                        | 44 |
| 6.5.2. Conteo de células en cámara de Neubauer .....                                             | 45 |
| 6.5.3. Ensayo de respuesta a estrés <i>in vitro</i> .....                                        | 45 |
| 6.5.4. Prueba de patogenicidad en la planta, <i>Zea mays</i> .....                               | 46 |
| 7. Resultados y discusión.....                                                                   | 47 |
| 7.1. Análisis bioinformático .....                                                               | 47 |
| 7.2. Construcciones para recuperar el fenotipo silvestre .....                                   | 51 |
| 7.2.1. Plásmido AC94 gen homólogo UmTps2 “um10650”.....                                          | 51 |
| 7.2.2. Construcción del plásmido EH205 .....                                                     | 54 |
| 7.3. Transformación de cepas $\Delta tps2$ .....                                                 | 57 |
| 7.3.1. Identificación de cepas complementadas .....                                              | 57 |
| 7.3.2. Determinación a nivel molecular del gen TPS2 .....                                        | 59 |
| 7.4. Análisis funcional .....                                                                    | 62 |
| 7.4.1. Ensayo de respuesta a estrés <i>in vitro</i> .....                                        | 62 |
| 7.4.2. Análisis fenotípico en planta, <i>Zea mays</i> .....                                      | 66 |
| 8. Conclusión.....                                                                               | 75 |
| 9. Literatura citada.....                                                                        | 76 |

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| 10. Apéndice.....                                      | 83 |
| 10.1. Preparación de soluciones .....                  | 83 |
| 10.2. Preparación de medios de cultivo .....           | 84 |
| 10.3. Programas utilizados para el termociclador ..... | 85 |
| 10.4. Alineamiento de la proteína Tps2.....            | 87 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Aplicaciones de la trehalosa en la naturaleza y en el laboratorio..... | 24 |
| Tabla 2. Cepas utilizadas para este trabajo .....                               | 36 |
| Tabla 3. Lista de oligonucleótidos empleados.....                               | 36 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estructura de la trehalosa .....                                            | 16 |
| Figura 2. Rutas biosintéticas de la trehalosa en diferentes organismos .....          | 17 |
| Figura 3. Esquema del metabolismo de la trehalosa propuesto para <i>U. maydis</i> ... | 18 |
| Figura 4. Representación esquemática del ciclo de vida de <i>U. maydis</i> .....      | 27 |
| Figura 5. Ensayo de respuesta a estrés en cepas silvestres y mutantes.....            | 29 |
| Figura 6. Ensayo de patogenicidad .....                                               | 30 |
| Figura 7. Representación esquemática del dominio de la proteína Tps2 .....            | 49 |
| Figura 8. Representación esquemática de dominios GT1-TPS y TPP .....                  | 50 |
| Figura 9. Plásmido AC94.....                                                          | 53 |
| Figura 10. Estrategia de construcción del gen quimérico heterólogo.....               | 55 |
| Figura 11. Construcción del plásmido EH205 .....                                      | 56 |
| Figura 12. Ensayo de respuesta a estrés <i>in vitro</i> , LiCl, 28° C .....           | 58 |
| Figura 13. Crecimiento de cepas mutantes $\Delta tps2$ (1328) complementadas.....     | 58 |
| Figura 14. Identificación por PCR de cepas complementadas con AC94.....               | 59 |
| Figura 15. Determinación de la identidad del plásmido EH205 .....                     | 61 |
| Figura 16. Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>U. maydis</i> , con AC94 .....           | 64 |
| Figura 17. Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>U. maydis</i> , con EH205 .....          | 65 |
| Figura 18. Planta sana de maíz (variedad cacahuazintle), control positivo.....        | 70 |
| Figura 19. Planta de maíz inoculada con las cepas silvestres FB1xFB2.....             | 71 |
| Figura 20. Planta de maíz inoculada con el plásmido AC94 .....                        | 72 |
| Figura 21. Planta de maíz inoculada con el plásmido EH205 .....                       | 73 |
| Figura 22. Planta de maíz inoculada con el plásmido EH205 .....                       | 74 |

## 1. INTRODUCCIÓN

En México, una de las aportaciones que presenta mayor peso económico y sobre todo de gran importancia en la alimentación, es sin duda la producción de maíz (CIMMYT <http://www.cimmyt.org>). Según cifras de la SAGARPA (2011) (<http://www.sagarpa.gob.mx>), en el año 2010 se cosecharon más de 23 millones de toneladas de maíz, obteniéndose un ingreso superior a los 65,000 millones de pesos. De manera natural, el maíz posee resistencia genética contra una gran variedad de microorganismos patógenos ya sean virus, hongos, bacterias o fitoplasmas, sin embargo, el maíz es susceptible de ser atacado por muchos tipos de hongos. Estos microorganismos que son eucariotas simples producen diversos síntomas en prácticamente cualquier parte de la planta. Entre los hongos que atacan al maíz se encuentran, por mencionar algunos; *Fusarium moliniforme*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *Giberela zeae*, *Nigrospora oryzae*, *Penicilium oxalicum*, *Phytium aphanidermatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Peronosclerospora sorghi* y *Aspergillus flavus* (Agrios, 2005). De igual manera, existen otros hongos patógenos naturales de este cultivar, como es el caso de *Ustilago maydis*, el cual también parasita al teocinte (*Zea mexicana*). El síntoma principal de la enfermedad producida por *U. maydis*, es el desarrollo de un tumor que se genera principalmente en los granos de elote, por lo tanto, en la etapa final del desarrollo de esta planta. En México, este tumor es conocido comúnmente como “huitlacoche” o enfermedad del carboncillo del maíz (Banuett, 2005), lo cual afecta en gran medida a la economía a nivel mundial. Es interesante comentar que tanto el producto de la enfermedad, “el tumor”, como el propio hongo (*U. maydis*) no generan ningún tipo de daño o patología para el hombre. Por el contrario, el huitlacoche es comestible y forma parte de la riqueza cultural de México (Martínez Espinoza y Ruíz-Herrera, 1998; Ruíz-Herrera, 2011).

El hongo *U. maydis*, es un basidiomiceto perteneciente al grupo de los Ustilaginales, que durante una etapa de su ciclo de vida presenta el fenómeno denominado dimorfismo, lo cual significa que tiene una fase de crecimiento en forma de levadura, que es haploide saprófita y otra con la morfología de micelio

que es diploide y además esta última constituye la forma infectiva del hongo (Brefort *et al.* 2009; Ruiz-Herrera, 2011; Vollmeiste, 2012). Sin embargo, para que *U. maydis* complete su ciclo de vida, este requiere de la presencia de su hospedero natural, que son la planta del maíz y el teocinte. La sintomatología que se desarrolla en la planta debido a la infección del hongo, consiste en la presencia de clorosis, producción de antocianinas y por último el desarrollo de tumores en las partes aéreas de la planta (tallos y hojas), siendo la mazorca el órgano más afectado. Una vez que la planta está infectada, el grano de elote se deforma completamente y en este se desarrollan las teliosporas, las cuales constituyen las formas de propagación y reproducción del hongo, además son las responsables del color negro característico presente en el tumor, otorgándole el aspecto carbonoso (Brefort *et al.* 2009; Ruiz-Herrera, 2011; Vollmeiste, 2012).

Por otra parte, la trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa. Este disacárido, se produce en varios tipos de organismos, con la excepción de los vertebrados. En los hongos, la trehalosa tiene doble funcionalidad, sirve tanto como carbohidrato de reserva, así como en la respuesta ante condiciones de estrés (Singer & Lindquist, 1998; Al-Bader N. *et al.* 2010). Existe una relevante relación entre la producción de trehalosa y la respuesta a condiciones de estrés, lo cual ha sido sujeto de estudio principalmente en hongos patógenos de humanos (Van Dijck *et al.* 2002). En el caso de *Candida albicans*, hongo de gran interés e importancia debido a su capacidad para infectar al ser humano, se ha reportado que la interrupción del gen *CaTPS2* (trehalosa-fosfato-fosfatasa), se obtiene como resultado la ausencia de trehalosa, acumulándose altos niveles de T6P (trehalosa-6-fosfato), lo que conduce a que las células se agreguen en su fase estacionaria y disminuye la infectividad de *C. albicans* en ratones (Zaragoza *et al.*, 2002). En *C. albicans*, la trehalosa es sintetizada en dos pasos enzimáticos; 1) La enzima trehalosa-6-fosfato sintasa que es codificada por el gen *TPS1*, produce trehalosa-6-fosfato (Tre6P), a partir de una molécula de glucosa-6-fosfato y una molécula de UDP (Uridin Difosfato)-glucosa, 2) La enzima Tre6P fosfatasa, codificada por el gen *TPS2*, desfosforila a la Tre6P, produciendo así trehalosa y fosfato. De acuerdo con Van Dick *et al.* 2002, señala que en las

cepas mutantes de *C. albicans* (*CaTPS2*), se inhibe el crecimiento y las células mueren pronto ante la exposición a alta temperatura (condición de estrés), lo que sugiere que la enzima Tps2, puede ser blanco de acción para la producción de fungicidas. Así mismo, los patógenos de humanos *Cryptococcus gattii* y *C. neoformans*, a pesar de que ambas especies han divergido evolutivamente, las vías de síntesis de trehalosa se encuentran altamente relacionadas en lo que se refiere a su participación en la virulencia (Petzold *et al.* 2006; Ngamskulrungron *et al.*, 2009).

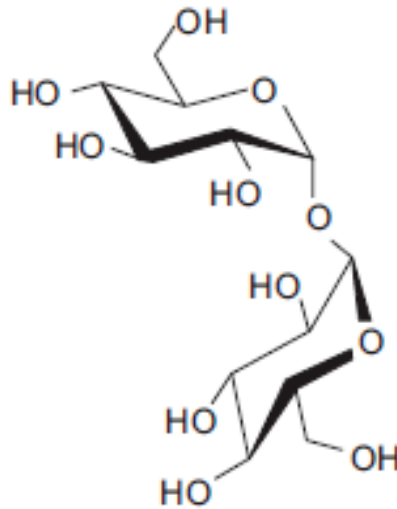
## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. HONGOS

Los hongos, son organismos eucariotas que pertenecen al reino Fungi. Este grupo se divide en cinco filas denominados *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota*, *Zygomycota* y *Chytridiomycota*. No sintetizan materiales orgánicos a diferencia de las plantas, ni tampoco pueden ingerir sólidos como en el caso de los animales. Como características generales y en común son heterotrófos para el carbono, obtienen sus nutrientes por absorción de materiales solubles orgánicos e inorgánicos, contienen quitina como parte de la pared celular, así mismo presentan estilos de vida únicos y distintos para cada caso, pueden ser sexuales, otros asexuales e incluso algunos combinan ambas formas de vida, la forma de dispersión es mediante sus esporas (Hudson, 1992).

### 2.2. TREHALOSA

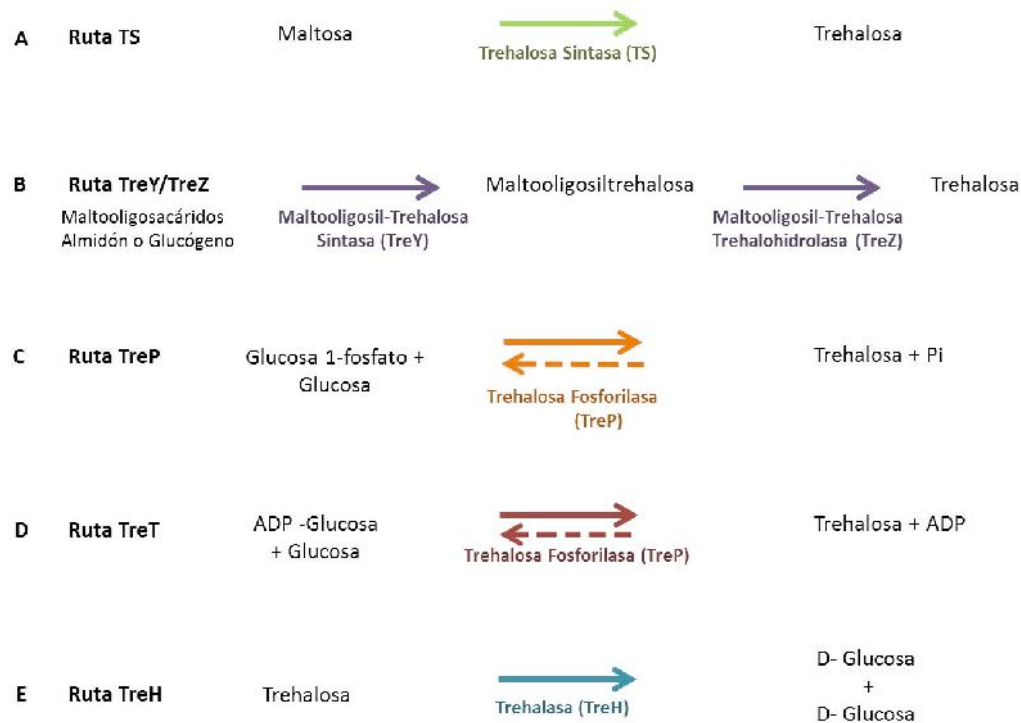
La trehalosa, es un disacárido no reductor, que consiste en dos moléculas de glucosa unidas en una configuración  $\alpha,\alpha$ -1,1, siendo un disacárido muy estable (Figura 1), funciona como fuente de energía de reserva y en respuesta a estrés (Matthew *et al.* 2008). Se encuentra en bacterias, levaduras, hongos, plantas, insectos e invertebrados (Elbein, 2003). Es también conocida como “tremalosa” o “mycosa”. En 1832 fue descubierta por H. A. Wiggers, en el hongo parásito de cereales y hierbas, *Claviceps purpurea*, conocido como ergot o cornezuelo; en el mismo año Berthelot, aisló de diferentes insectos un azúcar, al que nombró “trehalique glucosa” o trehalosa. Más tarde, en 1925 Koch & Koch, establecieron protocolos básicos de aislamiento de la trehalosa en levaduras (Richards *et al.* 2002; Lordachescu e Imai, 2011).



**Figura 1.** Estructura de la trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil  $\alpha$ -D-glucopiranosido)(Imagen tomada de Matthew *et al.* 2008).

### 2.2.1. RUTA BIOSINTÉTICA DE LA TREHALOSA

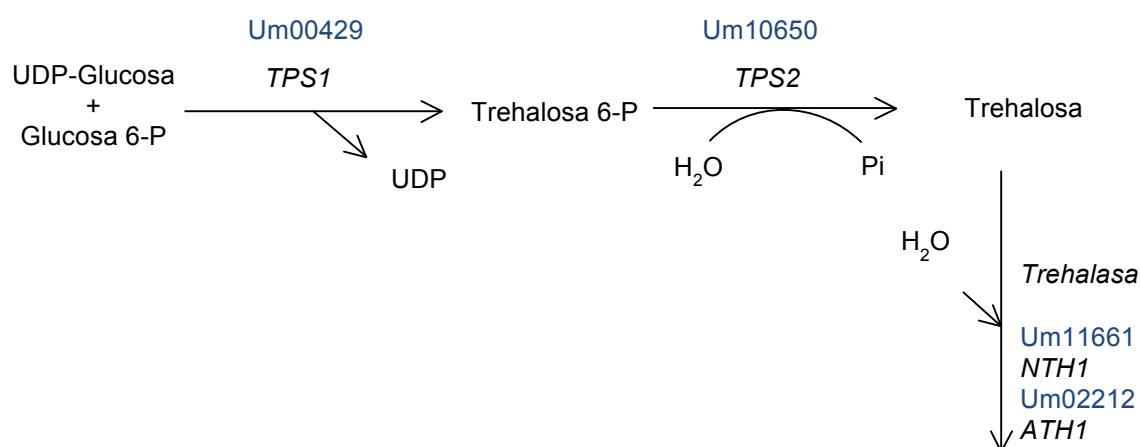
Actualmente se conocen alrededor de cinco diferentes rutas de la síntesis de trehalosa, en distintos organismos, desde bacterias, hongos, plantas e insectos (Figura 2) (Avonce, 2006). Mientras que la degradación de la trehalosa es realizada de manera general por las enzimas denominadas trehalasas.



**Figura 2.** Rutas biosintéticas de la trehalosa en diferentes organismos. A) la ruta biosintética de la trehalosa que se lleva a cabo en, micobacterias, endófitas y eubacterias como *Pimelobacter*; B) la ruta que predomina en el grupo de arqueas termófilas como *Sulfolobus*; C) la ruta presente sólo en algunos basidiomicetos, protistas, hongos micorrízicos y bacterias termófilas; D) la ruta presente en el arquea hipertermófilico *Thermococcus litoralis* y E) se indica el último paso metabólico, que finaliza con la degradación de la trehalosa por la enzima trehalasa, formándose así dos moléculas de glucosa (Imagen tomada de Avonce *et al.* 2006).

En el caso particular de los hongos, la vía de síntesis de trehalosa se conoce como la vía TPS/TPP (Figura 3) descrita inicialmente en la levadura *S. cerevisiae*, por Cabib & Lenoir en 1958, sin embargo, como se mencionó se conocen otras cinco rutas biosintéticas descritas para otros organismos (Figura 2). En el caso de la levadura, la primera fase de síntesis consiste en la producción de trehalosa-6-fosfato (T6P), la cual es sintetizada por la enzima trehalosa fosfato-sintasa (Tps), codificada por el gen *TPS1*, la cual transfiere un resto de glucosa a partir del uridin difosfato glucosa (UDPG) a la glucosa-6-fosfato (G6P).

Posteriormente, la enzima trehalosa-fosfato-fosfatasa (TPP), codificada por el gen *TPS2*, desfosforila a la trehalosa-6-fosfato generando trehalosa (T) y fósforo (Pi) (Bell *et al.* 1998). La trehalosa una vez que ha cumplido su función en la célula es degradada por las enzimas trehalasas, codificadas por los genes *NTH1* y *NTH2* (trehalasas neutras intracelulares con pH óptimo de 7) y *ATH1* (trehalasa ácida extracelular con pH óptimo de 4.5) (Petzold *et al.* 2006). En el caso de *U. maydis*, se realizó la búsqueda de los genes putativos involucrados en la ruta de síntesis-degradación de trehalosa en la base de datos del Munich Information Center for Protein Sequences, MIPS *Ustilago maydis* data base (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>), identificando a todos los genes participantes (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema del metabolismo de la trehalosa propuesto para *U. maydis*. La trehalosa-6-fosfato (T6P) es el precursor metabólico de la trehalosa, producto de la reacción de condensación de UDP-glucosa más glucosa-6-fosfato (G6P), es catalizada por la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (Tps1) (Um00429). La T6P es desfosforilada a trehalosa y fósforo inorgánico por la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (Tps2) (Um10650). La trehalosa es hidrolizada por las trehalasas Nth1 (Um11661) o Ath1 (Um02212), en dos moléculas de glucosa. Los números de acceso correspondiente a los genes putativos en *U. maydis* se obtuvieron de la base de datos MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>). El esquema general fue tomado de Liam *et al.* 2012.

### 2.2.2. FUNCIÓN PROTECTORA DE LA TREHALOSA

De manera general se ha descrito que la trehalosa es capaz de proteger y estabilizar la estructura y función de las proteínas, así como la integridad de las membranas celulares bajo condiciones de estrés abiótico como puede ser la: desecación, la congelación, alta salinidad, la oxidación y las radiaciones ultravioleta así como altas temperaturas, entre otros (Colaco *et al.* 1992; Lordachescu e Imai, 2011).

La poliglutamina (polyQ) es un fragmento peptídico que consiste en la repetición del aminoácido glutamina, en cantidades excesivas se relaciona con enfermedades neurodegenerativas, mediante agregación y toxicidad, causadas por mutaciones en modelo de ratón, que contienen fragmentos de huntingtina (HTT), y se caracteriza por la desregulación de la homeostasis de calcio (Czeredys *et al.* 2013). En un estudio realizado por Sarkar *et al.* 2007, en células de ratón tratadas con trehalosa, sostiene que ésta puede actuar por sí sola como chaperona al reducir la presencia de polyQ e inducir la autofagia. Señalan que la trehalosa aumenta los niveles de los reguladores de la autofagia, tales como Atg6, Atg12, Atg7 o Atg5. Y actúa como protector en los efectos secundarios durante la apoptosis. Estos autores resaltan la importancia del estudio de la trehalosa, ya que junto con el fármaco rapamicina, son considerados como una alternativa en el tratamiento de la enfermedad de Huntingtina, Parkinson y otras enfermedades relacionadas.

Como ya se mencionó, al tener la trehalosa la propiedad de estabilizar las membranas y las proteínas durante el estado de desecación, es considerada también un protector universal y como chaperona química que actúa en altas concentraciones, sobre todo presente en organismos anhidrobióticos, ante la presencia de estrés. Crowe, 2007 concluye que, la trehalosa sea posiblemente menos efectiva que otros oligosacáridos, sin embargo, resalta que en condiciones sub-óptimas es un excipiente preferente.

### 2.2.3. FUNCIÓN DE LA TREHALOSA EN HONGOS

En los hongos filamentosos y los levaduriformes, la trehalosa cumple una función protectora ante situaciones de estrés y para una gran variedad de funciones asociadas con la supervivencia y de manera puntual también relacionada con la patogenicidad (Lowe, 2009), puesto que tiene relación directa con la capacidad infectiva de algunos patógenos tanto de humanos como de plantas.

En el caso de *Magnaporthe grisea* hongo fitopatógeno que causa daño en los cultivos de arroz, la síntesis de la trehalosa es iniciada por el gen *TPS1*. Foster *et al.* 2003, observó que se requiere de la presencia de trehalosa para la producción de apresorios funcionales e infección primaria de la planta de arroz. Lo que les indicó que se requiere de la función del gen *TPS1* para la penetración de la cutícula en la planta por medio del apresorio. Además, en los conidios de *M. grisea* se acumula gran cantidad de trehalosa durante el proceso infectivo en la planta. Y observaron que en las mutantes afectadas en el gen *TPS1* que no producen trehalosa a niveles similares a los de la cepa silvestre, no son virulentas, lo que destaca la importancia de este disacárido en la funcionalidad del apresorio y por ende del proceso de patogenicidad (Foster *et al.* 2003; Wilson *et al.* 2007).

En el patógeno del trigo, *Stagnospora nodorum*, la síntesis de trehalosa se incrementa durante la esporulación y el crecimiento. En un estudio realizado por Lowe *et al.* 2009, demuestran que el gen *TPS1* es dispensable para la regeneración en presencia de lesiones, sin embargo, la contraparte indica que hay una disminución durante el crecimiento y la esporulación del hongo, tanto en ensayos en planta como *in vitro*. Resaltando que, la disminución en el crecimiento y en la esporulación del hongo se deben a la alta sensibilidad que hay en presencia de estrés oxidativo y de calor, lo que refuerza la idea de que la trehalosa juega un papel muy importante durante el proceso infectivo del hongo y en defensa contra el estrés.

En el caso de *Botrytis cinerea*, hongo patógeno que afecta a más de 230 especies de plantas, también conocido comúnmente como moho gris, la trehalosa

no participa directamente en la patogenicidad, sin embargo, esta molécula sí regula varias funciones fisiológicas como lo son: el crecimiento, la osmoprotección y la regulación ante situaciones de estrés. La trehalosa participa en la protección ante el estrés por calor, al igual que en la supervivencia de las conidias (esporas). En cuanto a la germinación de conidias, el metabolismo de la trehalosa interviene en dos aspectos: 1) proporciona una fuente importante de energía cuando los nutrientes externos se encuentran limitados, y 2) el precursor de la trehalosa T6P, desempeña el papel de regulación de flujo glucolítico (Doehlemann *et al.* 2006).

En *Candida albicans*, hongo oportunista y patógeno del humano, presenta tres diferentes morfologías a lo largo de su ciclo de vida, como son; 1) levadura, 2) pseudohifa e 3) hifa (Berman, 2006). Este hongo llega a causar desde infecciones superficiales hasta severas. Se consideran como factores de virulencia en *C. albicans*, la expresión de adhesinas e invasinas sobre la superficie celular, el tigmotropismo, la formación de la biopelícula, el cambio morfológico y la secreción de enzimas hidrolíticas (Mayer *et al.* 2013). La virulencia, depende en gran medida de la plasticidad morfogenética del mismo, por lo cual, al dimorfismo se le ha considerado un factor importante para la virulencia (Serneels *et al.* 2012), este patógeno puede producir infecciones a nivel gastrointestinal y genitourinario (Sudbery *et al.* 2004). Como se mencionó anteriormente, para *C. albicans*, el medio en el que se desarrolla influye en la morfología de este, es decir, a pH ácido (< 6) predomina el crecimiento en forma de levadura, sin embargo a pH neutro (> 7), se induce al crecimiento de hifas. En términos de patogenicidad, se ha visto que *C. albicans* se muestra más invasiva en forma de hifa que en la morfología de levadura (Mayer *et al.* 2013). En cuanto a la función que presenta la trehalosa en *C. albicans*, en este sentido destaca la participación que tiene el gen *CaTPS2*, el cual codifica para la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (T6P-fosfatasa), que es parte de la ruta de síntesis de trehalosa, y que a su vez tiene un lugar de suma importancia en la determinación de propiedades de la superficie celular, ya que al inhibir este gen presenta cambios en el crecimiento del hongo en la etapa de hifa, por lo cual también se ve influenciada en la virulencia (Zaragoza *et al.* 2002).

La importancia del estudio de la trehalosa en hongos, durante la respuesta a estrés, ha sido de gran interés por la biología de los mismos y lo que el conocimiento científico de este disacárido puede llegar a aportar en un futuro, para contribuir con soluciones que intervienen con el bienestar humano y/o con su entorno. Así mismo, se muestra en la Tabla 1, las aplicaciones que ha tenido la trehalosa tanto en la naturaleza como en el laboratorio en la protección durante situaciones de estrés.

#### **2.2.4. ESTRÉS Y RELACIÓN CON LA TREHALOSA**

Se ha relacionado a la trehalosa como una posible respuesta ante situaciones de estrés, en distintos organismos. Es decir, la tolerancia a altas y bajas temperaturas, estrés oxidativo, salinidad, desecación y más, han sido evitadas debido a la producción y almacenamiento de este disacárido (Lordachescu e Imai, 2011). Se ha conceptualizado el término “estrés abiótico” en aquellos factores no vivos, que afectan de manera negativa a los organismos. Sin embargo, estos factores han sido y son mitigados por mecanismos y sistemas biológicos que se desarrollan en los propios organismos afectados, todo esto como resultado de procesos evolutivos (Lordachescu e Imai, 2011). Existen dos mecanismos principales para contrarrestar el estrés abiótico; evitación y adaptación (Roelofs *et al.* 2008). En el primero, el organismo emigra de lugar, respeta sus límites de tolerancia como la temperatura y condiciones que éste requiere. En el segundo, la adaptación se basa en la activación de mecanismos genéticos de defensa, como producción y regulación de proteínas, solutos, rutas sintéticas y demás (Roelofs *et al.* 2008).

#### **2.2.5. TIPOS DE ESTRÉS ABIÓTICO**

De los principales tipos de estrés abiótico que se consideran de mayor importancia y que destacan para los estudios de respuesta a estrés, son los siguientes: 1) Desecación; el agua, es uno de los componentes que se considera

vital y esencial para los organismos. En 1975, Crowe & Madin definieron a la anhidrobiosis como “la capacidad de sobrevivir debido a la pérdida de agua”. Muchos organismos anhidrobióticos, durante la fase de desecación, acumulan altas concentraciones de trehalosa (Strom *et al.* 1993; Lordachescu e Imai, 2011). De acuerdo con Crowe *et al.* 1992, la trehalosa es el disacárido más efectivo, en estabilizar la membrana durante la desecación.

2) Temperatura; los organismos han desarrollado evolutivamente formas y características adaptativas para sobrevivir en el ambiente donde se desarrollan. La desnaturalización y la agregación de las proteínas ocurre en altas y bajas temperaturas. Sin embargo, la trehalosa como soluto compatible, puede prevenir la desnaturalización y agregación de las proteínas. Puede estabilizar la membrana, por los enlaces de hidrógeno con los grupos fosfato (Lordachescu e Imai, 2011).

3) Radiación; la radiación ultravioleta (UV) es uno de los principales tipos de estrés ambiental que causan daño celular. Puede provocar efectos tanto dañinos como benéficos, lo cual depende de la longitud de onda, el tiempo de exposición a la radiación y la fuente de UV. La exposición de rayos UV inducen la agrupación de algunos tipos de receptores en la superficie celular y envían señales de proliferación. De manera intracelular existen mecanismos de activación en respuesta a la radiación, que inducen factores de transcripción que activan genes involucrados en la reparación y síntesis de ADN, transcripción y regulación del ciclo celular. Si el daño es mínimo, la célula continúa su crecimiento o lo repara, por el contrario si es mayor el daño, inicia el fenómeno de la apoptosis (Gupta *et al.* 2013).

4) Estrés oxidativo; en los organismos aerobios, las células se exponen regularmente a un incremento en los niveles de ROS (por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species), tales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), aniones de superóxido ( $O_2^-$ ) y radicales hidroxilo ( $OH^-$ ) (Álvarez-Peral *et al.* 2002). Por lo que, cuando la producción de estas moléculas reactivas anulan la defensa antioxidante de la célula, se genera estrés oxidativo (Willcox *et al.* 2004). Así mismo, este tipo de estrés suele ser generado por productos xenobióticos extracelulares, que causan la pérdida de la integridad celular (Costa & Moradas-Ferreira, 2001). Se relaciona el estrés

oxidativo con enfermedades como desórdenes neurodegenerativos y cáncer (Finkel & Holbrook, 2000; Herdeiro, 2006).

**Tabla 1.** Aplicaciones de la trehalosa en la naturaleza y en el laboratorio.

## Aplicaciones

### *En la naturaleza*

Fuente de Carbono/Energía  
Osmoregulación  
Componente estructural de la pared celular en bacterias  
Protector durante la desecación  
Crioprotección  
Inmunogenicidad  
Regulador de crecimiento en plantas

### *En laboratorio*

Tratamiento de Xeroftalmia y Xeroderma  
Inhibidor de la diferenciación de osteoclastos, como modelo para el tratamiento de osteoporosis  
Estabilización de vacunas y liposomas  
Resistencia a la sequía en la cosecha de plantas  
Preservación de células de mamíferos durante la desecación  
Protección durante el estrés térmico  
Crioprotección de fibroblastos y ovocitos humanos  
Protección contra hipoxia en células de mamífero  
Protección contra anoxia inducida por agregación de proteínas  
Enfermedad de Huntington en el modelo de ratón  
Modelo de línea celular de OPMD  
Osteoporosis en modelo de ratón  
Agregación de  $\beta$ -amiloides  
Agregación de la proteína prión

---

La tabla muestra algunas de las áreas en las que la trehalosa actúa de forma natural y exhibe su acción de protección contra la exposición del organismo al estrés abiótico. Seguido de ejemplos, en el que se ha usado como “diseño” de protección en diferentes campos.

---

Tomada y modificada de Kumar & Roy, 2008.

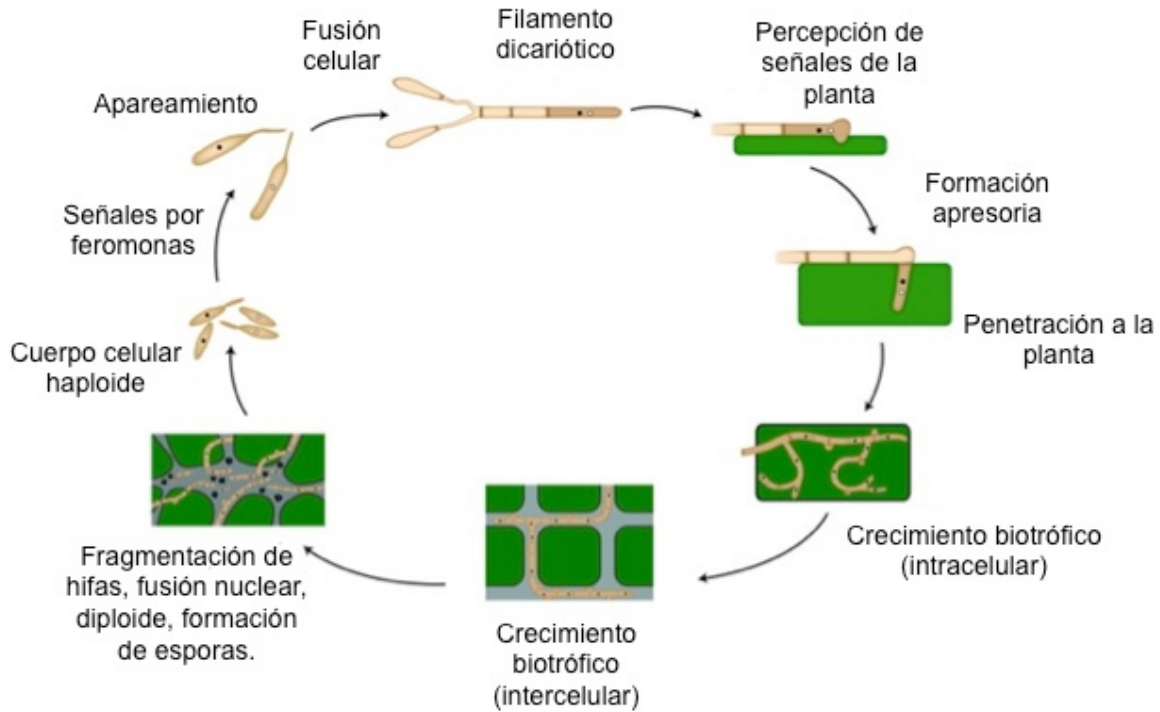
### 2.3. MODELO DE ESTUDIO *Ustilago maydis*

El hongo *Ustilago maydis*, posee características que lo han hecho un buen modelo de estudio, por ejemplo el ciclo de vida, la fase haploide saprófita en forma de levadura. Esta propiedad fue elogiada por Holliday (1961), quién señala que al compactarse las células a nivel genético, permite el uso de técnicas microbiológicas y favorece las moleculares. Es interesante el hecho de que *U. maydis* se ha posicionado como el hongo modelo para el estudio en hongos basidiomicetos, así mismo, ocupa uno de los diez primeros lugares dentro de los hongos con mayor importancia científica y económica, a nivel mundial (Dean *et al.*, 2012). Como en el caso de algunos hongos, el genoma de *U. maydis* fue recientemente secuenciado, su base de datos es de libre acceso y está debidamente anotada (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>). Un hecho importante son las herramientas de biología molecular y celular que se han desarrollado a lo largo de más de cuatro décadas de estudio en este hongo, las cuales están disponibles para la comunidad científica (Kamper *et al.* 2006).

#### 2.3.1. CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *U. maydis* presenta dos fases de crecimiento, una haploide (n) que se caracteriza por crecer en forma de levadura que mide de 12-18µm de largo y 4-5 µm de ancho y una fase diploide (2n) que se presenta de manera natural cuando el hongo se encuentra en la planta hospedera y se caracteriza por tener una morfología de hifa. Aunque *U. maydis* no es un patógeno obligado de la planta del maíz, requiere de ésta para completar la segunda fase de su ciclo de vida (revisado por Ruiz-Herrera & León Ramírez, 2012). Para explicar el ciclo de vida, es importante indicar la participación de los loci **a** y **b**, es decir; es un tipo de apareamiento tetra-polar (Vollmeister *et al.* 2012). Para que se lleve a cabo el apareamiento, se requiere de la unión de dos cepas que sean sexualmente compatibles, como ejemplo, una cepa a1b1, se puede aparear con una cepa a2b2. El locus **a** codifica la feromona (*mfa1,2*) y el receptor (*pra1,2*) de la feromona (Farfsing *et al.* 2005), para el locus **a** solamente existen dos alelos el a1

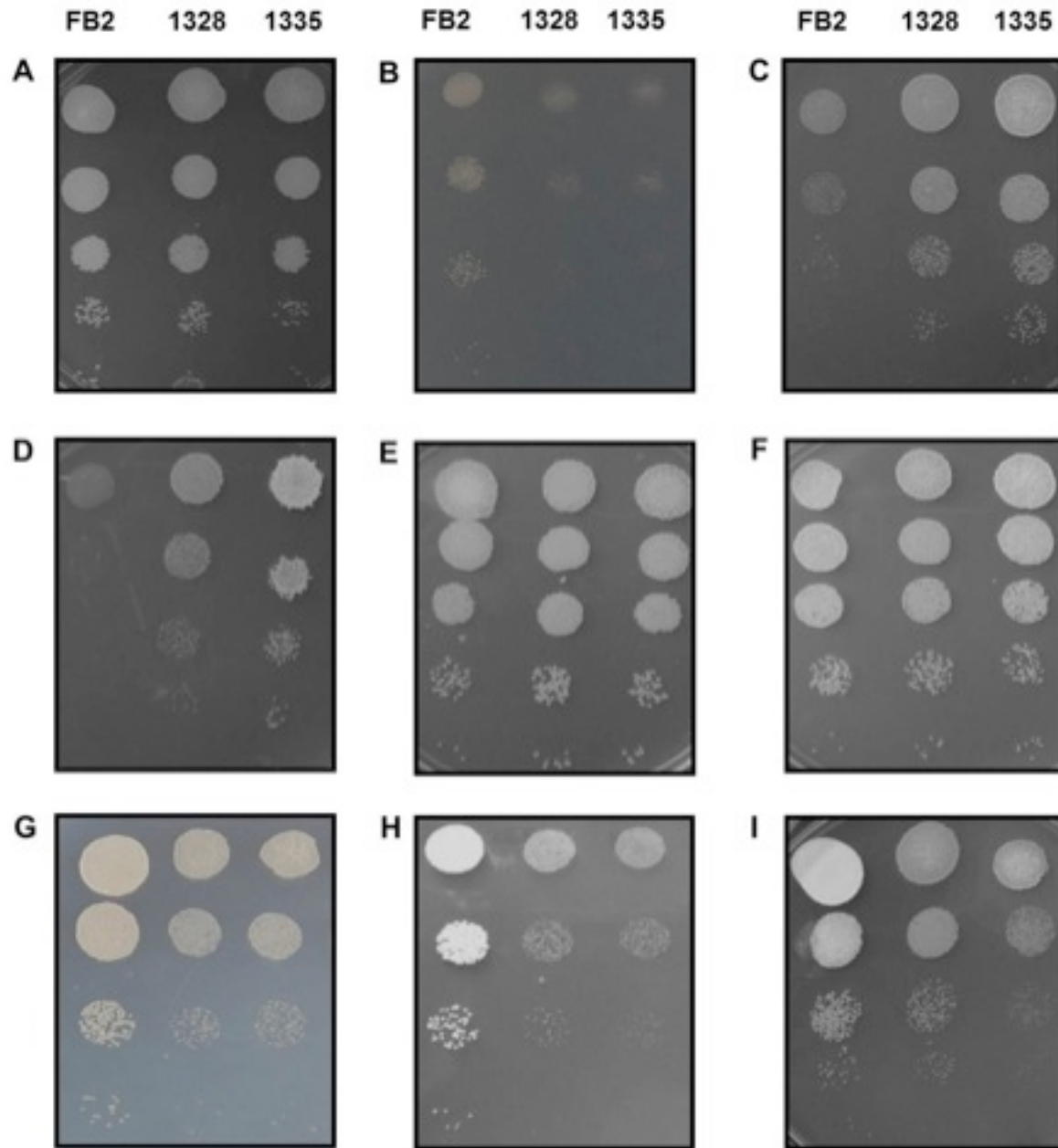
y el a2, caso contrario para el locus **b**, éste es multi-alélico puesto que se ha reportado la presencia del b1 hasta el b25. Este locus, codifica para las proteínas bW y bE, que cuando provienen de loci diferentes éstas interactúan y forman un heterodímero, cuya función es vital para regular la expresión de los genes relacionados con la patogenicidad (revisado por Ruiz-Herrera & León-Ramírez, 2012). Posterior a la unión de dos cepas haploides, se produce una hifa dicariótica, la cual constituye la forma infecciosa del hongo, cuando la teliospora madura, se lleva a cabo la fusión nuclear “cariogamia”, en esta etapa se convierte en diploide. Cuando se dan las condiciones propicias, se lleva a cabo la meiosis y comienza a germinar la teliospora, generándose de ella cuatro basidiosporas haploides, las cuales comienzan a crecer en forma de levadura. Sin embargo, para que *U. maydis* genere patogenicidad y cause daño en la planta, una vez fusionadas las formas haploides ej. **a1b1** y **a2b2** que forman un dicarion, éste comienza a crecer y desarrollar el promicelio o hifa, por lo que requiere tener contacto directo con la pared celular de la planta hospedera *Zea mays*, y así penetra por los estomas u orificios de la planta y continúa el crecimiento del micelio entre la pared celular y el citoplasma. Provoca anomalías morfológicas durante el crecimiento y desarrollo de la planta, presentando clorosis, desarrollo y crecimiento anormal, así como formación de tumores en la planta y en el fruto (mazorca). Se sabe que los tumores ya sea en los granos de elote, hojas o en tallos, éstos contienen basidiosporas, por lo que éstas se dispersan y continúan el ciclo de vida de este microorganismo (Brefort *et al.* 2009; Ruiz-Herrera & León-Ramírez, 2012) (Figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática del ciclo de vida de *U. maydis*. El ciclo se divide en dos fases, haploide y diploide. Se señalan las teliosporas inmaduras y maduras (meiosis) con la formación del promicelio, éstas forman cuatro basidiosporas, que se desprenden y se reproducen en forma de levadura. Se conjugan dos esporidias sexualmente compatibles y forman un dicarion que, posteriormente invade a la planta creciendo en la morfología de hifa, dando origen eventualmente a los tumores donde se almacenan las teliosporas (Tomada y modificada de Pérez-Nadales *et al.* 2014).

## 2.4. ANTECEDENTES DE LA FUNCIÓN DE LA TREHALOSA EN *U. maydis*

En este grupo de trabajo se generaron las mutantes  $\Delta tps2$  denominadas 1328 y 1335, las cuales no producen trehalosa, es por ello que al estudiar su comportamiento encontramos que presentan diferentes características fenotípicas interesantes, entre las que destacan la incapacidad de responder a diferentes situaciones de estrés *in vitro*, como es oxidativo, salino y agentes que dañan la pared celular (Cervantes Chávez y col. datos no publicados) (Figura 5, datos representativos). Así mismo, nuestros ensayos de virulencia en plantas de maíz sugieren que las mutantes  $\Delta tps2$  de *U. maydis* están afectadas en el establecimiento de la enfermedad (Figura 6). Estos datos resaltan la importancia que la síntesis de trehalosa tiene en *U. maydis*, siendo éste el primer hallazgo en un basidiomiceto patógeno de plantas.



**Figura 5.** Ensayo de respuesta a estrés de las cepas silvestre (FB2), mutantes  $\Delta tps2$  [1328 (a1b1) y 1335 (a2b2)], empleado en distintos agentes estresantes. **A)** Control a 28° C, **B)** 0.7M Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), **C)** 10mM Cloruro de Litio ( $\text{LiCl}$ ), **D)** 50mM Acetato de Litio ( $\text{AcLi}$ ), **E)** 50mM Acetato de Sodio ( $\text{AcNa}$ ), **F)** 50mM Acetato de Potasio ( $\text{AcK}$ ), **G)** 2mM Cafeína, **H)** 200 $\mu\text{M}$  CFW e **I)** 0.003 % SDS.



**Figura 6.** Ensayo de patogenicidad. Las plantas de maíz de la variedad cacahuazintle, fueron inoculadas con diferentes cepas de *U. maydis*. La imagen muestra, de izquierda a derecha, la cruza de cepas  $\Delta tps2$  1328x1335 y la cruza de cepas silvestres FB1xFB2. Los síntomas se registraron 4 semanas posteriores a la inoculación.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En éste grupo de trabajo se ha eliminado el gen *TPS2* en *U. maydis*, las cepas mutantes  $\Delta tps2$  muestran alteraciones que pueden de manera conjunta estar involucradas en el estado general del bienestar del hongo, repercutiendo así en la virulencia. Se debe considerar que la planta, como primer mecanismo de defensa ante la presencia de un patógeno, monta la explosión oxidativa. Aunado a ello, la apropiada remodelación de la pared celular es importante para que el hongo pueda invadir exitosamente al huésped (Brefort *et al.* 2009). Así como los defectos observados en la virulencia, estos datos resaltan la importancia que la síntesis de trehalosa tiene en *U. maydis*, siendo éste el primer hallazgo en un basidiomiceto patógeno de plantas.

Se ha indicado en párrafos anteriores que existe poca información de la función de la trehalosa en hongos fitopatógenos, puesto que ésta ha sido sujeto de estudio desde un punto de vista antropocéntrico. Aunado a ello, como se citó el hongo *U. maydis* posee características que lo han hecho un atractivo modelo de estudio y lo han colocado entre los diez patógenos de mayor interés a nivel mundial, lo que hace posible extrapolar la información que se obtiene en este hongo a otros basidiomicetos recalcitrantes a eventos de transformación (Dean *et al.* 2012).

Sin embargo, para poder concluir que el fenotipo observado en las cepas  $\Delta tps2$  es debido a la eliminación del gen *TPS2*, es necesario complementar dichas mutantes. Por lo que se propuso realizar la complementación utilizando tanto el gen homólogo, así como un gen heterólogo previamente caracterizado en otro sistema. Es por ello que basados en un análisis filogenéticos se plantea utilizar el gen de la levadura *S. cerevisiae* (*ScTPS2*) para la complementación heteróloga así como el gen endógeno de *U. maydis* (Um11650). La recuperación del fenotipo silvestre en las mutantes  $\Delta tps2$  complementadas tanto con el gen silvestre como con el heterólogo, nos indicará que las características fenotípicas observadas en

las mutantes  $\Delta tps2$  son debidas a la ausencia de la función del gen *UmTPS2* y por lo tanto se podrá validar la participación de la molécula de trehalosa en la respuesta fisiológica del hongo ante diferentes condiciones de estrés y principalmente en la capacidad infectiva del mismo.

#### 4. HIPÓTESIS

Las características fenotípicas observadas en las mutantes  $\Delta tps2$  de *U. maydis* (1328 y 1335) afectadas en la síntesis de trehalosa, son debidas a la ausencia del gen *UmTPS2* y el fenotipo mutante podrá ser revertido por la función del gen homólogo *UmTPS2* y/o del gen heterólogo quimérico *ScTPS2*.

## 5. OBJETIVO

Revertir el fenotipo de las mutantes  $\Delta tps2$  de *U. maydis* en la respuesta a estrés *in vitro* y la virulencia en plantas de maíz, expresando de manera independiente el gen homólogo *UmTPS2* y el gen heterólogo quimérico *ScTPS2*.

### 5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Transformar genéticamente las cepas mutantes  $\Delta tps2$  1328 y 1335 de *U. maydis* con un plásmido que porte el gen homólogo *UmTPS2*.
- Transformar genéticamente las cepas mutantes  $\Delta tps2$  1328 y 1335 de *U. maydis* con un plásmido que porte el gen *ScTPS2* heterólogo quimérico de *S. cerevisiae*.
- Identificar a nivel molecular la presencia de los genes *UmTPS2* y *ScTPS2* en las cepas complementadas.
- Analizar el fenotipo, en condiciones de estrés, de las cepas complementadas con ambos genes de manera independiente.
- Analizar la capacidad infectiva de las cepas complementadas con ambos genes de manera independiente, en plantas de maíz.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**

#### **6.1.1. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS**

Las construcciones de los plásmidos EH205 y AC94 se secuenciaron en el LANGEBIO, CINVESTAV, Unidad Irapuato, del Instituto Politécnico Nacional, para verificar su identidad. El análisis de la secuencia obtenida se analizó con los programas Vector NTI y APE. Así mismo, las secuencias de los genes heterólogos de *TPS2*, de diferentes organismos se obtuvieron de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para realizar este trabajo, se diseñaron varios oligonucleótidos, los cuales se sintetizaron en la compañía Sigma. Estos se diluyeron a una concentración de 1µg/µl en agua destilada estéril grado biología molecular (H<sub>2</sub>O-GBM), y para la solución de trabajo se diluyeron a 100ng/µl (Tabla 2).

### **6.2. CEPAS EMPLEADAS**

Se presentan los datos de las cepas, que fueron utilizadas para el desarrollo del presente proyecto (Tabla 3), éstas se conservaron a -80° C en 50% glicerol, cuando fue necesario las cepas de interés se recuperaron en medio completo (MC) (Apéndice), suplementado con el agente de selección según fue el caso.

**Tabla 2.** Lista de oligonucleótidos empleados en este trabajo.

| NOMBRE               | SECUENCIA                                               |
|----------------------|---------------------------------------------------------|
| 1-1 F ScTPS2 (2045)  | 5'-GGAGTCGTGAGTCGTGGTCAA-3'                             |
| 1-3 R ScTPS2 (2046)  | 5'-GAATTGTCTTGGGCAGTGGTGGTCATCGTGCGTTTTCTCTTCACGCTG-3'  |
| 1-2 F ScTPS2 (2047)  | 5'-CAGCGTGAAGAGAAAACGCACGATGACCACCACTGCCCCAAGACAATTC-3' |
| 1-4 R ScTPS2 (2048)  | 5'-CTTACACCGGCGCAAAGGTTTAATACGATGTAAAGCACGTTTTTTTTTC-3' |
| 1-6 F ScTPS2 (2049)  | 5'-CGGTACAAGCACGCTCTAGG-3'                              |
| 1-5 R ScTPS2 (2050)  | 5'-GAAAAAAAACGTGCTTTACATCGTATTAAACCTTTGCGCCGGTGTAAAG-3' |
| Secuencia ATG (2051) | 5'-CGTCCAGATCCTGTGGTTTT-3'                              |
| F KpnI UmTPS2 (2013) | 5'-CGCCATATGGTACCCGCCGAGTGACAGAACAAGTA-3'               |
| R KpnI UmTPS2 (2014) | 5'-CGTCAACGGGTACCCACTACCTCGACCGTCATCTC-3'               |
| F UmTPS2 (2040)      | 5'-CAAGGTCCGGAACATGTCTT-3'                              |
| R UmTPS2 (2057)      | 5'-AGGACAGGACGAGTACCGAA-3'                              |

*Abreviaturas:* F: Forward; R: Reverse; Sc: *S. cerevisiae*; Um: *U. maydis*; TPS2: Trehalosa-fosfato-fosfatasa; KpnI: Sitio de restricción de la enzima se muestra subrayado.

**Tabla 3.** Cepas utilizadas para este trabajo.

| NOMBRE | GENOTIPO                                                                 | FUENTE                      |
|--------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|        | <i>Ustilago maydis</i>                                                   |                             |
| FB1    | Silvestre a1b1                                                           | F. Banuet                   |
| FB2    | Silvestre a2b2                                                           | F. Banuet                   |
| 1328   | Mutante $\Delta tps2, a1b1$ cbx <sup>R</sup>                             | No publicado                |
| 1335   | Mutante $\Delta tps2, a2b2$ cbx <sup>R</sup>                             | No publicado                |
| EH236  | Complementada 1328 $\Delta tps2, a1b1$ hyg <sup>R</sup> cbx <sup>R</sup> | Este trabajo                |
| EH237  | Complementada 1328 $\Delta tps2, a1b1$ hyg <sup>R</sup> cbx <sup>R</sup> | Este trabajo                |
| EH287  | Complementada 1335 $\Delta tps2, a2b2$ hyg <sup>R</sup> cbx <sup>R</sup> | Este trabajo                |
| EH289  | Complementada 1335 $\Delta tps2, a2b2$ hyg <sup>R</sup> cbx <sup>R</sup> | Este trabajo                |
| AC145  | Complementada 1328 $\Delta tps2, a1b1$ hyg <sup>R</sup> cbx <sup>R</sup> | Este trabajo                |
| AC146  | Complementada 1328 $\Delta tps2, a1b1$ hyg <sup>R</sup> cbx <sup>R</sup> | Este trabajo                |
| AC167  | Complementada 1335 $\Delta tps2, a2b2$ hyg <sup>R</sup> cbx <sup>R</sup> | Este trabajo                |
| AC168  | Complementada 1335 $\Delta tps2, a2b2$ hyg <sup>R</sup> cbx <sup>R</sup> | Este trabajo                |
|        | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                                          |                             |
| BY4741 | <i>his3Δ leu2Δ met15Δ ura3Δ</i>                                          | LANGEBIO,<br>CINVESTAV.     |
|        | <i>Escherichia coli</i>                                                  |                             |
| Top10  | <i>recA1</i>                                                             | (Invitrogen <sup>TM</sup> ) |

*Abreviaturas:*  $\Delta$ ; mutante, cbx<sup>R</sup>; cepas con resistencia a carboxina, hyg<sup>R</sup>; cepas con resistencia a higromicina B. Se enlista por columnas en el siguiente orden; el nombre de la cepa, genotipo relevante y fuente de dónde se obtuvieron.

### **6.3. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

#### **6.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO**

Una vez que se tuvo listo el cultivo (10 ml) de células de interés, crecidas hasta la fase estacionaria, las células fueron centrifugadas a 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. Se obtuvo una pastilla celular y ésta fue re-suspendida en 200µl de Buffer TE (10 mM Trizma base, 1 mM EDTA, pH 8). Las muestras se transfirieron a tubos Eppendorf y se adicionaron 400 µl del buffer de lisis: 2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM EDTA. Se agregaron 400 µl de la mezcla de Fenol-Cloroformo (1:1) y 0.3 gr de perlas de vidrio (0.1mm de diámetro, lavadas con ácido nítrico y esterilizadas). Para romper las paredes de las células, se colocaron en agitador vórtex de 3 a 5 minutos. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 14 000 rpm durante 10 minutos y se recuperó la fase acuosa en tubos nuevos (estériles). Se adicionaron 2 µl de RNasa A (10 mg/ml) y se incubaron por 5 minutos a 37°C. Se adicionaron 400 µl de fenol-cloroformo y se agitaron en el vórtex por 1 minuto, se centrifugaron durante 7 minutos a 14 000 rpm y se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf. Posteriormente se adicionaron 400 µl de cloroformo y se agitaron en el vórtex por 1 minuto, nuevamente se centrifugaron durante 5 minutos a 14 000 rpm y se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf. El ADN se precipitó con acetato de sodio 3 M (1/10 del volumen) y con etanol 95% frío (dos volúmenes). Se dejó precipitar a -20°C durante 20 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 12 000 rpm, la pastilla se lavó con 300µl de etanol al 70% frío, nuevamente se centrifugaron durante 3 minutos a 12 000 rpm, se decantó y se dejó secar la muestra, finalmente el ADN se disolvió con H<sub>2</sub>O-GBM, utilizándose un volumen aproximado de 50µl.

#### **6.3.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

Se utilizó la electroforesis en gel de agarosa al 1%, para determinar la pureza y la calidad del ADN genómico, plasmídico, observar fragmentos de PCR y productos de digestión de plásmidos. Para ello se prepararon geles de agarosa al

1%, que contienen; para 100ml de agarosa al 1%: 1g de agarosa disuelto en 100ml de buffer TAE 1X (Stock 50X, 242g Trizma<sup>TM</sup> base, 100ml EDTA 0.5 M con 57.1ml de ácido acético, volumen final 1L), y 6µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml). Una vez que el gel de agarosa se solidificó, se colocó dentro de una cámara de electroforesis con solución de Buffer TAE 1X, la electroforesis se realizó a 100 Voltios durante 30 a 60 minutos. Para cargar las muestras, éstas se prepararon con 3µl de Buffer de carga 6x (azul de bromofenol 0.25%, xilen-cianol FF 0.25%, glicerol 30%). Así mismo se coloca en cada uno de los pocillos cada una de las muestras que se requiere observar. Como marcador de peso molecular se utilizó 1 Kb o 100 pb (Fermentas). Una vez corrida la electroforesis el gel se observó en el fotodocumentador (Molecular Image<sup>®</sup> Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ with Image Lab<sup>TM</sup> Software de BIORAD).

### **6.3.3. CUANTIFICACIÓN DEL ADN EN NANODROP**

Las muestras de ADN se cuantificaron por un método espectrofotométrico, utilizándose el Nanodrop (NanoDrop2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). Como blanco se colocaron 2µl de H<sub>2</sub>O-GBM. Posteriormente se colocaron 2µl de la muestra, el cual se mide con el software apropiado.

### **6.3.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

En tubos para PCR, se colocaron 2µl de ADN (100 ng/µl), 2.5µl de 10x Buffer, 0.75µl de 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4µl de 10mM dNTP's, 0.5µl de oligonucleótido sentido 5' (100 ng/µl) y 0.5µl de oligonucleótido reverso 3' (100 ng/µl), 0.15µl de Enzima (Taq DNA Polimerasa, Invitrogen) y 17.95µl de H<sub>2</sub>O-GBM, para el volumen total de 25µl. Se utilizó el termociclador (T100<sup>TM</sup> Thermal Cycler, BIO-RAD), el cual fue programado con las temperaturas y ciclos específicos correspondientes para cada par de oligonucleótidos (Apéndice).

### 6.3.5. EXTRACCIÓN DEL ADN DE PLÁSMIDO

La cepa de interés de *Escherichia coli* se cultivó en 5ml de medio LB (*Luria Bertani*) (Apéndice) por 24 hrs a 37°C en agitación constante. Posteriormente la muestra se centrifugó 2 minutos a 12000 rpm para concentrar las células, a continuación se decantó el sobrenadante y se repitió el proceso de centrifugación. Las células se re-suspendieron con 200µl de la Solución I (Apéndice), posteriormente se adicionaron 400µl de la Solución II (Apéndice), se homogenizaron y se incubaron por 10 minutos en hielo. Se agregaron 300µl de la Solución III (Apéndice), se incubaron 10 minutos en hielo. Posteriormente el tubo se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm, se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos. El ADN de plásmido se precipitó adicionando 600µl de isopropanol frío y se mantuvieron a -20°C por 20 minutos. Se centrifugaron 10 minutos a 12000 rpm. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 300µl de etanol al 70% frío, nuevamente se centrifugaron 5 minutos a 12000 rpm, se decantó el etanol y se invirtieron los tubos para secar la pastilla. Para limpiar el ADN de plásmido este se re-suspendió en 700µl de H<sub>2</sub>O-GBM, se añadieron 3µl de RNAsaA (10 mg/ml), se mezcló e incubó durante 20 minutos a 37°C, se agregó 300µl de fenol:cloroformo 1:1, 2 minutos en vórtex, se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 300µl de cloroformo, 2 minutos en vórtex, y se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm, se recuperó el sobrenadante, este paso se repitió dos ocasiones. El ADN se precipitó con 1/10 del volumen total, de 3 M acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol 100% frío. Las muestras se mantuvieron 20 minutos a -20°C, posteriormente se centrifugaron 10 minutos a 12000 rpm y se decantaron, se lavaron con 300µl de etanol al 70%, se centrifugaron y se dejaron secar. Finalmente las muestras se re-suspendieron en 50µl de H<sub>2</sub>O-GBM.

#### **6.3.6. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE PLÁSMIDO**

La reacción se realizó en un volumen total de 20µl. Para ello se colocaron en tubos Eppendorf; 5µl de ADN (1µg), 0.5µl de Enzima de restricción, 2µl de buffer de Enzima correspondiente, H<sub>2</sub>O-GBM para 20µl. La reacción se incubó a 37°C durante 90 minutos. Finalmente el producto de la digestión se separó en gel de agarosa al 1% y se observó en el transluminador (Molecular Image® Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software de BIORAD).

#### **6.3.7. PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES**

Las células de *E. coli* se cultivaron en 10ml de medio YENB (Extracto de levadura 0.75% y caldo nutritivo 0.8%) y se incubaron a 37°C en agitación, toda la noche. Un litro de medio de cultivo se inoculó con 5-10ml del cultivo anterior y se incubaron a 37°C en agitación, durante tres horas, hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.6 y 0.9 (DO<sub>600</sub>). Una vez que el cultivo obtuvo la DO adecuada, este se colocó 5 minutos en hielo y el cultivo se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de células se lavó con H<sub>2</sub>O milliQ estéril fría, este paso se repitió dos veces. Posteriormente las células, se re-suspendieron en glicerol al 10% frío (H<sub>2</sub>O milliQ) y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente la pastilla celular se re-suspendió en 2 ml de glicerol al 10% frío (H<sub>2</sub>O milliQ). Se prepararon alícuotas de 50µl y se conservaron a -80°C hasta su uso (Sambrook, 1989).

#### **6.3.8. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS DE *U. maydis* PARA TRANSFORMACIÓN EN *Escherichia coli***

Se sembró la cepa de *U. maydis* de interés y se incubó en condiciones estándar (28°C, agitación 150 rpm, 18-24 hrs) posteriormente el cultivo se centrifugó a 3,500 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y a la pastilla de células se le agregaron 500µl de buffer de extracción (Apéndice) se agitó 5 veces en el vórtex por 1 minuto y colocando la muestra un minuto en hielo.

Posteriormente se incubó a 70°C por 10 minutos. Se agregaron 200µl de 5M acetato de potasio y 150µl de 5 M NaCl, se incubaron en hielo durante 20 minutos. Las muestras se centrifugaron 20 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos. Se agregó 1/3 del volumen de polietilenglicol 6000 al 30% y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente la muestra se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm, se decantó el sobrenadante y la pastilla fue re-suspendida en 50µl de H<sub>2</sub>O-GBM. La transformación de *E. coli* se llevó a cabo por electroporación.

#### **6.4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *U. maydis***

##### **6.4.1. FORMACIÓN DE PROTOPLASTOS**

Se inoculó una colonia de la cepa de *U. maydis* de interés en 5ml de medio líquido MC y se incubó a 28°C durante toda la noche en agitación constante. De este cultivo se tomaron 100µl, 250µl y 500µl para inocular 100ml de medio MC líquido en 3 matraces de 250ml y se incubó durante 20 horas a 28°C en agitación, hasta que se obtuvo una densidad óptica (DO<sub>600</sub>) cercana a 0.8. Una vez que se alcanzó la DO, se transfirió el cultivo del matraz seleccionado a dos tubos cónicos de 50ml, y fueron centrifugados a 2500 rpm durante 7 minutos, el sobrenadante fue desechado. Se adicionaron 15ml de SCS (Apéndice) a cada tubo, se re-suspendieron las células y se juntaron en un solo tubo, nuevamente se centrifugó y fue desechado el sobrenadante. El concentrado de células fue re-suspendido en 1ml de SCS y se adicionaron 800µl de una solución de enzimas líticas [(100mg/ml) de *Trichoderma harzianum*, SIGMA-Aldrich]. Se colocaron en agitación suave durante 10 minutos o, hasta que comenzó la formación de los protoplastos (monitoreada al microscopio). Se centrifugaron a 2300 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se adicionó 1ml de SCS. Las células se cambiaron a tubos Eppendorf, se centrifugaron a 2000 rpm durante cinco minutos, se decantó el sobrenadante y las células se re-suspendieron en 1ml de SCS. Se repitió el paso anterior finalmente posterior a decantar el sobrenadante se re-suspendieron en 1ml de STC (Apéndice) frío. Para su almacenamiento a -80°C se adicionó

dimetilsulfóxido (DMSO) al 7% (70µl de DMSO y 930µl de protoplastos) y se prepararon alícuotas de 50µl.

#### **6.4.2. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *U. maydis* EN HIELO**

El ADN plasmídico (5µg), se re-suspendió en 4µl de STC y se adicionó 1µl de Heparina (15mg/ml en STC), se mantuvo en hielo. Se transfirió a 50µl de protoplastos y se mezcló en círculos suavemente con la pipeta, se mantuvieron en hielo por 10 minutos. Se adicionaron 500µl de polietilenglicol (Apéndice) frío y se incubó por 15 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo se agregaron 500µl de STC y se mezcló suavemente por 15 segundos. La reacción se centrifugó a 2500 rpm durante cinco minutos. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 200µl de STC para re-suspender las células. El contenido se depositó en una caja petri con medio sólido [DCMS (Apéndice)] suplementado de antibióticos, 1µg/ml de Carbenicilina (stock 100µg/ml), 200µg/ml de Higromicina B (stock 50,000µg/ml), 4µg/ml de Carboxina (stock 5000µg/ml), las células se distribuyeron suavemente de manera homogénea en toda el área de la caja utilizando una varilla de vidrio. Finalmente se incubaron a 28°C durante 4 o 5 días aproximadamente. Cuando las transformantes crecieron, éstas se recuperaron en MC sólido adicionado con el agente selectivo.

#### **6.4.3. CONSTRUCCIÓN DEL GEN HETERÓLOGO QUIMÉRICO: PLÁSMIDO EH205**

Para la construcción del plásmido que porta el “open reading frame”, marco de lectura abierto (ORF) del gen *TPS2* de *S. cerevisiae*, cuya expresión estará dirigida por el promotor y el terminador del gen *UmTPS2*, brevemente, se amplificó por PCR el promotor del gen *UmTPS2* de *U. maydis* (919 pb), con los oligonucleótidos 2045 y 2046. En otra reacción de PCR se amplificó el terminador del gen *UmTPS2* de *U. maydis*, con los oligonucleótidos 2049 y 2050 (697 pb). Así mismo se amplificó también el marco de lectura del gen heterólogo *ScTPS2* con

los oligonucleótidos 2047 y 2048 (2738 pb). A continuación se realizó la reacción de empalme por PCR, de los tres fragmentos (promotor, marco de lectura abierto, terminador) siguiendo las indicaciones de Davidson *et al.* 2002 y utilizando los oligonucleótidos 2013 y 2014, obteniéndose la banda de amplificación del tamaño esperado de 4354 pb. Posteriormente se realizó la clonación de dicho producto de PCR en el vector comercial pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>) se mezclaron 4.5µl del producto de PCR, 1µl de sales (50mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>) y 0.5µl del vector, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La reacción de clonación se dializó durante diez minutos utilizando una membrana Millipore<sup>®</sup> de 0.022µm de tamaño de poro, posterior a la diálisis se recuperó la reacción de ligación. Se mezclaron 4µl de ésta con 50µl de células electro-competentes de *E. coli*, siguiendo las especificaciones señaladas en el manual de uso (Eporator Eppendorf). Posteriormente se adicionaron a la celda 500µl de medio LB sin antibiótico y se recuperó la reacción de electroporación en un tubo Eppendorf nuevo estéril. Esta mezcla se incubó por una hora a 37°C en agitación, transcurrido este tiempo se sembraron 100µl de esta reacción, en una caja petri con medio LB, suplementado los antibióticos de selección, 25µl de carbenicilina (1µg/ml), 6µl de kanamicina (12µg/ml) y 20µl de X-gal (800µg/ml). Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente se seleccionaron aquellas colonias de color blanco, para realizar la extracción de plásmido. La identidad del plásmido se determinó por patrón de digestión y por PCR utilizando el par de oligonucleótidos 2047 y 2048.

Posteriormente el fragmento (3890 pb) se subclonó en el mismo sitio del plásmido pNEBU-H (resistencia a Higromicina B, proporcionado por la Dra. R. Kahmann, Instituto Max Planck, for Terrestrial Microbiology, Marbug, Alemania). Las transformantes se seleccionaron en medio LB suplementado con 20µl de X-gal (800µl/ml), y se analizaron las colonias blancas. Se identificó aquellas que portaran el plásmido correcto en base al patrón de digestión y al PCR, generando así el plásmido EH205.

#### **6.4.4. CONSTRUCCIÓN DEL GEN HOMÓLOGO: PLÁSMIDO AC94**

El plásmido AC94, deriva del vector pNEBU-H. Porta el gen *UmTPS2* endógeno. Esta secuencia se obtuvo de la base de datos MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>) de *U. maydis*, número de acceso um10650. El fragmento de ADN para la complementación incluye 783 pb del promotor (5' UTR), 3963 pb para el marco de lectura abierto y 568 pb para el terminador (3' UTR), el gen completo fue amplificado con los oligonucleótidos 2013 y 2014 flanqueados con la enzima de restricción KpnI. Para esta amplificación se utilizó la enzima de alta fidelidad, Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen™). El producto del PCR fue digerido con la enzima KpnI y clonado con el único sitio KpnI de pNEBU-H, utilizándose la enzima T4DNA ligasa, el producto de ligación se transformó en *E. coli* como en el caso del plásmido EH205, generando así el plásmido AC94.

#### **6.5. ANÁLISIS FENOTÍPICO**

##### **6.5.1. DILUCIONES SERIADAS EN PLACA**

Una vez que se obtuvieron las cepas complementadas de las mutantes 1328 y 1335, se seleccionaron las colonias de mejor apariencia (crecimiento uniforme) y se estriaron (cepario, 100 colonias). Algunas de ellas se inocularon en MC líquido con 1µl/ml de carbenicilina (100µg/ml), 200µg/ml de higromicina B y 4µg/ml de carboxina, se incubaron a 28°C de 24 a 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se observaron las células complementadas en el microscopio para descartar contaminación. Se centrifugaron a 3000 rpm durante cinco minutos y se decantó el medio, las células complementadas se lavaron con H<sub>2</sub>O destilada estéril y se decantó el sobrenadante, esto se repitió dos veces. Una vez lavadas las células, se re-suspendieron en 1ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

### **6.5.2. CONTEO DE CÉLULAS EN CÁMARA DE NEUBAUER**

Se determinó la cantidad de células de *U. maydis* presentes por ml, realizándose el conteo en la cámara de Neubauer. Para ello se preparó una dilución 1:10 de las células previamente lavadas con agua destilada estéril. Se colocaron 10µl de esta dilución en la cuadrícula de la cámara de Neubauer y se procedió a contar las células presentes. El número total de células por ml se determinó de la siguiente manera; el número de células contadas se multiplicó por cinco, en seguida el resultado se multiplicó por 10 mil y finalmente el resultado que se obtuvo de esto se multiplicó por 10 (factor de dilución). Posteriormente dicho resultado, fue utilizado como denominador en la división de la multiplicación de un mililitro por el número exponencial  $1 \times 10^7$ , obteniéndose así el número de células que se requieren en microlitros, en seguida se aforó a un mililitro con agua destilada estéril, para realizar las diluciones a partir de la concentración así preparada de  $1 \times 10^7$  células/ml. Subsecuentemente se realizaron diluciones decimales de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  hasta  $1 \times 10^3$  células/ml que fueron utilizadas para los ensayos de estrés correspondientes.

### **6.5.3. ENSAYO DE RESPUESTA A ESTRÉS *in vitro***

Para realizar las pruebas de estrés se preparó medio mínimo a pH 7 (Apéndice) con los diferentes agentes estresantes: LiCl, NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBOOH, Menadiona, Sorbitol, Manitol, Radiaciones UV, estrés de temperatura (37°C), como control se incubó una caja carente de agente estresante a 28°C. Se colocaron gotas de 10µl de cada una de las diluciones antes mencionadas, en orden descendente, para analizar el crecimiento de las cepas de *U. maydis* complementadas, mutantes y silvestres, se comparó y analizó el fenotipo de cada una, ante la presencia de los diferentes agentes estresantes.

#### **6.5.4. PRUEBA DE PATOGENICIDAD EN LA PLANTA, *Zea mays***

Para analizar la funcionalidad de las cepas complementadas de las mutantes  $\Delta tps2$  1328 y 1335 de *U. maydis*, se inoculó por inyección en el tallo de las plantas de maíz (*Zea mays*, variedad cacahuazintle) con el fin de observar la patogenicidad de *U. maydis* y los síntomas mostrados por parte de la planta; éstas fueron inoculadas con pares de cepas complementadas que son sexualmente compatibles, que de manera independiente portan los plásmidos AC94 o EH205. Así mismo, simultáneamente se inocularon otras plantas con los respectivos controles que corresponden a la cruza silvestre FB1xFB2, y la cruza mutante  $\Delta tps2$  1328x1335, así como plantas inoculadas con agua destilada estéril como control negativo. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero a lo largo de tres semanas a un mes.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

En términos de propiedades físicas, la trehalosa, es de coloración blanca e inodora, polimórfica con formas cristalinas que varían con la temperatura e interacción con el agua; en la que una es anhidra y otra amorfa muy bien definida, que se denomina como dihidrato (Nishant & Ipsita, 2008), además de ser una fuente de carbono para algunos organismos, sirve como componente estructural y de protección (Lordachescu e Imai, 2011). A pesar de que se han propuesto teorías y se consideran muchas de las propiedades que tiene la trehalosa, aún no se termina de concretar todos los factores involucrados que existen para explicar cómo ocurre dicho efecto de protección y por qué es un estabilizador de proteínas, durante una situación de estrés a la que se expone un organismo. Lo que sí se tiene conocimiento concreto es que la trehalosa, a excepción de los vertebrados, es producida por una gran variedad de organismos (Tournu *et al.* 2013); y que éstos a su vez, de acuerdo a estudios previos y con diferentes enfoques, coinciden en responder con cambios o modificaciones en el crecimiento cuando se generan alteraciones en la producción de la trehalosa y además ante situaciones de estrés.

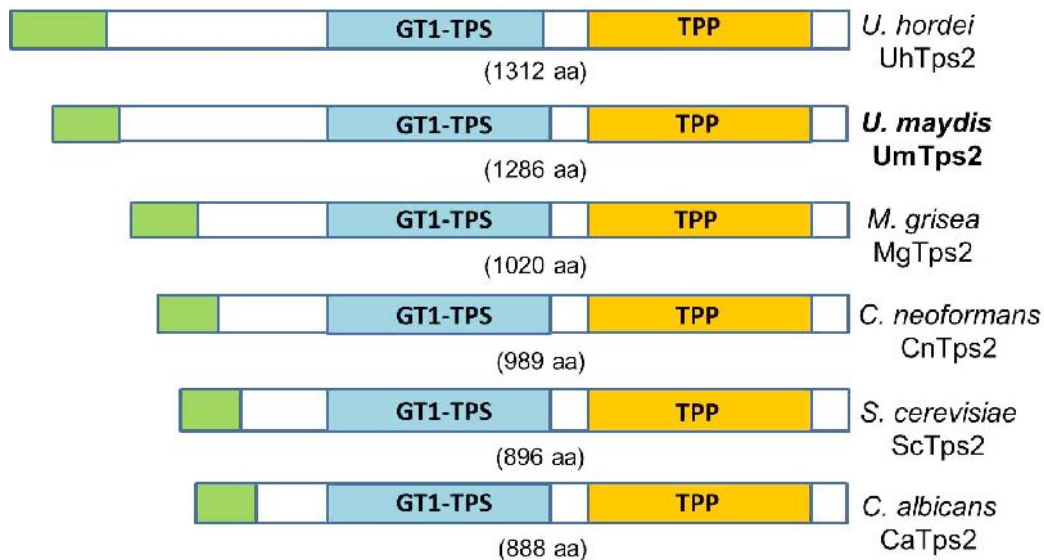
Esto puede orillar a pensar, de manera evolutiva, en el posible múltiple origen que tiene esta molécula protectora y de gran interés, que está presente en diversos organismos pero no en vertebrados. Entre varios aspectos, en este trabajo se presenta un análisis de la estructura de la proteína Tps2, que de acuerdo con las herramientas informáticas, celulares y moleculares que existen en la actualidad, es posible realizar simulaciones que proporcionan información de este tipo.

Posteriormente se muestra como representación esquemática, la comparación de los dominios catalíticos de la proteína Tps2, de los fitopatógenos *U. maydis* (maíz), *U. hordei* (cebada) y *M. grisea* (arroz); los patógenos de humano *C. neoformans* y *C. albicans*; y finalmente a *S. cerevisiae*, levadura de la

cual se utilizó el marco de lectura abierto, gen *TPS2*, para construir el gen quimérico heterólogo.

De acuerdo con Karp (2010) los dominios, además de ser las subunidades y partes estructurales en la composición de una proteína son, en términos evolutivos, una fuente importante de información, ya que pueden indicar la cercanía que tienen las especies entre sí. De este modo, los dominios en las diferentes proteínas son característicos, ya que definen su estructura y función e influyen en la interacción con otras proteínas, de tal manera que representan como es que éstos, a través del tiempo evolutivo de los organismos, se han conservado o se han perdido y la importancia que esto conlleva.

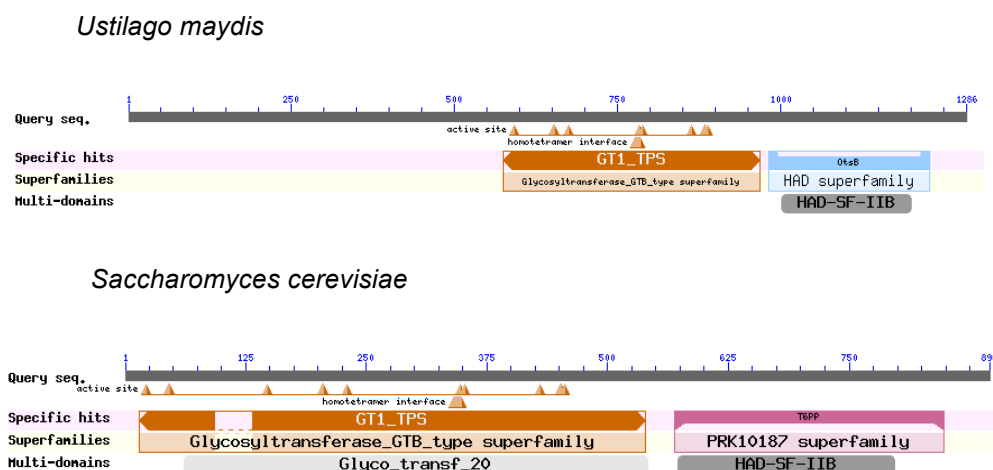
En la proteína Tps2, se encuentra la presencia de dos dominios, el GT1-TPS y TPP. El primero, participa en la síntesis de trehalosa 6-fosfato, mientras que el segundo tiene la función fosfatasa que desfosforila a la trehalosa 6-fosfato, generando así trehalosa y fósforo inorgánico. Como se puede observar, en la Figura 7, los mayores tamaños, en número de amino ácidos (aa), de la proteína Tps2, están presentes en *U. hordei* y *U. maydis*, con 1312 y 1286 aa respectivamente; en *M. grisea*, 1020 aa; *C. neoformans*, 989 aa; *S. cerevisiae*, 896 aa y de menor tamaño a *C. albicans* con 888 aa. Se observa, para todos los organismos señalados, el mismo arreglo estructural de la proteína Tps2, es decir el dominio GT1-TPS en la parte central y el dominio TPP hacia el extremo carboxilo.



**Figura 7.** Representación esquemática de los dominios presentes en la proteína Tps2. Se compara la proteína de *U. maydis* con la de *U. hordei*, *S. cerevisiae*, *M. grisea*, *C. neoformans* y *C. albicans*. Debajo de cada una de las barras, se especifica el número de amino ácidos que conforman la proteína Tps2, en cada uno de los organismos señalados. En color verde se representa el extremo N- terminal de la proteína, en color azul se representa el dominio glucosiltransferasa trehalosa-6-fosfato sintasa (GT1-TPS) y en color amarillo se representa el dominio catalítico fosfatasa.

Como se puede apreciar, igualmente la Figura 8 muestra una representación esquemática, que se obtuvo con la ayuda de la opción Conserved Domains localizada en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), la cual señala a la proteína Tps2 de *U. maydis* (arriba) y de *S. cerevisiae* (abajo), con sus respectivas medidas y distancias en pares de bases. Así mismo, el esquema muestra los dominios conservados que conforman a la proteína Tps2, GT1-TPS (glucosiltransferasa) y TPP (fosfatasa), que destacan en este trabajo por su importante función en la producción de trehalosa. Indicando así, que la proteína de *S. cerevisiae* carece prácticamente de un fragmento que las proteínas Tps2 de los basidiomicetos *U. maydis* y *U. hordei* adquirieron y que está localizada en el extremo amino terminal, en la cual no existe la presencia de ningún dominio.

## Dominios conservados: GT1-TPS y TPP



**Figura 8.** Representación esquemática de la proteína Tps2 en *U. maydis* (arriba) y *S. cerevisiae* (abajo), con los dominios conservados GT1-TPS y TPP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Este arreglo estructural es de gran interés, ya que en el caso de bacterias como *E. coli*, cada una de estas actividades catalíticas OtsA (trehalosa fosfato sintasa) y OtsB (trehalosa fosfato fosfatasa) son codificadas por genes independientes, cabe mencionar que en eucariotes, poseen además un gen adicional para la síntesis de trehalosa 6-fosfato, qué como se indicó previamente en la Figura 3, en el caso de *U. maydis* dicho gen se denomina *UmTPS1*, existiendo correlación con el análisis realizado por Avonce *et al.* 2006.

Aunado a esto, se analizaron las secuencias de la proteína Tps2 entre *U. maydis* con 1286 amino ácidos y *S. cerevisiae* con 896 amino ácidos. Para lo cual, se realizaron tres alineamientos en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos del NCBI (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), el primer alineamiento de secuencias, se realizó utilizando toda la secuencia de la proteína Tps2, el cual mostró que existe un 48-46% de similitud (Apéndice). En el segundo alineamiento que se realizó, se utilizó exclusivamente la sección del dominio catalítico fosfatasa, el cual mostró un 75-49% de similitud (Apéndice), en el que se puede observar que la zona que se encuentra mayormente conservada

corresponde al dominio fosfatasa de la enzima. El tercer alineamiento se realizó utilizando únicamente la secuencia que corresponde al dominio GT1-TPS, y se encontró un 45-81% de similitud (Apéndice). De acuerdo con el porcentaje de similitud que presentan los alineamientos, éste va en aumento cuanto más específico es, y a su vez, sí éste se realiza con secuencias del mismo dominio, que en este caso se trata de los dominios fosfatasa y GT1-TPS. Estos resultados proporcionan información adicional que orienta a pensar, nuevamente en el origen común que puede existir entre los organismos y no sólo de la evolución de cada uno de ellos, sino de cada dominio, gen e inclusive de cada enzima, que aunque estos varíen, siguen conservando partes específicas que no se modifican y que son clave para que estos sigan teniendo las mismas funciones, aunque se trate de organismos con linajes diferentes.

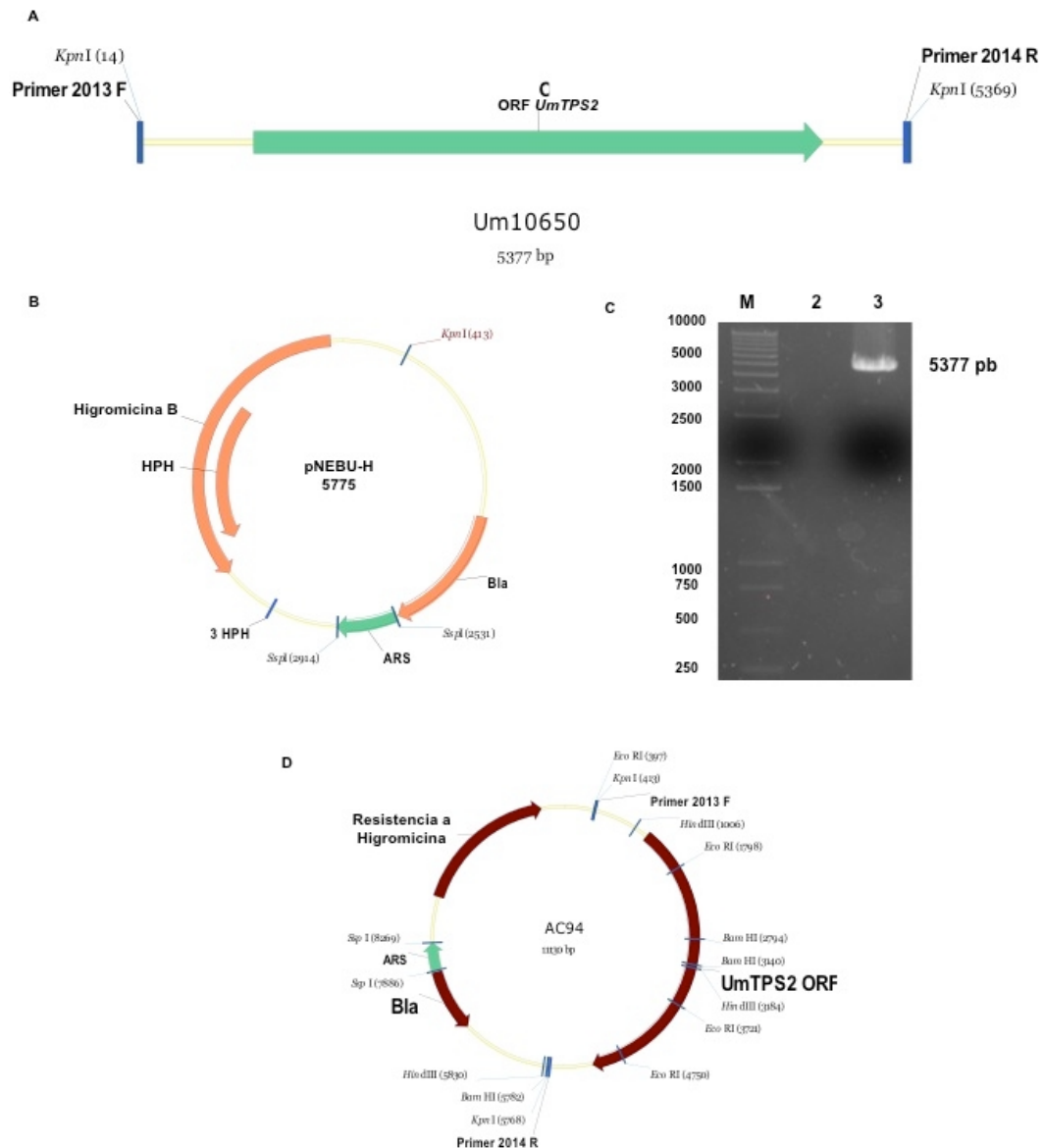
## **7.2. CONSTRUCCIONES PARA RECUPERAR EL FENOTIPO SILVESTRE**

Como se mencionó, para este trabajo fue necesario construir dos plásmidos, el AC94 con el gen homólogo de *U. maydis* *UmTPS2* y el plásmido EH205 con el gen quimérico heterólogo de *S. cerevisiae* *ScTPS2*, esto para realizar la complementación genética de las mutantes 1328 y 1335  $\Delta tps2$  de *U. maydis* con los plásmidos mencionados. La presencia de estos plásmidos se determinaron a nivel molecular, amplificando por PCR un fragmento correspondiente a cada uno de los genes: *UmTPS2* y *ScTPS2* y/o por la recuperación del plásmido en *E. coli* a partir del material genético recuperado de las cepas  $\Delta tps2$  complementadas (ver Materiales y Métodos).

### **7.2.1. PLÁSMIDO AC94 GEN HOMÓLOGO *UmTPS2* “Um10650”**

En el caso de *U. maydis*, los marcadores de selección para eventos de transformación genética que existen, son genes que confieren resistecia a antibióticos, como son: Higromicina B, Carboxina, Benomil y Nourseothricina. Para poder complementar a las mutantes  $\Delta tps2$ , se realizó a partir del vector pNEBU-H

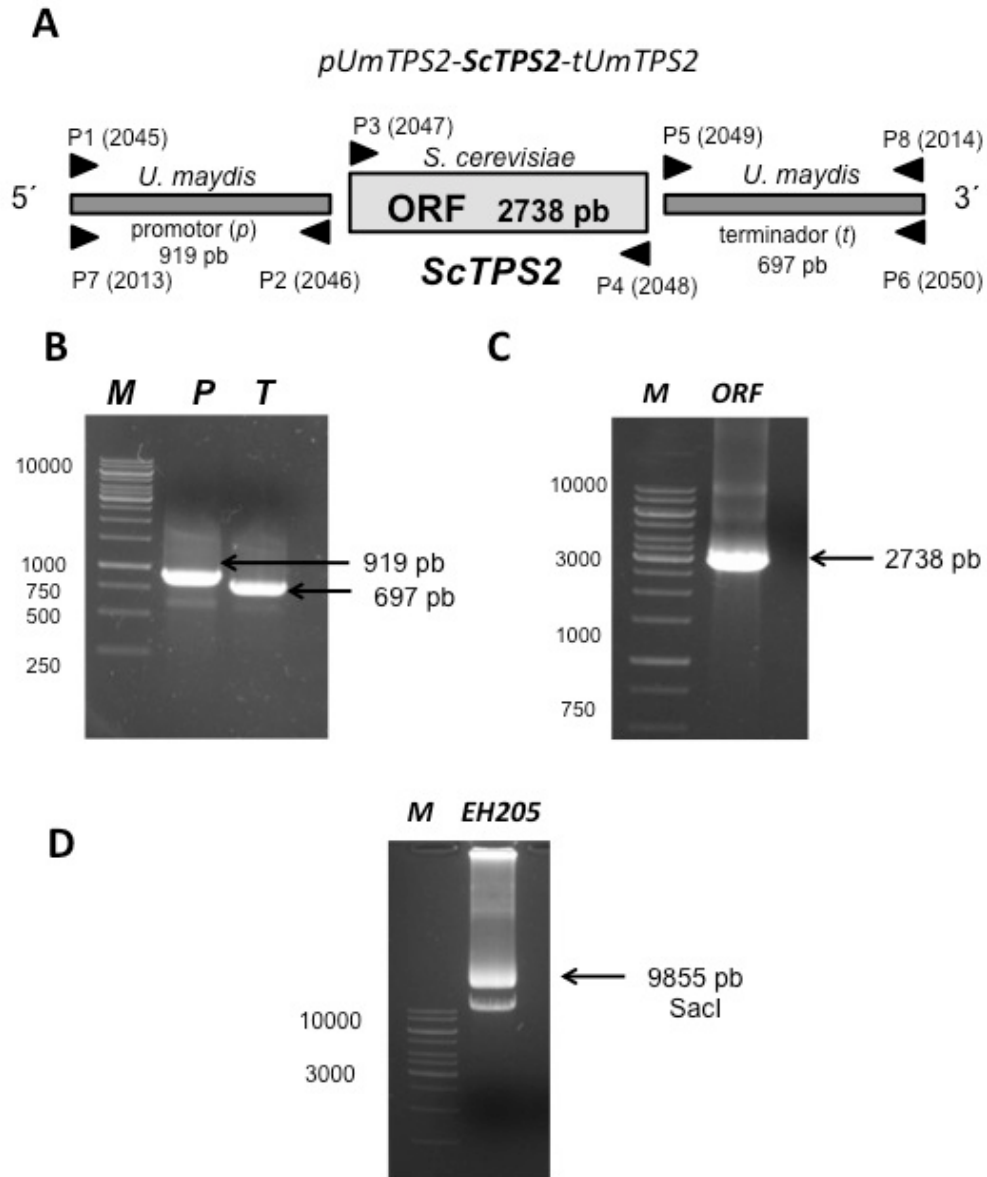
(que porta el gen HPH que confiere resistencia a Higromicina B (Figura 9.B), puesto que las mutantes  $\Delta tps2$  son resistentes a carboxina. Para llevar a cabo la clonación del fragmento de ADN para la complementación con el gen homólogo, se incluyó 783 pb del promotor (5' UTR), 3963 pb para el marco de lectura abierto y 568 pb para el fragmento del terminador (3' UTR). Esta secuencia se obtuvo de la base de datos (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>) de *U. maydis*, número de acceso um10650. Este fragmento se amplificó por PCR con los oligonucleótidos 2013 y 2014, que están flanqueados con la secuencia del sitio de restricción de la enzima KpnI (Tabla 2). El PCR se realizó con la enzima de alta fidelidad, Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen™) obteniendo una banda única de amplificación (Figura 9.C). El producto del PCR fue digerido con la enzima KpnI y clonado directamente en el único sitio KpnI de pNEBU H, generando así el plásmido AC94 (Figura 9.D).



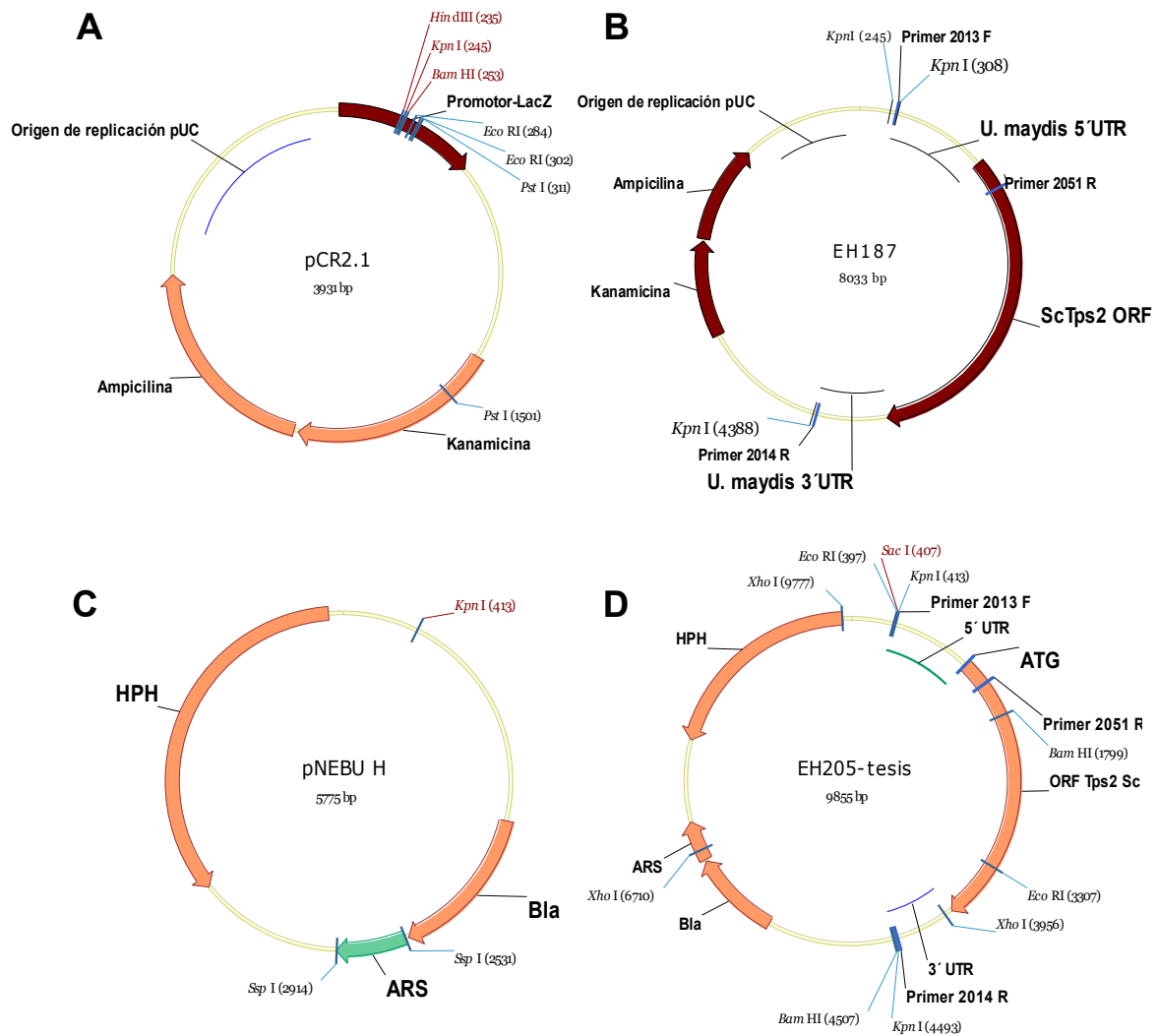
**Figura 9.** Plásmido AC94. **A)** Representación esquemática del gen *TPS2* de *U. maydis* (Um10650), señala los sitios de restricción que se utilizaron para la clonación: KpnI (14 pb); KpnI (5369 pb) y los oligonucleótidos: P7, (2013 F); y P8, (2014 R) (Tabla. 2). La barra indica el marco de lectura abierto, y las líneas las regiones 5' y 3' UTR. **B)** Representación esquemática del vector pNEBU-H (5775 pb) utilizado para clonar el gen *UmTPS2*. **C)** Banda única de amplificación del producto de PCR. **D)** Representación esquemática del plásmido AC94 que porta el gen de resistencia a higromicina B (HPH) y el gen *TPS2* de *U. maydis*.

### 7.2.2. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO EH205

Para la construcción del plásmido EH205, que porta el gen heterólogo quimérico *TPS2* (ORF) de *S. cerevisiae*, se procedió a realizar la búsqueda de dicho gen en la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)), posteriormente se diseñaron los oligonucleótidos necesarios utilizando el programa VectorNTI® (Tabla 2) para cada fragmento correspondiente (Figura 10.A), de acuerdo a los lineamientos de Davidson *et al.* (2012) de tal manera que sea posible fusionar fragmentos de PCR sin la necesidad de utilizar enzimas de restricción. Para ello se realizaron las amplificaciones por PCR del promotor de *UmTPS2* (919 pb) con los oligonucleótidos 2045-2046 (Figura 10.B), del terminador de *UmTPS2* (697 pb) con los oligonucleótidos 2049-2050 (Figura 10.B) y del marco de lectura abierto del gen *ScTPS2* (2738 pb) de *S. cerevisiae*, con los oligonucleótidos 2047-2048 (Figura 10.C). Una vez obtenidos los productos de amplificación, éstos se empalmaron por medio de PCR con los oligonucleótidos 2013 y 2014, el producto de PCR esperado de 4.35 Kpb se clonó en el vector pCR® 2.1-TOPO® (Invitrogen™) (Figura 11.A) y se transformó en *E. coli*, generando así el plásmido EH187 (Figura 11.B). El gen quimérico fue recuperado como el fragmento KpnI (4.35 Kb) y se sub-clonó en el único sitio KpnI del vector pNEBU-H (Figura 11.C), de esta manera se recuperó en *E. coli* el plásmido EH205 (Figura 11.D), el cual posteriormente se utilizó para transformar las cepas  $\Delta tps2$  de *U. maydis*.



**Figura 10.** Estrategia de construcción del gen quimérico heterólogo *ScTPS2*. **A)** Representación esquemática de la construcción del gen quimérico heterólogo *ScTPS2* de *S. cerevisiae*. Para amplificar cada uno de los fragmentos se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: P1 (2045) y P2 (2046) para el promotor (*p*) de *UmTPS2*; P3 (2047) y P4 (2048) para el ORF de *ScTps2*; P5 (2049) y P6 (2050) para el terminador (*t*) de *UmTPS2*; P7 (2013) y P8 (2014) para el empalme de las tres amplificaciones. **B)** PCR que muestra los productos de amplificación del promotor (*p*) y terminador (*t*) de *U. maydis*. **C)** Producto de amplificación del ORF de *ScTPS2*. **D)** Plásmido abierto o linearizado (9855 pb) con la enzima *SacI* de la cepa 1328, indicado en la imagen como la segunda banda del segundo carril. *Abreviaturas:* *m*: marcador molecular; *p*: promotor; *t*: terminador; *e*: empalme; pb: pares de bases.



**Figura 11.** Construcción del plásmido EH205. **A)** Representación esquemática de la clonación del gen quimérico heterólogo (*pUmTPS2-ScTPS2-tUmTPS2*) en el vector pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>) (3931 pb), del cual se generó el **B)** Plásmido EH187. **C)** Representación esquemática de la sub-clonación del sitio *Kpn*I en el vector pNEBU-H (5775 pb) que contiene el gen de resistencia a higromicina HPH. **D)** Plásmido EH205 (9855 pb).

### 7.3. TRANSFORMACIÓN DE CEPAS $\Delta tps2$

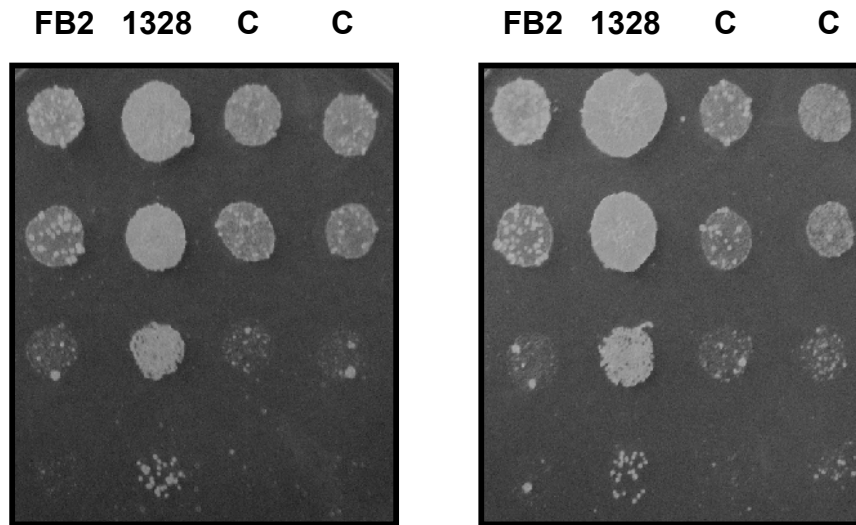
Una vez que se obtuvieron los plásmidos AC94 y EH205, se transformó a cada una de las cepas mutantes  $\Delta tps2$  1328 y 1335, con cada uno de los plásmidos, de manera independiente. Para lo cual se siguieron dos estrategias:

para el plásmido AC94 este posee una secuencia autónoma de replicación “ARS”, la cual puede ser eliminada con la enzima *SspI*. Se procedió a eliminar dicha secuencia, por lo cual se transformó a las mutantes con el plásmido linearizado siendo éste de naturaleza integrativa. Una vez que éste se integró de manera aleatoria en el genoma del hongo, las cepas transformantes se recuperaron en medio DCMS con carboxina e higromicina B como agentes selectivos.

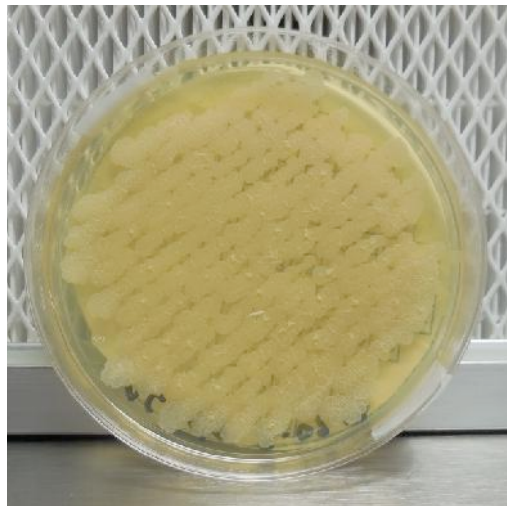
En el caso del plásmido EH205 no fue posible seguir esta estrategia, debido a que, además de los sitios *SspI* que eliminan la secuencia “ARS”, existe un sitio adicional localizado en el gen quimérico. En este caso, se procedió a transformar a las cepas  $\Delta tps2$  1328 con el plásmido abierto (linearizado) con la enzima *SacI* (Figura 10. D) y las cepas  $\Delta tps2$  1335 se transformaron con el plásmido cerrado.

### 7.3.1. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS COMPLEMENTADAS

Cabe recordar que las cepas mutantes  $\Delta tps2$  1328 y 1335 son resistentes a la presencia de 10mM LiCl en MM7, en comparación con las cepas silvestres FB1 y FB2 que presentan cierta dificultad para crecer en esta condición (Figura 12), ésta resistencia fue utilizada como criterio de selección de las cepas complementadas. La razón por la cual las mutantes  $\Delta tps2$  son resistentes a la presencia de LiCl se desconoce, puesto que en el caso de *S. cerevisiae* se ha observado una respuesta contraria, dado que las mutantes  $\Delta tps2$  de esta levadura son incapaces de crecer en la presencia de 250mM de LiCl en comparación con el crecimiento normal de la cepa silvestre (Mulet *et al.* 2004). En base a este criterio se utilizaron algunas de las cepas que posterior al evento de transformación mostraron una resistencia franca a higromicina B (hasta 300 µg/ml) (Figura 13), se analizó si recuperaban o no la sensibilidad a la presencia de 10mM LiCl. A partir de esta selección se obtuvieron varias cepas “complementadas” a las cuales se les realizó extracción de ADN plasmídico para determinar a nivel molecular la presencia del gen homólogo *UmTPS2* y del gen quimérico heterólogo *ScTPS2*.



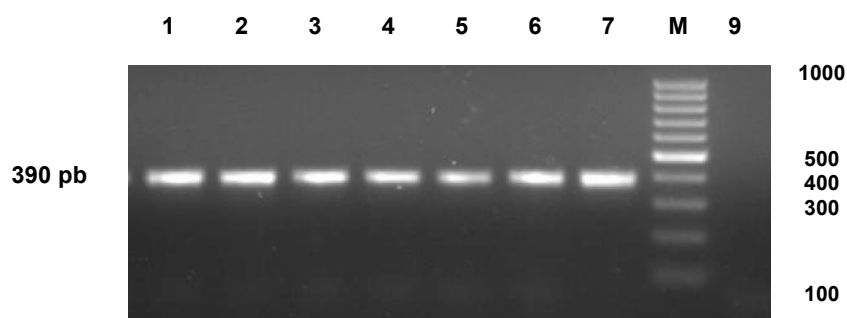
**Figura 12.** Ensayo de respuesta a estrés *in vitro* en MM7 a 28° C, con el agente estresante 10mM LiCl. Se muestra claramente que a diferencia del resto de los agentes estresantes, las mutantes parecen ser más resistentes a esta condición de estrés, caso contrario para las cepas silvestres que muestran disminución en el crecimiento así mismo las cepas complementadas con el plásmido AC94.



**Figura 13.** Crecimiento de colonias de las cepas complementadas ( $\Delta tps2$  1328) con el plásmido EH205 abierto, en medio completo adicionado con el antibiótico higromicina B como marcador de selección, a 28° C.

### 7.3.2. DETERMINACIÓN A NIVEL MOLECULAR DEL GEN *TPS2*

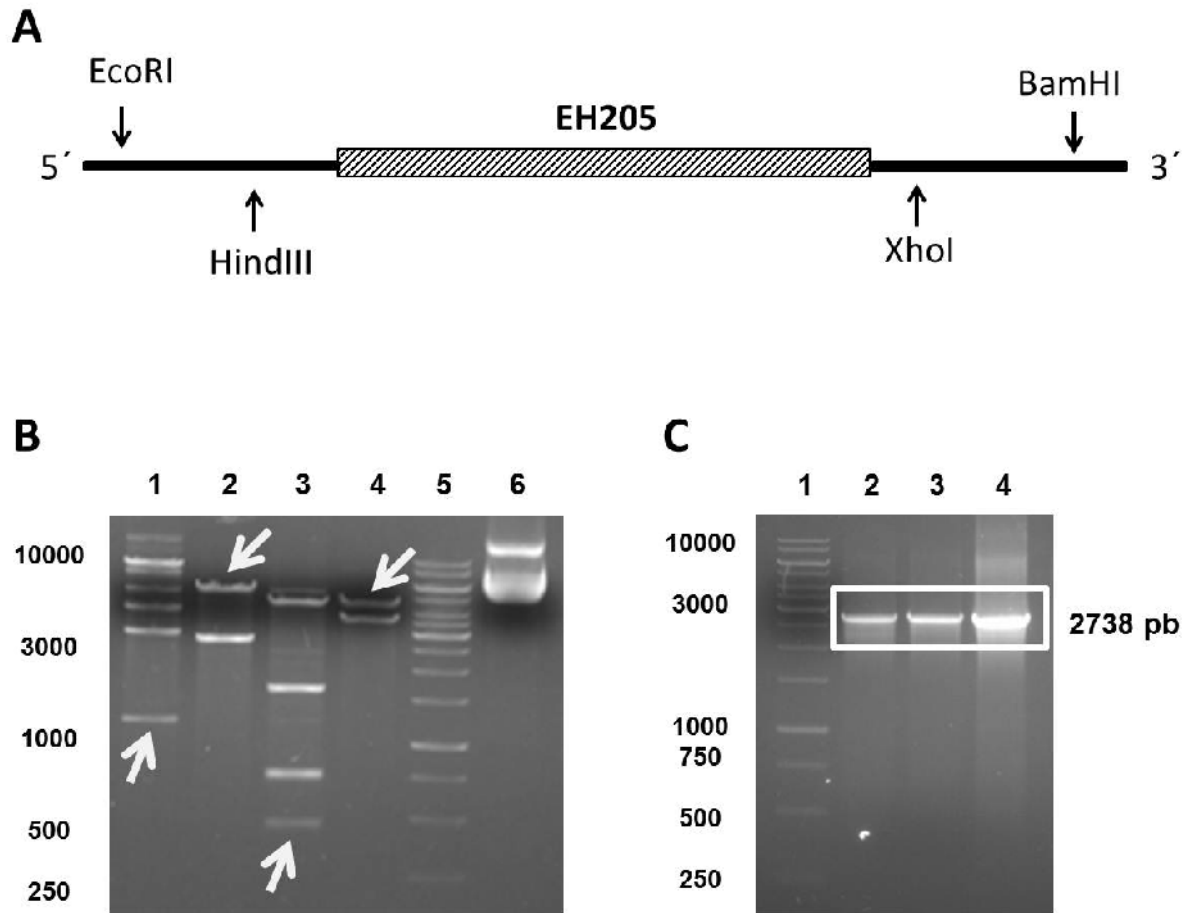
Posterior a un análisis de las transformantes que se obtuvieron con el plásmido AC94 (Figura 9.D) se conservaron las siguientes cepas complementadas: AC145, AC146, AC167, AC168. Como se indicó, en este caso el plásmido es integrativo. Se procedió a purificar el ADN genómico de estas cepas para realizar la identificación del gen *UmTPS2* por PCR, utilizando como control negativo el ADN genómico de la cepa mutante 1328 y como control positivo el ADN genómico de la cepa silvestre FB2. Para lo cual se utilizó el par de oligonucleótidos 2040 y 2057, los cuales amplifican una parte central del gen *UmTPS2* correspondiente al ORF (Figura 14).



**Figura 14.** Identificación por PCR de las cepas complementadas con el plásmido AC94. A partir del ADN genómico de las cepas transformantes seleccionadas que son sensibles a LiCl, se amplificó por PCR un fragmento del ORF, con los oligonucleótidos 2040 y 2057 (Tabla 2). Se indica la banda esperada de 390 pb y corresponde a un fragmento del ORF de *UmTPS2*.

Las cepas transformadas con el plásmido EH205 seleccionadas son las siguientes: EH236 y EH237 de la cepa 1328  $\Delta tps2$  y EH287 y EH289 de la cepa 1335  $\Delta tps2$ . Posteriormente se muestra en el análisis fenotípico, la funcionalidad de la síntesis de trehalosa en las cepas complementadas con el plásmido EH205, ante situaciones de estrés. De acuerdo con el ciclo de vida de *U. maydis*, las cepas EH236 y EH287, sexualmente compatibles, se utilizaron para el análisis

fenotípico de los ensayos *in vitro*, así mismo para las plantas de maíz. Es importante resaltar que sólo se realizó la identificación por PCR de las cepas EH236 y EH237 [1328  $\Delta tps2$ ] (Figura 15.C). Ya que, el plásmido EH205 fue cortado con la enzima de restricción *SacI* (Figura 10.D) y la transformación de las cepas 1328  $\Delta tps2$  de *U. maydis* se realizó con el plásmido abierto y éste se insertó en el genoma, para ello se utilizaron los oligonucleótidos 2047 y 2048 (Tabla 2) que amplifican el ORF del gen *ScTPS2* de *S. cerevisiae*. Sin embargo, caso contrario para la cepa 1335  $\Delta tps2$  (EH287), la transformación se realizó con el plásmido EH205 cerrado, lo cual implica que no se insertó en el genoma. Y por ello se procedió a recuperar el plásmido aislado de estas transformantes en *E. coli*. La identidad de cada uno de los productos de PCR se determinó por digestión enzimática utilizando las enzimas *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* y *XhoI* (Figura 15.A, 15.B).



**Figura 15.** Determinación de la identidad del plásmido EH205. **A)** Representación esquemática de la secuencia lineal del plásmido. Señala la ubicación y distribución de las enzimas de restricción que se utilizaron, para determinar la identidad del plásmido. **B)** Fotografía de electroforesis en gel de agarosa 1%, del plásmido EH205 mediante digestión enzimática, señalado con las flechas blancas por carril en el siguiente orden: 1) *EcoRI* (1202 pb, 3547 pb, 6547 pb, 7749 pb); 2) *BamHI* (7147 pb, 2708 pb); 3) *HindIII* (450 pb, 633 pb, 1641 pb, 5497 pb); 4) *XhoI* (5821 pb, 3596 pb); 5) Marcador y 6) Control positivo (plásmido EH205). **C)** Determinación por PCR de las cepas mutantes complementadas (carril 2 y 3), para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos P3 (2047) y P4 (2048) que amplifican el ORF del gen *TPS2* (2738 pb), como control se amplificó el plásmido solo (carril 4).

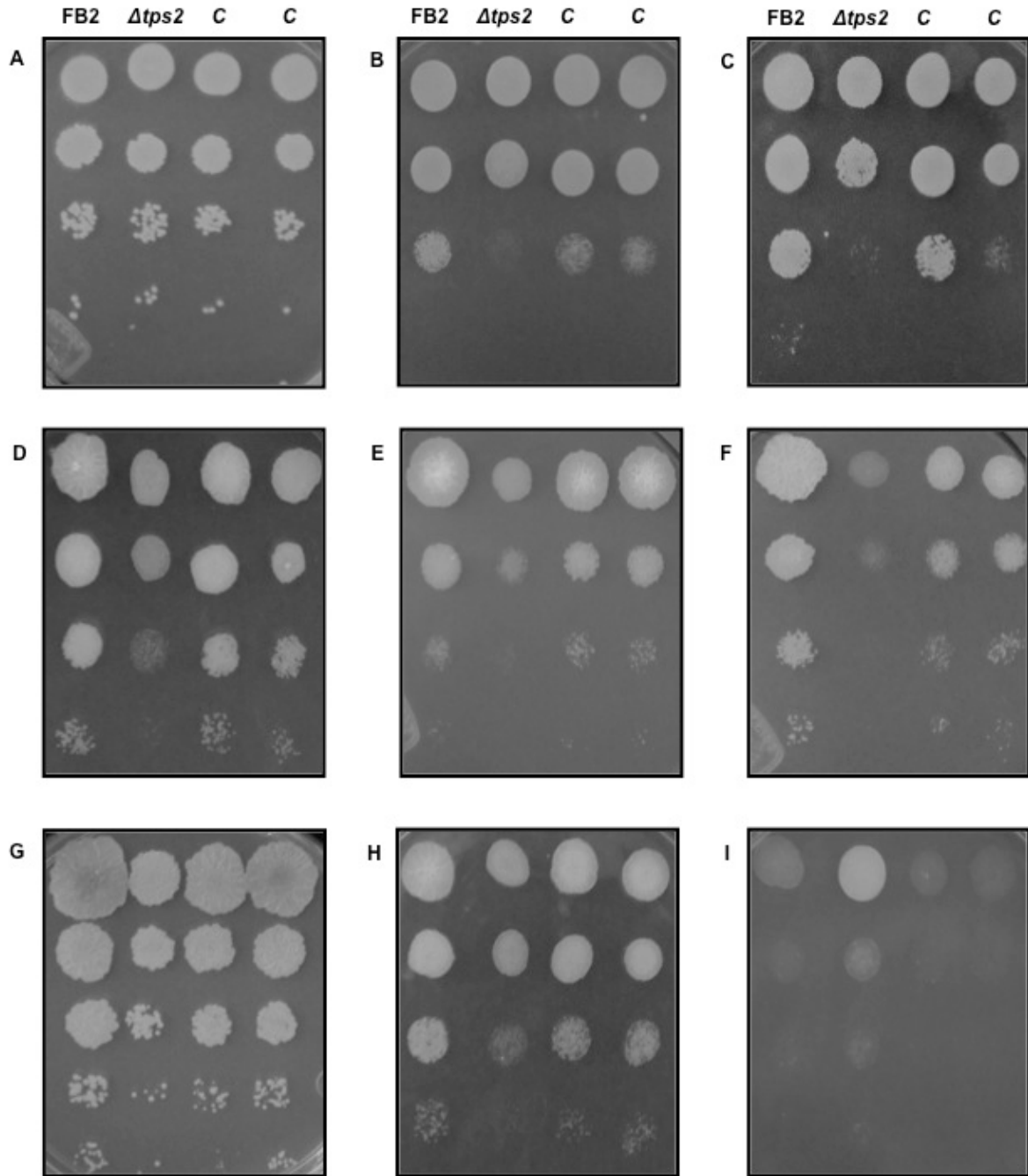
#### 7.4. ANÁLISIS FUNCIONAL

La complementación funcional de las cepas mutantes  $\Delta tps2$  1328x1335 de *U. maydis* transformadas con el plásmido AC94 que porta el gen homólogo *UmTps2* de *U. maydis* y con el plásmido EH205 que porta el gen heterólogo quimérico de *ScTps2* de *S. cerevisiae*, fue evaluada en términos generales, de dos maneras. La primera, mediante el análisis de respuesta a estrés en ensayos *in vitro* con diversos agentes estresantes que producen estrés oxidativo, estrés osmótico y radiación con luz UV. Esto revela la respuesta del organismo ante situaciones de estrés, en ausencia y presencia del gen *TPS2* que codifica para la fosfatasa involucrada en la etapa final de la síntesis de trehalosa. La segunda, en la determinación de la sintomatología producida por las cepas complementadas una vez inoculadas en plantas de maíz (*Zea mays*, variedad cacahuazintle), teniendo como controles plantas inoculadas con la mezcla de las cepas silvestres FB1xFB2 y las cepas mutantes  $\Delta tps2$  1328x1335.

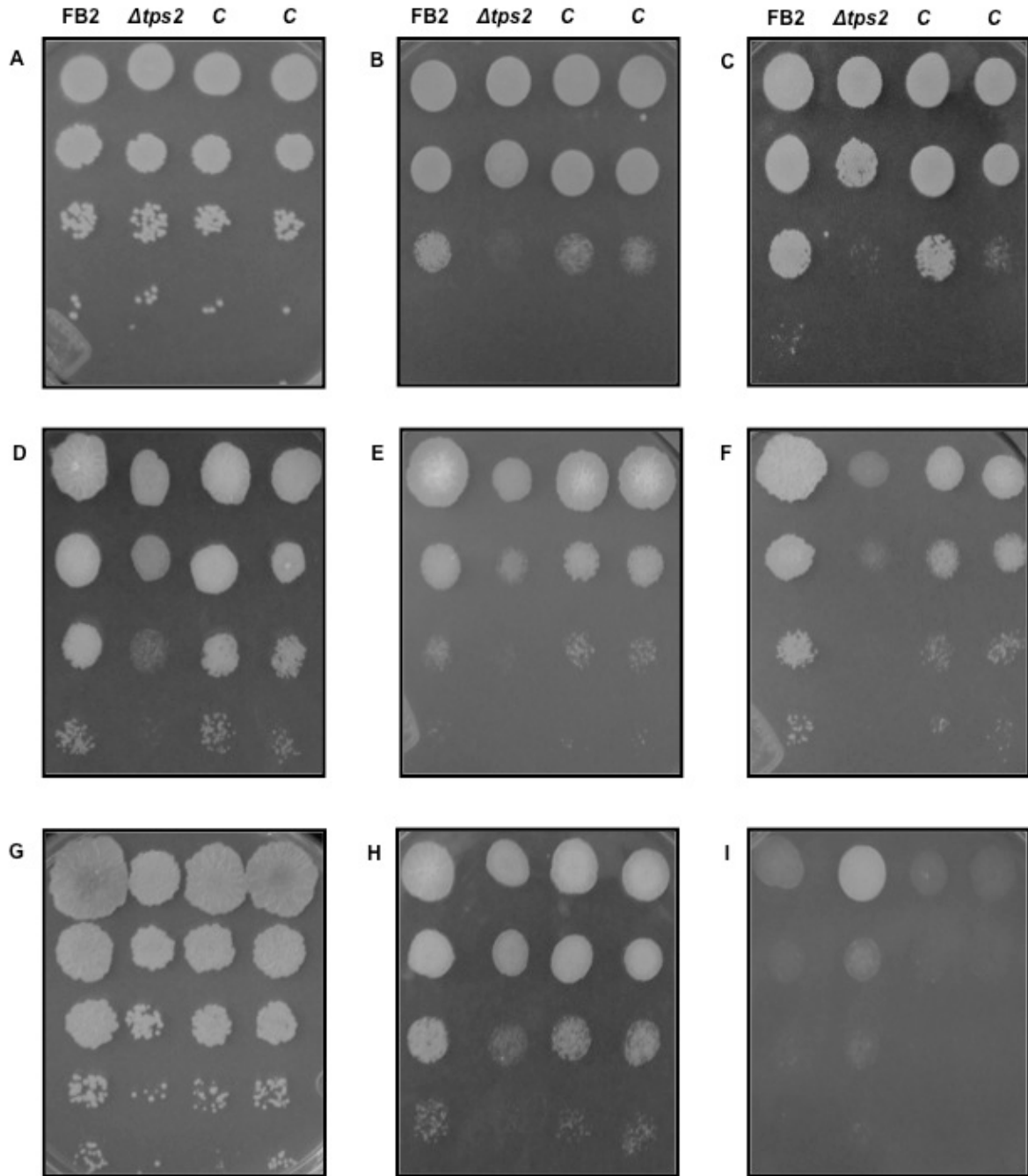
##### 7.4.1. ENSAYO DE RESPUESTA A ESTRÉS *in vitro*

Los ensayos de respuesta a estrés, muestran el crecimiento de las cepas: silvestre FB1 y FB2; mutante 1328  $\Delta tps2$  y 1335  $\Delta tps2$ ; transformadas AC145 y AC146 de 1328  $\Delta tps2$ , AC167 y AC168 de 1335  $\Delta tps2$ , con el plásmido AC94 (Figura 16). Así mismo, las cepas: silvestre FB1 y FB2; mutante 1328  $\Delta tps2$  y 1335  $\Delta tps2$ ; transformadas EH236 y EH237 de 1328  $\Delta tps2$ , EH287 y EH289 de 1335  $\Delta tps2$ , con el plásmido EH205 (Figura 17). Para realizar las pruebas de estrés se prepararon diluciones de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^4$  de las cepas de interés y se sembraron alícuotas de 10  $\mu$ l, sobre medio mínimo pH 7 (MM7). Se utilizaron diferentes agentes estresantes, para determinar la respuesta de las cepas, como control se utilizó MM7 a 28°C. Para determinar la respuesta a estrés oxidativo se utilizó menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona, vitamina K3), que es un componente multivitamínico que ha sido usado para estudios de estrés oxidativo, así como un agente terapeutico para la hipotrombinemia y el cáncer. La menadiona actúa como un mecanismo citotóxico, que como fuente exógena, ha

sido asociada con la generación excesiva de ROS (Vieira *et al.* 2008), es capaz de formar tanto superóxido, peróxido de hidrógeno así como radicales libres (Laux & Nel *et al.* 2001). Otros agentes oxidantes que se utilizaron fueron tert-butil hidroperóxido (TBOOH) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Como se mencionó antes, también se sometió a las cepas con estrés osmótico, para lo cual se utilizó sorbitol y manitol. Otro agente estresante que se utilizó fue la radiación UV (10,000 microjoules cm<sup>-2</sup>). Posteriormente fueron monitoreadas a partir de las 48 horas de incubación a 28°C y fotografiadas.



**Figura 16.** Crecimiento *in vitro* de *U. maydis* con el plásmido **AC94**, en MM7 a 28°C. Las cepas se fotografiaron a los cinco días de incubación. A) Condición control, sin agente estresante. B) 3μl Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). C) 4μl Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). D) 1.2M Manitol. E) 0.8M NaCl. F) 1M KCl. G) 2μl Menadiona. H) 1.5M Sorbitol. I) 10mM Cloruro de litio (LiCl).



**Figura 17.** Crecimiento *in vitro* de *U. maydis* con el plásmido **EH205**, en MM7 a 28°C. Las cepas se fotografiaron a los cinco días de incubación. A) Condición control, sin agente estresante. B) 0.5μl Menadiona. C) 2μl Menadiona. D) 1μl TBOOH. E) 2μl TBOOH. F) 1μl Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). G) 1.3M Sorbitol. H) 1M Manitol I) Radiación ultra-violeta (UV, 10000 pulsos).

#### 7.4.2. ANÁLISIS FENOTÍPICO EN PLANTA, *Zea mays*

Para el ensayo fenotípico en plantas de maíz (*Zea mays*, var. cacahuazintle), se inocularon plantas con las cepas silvestres (FB1xFB2), cepas mutantes  $\Delta tps2$  (1328x1335), transformadas con el plásmido AC94 (AC145xAC168 y AC146xAC167) y transformadas con el plásmido EH205 (EH236xEH287), que respectivamente, son sexualmente compatibles. Las plantas inoculadas con el gen *ScTps2*, presentan clorosis, formación de tumores y anomalías morfológicas durante el crecimiento y desarrollo de las mismas, tal como se presenta la cepa silvestre en la segunda fase del ciclo de vida de *U. maydis*, fase infectiva del hongo en la planta (Brefort *et al.* 2009; Ruiz-Herrera & León-Ramírez, 2012). Al presentar las plantas inoculadas con las cepas complementadas, los mismos síntomas que los observados con las cepas silvestres, nos indica que se llevó a cabo la complementación funcional de las mutantes  $\Delta tps2$  de *U. maydis* con el gen quimérico heterólogo *ScTps2*. Así mismo, las plantas que fueron inoculadas con cepas mutantes  $\Delta tps2$  (1328x1335), no presentaron sintomatología alguna, es decir, las plantas estaban sanas, en comparación con las plantas provenientes de la inoculación con la cruza silvestre FB1xFB2 por lo que se puede considerar que el gen *TPS2* que interviene en la síntesis de trehalosa, influye en el crecimiento del hongo en la planta hospedera y es un posible mecanismo clave para determinar la virulencia en la misma.

En estudios previos relacionados con la síntesis de trehalosa, específicamente en hongos patógenos de humano, se ha revelado la importancia que tiene esta ruta sobre la virulencia. En el caso de *A. fumigatus*, la disrupción del gen *ORLA*, gen ortólogo de *TPS2*, en ensayos *in vitro* genera en las células mutantes defectos morfológicos en el crecimiento de las hifas y disminución en la conidiación, aunque no hay una disminución significativa en la producción de trehalosa, ya que durante la síntesis de ésta se encuentran involucrados otros genes. No obstante, en Puttikamonkul *et al.* (2010), concluyen que los genes ortólogos a *tps2*, involucrados en la producción de trehalosa, son requeridos para la virulencia en hongos. En este caso, el hongo provoca aspergilosis pulmonar, por lo que el conocimiento que aporta la inhibición de esta vía, puede ser considerado

para posibles propuestas alternativas en futuros tratamientos. En el caso de *C. gattii*, si la producción de trehalosa es interrumpida se genera un cambio en los niveles de producción de manitol como mecanismo de protección celular y como estabilizador osmótico. Por otra parte, aunque *C. neoformans* y *C. gattii* son especies hermanas, ya que pertenecen al mismo género, sólo para el caso de la cepa mutante *R265tps2Δ* (*C. gattii*), en ensayos *in vitro* al reemplazar la glucosa por galactosa como suelo de crecimiento, suprime el defecto de crecimiento en altas temperaturas (37°C). Sin embargo, en las mutantes *H99tps1Δ* y *H99tps2Δ* (*C. neoformans*) el crecimiento de ambas, pueden ser suprimido con la sustitución de galactosa. Con estos resultados destacan que *TPS1* y *TPS2* pueden controlar el flujo glicolítico, ligeramente diferente, en las dos especies (Ngamskulrungrroj *et al.* 2009). En Petzold *et al.* (2006), realizaron estudios con modelos de ratón y conejo, en el que concluyen que *C. neoformans* requiere de esta ruta biosintética para sobrevivir en el hospedero. Así mismo, resaltan el hecho de que la trehalosa no es sintetizada en mamíferos, y podría ser empleada como fármaco antifúngico e incluso, proponen de manera preventiva, el diseño de vacunas en el que participe como inmunizadora. En *C. albicans* la interrupción del gen *CaTPS2* muestra un defecto sobre la integridad de las células, por lo que dichas mutantes presentan defecto en la síntesis de la pared celular, conducen la agregación de las células en la fase estacionaria y disminuye la infectividad de *C. albicans* en ratón (Zaragoza *et al.* 2002). Del mismo modo, en experimentos realizados por Álvarez-Peral *et al.* (2002), indican que se requiere de la trehalosa como un protector para el crecimiento de los blastoconidios de *C. albicans*, cuando se somete a tratamientos severos de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Los efectos tóxicos de ROS son cruciales en la destrucción de patógenos intracelulares y reflejan la habilidad de dañar los componentes celulares esenciales como los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Por lo cual muchos organismos tienen mecanismos específicos de defensa, como la síntesis y/o activación de moléculas o enzimas (Estruch, 2000; Álvarez-Peral *et al.* 2002), siendo la trehalosa una de ellas. Por otro lado, en otros organismos que sin pertenecer necesariamente al grupo de los hongos, destaca la importancia que

tiene la función de la síntesis de trehalosa. Por ejemplo, en *E. coli*, la trehalosa es sintetizada en respuesta a la alta osmolaridad. Sin embargo, en el caso de *Bacillus subtilis*, es utilizada sólo como fuente de carbono y no para la osmoregulación. En *Streptomyces sp.*, es almacenada en las hifas aéreas y las esporas, lo cual tiene influencia sobre el crecimiento (Nishant & Ipsita, 2008).

De la misma manera, en Liam *et al.* (2012) mencionan que la trehalosa es indispensable para el crecimiento en algunas plantas, como el caso de *Arabidopsis sp.* No obstante, los resultados que se muestran en este trabajo, coinciden con lo aportado en estudios previos. Los ensayos *in vitro* que se realizaron como control, sin ningún tipo de agente estresante (Figura 16.A, 17.A), de las cepas  $\Delta tps2$  de *U. maydis* con inhibición del gen *TPS2* que interviene en la síntesis de trehalosa, muestran disminución, con respecto a la cepa silvestre, en el crecimiento. Así mismo, las cepas fueron sometidas a pruebas de estrés oxidativo, estrés osmótico y radiación principalmente, en los que muestran una clara disminución en el crecimiento ante situaciones de estrés. Incluso, en algunos casos, el crecimiento es casi nulo con agentes estresantes como: Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Figura 16.B, 16.C), 0.8M NaCl (Figura 16.E), 1M KCl (Figura 16.F), Menadiona (Figura 16.G, 17.B, 17.C), 1.5M y 1M Sorbitol (Figura 16.H, 17.G), 10mM LiCl (Figura 16.I), TBOOH (Figura 17.D, 17.E) que se caracterizan en causar estrés oxidativo, al igual en que genera estrés osmótico. En el caso de los ensayos con 1M y 1.2M Manitol (Figura 16.D, 17.H) y Radiación UV (Figura 17.I), las cepas mutantes crecen, sin embargo, en menor proporción que las cepas de tipo silvestre y las transformadas con los plásmidos AC94 y EH205. Lo que también indica que la complementación de las mutantes  $\Delta tps2$  que intervienen en la síntesis de trehalosa es funcional con ambos genes, *UmTps2* y *ScTps2*.

Así mismo, se muestra en los experimentos realizados en las plantas de maíz, la patogenicidad causada por las cepas mutantes  $\Delta tps2$  complementadas con el plásmido AC94 y EH205. Las plantas desarrollaron disminución y anormalidad en el crecimiento, clorosis y tumoración en hojas y tallos, mismas alteraciones que ocasiona la cepa silvestre de *U. maydis*, por lo que la

complementación se obtuvo de manera exitosa. Los ensayos realizados en la planta de maíz variedad cacahuazintle, se llevaron a cabo con plantas control las cuales fueron inoculadas con agua destilada estéril (Figura 18), plantas inoculadas e infectadas con las cepas silvestres FB1xFB2 (Figura 19), plantas inoculadas e infectadas con las cepas que presentan el plásmido AC94 (Figura 20) y plantas inoculadas e infectadas con el plásmido EH205 (Figura 21 y Figura 22) que posee el gen *ScTps2* de *S. cerevisiae* y el gen de resistencia a higromicina B, que se utilizó como principal marcador de selección.



**Figura 18.** Planta sana de maíz (variedad cacahuazintle) utilizada como control positivo, la cual fue inoculada con agua destilada estéril. **A)** Acercamiento de la planta en el que se muestra a la planta de maíz sana, sin ningún tipo de indicador aparente de virulencia. **B)** Se muestra la planta infectada aún sembrada en la maceta. **C)** La imagen muestra a la planta desde la raíz, en la cuál nuevamente se muestra sin indicador de viruencia, con morfología normal, crecimiento y desarrollo uniforme.



**Figura 19.** Planta de maíz (variedad cacahuazintle) infectada con la cepa silvestre FB1xFB2. **A)** Acercamiento de la imagen que muestra la tumoración en la hoja de la planta de maíz infectada, daño característico que genera *U. maydis* en la hoja de la planta de maíz. **B)** Se muestra la planta infectada aún sembrada en la maceta. **C)** Se muestra la planta infectada, desde la raíz hasta las hojas, en la cual se aprecia la tumoración en la hoja de la planta.



**Figura 20.** Plantas de maíz (variedad cacahuazintle). **A)** De izquierda a derecha, se muestra el desarrollo y crecimiento anormal de las plantas infectadas con las siguientes cepas: cruza de cepas silvestre FB1xFB2, en seguida una planta infectada con las cepas  $\Delta tps2$  1328 mutante y silvestre FB1, en el tercer lugar se muestra una planta infectada con las cepas  $\Delta tps2$  1328 y 1335 complementadas con el plásmido **AC94** que porta el gen homólogo de *U. maydis* y el gen de resistencia a higromicina B. **B)** Hoja de una planta de maíz infectada con las cepas mutantes  $\Delta tps2$  1328 y 1335, la cual muestra la presencia de clorosis y daño ligero, así mismo en **C)** se muestra un cúmulo de tumores y un ligero daño en la hoja, mostrándose como corrugada y la tumoración con tendencia a ser plana. **D)** Lo que indica que, aunque se presente daño en la planta por parte de las cepas mutantes  $\Delta tps2$ , éste no se muestra tan significativo como para interrumpir el crecimiento o el desarrollo normal de la planta de maíz, lado izquierdo. A diferencia de la cepa silvestre, lado derecho, que interrumpe el desarrollo y crecimiento normal de la planta.



**Figura 21.** Plantas de maíz (variedad cacahuazintle) infectadas con las cepas mutantes  $\Delta tps2$  complementadas (EH236xEH287) con el plásmido **EH205**, el cual porta el gen quimérico heterólogo *ScTps2* de *S. cerevisiae* junto con el gen de resistencia a higromicina B. **A)** Se observa un acercamiento de la tumoración que presenta la planta de maíz en una sección de la hoja. En las siguientes imágenes se puede observar que la planta de maíz presenta **B)** clorosis y **C)** tumoración en diferentes secciones de las hojas de la planta. **D)** Plantas de maíz infectadas, se observa claramente desde la raíz que el crecimiento, desarrollo y morfología son anormales. **E)** Tumoración en una sección de una hoja de otra planta de maíz infectada con las cepas complementadas.



**Figura 22.** Plantas de maíz (variedad cacahuazintle) infectadas con las cepas mutantes  $\Delta tps2$  complementadas con el plásmido EH205 que poseen el gen quimérico heterólogo *ScTps2* de *S. cerevisiae*. **A)** La imagen muestra tumoración en el tallo de la planta. **B)** Se observa en la imagen, la base de una planta de maíz la cual se encuentra abultada, presenta crecimiento anormal y además tumoración. **C)** La imagen muestra a tres plantas infectadas con las cepas mutantes  $\Delta tps2$  complementadas, en la que desde la raíz se aprecia claramente el crecimiento y morfología anormal de la planta de maíz. Los cuales son claros indicadores, como en el caso de las cepas silvestres, de la virulencia y el daño ocasionado por *U. maydis* con la presencia del gen TPS2 que interviene en la síntesis de trehalosa.

## 8. CONCLUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron, confirman la hipótesis propuesta. Las características fenotípicas observadas en las mutantes 1328 y 1335  $\Delta tps2$  de *Ustilago maydis* afectadas en la síntesis de trehalosa, son debidas a la ausencia del gen *UmTPS2*, ya que el fenotipo mutante se revierte por la función del gen homólogo *UmTPS2* plásmido AC94 y del gen quimérico heterólogo *ScTPS2* plásmido EH205.

El ORF del gen *TPS2* de *S. cerevisiae* es funcional en *U. maydis*. Aunque estos dos microorganismos se encuentren evolutivamente separados, al ser el primero un ascomiceto y el segundo un basidiomiceto.

Este estudio proporciona conocimiento adicional sobre el efecto protector de la trehalosa ante situaciones de estrés y la relación de la trehalosa con la virulencia, en hongos patógenos. Siendo este el primer hallazgo en un hongo fitopatógeno que pertenece a los basidiomicetos.

Así mismo, parece ser que la virulencia de *U. maydis* en la planta del maíz, puede estar relacionada con la adecuación del hongo, dicha situación puede estar también influenciada directamente por la participación de la trehalosa.

## 9. LITERATURA CITADA

- Al-Bader N., Vanier G., Liu H., Gravelot F.N., Urb M., Hoareau C. M.Q., Campoli P., Chabot J., Filler S.G. & Sheppard D.C. 2010. Role of Trehalose in *Aspergillus fumigatus* Development, Stress Response, and Virulence. *Infection and Immunity* 78: 3007-3018.
- Álvarez-Peral F.J., Zaragoza O., Pedreño Y. & Argüelles J.C. 2002. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiology* 148: 2599-2606.
- Avonce N., Mendoza-Vargas A., Morett E. & Iturriaga G. 2006. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology* 109: 1-15.
- Banuett, F. 1995. "Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen of maize that induces tumor formation" *Annual Reviews in Genetics* 29: 179-208.
- Bell W., W. Sun, S. Hohmann, S. Wera, A. Reinders, C. De Virgilio, A. Wiemken & J. M. Thevelein. 1998. Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 33311-33319.
- Berman J. 2006. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. Review. *Current Opinion in Microbiology* 9: 595 -601.
- Brefort T., G. Soehleemann, A. Mendoza-Mendoza, S. Reissmann, A. Djamei & R. Kahmann. 2009. *Ustilago maydis* as pathogen. *Annual Review of phytopathology* 47: 423-445.
- Cabib E. & Lenoir L.F. 1958. The biosynthesis of trehalose phosphate. *The Journal Biological Chemical* 231: 259-275.
- Cervantes-Chavez J., L. Ortiz-Castellanos, M. Tejeda-Sartorius, S. Gold & J. Ruiz-Herrera. 2010. Functional analysis of the pH responsive pathway Pal/Rim in the

phytopathogenic basidiomycota *Ustilago maydis*. Fungal genetics and Biology 47: 446-457.

Colaco C., S. Sen, M. Thangavelu, S. Pinder & B. Roser. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. Biotechnology 10: 1007-1111.

Costa V. & Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. Molecular Aspects of Medicine 22: 217-146.

Crowe J. H., & Madin K. A. C. 1975. Anhydrobiosis in nematodes: evaporative water loss and survival. Journal of Experimental Zoology 193: 323-334.

Czeredys M., Gruszczynska-Biegala G., Schacht T., Methner A. & Kuznicki J. 2013. Expression of genes encoding the calcium signalosome in cellular and transgenic models of Huntington's disease. Frontiers in Molecular Neuroscience 42: 1-14.

Davidson R.C., Blankenship J.R., Kraus P.R., Berrios M.J., Hull C.M., D'Souza C., Wang P. & Heitman J. 2002. A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. Microbiology 148: 2607-2615.

Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Prieto., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. & Foster G.D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Review Molecular Plant Pathology 10: 1-17.

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

Elbein, A. D., Pan Y. T., Pastuszak & Carroll D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology 13: 17-27.

Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. FEMS Microbiology Reviews 24: 469-486.

- Farfsing J.W., Auffarth K. & Basse C.W. 2005. Identification of *cis*-active elements in *Ustilago maydis mig2* promoters conferring high-level activity during pathogenic growth in maize. The American Phytopathological Society 18: 75-87.
- Finkel T. & Holbrook N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408: 239-241.
- Foster A.J., Jenkinson J.M. & Talbot N.J. 2003. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plants infection by *Magnaporthe grisea*. The EMBO Journal 22: 225-235.
- Gupta A., Avci P., Dai T., Huang Y-Y. & Hamblin R.M. 2013. Ultraviolet radiation in wound care: sterilization and stimulation. Wound Healing Society. Advances in Wound Care 2: 422-437.
- Herdeiro R.S., Pereira M.D., Panek A.D. & Eleutherio E.C.A. 2006. Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipids peroxidation during oxidative stress. Biochimica et Biophysica Acta 1760: 340-346.
- Holliday, R. 1961. The genetics of *Ustilago maydis*. Genetics Research 2: 204-230.
- Hudson H.J. 1992. Fungal Biology. Chapter 1. Fungi as organisms. CUP Archive. 306 p.
- Iordachescu M. e Imai R. 2011. Trehalose and abiotic stress in biological systems. In Abiotic stress in plants: mechanisms and adaptations. (Arun K. Shanker & B. Venkateswarlu eds.). In Tech. Croatia 215-234.
- Karp G. 2010. Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos. Traducción: Martha Elena Araiza Martínez. Sexta Edición. McGrawHill. 765 p.
- Kumar N.J. & Ipsita Roy. 2008. Effect of trehalose on protein structure. Review Protein Science 18: 24-36.
- Laux I. & Nel A. 2001. Evidence that oxidative stress-induced apoptosis by menadione involves fas-independent pathways. Clinical Immunology 101: 335-344.

- Liam E.O'Hara, Matthew J.P. & Wingler A. 2012. How Do Sugars Regulate Plant Growth and Development? New Insight into the Role of Trehalose-6-Phosphate. *Molecular Plant* 1-14.
- Lowe R.G.T., Lord M., Rybak K., Trengove R.D., Oliver R.P. & Solomon P.S. 2009. Trehalose biosynthesis is involved in sporulation of *Stagonospora nodorum*. *Fungal Genetics and Biology* 46: 381-389.
- Mayer, F.L., Wilson D. & Tube, B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Landes Bioscience. *Virulence* 4: 119-128.
- Matthew, J.P., Primavesi L.F., Jhurrea D. & Zhang Y. 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology* 59: 417-441.
- Martínez E., A.D. & Ruíz H., J. 1998. El hongo *Ustilago maydis*, de la época prehispánica al tercer milenio. *Fitopatología* 33: 194-204.
- Mulet M.J., Alejandro S., Romero C. & Serrano R. 2004. The trehalose pathway and intracellular glucose phosphates as modulators of potassium transport and general cation homeostasis in yeast. *Yeast* 21: 569-582.
- Ngmaskulrungraj P., Himmelreich U., Breger J.A., Wilson C., Chayakulkeeree M., Krockenberger M.B., Malik R., Heide-Marie D., Toffaletti D., Djordejevic J.T., Mylonakis E., Meyer W. & Perfect J.R. 2009. The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. *Infection and Immunity* 4584-4596.
- Nishant K.M. & Ipsita R. 2008. Effect of trehalose on protein structure. *Review Protein Science* 18: 24-36.
- Pérez-Nadales E., Almeida Nogueira M.F., Baldín C., Castanheira S. & Mennat El Ghalid E. 2014. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genetics and Biology* 70: 42-67.
- Petzold E.W., Himmelreich U., Mylonakis E., Rude T., Toffaletti D., Cox G. M., Miller J.L. & Perfect J.R. 2006. Characterization and regulation of the trehalose synthesis

pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. Infection and Immunity 74: 5877-5887.

Puttikamonkul S., Willger S.D., Grahl N., Perfect J.R., Movahed N., Bothner B., Park S., Paderu P., Perlin D.S. & Cramer Jr. R.A. 2010. Trehalose 6-phosphate is required for cell wall integrity and fungal virulence but not trehalose biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. Molecular Microbiology 77: 891-911.

Richards A.B., Krakiwka S., Dexter L.B., Schid H., Wolterbeek A.P.M., Waalkens-Berendsen D.H., Shigoyuki A. & Murimoto M. 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple studies. Food and Chemical Toxicology 40: 871-898.

Roelofs D., Aarts M.G.M., Schat H. & van Straalen M. 2008. Functional ecological genomics to demonstrate general and specific responses to abiotic stress. Functional Ecology 22: 8-18.

Ruiz-Herrera J. 2011. *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. Nova Scientia 1: 118-135.

Ruiz-Herrera J. & León-Ramírez C.G. 2012. Development and Dimorphism of the Phytopathogenic Basidiomycota *Ustilago maydis*. Dimorphic fungi. Their importance as Models for Differentiation and Fungi Pathogenesis. Chapter 8. 105-116.

Sambrook J. & Russell D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2100.

Sarkar S., Davies J.E., Huang Z., Tunnacliffe A. & Rubinsztein D.C. 2007. Trehalose, a Novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and  $\alpha$ -Synuclein. The Journal of Biological Chemistry 282: 5641-5652.

- Serneels J., Tournu H. & Van Dijck P. 2012. Tight control of trehalose content is required for efficient heat-induced cell elongation in *Candida albicans*. The Journal of Biological Chemistry 287: 36873-36882.
- Singer M.A. & Lindquist S. 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. Molecular Cell 1: 639-648.
- Strom B.A.R. & Kaasen I. 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. Molecular Microbiology 8: 205-210.
- Sudbery P., Gow N. & Berman J. 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Review TRENDS in Microbiology 12: 317-324.
- Thevelein J.M. 1984. Regulation of trehalose mobilization fungi. Microbiology Review 48: 42-59.
- Tournu H., Fiori A. & Van Dijck P. 2013. Relevance of trehalose in pathogenicity: some general rules, yet many exceptions. PLOS Pathogens 9: 1-4.
- Van Dijck P., De Rop L., Szlufcik K., Van Ael E. & M. Thevelein J. 2002. Disruption of the *Candida albicans* TPS2 gene encoding Trehalose-6-Phosphate Phosphatase decreases infectivity without affecting hypha formation. Infection and Immunity 70: 1772-1782.
- Vieira Castro F.A., Mariani D., Dolly Panek A., Araújo Eleutherio E.C. & Dias Pereira M. 2008. Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. Public Library Of Science 3: 1-6.
- Vollmeister E., Schipper K., Baumann S., Haag C., Pohlmann T., Stock J. & Feldbrügge M. 2011. Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. FEMS Microbiology Review 36: 59-77.
- Wilson, R.A., Jenkinson, J.M., Gibson, R.P., Littlechild, J.A., Wang, Z.Y., & Talbot, N.J. 2007. Tps1 regulates the pentose phosphate pathway, nitrogen metabolism and fungal virulence. The EMBO Journal 26: 3673-3685.

Willcox J.K., Ash S.L. & Catignani G.L. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Review in Food Science Nutrition* 4: 275-295.

Zaragoza O., De Virgilio C., Pontón J. & Gancedo C. 2002. Disruption in *Candida albicans* of the *TPS2* gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase affects cell integrity and decreases infectivity. *Microbiology* 148: 1281-1290.

MIPS [en línea] Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, GmbH Ingolstädter Landstraße 1, D-85764 Neuherberg, Grupo Académico, Alemania, [Fecha de consulta: 18 Septiembre 2014] Base de datos de *Ustilago spp.* Disponible en <<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>>.

SGD [en línea] Stanford University, Stanford, CA94305, [Fecha de consulta: 18 Septiembre 2014]. Base de datos de *S. cerevisiae*. Disponible en <[www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)>.

CIMMYT [en línea] Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, [Fecha de consulta: 18 Septiembre 2014]. Disponible en <[www.cimmyt.org](http://www.cimmyt.org)>.

NCBI [en línea] National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA, [Fecha de consulta: 18 Septiembre 2014]. Disponible en <[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)>.

## 10. APÉNDICE

### 10.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### **Soluciones para extracción de plásmido:**

**Solución I:** para 100mL, se agrega 0.99g de 50mM Glucosa monohidratada, 1.25ml de 25mM Tris-HCl pH 8 y 2ml de 10mM EDTA pH 8. Aforar a 100ml con H<sub>2</sub>O destilada estéril.

**Solución II:** para 10ml se coloca 0.5ml de 2M NaOH, 1ml de SDS 1%, aforar a 10ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril (debe ser preparada al momento en que ésta es utilizada).

**Solución III:** para 100ml se coloca 60ml de 5M acetato de potasio, 11.50ml de ácido acético glacial y 28.50ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

**Solución de buffer de extracción (plásmido):** 50mM Tris-HCl pH 7.5, 20mM EDTA pH 8, 1% SDS.

#### **Soluciones para transformación y formación de protoplastos:**

**SCS:** 20mM citrato de sodio (dihidratado) pH 5.8, 1M sorbitol (para 200ml: 1.18g citrato de sodio, ajustar pH con HCl, 36.44g sorbitol, utilizar H<sub>2</sub>O destilada estéril).

**STC:** 10mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM CaCl<sub>2</sub> (anhidro), 1M sorbitol (para 200ml: 2ml Tris-HCl [1M pH 7.5], 20ml CaCl<sub>2</sub> [1M], 36.44g sorbitol, utilizar H<sub>2</sub>O destilada estéril).

**Buffer II:** 25mM Tris-HCl, pH 7.5, 25mM CaCl<sub>2</sub> (anhidro), 1M sorbitol. Utilizar H<sub>2</sub>O destilada estéril.

**Enzimas líticas (Sigma):** Disolver 100 mg de enzimas líticas en 1ml de buffer II. Utilizar H<sub>2</sub>O destilada estéril.

**YEPS:** 1% extracto de levadura, 2% bacto-peptona, 2% sacarosa.

**Cuarenta porciento (40%) de PEG en STC:** Autoclave 4g polietilenglicol (MW 3350) y 1.82g sorbitol con 3ml de H<sub>2</sub>O destilada, agregar 0.1ml de 1M Tris-HCl a pH 7.5, 1ml 1M CaCl<sub>2</sub> y esterilizar con H<sub>2</sub>O destilada en 10ml.

**Solución de Sales Ustilago:** para 1 litro: 16g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8g KCl, 2g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 8ml solución de elementos traza, aforar a 1 litro con agua destilada.

**Solución de elementos traza:** para 500ml: 30mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 70mg MnCl<sub>2</sub>, 200mg ZnCl<sub>2</sub>, 20mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 50mg FeCl<sub>3</sub>, 200mg CuSO<sub>4</sub>, disolver y aforar a 0.5 L con agua destilada.

## 10.2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

**LB:** bacto-triptona 10g, extracto de levadura 5g, NaCl 10g, H<sub>2</sub>O destilada estéril para 1 litro.

**MC:** Para 1 litro; 5g peptona, 10g extracto de levadura, 10g glucosa, 1.5g nitrato de amonio, 62.5ml solución de sales, H<sub>2</sub>O destilada para aforar a 1 litro.

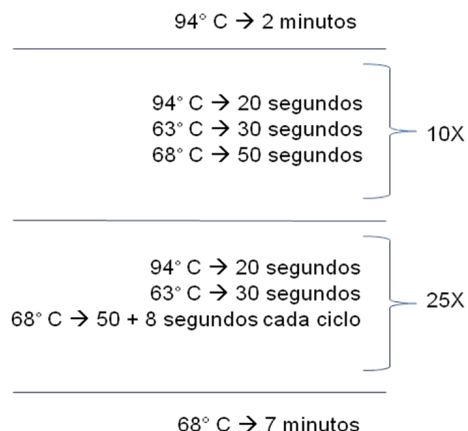
**MM pH7:** Para 100ml: 1g glucosa, 300mg KNO<sub>3</sub>, 6.25ml solución de sales, 2g agar, aforar con H<sub>2</sub>O destilada a 100ml.

**DCM-S:** Para 250ml: doble medio completo con D-sorbitol, 0.75g nitrato de amonio, 5g extracto de levadura, 31.25ml solución de sales, 45.55g D-Sorbitol, 5g agar, 5ml glucosa (adicionar después de esterilizar).

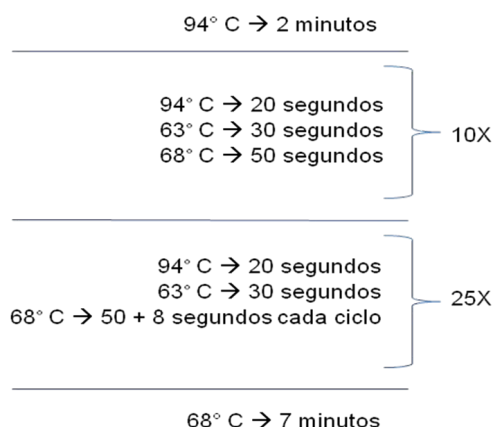
**Medio Mínimo pH7 con agente estresante:** Para realizar las distintas pruebas de respuesta a estrés, se prepararon los medios de cultivo; medio mínimo (**MM pH7:** Para 100ml: 1g Glucosa 1%, 300mg KNO<sub>3</sub>, 6.25ml solución de sales, 2g agar, aforar con H<sub>2</sub>O a 100ml), esterilizar por autoclave, posteriormente ajustar el pH a 7 con 1M Tris-HCl (estéril). Agregar los agentes estresantes de manera individual: 1.3M sorbitol, 1M manitol, 10mM LiCl, 0.9M NaCl, 1M KCl, 0.7M CaCl<sub>2</sub>, 1μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1μl Tert-butoxido (TBOOH), 2μl Tert-butoxido (TBOOH), 0.5μl

menadiona, 2µl menadiona, radiaciones de luz ultra-violeta (UV; 10000 pulsos). Así mismo, se utilizaron como tolerancia a temperatura el medio MM pH7 sin agente estresante a 37°C y como control positivo el MM pH7 sin agente estresante a 28°C. Una vez que se prepararon los medios con los diferentes agentes estresantes se vaciaron en cajas de Petri.

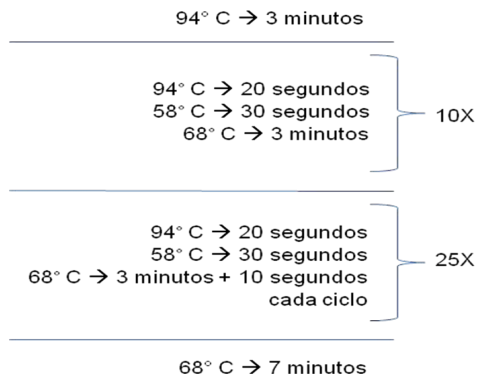
### 10.3. PROGRAMAS UTILIZADOS PARA EL TERMOCICLADOR



Programa 1. Programa para la amplificación del promotor de *Ustilago maydis*.



Programa 2. Programa para la amplificación del terminador de *Ustilago maydis*.



Programa 3. Programa para la amplificación del marco de lectura abierto de *TPS2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

10.4. ALINEAMIENTO DE LA PROTEÍNA Tps2

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

NCBI/ BLAST/ blastp suite-2sequences/ Formatting Results - YMEASCV5114  
Formatting options  
Download  
Blast report description

Blast 2 sequences

U. maydis y S. cerevisiae TPS2 complete gene

|               |                                         |                |                |
|---------------|-----------------------------------------|----------------|----------------|
| RID           | YMEASCV5114 (Expires on 08-13 23:57 pm) | Subject ID     | Icl 60743      |
| Query ID      | Icl 60741                               | Description    | None           |
| Description   | None                                    |                | See details    |
| Molecule type | amino acid                              | Molecule type  | amino acid     |
| Query Length  | 1286                                    | Subject Length | 896            |
|               |                                         | Program        | BLASTP 2.2.29+ |

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

| Description             | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|-------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|-----------|
| unnamed protein product | 561       | 561         | 48%         | 0.0     | 46%   | 60743     |

Alignments

unnamed protein product  
Sequence ID: Icl|60743 Length: 896 Number of Matches: 1  
Range 1: 136 to 792

| Score          | Expect | Method                                                         | Identities   | Positives    | Gaps       | Frame |
|----------------|--------|----------------------------------------------------------------|--------------|--------------|------------|-------|
| 561 bits(1445) | 0.0()  | Compositional matrix adjust.                                   | 304/667(46%) | 420/667(62%) | 52/667(7%) |       |
| Features:      |        |                                                                |              |              |            |       |
| Query          | 579    | PVWLDYNVAHGHYEGYCKATLWPLFHYLLWQDVNSERRAWEEYSWDAYYAANEAFAKRVA   | 638          |              |            |       |
| Sbjct          | 136    | PVWL + Y + +WP FHY+L E+ E+ W Y NEA+A+++                        | 191          |              |            |       |
| Query          | 639    | QYKPGDLVWIHDYHLLVPLMLRKLVPD--AVIGLFVHAPFSPSEVFRCLPFRKEILEG     | 696          |              |            |       |
| Sbjct          | 192    | EVYRKGDIIWIHDYHLLVPLQLLRMKFNDESI IIGYFHAPWPSNEYFRCLPFRKKQILGD  | 251          |              |            |       |
| Query          | 697    | MLGADLACFQAFSFSYRHLFSSCIRVCGYEASSNAVESASGHVTNITYN-----PIGI     | 748          |              |            |       |
| Sbjct          | 252    | ++GA+ CFQ S+SRHF+SSC R+ A + S S Y PIG+ PIG+                    | 311          |              |            |       |
| Query          | 749    | DSVKIAKDSSEGVLPKIEAIREMYKGGKILVGRDKLDVVRGVVQKLQAFYKFLAEYPEW    | 808          |              |            |       |
| Sbjct          | 312    | NTQTILKDAFTKIDSKVLSIKQAYQNKIIIGRDRLDSVRGVVQKLRAFETFLAMYPEW     | 371          |              |            |       |
| Query          | 809    | RNKVVLIQVTPAPALN-DSP---KLERQVSELVSHINGEFGSLSFPTPVHHYHQIIDRDEYF | 864          |              |            |       |
| Sbjct          | 372    | R++VVLIQV++P N +SP ++LE+OV+ELV+ IN E+G+L+F+PV HY+ I +D Y       | 431          |              |            |       |
| Query          | 865    | RDQVVLIQVSSPTANRNSPQTIRLEQQVNLVNSINSEYGNLNFSPVQHYMRIPKDVYL     | 919          |              |            |       |
| Sbjct          | 432    | +LL VADL LITSVRDGMNNT++EY+ ++ + +PLILSEF+G++ ++ AI V           | 491          |              |            |       |
| Query          | 920    | SLLRVADLCLITSVRDGMNNTALEYVTVKSHMSNFCYGNPLILSEFGSSNVLKDAIVV     | 979          |              |            |       |
| Sbjct          | 492    | NPWNIFGVAKAIDYALRLTDEEKRARHDQLYHQVVMHTSHTWAAGLVKQLLTRLHNEHSA   | 549          |              |            |       |
| Query          | 980    | H--LTPPLDRKEMVEKYRNNAKRLLLLDYDGTLPPIVKQPEMALPSQRLLTALDVLSDQE   | 1037         |              |            |       |
| Sbjct          | 550    | ERKMTPALNRPVLLLENYKQAKRRLFLFDYDGTLPPIVKDPAALPSARLYTILQKLCADP   | 609          |              |            |       |
| Query          | 1038   | KNIFYIISGRDGGFLGKHL-GHFRGIGFSAEHGGFVKEPGQDEYRNLTEDLDMTWMKDIR   | 1096         |              |            |       |
| Sbjct          | 610    | NHNIWIISGRDQKFLNKLWLGKLPQLGLSAEHGCFMKDVSQDQVNLTEKVDMSWQVRVN    | 669          |              |            |       |
| Query          | 1097   | SVFEYYTERTAGSFIEQKKSAITWHYRGADPDFGSFOAKECQAHLENLSSQNKLAEVLV    | 1156         |              |            |       |
| Sbjct          | 670    | +E R K A T RT GSFI E+K A+TWYR P+ G F AKE + L LS + +EV+         | 727          |              |            |       |
| Query          | 1157   | EYMEEFTRTPGSFIERKKVALTWYRRTVPELGEFHAKELKEKL--LSFTDDFDLEVMD     |              |              |            |       |
| Sbjct          | 728    | GKKNLEVRPLAINKGEIVKRILY-----DHPDAEFVFCAGDDKTD                  | 1196         |              |            |       |
| Query          | 1197   | GKANIEVRPRFVNKGEIVKRLVWHQHGKPKQDMLKGISEKLPKDEMPD--FVLCGLGDDFTD | 785          |              |            |       |
| Sbjct          | 786    | EDMFRTL 1203                                                   |              |              |            |       |
|                |        | EDMFR L 792                                                    |              |              |            |       |

Primer alineamiento entre *U. maydis* y *S. cerevisiae* de la proteína Tps2, el cual mostró una similitud de 46-48%.

# BLAST ®

## Basic Local Alignment Search Tool

NCBI/ BLAST/ blastp suite-2sequences/ Formatting Results - YNMJTC114

[Formatting options](#)  
[Download](#)  
[Blast report description](#)

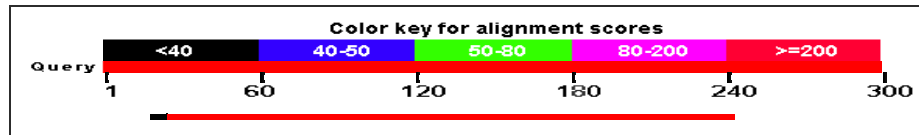
### Blast 2 sequences

Domain U.m-S.c

|                      |                                       |                       |                             |
|----------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| <b>RID</b>           | YNMJTC114 (Expires on 08-14 02:01 am) | <b>Subject ID</b>     | Icl 3585                    |
| <b>Query ID</b>      | Icl 3583                              | <b>Description</b>    | None                        |
| <b>Description</b>   | None                                  |                       | <a href="#">See details</a> |
| <b>Molecule type</b> | amino acid                            | <b>Molecule type</b>  | amino acid                  |
| <b>Query Length</b>  | 300                                   | <b>Subject Length</b> | 416                         |
|                      |                                       | <b>Program</b>        | BLASTP 2.2.29+              |

### Graphic Summary

Distribution of 2 Blast Hits on the Query Sequence



### Descriptions

Sequences producing significant alignments:

| Description             | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|-------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|-----------|
| unnamed protein product | 220       | 235         | 75%         | 2e-72   | 49%   | 3585      |

### Alignments

unnamed protein product

Sequence ID: Icl|3585 Length: 416 Number of Matches: 2

Range 1: 73 to 312

| Score         | Expect  | Method                                                        | Identities   | Positives    | Gaps        | Frame |
|---------------|---------|---------------------------------------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------|
| 220 bits(561) | 2e-72() | Compositional matrix adjust.                                  | 119/244(49%) | 149/244(61%) | 25/244(10%) |       |
| Features:     |         |                                                               |              |              |             |       |
| Query         | 21      | LTPPLDRKEMVEKYRNAKRLLLLDYDGTLTPIVKQPEMALPSQRLLTALDVLSDQDEKNI  |              |              |             | 80    |
| Sbjct         | 73      | +TP L+R ++E Y+ AK+RL L DYDGTLTPIVK P A+PS RL T L L D N        |              |              |             | 132   |
| Query         | 81      | FYIISGRDGGFGLGKHLG-HFRGIGFSAEHGGFVKEPGQDEYRNLTEDLDMTWMKDIRSVF |              |              |             | 139   |
| Sbjct         | 133     | +IISGRD FL K LG +G SAEHG F+K+ ++ NLTE +DM+W + V               |              |              |             | 192   |
| Query         | 140     | EYRTERTAGSFIEQKKSAITWHYRGADPDFGSFOAKECQAHLENLSSQNKLAIIEVLVGKK |              |              |             | 199   |
| Sbjct         | 193     | E+T RT GSFIE+KK A+TWHYR P+ G F AKE + L LS + +EV+ GK           |              |              |             | 250   |
| Query         | 200     | EEFTTRTPGSGFIERKKVALTWHYRRTVPPELGEFHAKELEKL--LSFTDDFDLEVMGKA  |              |              |             | 250   |
| Query         | 200     | NLEVRPLAINKGEIVKRILY-----DHPDAEFVFCAGDDKTDED                  |              |              |             | 239   |
| Sbjct         | 251     | N+EVVRP +NKGEIVKR+++ + PD FV C GDD TDED                       |              |              |             | 308   |
| Query         | 240     | NIEVRPRFVNKGEIVKRLVWHQHKGPKQDMLKGISEKLPKDEMPD--FVLCIGDDFTDED  |              |              |             | 308   |
| Sbjct         | 309     | FRTL 243                                                      |              |              |             |       |
|               |         | FR L                                                          |              |              |             |       |
|               |         | FRQL 312                                                      |              |              |             |       |

Range 2: 351 to 356

| Score         | Expect | Method                       | Identities | Positives | Gaps    | Frame |
|---------------|--------|------------------------------|------------|-----------|---------|-------|
| 15.0 bits(27) | 3.2()  | Compositional matrix adjust. | 5/6(83%)   | 5/6(83%)  | 0/6(0%) |       |
| Features:     |        |                              |            |           |         |       |
| Query         | 19     | AHLTPP 24                    |            |           |         |       |
| Sbjct         | 351    | AHLT P 356                   |            |           |         |       |
|               |        | AHLTDP                       |            |           |         |       |

Segundo alineamiento entre *U. maydis* y *S. cerevisiae*, únicamente del dominio catalítico fosfatasa, el cual mostró una similitud de 75-49%.

# BLAST ®

## Basic Local Alignment Search Tool

NCBI/ BLAST/ blastp suite-2sequences/ Formatting Results - YVW7297611N  
[Formatting options](#)  
[Download](#)  
[Blast report description](#)

### Blast 2 sequences

Domain GT1-TPS U.m - S. c

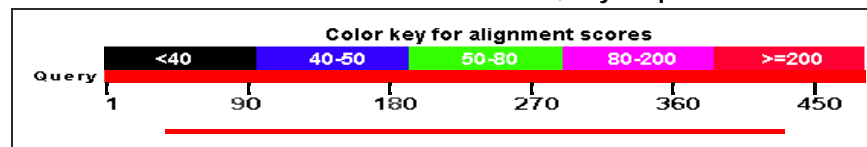
RID [YVW7297611N](#) (Expires on 08-16 19:20 pm)

**Query ID** lcl|186723  
**Description** None  
**Molecule type** amino acid  
**Query Length** 480

**Subject ID** lcl|186725  
**Description** None  
[See details](#)  
**Molecule type** amino acid  
**Subject Length** 526  
**Program** BLASTP 2.2.29+

### Graphic Summary

#### Distribution of 1 Blast Hits on the Query Sequence



### Descriptions

Sequences producing significant alignments:

| Description             | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|-------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|-----------|
| unnamed protein product | 347       | 347         | 81%         | 3e-117  | 45%   | 186725    |

### Alignments

unnamed protein product

Sequence ID: lcl|186725 Length: 526 Number of Matches: 1

Range 1: 122 to 525

| Score                                                                                    | Expect | Method                                                      | Identities | Positives | Gaps | Frame |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------|------------|-----------|------|-------|
| 347 bits(890) 3e-117() Compositional matrix adjust. 185/410(45%) 268/410(65%) 25/410(6%) |        |                                                             |            |           |      |       |
| Features:                                                                                |        |                                                             |            |           |      |       |
| Query                                                                                    | 39     | PVWLDYNVAHGHYEGYCKATLWPLFHYLLWQDVNSERRAWEEYSWDAYYAANFAKRVA  |            |           |      | 98    |
| Sbjct                                                                                    | 122    | PVWL + Y + +WP FHY+L E+ E+ W Y NEA+A+++                     |            |           |      | 177   |
| Query                                                                                    | 99     | QEYKPGDLVWIHDYHLLLPLMLRKLVPDA--VIGLFVHAPFSPSEVFRCLPKRKEILEG |            |           |      | 156   |
| Sbjct                                                                                    | 178    | + Y+ GD++WIHDY+LLL+P +LR D +IG F HAP+PS+E FRCLP+RK+IL+G     |            |           |      | 237   |
| Query                                                                                    | 157    | MLGADLACFOAFSRSRHLSSCIRVCGEASSNAVESASGHVTNITYN-----PIGI     |            |           |      | 208   |
| Sbjct                                                                                    | 238    | ++GA+ CFQ S+SRHF+SSC R+ A + S S Y PIG+                      |            |           |      | 297   |
| Query                                                                                    | 209    | DSVKIAKDSSEGVLPKIEAIREMYKGGKILVGRDKLDVVRGVVQKLQAFYKFLAEYPEW |            |           |      | 268   |
| Sbjct                                                                                    | 298    | ++ +I KD+ ++ + K+ +I++ Y+ KKI++GRD+LD VRGVVQKL+AF FLA YPEW  |            |           |      | 357   |
| Query                                                                                    | 269    | RNKVVLIQVTPALN-DSP---KLERQVSELVSHINGEFGSLSFTPVHHYHQIIDRDEYF |            |           |      | 324   |
| Sbjct                                                                                    | 358    | R++VVLIQV++P N +SP +LE+QV+ELV+ IN E+G+L+F+PV HY+ I +D Y     |            |           |      | 417   |
| Query                                                                                    | 325    | ALLSVADLALITSVRDGMNTTSMYEIICQNRFNK-----SPLILSEFTGTAGRMRSIQV |            |           |      | 379   |
| Sbjct                                                                                    | 418    | +LL VADL LITSVRDGMNTT++EY+ ++ + +PLILSEF+G++ ++ AI V        |            |           |      | 477   |
| Query                                                                                    | 380    | NPWNIFGVAKAIDYALRLTDEEKRARHDQLYHQVVMHTSHTWAAGLVKQL          |            |           | 429  |       |
| Sbjct                                                                                    | 478    | NPW+ VAK+I+ AL+L EEK +L+ +V T W + L                         |            |           | 525  |       |
| NPWDSVAVAKSINMALKLDKEEKSINLESKLWKEV--PTIQDWTNKFLSSL                                      |        |                                                             |            |           |      |       |

Tercer alineamiento de *U. maydis* y *S. cerevisiae*, únicamente del dominio GT1-TPS, el cual mostró una similitud de 81-45%.