



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



TÍTULO:

Implementación del gen *PYR4* como marcador de selección en el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Microbiología

Presenta:

Alma Delia Vega Jiménez

Dirigido por:

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Sinodales

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Presidente



Firma

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Secretario

Esquivel Naranjo Edgardo U.

Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime

Vocal



Firma

Dr. Virginia Mandujano González

Vocal



Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
14 de Junio de 2019
México

RESUMEN

Para realizar experimentos de manipulación genética en los organismos, es necesario contar con marcadores de selección que permitan identificar dentro de una población al organismo que porta la modificación genética realizada. El cambio generado puede ser interrumpir un gen o sobreexpresarlo. Generalmente existen dos tipos de marcadores, los que confieren resistencia a antibióticos y los auxotróficos. En el caso de *U. maydis*, actualmente se utilizan cuatro marcadores que confieren resistencia a antibióticos como son: la Higromicina B, Carboxina, Fleomicina y Nourseotricina. Sin embargo, en este hongo no se ha implementado el uso de marcadores de selección auxotróficos.

U. maydis tiene gran importancia tanto en la investigación básica como en la biotecnología. Por lo que en este trabajo analizamos la factibilidad del uso del gen *PYR4* para ser empleado como marcador de selección en este basidiomicete. De tal manera que, si la intención es utilizar a *U. maydis* en algún proceso biotecnológico por ejemplo aplicado al sector agrícola, será importante y deseable modificar cepas que no porten resistencia a antibióticos, facilitando así su aceptación por cuestiones de regulación.

La auxotrofia es la pérdida de la capacidad del organismo para sintetizar cierto compuesto, por lo tanto, es necesario que éste se suplemente de manera exógena al medio de cultivo. Usualmente estos marcadores de selección auxotróficos corresponden a genes involucrados en la síntesis de aminoácidos o bases nitrogenadas.

El gen *PYR4* codifica la enzima Dihidroorotato deshidrogenasa, encargada de catalizar la conversión de dihidrorotato (DHO) a orotato, se localiza en la membrana mitocondrial y es una de las enzimas involucradas en la síntesis de pirimidinas. La delección de este gen causa auxotrofia a uracilo en las cepas de *U. maydis*, sensibilidad a estrés osmótico y oxidativo, y la incapacidad para producir enfermedad en maíz. La complementación de las mutantes $\Delta pyr4$ con dos versiones de gen silvestre *PYR4* que difieren en el tamaño de sus regiones 5' y 3' regulatorias, permite la recuperación del fenotipo silvestre.

Por lo tanto, se propone al gen *PYR4* como marcador de selección auxotrófico en este hongo, además, con la relación filogenética y evolutiva puede emplearse con otros hongos fitopatógenos de importancia agrícola, como *Ustilago hordei*, *Sporisorium reilianum*, entre otros.

Palabras clave: *U. maydis*, *PYR4*, uracilo, marcador de selección.

SUMMARY

To carry out experiments of genetic manipulation in organisms, it is necessary to have selection markers that allow the identification of the organism that carries the genetic modification within a population. The change generated may be a gene deletion or gene overexpression. Generally, there are two types of gene selective markers, those that confer resistance to antibiotics and auxotrophics. In *U. maydis*, four selection markers resistant to antibiotics have been used: Hygromycin B, Carboxin, Phleomycin and Nourseotricin. However, selective auxotrophic markers have not been implemented in this fungus.

U. maydis has great importance in basic science and recently, also in biotechnology. In this work, we analyze the feasibility of using the *PYR4* gene as a gene selective marker in *this basidiomycete*. Regarding the use of *U. maydis* in biotechnology, for example in the agriculture sector, it will be important and desirable to modify strains that do not carry any resistance to antibiotics gene, making easier its use due to regulatory issues.

The auxotrophy, is the loss of the ability of the microorganism to synthesize any compound, therefore it is necessary supplement it exogenously to the culture medium to allow its grow. Usually these auxotrophic selection markers correspond to genes involved in the synthesis of amino acids or nitrogenous bases.

The *PYR4* gene encodes the enzyme Dihydroorotate dehydrogenase, this is the enzyme that is responsible for catalyzing the conversion of dihydrorotate (DHO) to orotate, is located in the mitochondrial membrane and is one of the enzymes involved in the synthesis of pyrimidines. As a result of its deletion, *U. maydis* mutants are auxotrophic to uracil, in addition the mutants are sensitive to osmotic and oxidative stress, and are not able to produce the disease in corn. Whereas the complemented $\Delta pyr4$ mutants with two versions of wild type *PYR4* gene that differ in the size of their 5' and 3' regulatory regions, showed a phenotype similar to the wild strain.

Therefore, the *PYR4* gene is proposed as a marker for auxotrophic selection in this fungus. Furthermore, due to the phylogenetic and evolutionary relationship, it can be used with other phytopathogenic fungi of agricultural importance, such as *Ustilago hordei*, *Sporisorium reilianum*, and others.

Key words: *U. maydis*, *PYR4*, uracil, auxotrophic selection marker

DEDICATORIAS

Todo el esfuerzo que he realizado a lo largo de este tiempo es gracias a mis padres, esta tesis es el resultado de todo el esfuerzo y apoyo que he recibido de ellos. Estoy profundamente agradecida por todos los sacrificios que han realizado.

A mis hermanos por todo su apoyo y paciencia a lo largo de la universidad, Guadalupe y Enrique, espero que todo esto sea un ejemplo para que ustedes algún día logren realizar todo lo que se propongan.

La familia siempre será lo más importante por sobre todas las cosas, es el lugar en donde encuentras las fortalezas y el mayor apoyo para lograr superar todas las cosas por más difíciles que sean. Estoy agradecida a la vida por estar juntos y por tener el apoyo, el amor y sobre todo los valores. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad por la beca otorgada para realizar este proyecto.

Al Dr. José Antonio Cervantes Chávez quién me acepto en su grupo de investigación, por la paciencia y toda la enseñanza adquirida en este tiempo.

A mis amigos y a los papás de ellos. Pasamos de todo juntos y con ustedes pase los mejores momentos de la universidad, hemos estado juntos desde entonces y aunque las cosas se pongan difíciles saben que uno para todos y todos para uno. Gracias Erick, Gaby, Juanita y Daniel.

A mis compañeros de laboratorio, Eve por toda tu ayuda en mis experimentos, tus palabras en momentos de frustración, Diana, Albo, Omar y Alán.

A lo largo de las etapas de la vida conocemos a los amigos y solo los verdaderos amigos perduran a lo largo de tiempo y la distancia, gracias Quique Tello por seguir siendo mi mejor amigo desde la secundaria. Angie por tus palabras de aliento y tu gran amistad. A mis mejores amigas; Martha y Carmen por sus ánimos durante toda la tesis.

Y a una persona muy especial, gracias Luis por todo.

A mis maestros, por la enseñanza académica y personal. Por hacer de la ciencia la mejor de las disciplinas.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Hongos fitopatógenos	3
2.2 <i>Ustilago maydis</i>	34
2.3 Los genes marcadores de selección	6
2.4 Los marcadores auxótrofos	7
2.5 Síntesis de pirimidinas	78
2.6 Uracilo.....	910
2.7 Ácido-5-fluororótico (5-FOA)	1011
2.8 Marcadores de selección en <i>U. maydis</i>	1011
3 JUSTIFICACIÓN	1213
4 HIPÓTESIS	1314
5 OBJETIVOS	1314
5.1 General	1314
5.2 Específicos.....	1314
6 MATERIALES Y METODOS	1415
6.1 Cepas y condiciones de cultivo	1415
6.2 Análisis <i>in silico</i> del gen <i>PYR4</i>	1516
6.3 Comprobación de la auxotrofia a uracilo de las cepas mutantes $\Delta pyr4$	1516
6.4 Concentración óptima de uracilo para permitir el crecimiento de las mutantes $\Delta pyr4$	1516
6.5 Selección en ácido-5-fluororótico (5-FOA).....	1617
6.6 Análisis fenotípico de las cepas mutantes $\Delta pyr4$	1617
6.7 Extracción de ADN genómico.....	1617
6.8 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa "PCR" del gen silvestre <i>PYR4</i> de <i>U. maydis</i>	1718
6.9 Análisis de las secuencias promotoras de los fragmentos 4042 pb y 3439 pb gen <i>PYR4</i> ...	1719
6.10 Transformación genética de <i>U. maydis</i>	1819
6.10.1 Formación de protoplastos	1819

6.10.2 Transformación genética en hielo	1820
6.11 Complementación genética de las mutantes $\Delta pyr4$	1920
6.11.1 Comprobación por sensibilidad a Higromicina B	1920
6.11.2 Prototrofia a uracilo	1921
6.11.3 Comprobación por PCR de la integración homóloga del gen <i>PYR4</i> en las cepas $\Delta pyr4$ complementadas	1921
6.12 Análisis fenotípico de las cepas $\Delta pyr4$ complementadas	1921
6.13 Obtención de una cepa complementada $\Delta pyr4$ (<i>a1b1</i>) por recombinación en planta	1921
6.14 Germinación de teliosporas	1921
6.15 Ensayo de apareamiento “Reacción fuz”.....	2022
6.16 Comprobación de la cepa complementada (<i>a1b1</i>) proveniente de la progenie	2022
6.16.1 Comprobación por sensibilidad a Higromicina B	2022
6.16.2 Prototrofia a uracilo	2123
6.16.3 Comprobación por PCR de la integración homóloga del gen <i>PYR4</i>	2123
6.17 Análisis fenotípico de las cepas complementadas (<i>a1b1</i>) recuperadas por análisis de progenie	21
23	
6.18 Ensayo de la transición dimórfica.....	2123
6.19 Ensayos de patogenicidad	2124
6.20 Diseño de un cassette de interrupción con el gen <i>PYR4</i> como marcador de selección....	2224
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	2325
8 CONCLUSIONES.....	5359
9 PERSPECTIVAS	5460
10 Apéndice	5561
11 BIBLIOGRAFÍA	5864

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	5
Figura 2. Síntesis de <i>de novo</i> de las pirimidinas..	8
Figura 3. Estructura del uracilo.	9
Figura 4. Esquema del gen <i>PYR4</i>	23
Figura 5. Dominios de la proteína DHODH de <i>U. maydis</i>	24
Figura 6. Cladograma de <i>Pyr4</i>	26
Figura 7. Comprobación de la auxotrofia a uracilo de las cepas mutantes $\Delta pyr4$	27
Figura 8. Determinación de la concentración de uracilo para permitir el crecimiento de las cepas $\Delta pyr4$	28
Figura 9. Selección en 5-FOA.....	29
Figura 10. Respuesta a estrés osmótico de las cepas mutantes $\Delta pyr4$	30
Figura 11. Respuesta a estrés oxidativo de las cepas mutantes $\Delta pyr4$	32
Figura 12. Amplificación del gen silvestre <i>PYR4</i> (4042 pb) y análisis por restricción.....	33
Figura 13. Amplificación del gen silvestre <i>PYR4</i> (3439 pb) y análisis de restricción.....	34
Figura 14. Sitios de unión de factores de transcripción del gen <i>PYR4</i>	35
Figura 15. Análisis de sensibilidad a Higromicina B de las cepas complementadas.....	36
Figura 16. Prototrofia a uracilo de las cepas complementadas.	37
Figura 17. Identificación por PCR del gen <i>PYR4</i> en las cepas complementadas.	38
Figura 18. Respuesta a estrés osmótico de las cepas complementadas.....	39
Figura 19. Respuesta a estrés oxidativo de las cepas complementadas.....	40
Figura 20. Reacción fuz..	41
Figura 21. Análisis de sensibilidad a Higromicina B de las cepas obtenidas por análisis de la progenie.....	41
Figura 22. Prototrofia a uracilo de las cepas obtenidas por análisis de la progenie.....	42
Figura 23. Amplificación por PCR del gen <i>PYR4</i> de las cepas obtenidas por análisis de progenie..	43
Figura 24. Respuesta a estrés osmótico de las cepas obtenidas por análisis de la progenie.	44
Figura 25. Respuesta a estrés oxidativo de las cepas obtenidas por análisis de progenie.....	45
Figura 26. Dimorfismo en <i>U. maydis</i>	46
Figura 27. Signos en plantas de maíz infectadas con <i>U. maydis</i>	47
Figura 28. Fenotipo en plantas infectadas cepas mutantes $\Delta pyr4$	48
Figura 29. Fenotipo en plantas infectadas con las cepas complementadas..	49
Figura 30. Cuantificación del análisis de patogenicidad..	50

Figura 31. Mapa del diseño del cassette de interrupción.....	51
Figura 32. Amplificación por PCR del promotor <i>HOG1</i> , gen <i>PYR4</i> y terminador <i>HOG1</i>	52

1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos patógenos como los hongos, oomicetos, bacterias y virus causan aproximadamente un 10% de pérdidas en los cultivos agrícolas de todo el mundo (Oerke, 2006). Para combatir a estos patógenos y mejorar la resistencia de los cultivos a las enfermedades ocasionadas por éstos, es necesario estudiar los mecanismos por los cuales los microorganismos colonizan a las plantas. Para ello, es necesario poder conocer la función de los productos que codifica el genoma de cada uno de los organismos

Para tal efecto, se han implementado técnicas de genética reversa, sobre todo en organismos secuenciados, en el que se identifica un gen en el genoma del organismo en cuestión, por técnicas moleculares se prepara una construcción o cassette de delección, el cual será insertado en el genoma del organismo blanco, reemplazando así la región codificante y posteriormente se estudiará el fenotipo producido por la mutación. También es posible realizar lo inverso, es decir sobre expresar un gen o bien generar organismos transgénicos con la intención de que tengan una mejor característica, o bien que produzcan una proteína o compuesto de interés de manera controlada (Fraiture, *et al.*, 2014).

Hoy en día es posible manipular el genoma de los organismos con cierta facilidad, incluso también es posible editarlo. Tenemos el ejemplo de CRISPERCas, que fue identificado en bacterias, y hoy en día ha sido adaptado a varios organismos eucariotas para la edición de su genoma (Idnurm & Meyer, 2018). Para poder llevar a cabo la alteración del genoma y poder dar seguimiento a ese cambio en particular, es necesario contar con genes marcadores de selección. Generalmente se usan los que confieren resistencia a algún antibiótico, o en el caso de plantas resistencia a algún herbicida (Wyatt, *et al.*, 2014). Sin embargo, también existen los que restituyen la capacidad del organismo para crecer en un medio de cultivo mínimo carente de una fuente indispensable para su crecimiento, como son aminoácidos o bases nitrogenadas, a estos marcadores se les denomina auxotróficos (Pronk, 2002).

Ustilago maydis es un hongo fitopatógeno que pertenece a la subdivisión Basidiomycota y al orden de los Ustilaginales, la cual posee más de 1,500 especies de hongos mejor conocidos como “hongos tizón” u “hongos carbón”, esto debido al aspecto negro y pulverulento de sus esporas; entre ellos se encuentran los carbones, los tizones y las royas. Todos son patógenos de plantas especialmente de las gramíneas y llegan a causar daños económicos cuando atacan plantas de cultivos de interés agronómico (Brefort, *et al.*, 2009). De todos los Ustilaginales podemos mencionar entre los más importantes, a *Ustilago hordei* y *U. nuda* que parasitan a la cebada, *U. nigra* que infecta a la avena, *Tilletia indica*, *T. caries* y *T. controversa* patógenos del trigo (Agrios, 2008).

En México el “Huitlacoche” es ampliamente usado en la gastronomía mexicana, es el resultado de la enfermedad producida por *U. maydis* en el maíz, este hongo es patógeno específico de maíz y teozintle. Se ha posicionado como un excelente modelo para profundizar en el estudio para entender la interacción entre el patógeno y la planta, por lo tanto, se han desarrollado diversas herramientas para realizar estudios de biología celular, molecular y genética (Martínez, *et al.*, 2002). Recientemente se ha implementado como plataforma para la producción de vacunas, así como varias proteínas de interés comercial, además de tener amplio potencial biotecnológico (Juárez-Montiel, *et al.*, 2015). Es por ello, que resulta interesante y necesario establecer el uso de marcadores auxotróficos en este organismo modelo. Puesto que el uso de los marcadores que confieren resistencia a algún antifúngico pueden llegar a ser costosos. Lo más importante desde el punto de vista de regulación, en relación a los organismos genéticamente modificados (OGM), será más fácil tratar con un OGM que no porta genes de resistencia a antibióticos, es por ello que la implementación de marcadores auxotróficos se ofrece como una excelente opción.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Hongos Fitopatógenos

La agricultura inició hace unos 10,000 años, desde entonces los agricultores se han enfrentado a varias dificultades entre ellas las plagas animales (insectos, ácaros, nematodos, roedores, caracoles), así como malezas, es decir, plantas que compiten por espacio, agua, disponibilidad de nutrientes con plantas de interés agronómico y especialmente los patógenos de plantas, entre los que encontramos a los virus, bacterias, fitoplasmas y hongos (Oerke, 2006). Debido a las asociaciones que se llevan a cabo entre las plantas y los microorganismos, algunas de las cuales son benéficas pero muchas son dañinas, surge la fitopatología, que es la ciencia que estudia las interacciones entre las plantas y los organismos patógenos, resultado de la asociación parasítica entre el organismo como los gusanos macroscópicos, microorganismos o virus y la planta misma (Agrios, 2008).

Las plagas reducen la productividad de diferentes maneras y se clasifican en función de su impacto, ya sea en reductores de tallo “damping-off”, reductores de la tasa fotosintética (hongos, bacterias y virus), aceleradores de la senescencia de las hojas (diversos patógenos), secuestradores de luz (malezas), asimiladores de savia (nematodos, artrópodos) y los consumidores de tejidos (masticadores y patógenos necrotróficos), así como las malezas que compiten por nutrientes inorgánicos (Berg, *et al.*, 2017). Se ha documentado que los patógenos microbianos como los hongos, oomicetos, bacterias y virus, causan aproximadamente el 10% de pérdidas de cultivo alrededor del mundo (Lanver, *et al.*, 2017).

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos, poseen un núcleo definido, algunos crecen como células alargadas denominadas hifas, estas a su vez se entrelazan formando micelio, propiedades que son características de los hongos filamentosos, algunos otros están constituidos por una sola célula tal es el caso de las levaduras. El reino de los hongos está conformado por más de 1.5 millones de miembros, los cuales tienen un impacto positivo o negativo con otras formas de vida y por lo tanto en los ecosistemas (Choi & Kim, 2017). Los hongos poseen cualidades únicas y generan un impacto perjudicial o benéfico en la actividad humana, ya que son empleados en la elaboración de alimentos o en la producción de antibióticos.

Por otro lado, pueden ocasionar enfermedades en plantas y animales, esto genera un reto para la investigación, ya sea en el diagnóstico, en su tratamiento así como su control y prevención (Deacon, 2006).

2.2 *Ustilago maydis*

Los hongos tizón hemibasidiomicetos están conformados por más de 1500 especies, entre éstas se encuentran los hongos fitopatógenos que infectan a plantas de importancia económica.

Entre ellas destacan las gramíneas en donde se encuentran plantas de interés agronómico como el maíz, el sorgo, la caña de azúcar, el trigo y la cebada (Brefort, *et al.*, 2009).

En los hongos tizón la capacidad del patógeno para producir enfermedad se encuentra acoplado al desarrollo sexual, las células haploides del sexo opuesto se fusionan y generan una célula dicariótica para poder invadir a la planta huésped, esto puede ser a través de las aperturas naturales como son los estomas o de forma directa, por medio de una estructura tipo apresorio, además de la producción de enzimas líticas (Brefort, *et al.*, 2009; Ryder, *et al.*, 2015).

Estos hongos infectan a la planta cuando el tejido no está diferenciado, para después continuar con su crecimiento dentro del tejido meristemático durante el desarrollo de la planta. La infección es sistemática y la producción de los signos se restringe a las inflorescencias femeninas y masculinas de la planta huésped, es decir en las flores se desarrolla una proliferación masiva de cuerpos fructíferos y por lo tanto la formación de esporas que da como resultado una masa de teliosporas negras, éstas pueden sobrevivir a todo tipo de ambiente prácticamente y permanecer inertes por largos periodos de tiempo (Pérez, *et al.*, 2014).

U. maydis causa signos de la enfermedad en todas las partes aéreas de la planta del maíz y de su antecesor el teozintle. La infección se caracteriza por la inducción de biosíntesis de antocianinas y la formación de agallas o tumores, en los que posteriormente se desarrollan las esporas. Cuando la temperatura y la humedad sean apropiadas, estas esporas diploides germinan, inician la meiosis y forman un promicelio. Posteriormente ocurre la septación que produce compartimentos que contiene un núcleo haploide; entonces se lleva a cabo la mitosis, y de esta manera las células haploides brotan del promicelio y entran al ciclo de vida vegetativo, durante el cual proliferan por gemación en forma de levadura. En la superficie de las hojas, las células haploides de sexo opuesto se fusionan y forman un dicarion, que presenta crecimiento filamentoso, y que es la única forma del hongo capaz de infectar a la planta. Los filamentos pueden llevar a cabo un proceso de diferenciación celular, en el que forman estructuras de infección llamadas apresorios (Lanver, *et al.*, 2017). Después de la penetración de la primera capa epidérmica de la planta, las estructuras en forma de abrazadera aseguran la correcta segregación de los dos núcleos en las hifas dicarióticas. Las hifas que se establecen en la epidermis y en los tejidos, se encuentran englobadas por la membrana plasmática del huésped, de esta manera se establece una interacción huésped-patógeno. Conforme la infección avanza las hifas alcanzan el tejido del mesófilo y algunas veces acceden al tallo para tomar los nutrientes. Las células vegetales se agrandan con la consiguiente formación de las agallas. Posteriormente los dos núcleos del dicarion se fusionan para después proliferar en células diploides. Las hifas se entrelazan fuertemente para después fragmentarse y desarrollar esporas de color oscuro (Lanver, *et al.*, 2017) (Fig. 1).

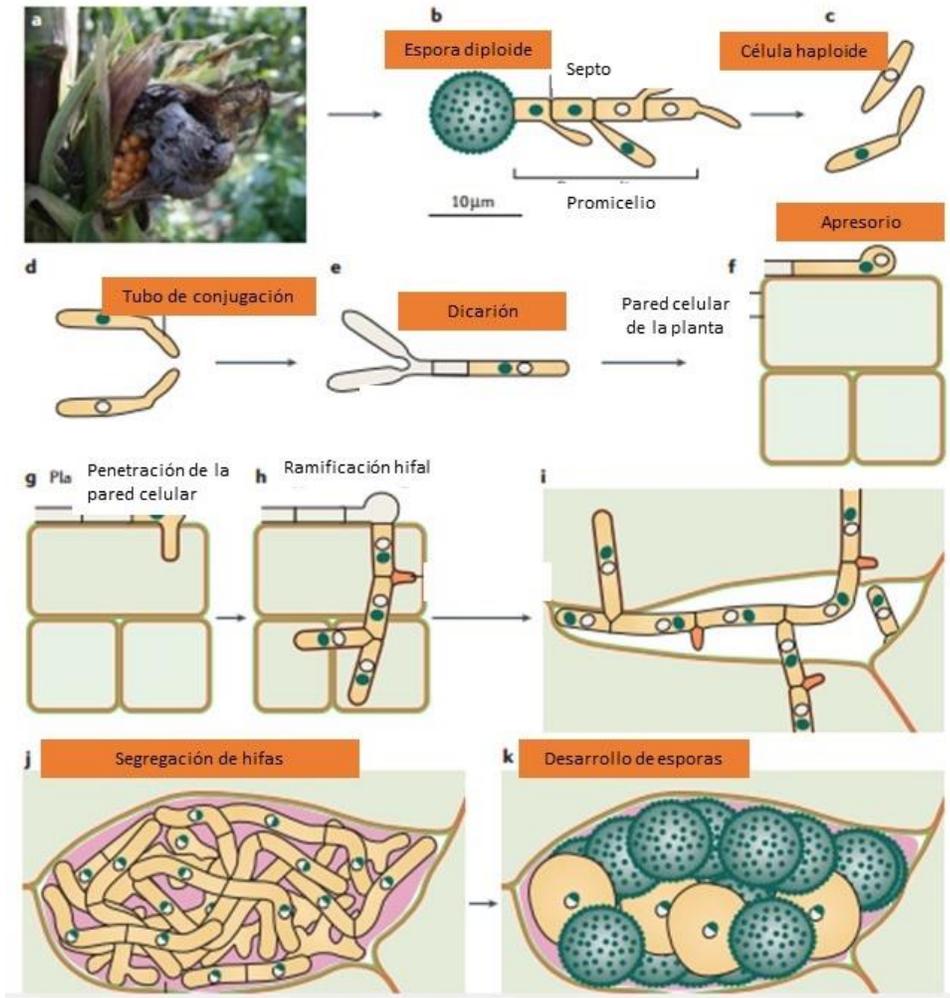


Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *Ustilago maydis*. Imagen modificada de (Lanver, 2017).

Dean *et al.* publicó en el 2012 que, entre los 10 hongos más importantes a nivel mundial, *U. maydis* se posiciona en el noveno lugar. Esto es debido a que económicamente la enfermedad del carbón del maíz no es tan devastadora, ya que en la mayoría de los casos las infecciones son locales, no se propagan y por lo tanto no se asocian con pérdidas severas en el rendimiento del maíz, en comparación con el devastador *Magnaphorte grisea*. Además, en México los elotes infectados son llamados “Huitlacoche” y representan un plato tradicional de la gastronomía mexicana (Dean, *et al.*, 2012). Cabe mencionar, que el huitlacoche es considerado una delicia, que además posee características nutracéuticas únicas (Valdez-Morales, *et al.*, 2010).

Por otro lado, los atractivos que hacen a este hongo importante para ser estudiado y además ser un modelo excelente para investigar la relación hongo-planta son, su fácil cultivo en medios definidos, el hongo como ya mencionamos alterna entre las fases haploide y diploide, forma colonias compactas de manera que pueden ser replicadas en placas, realiza de manera eficiente el reemplazo génico por recombinación homóloga (Dean, *et al.*, 2012). Cabe mencionar que este

hongo fue uno de los primeros para estudiar la recombinación homóloga. Es por ello que hoy en día se cuentan con múltiples herramientas para realizar investigaciones en el área de biología celular, molecular, genética, más recientemente, este hongo ha sido utilizado en la producción de proteínas heterólogas con aplicaciones biomédicas (Olicón-Hernández, *et al.*, 2019; Stock, *et al.*, 2012), y bien compuestos de interés industrial como el ácido itacónico (Zambanini, *et al.*, 2017).

2.3 Genes marcadores de selección

Los genes marcadores de selección se insertan junto con el gen de interés, se pueden clasificar en aquellos basados en genes de resistencia que le confieren a la célula la capacidad de crecer en presencia de compuestos tóxicos como antibióticos o herbicidas (Jones, 2003).

El fenotipo de resistencia a los antibióticos se genera por diferentes mecanismos entre ellos, la inactivación enzimática, alteraciones en el sitio blanco y alteraciones de permeabilidad (Blair, *et al.*, 2015). Uno de los mecanismos más comunes de acción, es dirigirse a la pared celular en procariontes, en otros casos los antibióticos funcionan interrumpiendo el proceso de replicación del ADN, por ejemplo, las quinolonas se dirigen al complejo de ADN y topoisomerasa II, de modo que se une al complejo y evita que se produzca la replicación del ADN (Sageman, 2015).

Los genes marcadores de selección confieren resistencia a algún antibiótico o a otros compuestos tóxicos, la selección de las cepas que portan el gen marcador requieren la adición del compuesto al medio de cultivo para llevar a cabo su selección. Las modificaciones genéticas como la inactivación dirigida de genes o su sobre-expresión, o bien la generación de organismos transgénicos, requieren el uso de marcadores de selección que permitan su adecuada detección y selección de las células transformadas. Además de la toxicidad de estos compuestos, su alto costo puede llegar a limitar su uso en procesos a gran escala (Pronk, 2002).

Para realizar eventos de transformación genética en hongos, la delección o introducción de genes, requiere el uso de genes marcadores que sean capaces de seleccionar el evento de transformación requerido. Posterior a la integración en el genoma, las nuevas propiedades adquiridas generalmente se heredarán de forma estable y la cepa se puede cultivar en condiciones no selectivas (Mapelli, 2014).

Los marcadores de selección dominantes son los más utilizados y se basan en la resistencia a antibióticos, requieren el uso de medios que contengan el agente selectivo que permita la obtención de transformantes, entre los más usados están el antibiótico aminoglicosídico G418, Higromicina B y cloranfenicol por mencionar algunos (Pronk, 2002). En el caso particular de *U. maydis*, contamos con la Higromicina B (HygR), Nourseotricina (NatR), Carboxina (CbxR) y Fleomicina, siendo todos estos marcadores dominantes en este hongo (Dean, *et al.*, 2012; Kamper *et al.*, 2006).

2.4 Los marcadores auxótrofos

La auxotrofia se define como la incapacidad de un organismo para sintetizar un compuesto orgánico en particular, el cual es fundamental para su crecimiento, una cepa es auxótrofa si porta una mutación que la hace incapaz de sintetizar dicho compuesto, si éste no se añade al medio mínimo de cultivo, el organismo no crece (Zhou *et al.*, 2017).

Los marcadores de selección auxotróficos generalmente se basan en el uso de mutantes en la síntesis de algunos aminoácidos y también de bases nitrogenadas. De tal manera que cuando se lleve a cabo la inclusión de las copias silvestres de los genes mutados en los vectores de transformación permita la selección de las transformantes (Pronk, 2002).

Entre los marcadores auxótrofos principales en hongos tenemos: adenina, metionina, uracilo, triptófano, arginina, leucina, inositol y prolina (Zhou, *et al.*, 2017).

Existen varios tipos de métodos para desarrollar mutantes auxotrofos, entre ellos está la mutagénesis, los mutágenos químicos, incluyen agentes alquilantes, agentes desaminantes y análogos de base, estos mutágenos conducen finalmente a cambios en el ADN y por lo tanto la acumulación de mutaciones en el cromosoma (Winkler, 2001).

El uso de transposones es otro método utilizado, ya que la inserción del transposón en un gen altera el marco de lectura de la proteína y por lo tanto inactiva el gen, los propios transposones llevan genes que imparten resistencia a los antibióticos, a su vez estas colonias pueden someterse a una prueba para detectar un requerimiento auxotrófico (Winkler, 2001).

La mutagénesis dirigida por oligonucleótidos se utiliza para crear mutaciones puntuales en una cadena de ADN, se requiere sintetizar un fragmento corto de ADN, un oligonucleótido que debe hibridar y que a su vez contenga la mutación, este hibrida con la molécula de ADN que posee el gen de interés, con la ADN polimerasa logra elongar la cadena para incorporar la mutación al ADN y formar una molécula bicatenaria de tal manera que puede ser introducida en una célula hospedadora para después escoger a las mutantes (Sauer, *et al.*, 2016)

El uso de PCR inversa en donde se utilizan oligonucleótidos, pero estos se encuentran orientados al revés es decir, el forward hacia la izquierda y el reverse hacia la derecha, para después amplificar el plásmido con una inserción, delección o una sustitución. Para realizar la inserción de los cebadores estos se posicionan en ambos lados del sitio de la mutación, mientras que uno contiene el segmento de secuencia para insertar (Sauer, *et al.*, 2016).

2.5 Síntesis de pirimidinas

La vía de biosíntesis de pirimidina se encuentra conservada entre los organismos procariontas y eucariotas, la ruta *de novo* está integrada por seis enzimas. La ruta comienza con la enzima carbamoil fosfato sintetasa II que da lugar a la formación de un carbamoil fosfato, después viene la formación del N-carbamilaspartato que se origina del carbamoil fosfato y del aspartato, esta reacción

se lleva a cabo por la enzima aspartato-transcarbamilasa. Posteriormente se forma el anillo de pirimidina, el N-carbamilfosfato pierde una molécula de agua de esta forma se lleva a cabo la formación del dihidro-ototato, con la deshidrogenación de este compuesto se forma el ototato la enzima implicada en esta reacción es la dihidroototato deshidrogenasa. El ototato incorpora una ribosa fosfato, para después reaccionar con el fosforibosilpirofosfato (PRPP) para formar ototidilato el cual es un nucleótido de pirimidina, finalmente este nucleótido se descarboxila hasta uridilato (uridina-monofosfato UMP) (Schultheisz, *et al.*, 2010).

Una de las enzimas implicada en la ruta es la Dihidroototato deshidrogenasa (DHODH) codificada por el gen *PYR4*, enzima que cataliza la conversión de dihiroototato (DHO) a ototato (Fig. 2).

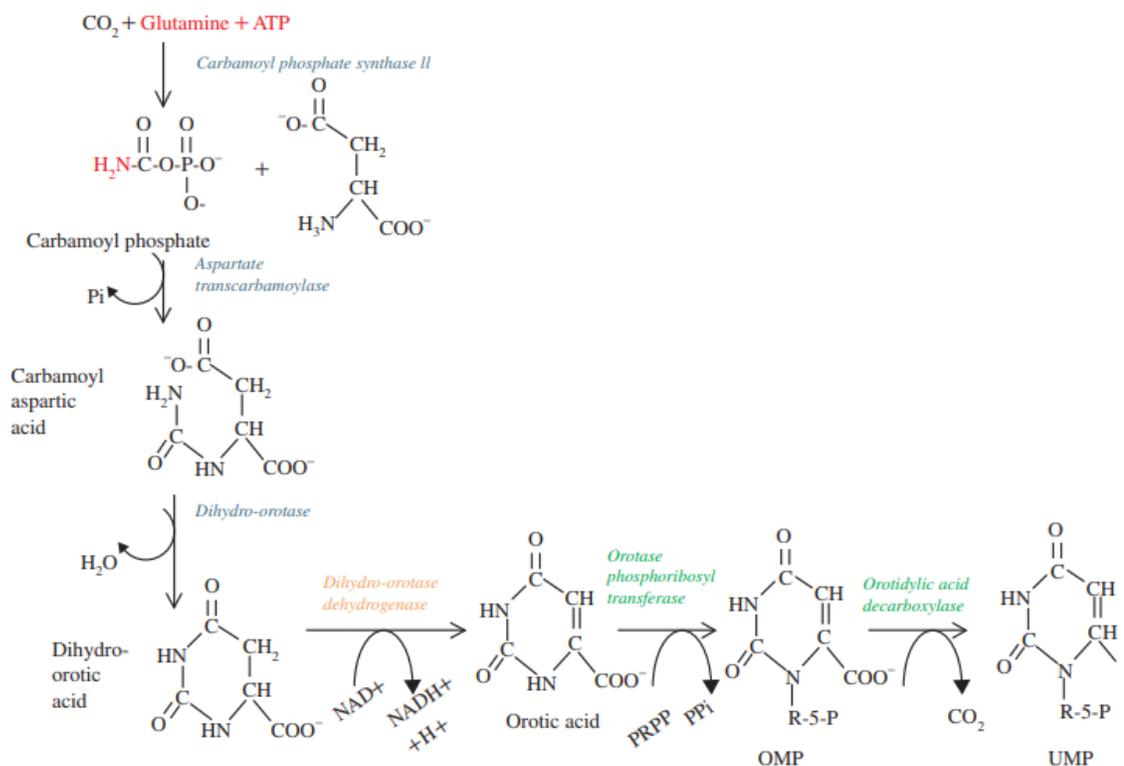


Figura 12 . Síntesis de novo de las pirimidinas. Imagen modificada de (Kumari, 2018).

En los organismos eucariotas la enzima DHODH está localizada en la membrana mitocondrial interna, la actividad de la enzima depende de la cadena respiratoria funcional. Además requiere ubiquinona como aceptor de electrones, en cambio en los organismos procariontes aerobios la enzima DHODH se encuentra unida a la membrana, semejante a las enzimas mitocondriales de los eucariotas, y en los organismos anaerobios obligados o facultativos, esta enzima se ha identificado en el citosol, la cual utiliza fumarato o NAD como aceptor de electrones (Zameitat, *et al.*, 2007).

Saccharomyces cerevisiae, posee una DHODH citosólica, reductor de fumarato, producto del gen *URA1*, es probable que este gen haya sido incorporado por transferencia horizontal de algún organismo procariota. Característica que le permite a esta levadura crecer en anaerobiosis, debido a que la oxidación catalizada por DHODH es el único paso que en otras especies depende obligatoriamente de la presencia de oxígeno (Zameitat, *et al.*, 2007).

En otros organismos, esta enzima está bien estudiada, todas las enzimas de la vía de biosíntesis de pirimidinas *de novo* son consideradas como blanco para el desarrollo de fármacos antiproliferativos e inmunosupresores (Christopherson, *et al.*, 2002). Se han usado con éxito inhibidores de la DHODH mitocondrial, los cuales han servido como agentes antiproliferativos, de manera que interfieren con el crecimiento neoplásico, además de suprimir reacciones inmunológicas, estos inhibidores se han propuesto como posibles agentes terapéuticos para infecciones parasitarias causadas por *Toxoplasma gondii*, el parásito de la malaria *Plasmodium falciparum*, entre otros (Zameitat, *et al.*, 2007).

2.6 Uracilo

En eucariotes, la síntesis de pirimidinas se lleva a cabo en el citoplasma, se sintetiza como un anillo libre y luego se le agrega una ribosa-5-fosfato que la hará producir nucleótidos directos, a diferencia de la síntesis de purina en donde el anillo se sintetiza uniendo átomos en la ribosa-5-fosfato (Kumari, 2018).

El uracilo es una base de pirimidina, en la cual el anillo de pirimidina se encuentra sustituido con dos grupos Oxo en las posiciones 2 y 4 (Fig. 3).

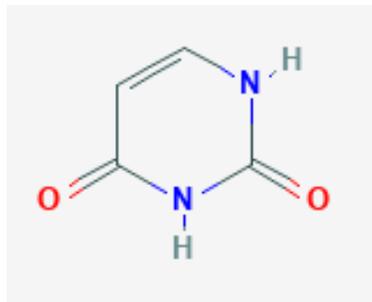


Figura 23. Estructura del uracilo. Imagen modificada de (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1174>).

Esta base se encuentra en el ARN y reemplaza a la timina durante la transcripción del ADN a ARN. El uracilo ayuda a llevar a cabo la síntesis de muchas enzimas para la función celular a través de la unión con ribosas y fosfatos, sirve como regulador alostérico y coenzima para reacciones bioquímicas, además de participar en la biosíntesis de polisacáridos como donador de sacáridos “Uridin” y en el transporte de azúcares que contienen aldehídos (PubChem, 2019).

2.7 Ácido-5-fluororótico (5-FOA)

El ácido 5-fluororótico (5-FOA) es un derivado del ácido orótico que es un precursor de las pirimidinas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el gen *URA3* codifica la orotidina 5-fosfato descarboxilasa. En el laboratorio, el 5-FOA se utiliza para seleccionar a aquellas levaduras que no porten el gen *URA3* no funcional. El producto del gen *URA3* descarboxila el 5-FOA a 5-fluorouracilo, que es un metabolito tóxico para aquellas cepas cuya vía de síntesis de uracilo no presenta mutaciones, por lo tanto se usa como agente de contra-selección de cepas que han perdido dicho gen marcador (Rosas Quijano, 2011).

2.8 Marcadores de selección en *U. maydis*

U. maydis es un modelo que realiza eficientemente la recombinación homóloga, por lo cual es factible llevar a cabo reemplazos génicos usando los marcadores de selección ya mencionados y que producen resistencia a: HygR, NatR, CbxR y la Fleomicina y que estos se usan como marcadores dominantes en este hongo (Dean, *et al.*, 2012).

Los aminoglucósidos se encuentran entre los primeros antibióticos descubiertos y utilizados clínicamente. La Hyg B es un aminoglucósido, producido por *Streptomyces hygroscopicus*, es activo contra células eucariotas y procariotas a una concentración de 0.38 mM, ya que a esa concentración detiene completamente el crecimiento de células de levadura en medios mínimos. Bloquea la síntesis de proteínas en los ribosomas, inhibe la translocación de ARNm y ARNt en el ribosoma en bacterias y en organismos eucariotas, además de tener un efecto en la decodificación de la fidelidad aumentando la afinidad del aminoacil-ARNt (Borovinskaya, *et al.*, 2008). La Hyg B inhibe la elongación de la cadena peptídica por los polisomas al prevenir la translocación dependiente del factor de elongación EF2, sin embargo, no afecta la formación del complejo EF-2-GTP o la hidrólisis de GTP (Becker & Cooper, 2013). El gen de resistencia a la Hyg B es el *HPH* que sintetiza una quinasa que fosforila e inactiva al antibiótico (Kalivoda, *et al.*, 2011)

Otro antibiótico que pertenece al grupo de los aminoglucósidos es la Nat producida por la bacteria *Streptomyces noursei*, al igual que la Hyg B, inhibe la síntesis de proteínas al inducir errores en la traducción. La Nourseotricina es inactivada por la nourseotricina N-acetil transferasa (NAT), esta enzima acetila el grupo beta amino del residuo de beta lisina de la NTC. De esta manera actúa como gen de resistencia a los antibióticos.

La Fleomicina es un antibiótico glicopéptido sintetizado por la bacteria *Streptomyces verticillus*, es un inhibidor del metabolismo del ADN. Este fármaco se une a porciones del ADN ricas en guanosina-citosina mediante la asociación del tripéptido "S" y mediante la intercalación parcial de anillos de bitiazol. Un grupo de cinco átomos de nitrógeno dispuestos en una conformación piramidal se une a metales divalentes que incluyen el hierro, el ligando activo, el cobre y un ligando inactivo. El oxígeno molecular, unido por el hierro produce radicales libres altamente reactivos y

hierro (Fe), estos radicales libres producen rupturas de una sola hebra de ADN en los enlaces 3'-4' en la desoxirribosa (Sidney, 2000). La resistencia esta mediada por hidrolasas de Fleomicina, que actúa como una tiol proteasa con actividad de aminopeptidasa, el cual es producto del gen *ble* (Dortet, *et al.*, 2017).

La carboxina es un fungicida que actúa inhibiendo la citocromo C reductasa de la succinato deshidrogenasa (SdnB) en mitocondrias. Esta se obtiene por la condensación del grupo amino de la anilina con el grupo carboxi del ácido 2-metil-5,6-dihidro-1,4-oxatina-3-carboxilico (Nyilasi, *et al.*, 2015). La sustitución de aminoácidos en la subunidad de la proteína hierro-azufre de la confiere resistencia a la carboxina, por lo que el gen *sdhB* se puede usar como marcador de selección en experimentos de transformación, cabe mencionar que este gen se aisló de *U. maydis* (Ando *et al.*, 2009). Actualmente la carboxina es utilizada para el tratamiento de semillas, específicamente para el control de *Rhizoctonia spp*, en cultivos comercialmente importantes como el algodón, el maíz, el sorgo, la soya y las hortalizas (Rica, 2019).

3 JUSTIFICACIÓN

La relación evolutiva ha establecido a los hongos como modelos de estudio en cuestiones de biología celular, molecular, genética entre otras. Los primeros modelos fueron las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, ambos ascomicetos, han proporcionado información relevante en bases moleculares relacionadas al ciclo celular, gemación, citoesqueleto, transcripción, entre otras.

En los últimos años *Ustilago maydis* se ha posicionado como excelente modelo de estudio, este basidiomiceto es el responsable de la enfermedad del carbón del maíz, es reconocido para el estudio de la interacción planta-patógeno, cuenta con herramientas genéticas, moleculares e informáticas, además su genoma está secuenciado y es de libre acceso, por lo cual es factible plantear estudios de genética reversa, así como realizar estudio de genética funcional y comparativa.

Para *U. maydis* no hay registro del uso de marcadores auxotróficos que permitan realizar experimentos de transformación genética. Considerando la utilidad de este tipo de marcadores, los cuales no suponen ningún riesgo en caso de transferencia horizontal al no estar relacionados con la resistencia a algún antibiótico y, tomando en cuenta la importancia que este hongo está cobrando en la biotecnología, así como el costo de los marcadores de selección que confieren resistencia a antibióticos, resulta interesante y atractivo implementar el uso del gen *PYR4* como como marcador de selección auxótrofo.

4 HIPÓTESIS

El fenotipo mostrado por las cepas $\Delta pyr4$ de *Ustilago maydis* complementadas con versiones del gen *PYR4* recuperarán el fenotipo silvestre, delimitando así la versión funcional de este gen para ser utilizado como marcador de selección.

5 OBJETIVOS

5.1 General

Estudiar la factibilidad del gen *PYR4* como marcador de selección auxotrófico en *U. maydis*.

5.2 Específicos

- Estudiar la respuesta de las cepas $\Delta pyr4$ en condiciones de estrés osmótico y oxidativo.
- Analizar el dimorfismo y la virulencia de las mutantes $\Delta pyr4$.
- Delimitar el fragmento del gen *PYR4* que permita recuperar el fenotipo silvestre de las mutantes $\Delta pyr4$.
- Diseñar un cassette de interrupción génica con el gen *PYR4* como marcador de selección.

6 MATERIALES Y METODOS

6.1 Cepas y condiciones de cultivo

Se trabajó con tres cepas de *U. maydis* auxótrofas a uracilo ($\Delta pyr4$) resistentes a Higromicina B, denominadas $\Delta 404$; sexo (*a1b1*), $\Delta 405$ y $\Delta 406$; sexo (*a2b2*), proporcionadas por el Dr. Michael Bölker; Facultad de Medicina de la Universidad Philipps, Marburg, Alemania. Las cepas silvestres (WT) FB1 (*a1b1*) y FB2 (*a2b2*) de *U. maydis* proporcionadas por la Dra. Flora Banuett, Universidad de California (Tabla 1). Las cepas fueron sembradas en medio completo (MC) (0.5% de peptona, 1% de extracto de levadura, 1% de glucosa, 0.15% de nitrato de amonio, 62.5 mL de solución de sales para *U. maydis* (Holliday, 1974) y 2% de agar bacteriológico para medio sólido). Las cepas $\Delta 404$, $\Delta 405$ y $\Delta 406$ se sembraron en MC suplementado con 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Higromicina B (Goldbio). Las cepas se conservaron a -80°C en glicerol al 40%. Se manipularon en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

Para los ensayos de patogenicidad en condiciones de invernadero se utilizaron semillas de maíz de la variedad “cacahuazintle” cultivadas en macetas con mezcla de suelo general preparada en el Cinvestav-Unidad Irapuato.

Tabla 1. Cepas utilizadas

Código	Características	Referencia
FB1	Silvestre <i>a1b1</i>	(Banuett & Herskowitz, 1989)
FB2	Silvestre <i>a2b2</i>	(Banuett & Herskowitz, 1989)
$\Delta pyr404$	Mutante del gen <i>PYR4 a1b1</i>	(Bölker, et al., 2002)
$\Delta pyr405$	Mutante del gen <i>PYR4 a2b2</i>	(Bölker, et al., 2002)
$\Delta pyr406$	Mutante del gen <i>PYR4 a2b2</i>	(Bölker, et al., 2002)
734-740	$\Delta pyr406$ complementada con el gen <i>PYR4</i> (fragmento 3439 pb)	Este estudio
758-761	$\Delta pyr406$ complementada con el gen <i>PYR4</i> (fragmento 4042 pb)	Este estudio
778-780	Cepas <i>a1b1</i> complementadas con fragmento <i>PYR4</i> 4042 pb, obtenidas por recombinación en planta.	Este estudio
806-810	Cepas <i>a1b1</i> complementadas con fragmento <i>PYR4</i> 3439 pb, obtenidas por recombinación en planta.	Este estudio

6.2 Análisis *in silico* del gen *PYR4*

Se analizó y se descargó la secuencia de nucleótidos y de proteína del gen “*PYR4*” Dihidroorotato deshidrogenasa de *U. maydis* en formato fasta de la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ869012.1?report=fasta>).

También, se obtuvieron las secuencias del gen correspondiente de otros hongos fitopatógenos, así como de *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa*. Con dichas secuencias se realizó un análisis tipo Blast de proteínas para analizar los dominios conservados, así mismo se realizó un cladograma en el programa CLC Main Workbench.

Además, se realizó la búsqueda de los genes de *Ustilago maydis* que participan en la síntesis de pirimidinas en la base de datos (<https://www.uniprot.org/uniprot/P15188>), (https://genome.jgi.doe.gov/cgi-bin/dispGeneModel?db=Ustma2_2&id=6887) y (<https://www.yeastgenome.org>), para ello se utilizaron los respectivos genes homólogos de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidos de la página (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>).

6.3 Comprobación de la auxotrofia a uracilo de las cepas mutantes $\Delta pyr4$

Las cepas $\Delta pyr4$ y la cepa WT FB1 (control) se crecieron en 5 ml de medio mínimo ajustado a pH 7 (30 mM Tris-HCl pH 7) MM7 (ver apéndice), se suplementó con ampicilina ($1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), así como Higromicina B ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; cepas $\Delta pyr4$). El medio se preparó con y sin uracilo (desde $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ hasta $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Se inocularon ambos tipos de medio de cultivo con cada una de cepas, éstos se incubaron de 18 a 24 horas a 28°C a 150 rpm. Posteriormente se tomaron fotografías con la cámara CANON EOS Rebel T3i. El ensayo se realizó por triplicado.

6.4 Concentración óptima de uracilo para permitir el crecimiento de las mutantes $\Delta pyr4$

Para determinar la cantidad mínima de uracilo necesaria para permitir el crecimiento de las cepas auxótrofas a uracilo, se realizó una curva utilizando cantidades variables de uracilo (Sigma-Aldrich). Las cepas auxótrofas y la cepa silvestre FB1 usada como control, se crecieron sobre MM7 sólido, el medio se adicionó con cantidades variables de uracilo: $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Para preparar el inóculo, las cepas de interés se sembraron en 10 mL de MC a 28°C durante 18-24 horas a 150 revoluciones por minutos (rpm) (condiciones estándar). Después de ese tiempo de incubación se realizó un lavado de las células con agua destilada estéril. La pastilla de células se re-suspendió en 5 mL de agua destilada estéril, para proceder a su conteo en la cámara de Neubauer. Posteriormente, se ajustó la concentración a 1×10^7 células $\cdot\text{mL}^{-1}$. A partir de éste, se prepararon diluciones decimales hasta 1×10^3 células $\cdot\text{mL}^{-1}$. Se colocaron 10 μL de cada dilución de manera ascendente sobre la placa correspondiente. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 a 72 horas. El experimento se realizó por triplicado.

6.5 Selección en ácido-5-fluororótico (5-FOA)

Las cepas de interés FB1, $\Delta 405$, 780 complementada con el fragmento *PYR4* de 4042 pb; y 806 complementada con el fragmento *PYR4* de 3439 pb; se sembraron en dos placas con MM7, una placa adicionada con Uracilo ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y con FOA ($1 \text{ g}\cdot\text{L}$) y la otra placa solamente con uracilo ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), se incubaron a 28°C durante 48 horas.

6.6 Análisis fenotípico de las cepas mutantes $\Delta pyr4$

Las cepas de interés se crecieron en 10 mL de MC líquido de 18 a 24 horas a 28°C a 150 rpm, las células se lavaron con agua destilada estéril y la pastilla se re-suspendió en 5 mL de agua destilada estéril. Las células se ajustaron a 1×10^8 células $\cdot\text{mL}^{-1}$ (cámara de Neubauer), a partir de ésta se realizaron diluciones decimales (1×10^{-7} hasta 1×10^{-3} células $\cdot\text{mL}^{-1}$). Se colocaron gotas de 10 μL de células sobre cada placa con diferente condición del agente estresante (indicada en cada figura). El medio utilizado para los ensayos de estrés fue MM7 con 1% de glucosa, adicionado con uracilo ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y suplementado con el agente estresante. Para el estrés osmótico: 1.4 M de cloruro de potasio (KCl), 1.3 M de cloruro de sodio (NaCl), 1.2 M de manitol y 1.8 M de sorbitol. Estrés oxidativo; 4 μM de menadiona, 1.5 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y 400 μM de tert-butyl-hidroperóxido (tBOOH).

Las placas se incubaron a 28°C durante 96 horas. Transcurrido este tiempo las cajas se fotografiaron con la cámara CANON EOS Rebel T3i. El ensayo se realizó por triplicado.

6.7 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó de acuerdo al protocolo (Wilson, 1987). Las cepas de interés se crecieron en placas de MC sólido, las cepas silvestres; FB1 y FB2 se inocularon en 10 mL de MC líquido mientras que para las cepas auxótrofas a uracilo el medio se suplementó con 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Higromicina B, se incubaron a 28°C a 150 rpm, de 18 a 24 horas. El cultivo se centrifugó a 3, 500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, la pastilla celular obtenida se recuperó en 200 μL de amortiguador (TE, 10 mM Tris-1 mM EDTA), la muestra se transfirió a tubos Eppendorf que contienen 0.3 gramos de perlas de vidrio (0.1 mm de diámetro, lavadas con ácido nítrico y esterilizadas), se adicionaron 200 μL de amortiguador de lisis TSNTE (2% tritón, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA), se añadió un volumen de 200 μL de la mezcla fenol cloroformo (1:1). El tubo se colocó en el agitador vortex por 3 minutos para romper las paredes. Se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf nuevo estéril, se añadió 1 mL de etanol al 100 %, se mezcló invirtiendo el tubo y se incubó a -20°C por 1 hora. Se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos, se re-suspendió la pastilla en 400 μL de TE, se agregaron 2 μL RNAsa I (Invitrogen, $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se incubó por 20 minutos a 37°C .

El ADN se precipitó con 10 µL de acetato de amonio 4 M y 1 mL de etanol al 100%. Se mezcló invirtiendo el tubo y se incubó por 5 minutos a -20°C, se centrifugó por 8 minutos a 12 000 rpm. La pastilla se lavó con 400 µL de etanol al 70% frío, se centrifugó por 5 minutos a 13 000 rpm. El tubo se colocó invertido para permitir que se seque la pastilla. Posteriormente, la pastilla de ADN se disolvió con 50 µL de agua grado biología molecular. El ADN obtenido se cuantificó en el Nanodrop (Thermo SCIENTIFIC), y se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (60 µg) en 100 mL de amortiguador TAE 1X (242 g de Tris base, 100 mL de 0.5 M EDTA pH 8, 57.1 mL de ácido acético glacial para un litro) el gel fue visualizado en un transiluminador BIO RAD® Gel Doc. XR y analizado con el Software Image Lab™.

6.8 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa “PCR” del gen silvestre *PYR4* de *U. maydis*

De acuerdo a la secuencia del gen silvestre *PYR4* obtenida de la base de datos Gene Bank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/DQ869012.1?report=fasta>) y con el software libre Primer3Plus Nucleic Acids Research 2007, se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar el gen completo en tres versiones, las cuales varían en el tamaño de las regiones 5' y 3' no traducidas. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa Sigma-Aldrich. (Tabla 3). De cada par de oligonucleótidos se determinó su temperatura de fusión (T_m) de manera experimental, mediante una reacción de PCR sometida a un gradiente de temperatura que permitiera amplificar una banda única y robusta del tamaño en pares de bases (pb) esperado. El PCR se realizó en un termociclador BioRad®T100, con la enzima DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El producto de PCR para realizar las transformaciones genéticas se obtuvo con la enzima de alta fidelidad Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity Thermo Fisher. Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 1% y se observaron en el transiluminador BIO RAD® Gel Doc. XR y con el Software Image Lab™. La identidad de los productos de PCR amplificados se verificó por digestión con las enzimas de restricción EcoRI, HindIII y XhoI. El marcador de peso utilizado fue TrackIt™ de 1 Kb. Para la reacción de digestión se incubó parte del producto de PCR de cada amplificación, con 0.5 µL de la enzima y 2 µL de buffer de reacción correspondiente, la reacción se llevó a un volumen final de 20 µL con agua grado biología molecular, ésta se incubó por una hora a 37°C. Los productos de la digestión se separaron en gel de agarosa al 1% y se visualizaron en el transiluminador como se mencionó anteriormente.

6.9 Análisis de las secuencias promotoras de los fragmentos 4042 pb y 3439 pb gen *PYR4*

Los elementos génicos de regulación de la región promotora del gen *PYR4* se analizaron con el software libre Yeasttrack (<http://www.yeasttrack.com/tfsbindingsites.php>).

6.10 Complementación (transformación) genética de *U. maydis*

6.10.1 Formación de protoplastos

La transformación se llevó a cabo mediante la formación de protoplastos, según el protocolo de Tsukuda *et al.* 1988. Se inoculó una colonia de la cepa $\Delta 406$ en MC más Higromicina B. Se incubó a 28°C durante 18-24 horas a 150 rpm. Posteriormente se inocularon 100 μL , 200 μL y 300 μL del cultivo en matraces de 500 mL que contenían 100 mL de MC. Se incubó de 18-24 horas a 28°C a 150 rpm. Después del tiempo transcurrido se midió la densidad óptica (D. O. 600nm) de cada uno de los cultivos en un espectrofotómetro Genesys 10s UV-Vis (Thermo SCIENTIFIC). Se eligió el cultivo cuya densidad óptica estuviera entre 0.8 y 0.9, éste se transfirió en dos tubos cónicos de 50 mL, se centrifugó 2,500 rpm por 7 minutos, el sobrenadante se descartó, se adicionaron 10 mL de amortiguador SCS (Apéndice) a cada tubo, se agitó (vortex) y las células se juntaron en un solo tubo para volver a centrifugar, la pastilla se re-suspendió en 1 mL de SCS. Al tubo se le agregaron enzimas líticas *Trichoderma harzianum* (100 mg·mL⁻¹; amortiguador II; ver apéndice), se agregaron volúmenes de 200 μL a tiempos de 10 minutos, se agitó lentamente en un agitador orbital oscilatorio, a intervalos de 10 minutos se observó en el microscopio (Leica DM750) para corroborar la formación de protoplastos. Cuando éstos se encuentran en una proporción aproximada al 50%, se centrifugo a 2,326 rpm durante 10 minutos, se removió el sobrenadante, éste se re-suspendió en 1 mL de SCS, las células fueron transferidas en tubos Eppendorf, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos, se removió el sobrenadante y se re-suspendió en 1 mL de STC (Apéndice) frío. Para almacenar los protoplastos a -80°C se agregó dimetilsulfóxido (DMSO) al 7% y se distribuyó en alícuotas de 70 μL .

6.10.2 Transformación genética en hielo

Para la transformación genética de *U. maydis*, se usó la versión del gen amplificada por PCR con la enzima de alta fidelidad Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity Thermo Fisher siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El producto de PCR se concentró a 65°C por 45 minutos a un volumen final de 5 μL y se agregaron 4 μL de STC y 1 μL de heparina (15 mg·mL⁻¹ en STC), la mezcla se transfirió al tubo Eppendorf que contiene 70 μL de protoplastos. Se mezcló con pipeta suavemente y se mantuvo por 10 minutos en hielo. Se añadió un volumen de 500 μL de polietilenglicol frío (PEG 40% en STC), se golpeó ligeramente y se incubó en hielo por 15 minutos. Se añadieron 500 μL de STC y se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos. Se removió el sobrenadante, la pastilla se re-suspendió en 200 μL de STC. Los protoplastos se sembraron con ayuda de una varilla de cristal estéril en placas de medio YNB sin uracilo y sin Higromicina B. Como control se incluyó una reacción sin producto de PCR, se sembró en medio YNB suplementado con uracilo (1 mg·mL⁻¹), y otra reacción sin producto de PCR sembrado en medio YNB sin uracilo. Las placas se incubaron a 28°C durante 6 días, pasado el tiempo de incubación se recuperaron las colonias transformantes en medio YNB sin uracilo.

6.11 Análisis de las cepas $\Delta pyr4$ complementadas

6.11.1 Comprobación por sensibilidad a Higromicina B

Las transformantes obtenidas en el medio YNB sin uracilo, se observaron al microscopio para confirmar la identidad de *U. maydis*. Estas se recuperaron en medio YNB sin uracilo, las placas se incubaron a 28°C de 24 a 48 horas. Las cepas transformantes se crecieron en placas de MC adicionado con Higromicina B (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), la placa se dividió en 5 partes. Se estriaron las colonias transformantes, la cepa parental ($\Delta 406$, resistente a Higromicina B) y la cepa silvestre FB2 (sensible, control). Las placas se incubaron a 28°C durante 24-48 horas.

6.11.2 Prototrofia a uracilo

Con las cepas transformantes se realizó la prueba de crecimiento en tubos con MM7 (30mM Tris-HCl) con y sin uracilo (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), se incubaron a 28°C a 150 rpm durante 48 horas.

6.11.3 Comprobación por PCR de la integración homóloga del gen *PYR4* en las cepas $\Delta pyr4$ complementadas

Las cepas se sembraron en MC líquido y se incubaron a 28°C durante 18-24 horas, para realizar la extracción de DNA y comprobar por PCR la presencia del gen *PYR4* con los oligonucleótidos 2192 y 2189 (ver tabla 3). Se utilizó la enzima DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El producto de PCR se observó en gel de agarosa al 1%.

6.12 Análisis fenotípico de las cepas $\Delta pyr4$ complementadas

Con las cepas complementadas se procedió a realizar los ensayos fenotípicos en las mismas condiciones y con los mismos agentes estresantes que los ensayos realizados a las mutantes $\Delta pyr4$.

6.13 Obtención de una cepa complementada $\Delta pyr4$ (*a1b1*) por recombinación en planta

Se infectaron las plantas de maíz con la cruce de las cepas $\Delta 404$ (*a1b1*) x la cepa complementada 758 (*PYR4*, *a2b2* 4042 pb), cepas $\Delta 404$ (*a1b1*) x 734 (*PYR4*, *a2b2* 3439 pb). Posterior a un mes de la inoculación de la planta, una vez que las agallas maduraron, éstas se colectaron y se procedió a la extracción y germinación de teliosporas, para realizar el análisis de la progenie.

6.14 Germinación de teliosporas

En condiciones de esterilidad, las agallas obtenidas se maceraron en un mortero con agua destilada estéril. El macerado fue recuperado y filtrado con un embudo y gaza en un tubo cónico de

50 mL. Este se centrifugó a 3,500 rpm durante 5 minutos. Se re-suspendió en 5 mL de agua destilada estéril con 5 mL de sulfato de cobre (CuSO_4) al 3%, 100 μL de carbenicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) y 200 μL de kanamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). El tubo se incubó por dos horas a 28°C a 150 rpm. Se realizaron dos lavados con agua destilada estéril para eliminar el material vegetal y el CuSO_4 , para ello se centrifugó el tubo 3,500 rpm durante 5 minutos. Las teliosporas obtenidas se re-suspendieron en 2 mL de agua destilada estéril, y se observaron a microscopio. Se sembraron 200 μL de la suspensión de teliosporas con perlas de vidrio estériles sobre placas de MC sólido suplementado con 0.5 % de Tritón. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas.

Después del tiempo de incubación y observar las colonias en el microscopio para corroborar la presencia de *U. maydis*, se seleccionaron 100 colonias con palillos estériles, se colocaron en un tubo cónico con 10 mL de agua destilada estéril, se colocó en el vortex por dos minutos, se sembraron 200 y 100 μL en placas de MC y se incubaron a 28°C durante 24 horas. Después de observar las colonias y de comprobar en el microscopio que se trataba de *U. maydis*, se replicaron 100 colonias en MC sólido con y sin Higromicina B ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) se incubó a 28°C durante 24 horas. Se seleccionaron aquellas colonias que crecieron en la placa de MC y que no crecieron en Higromicina B, posteriormente se procedió a determinar su sexo por ensayo de apareamiento.

6.15 Ensayo de apareamiento “Reacción fuz”

Este ensayo se realizó según lo descrito por (Banuett & Herskowitz, 1998). Para ello, las colonias seleccionadas se incubaron en MC líquido durante 24 horas, en agitación 150 rpm a 28°C . Posteriormente en MC sólido suplementado con 1% de carbón activado, se colocó una gota de 10 μL de células del sexo *a1b1* (FB1), se esperó a que la gota se seque, encima se colocaron 10 μL de la cepa a determinar su sexo (provenientes de las teliosporas). Este mismo procedimiento se repitió utilizando células del sexo *a2b2* (FB2). Como controles se incluyó una reacción de apareamiento entre las cepas FB1 x FB2, así como una gota de cada una de las cepas de manera individual en este mismo medio, de tal manera que se descartaron aquellas que por sí misma dieron reacción fuz positiva, puesto que esto indica que son diploides. Las placas se incubaron a 28°C de 24 a 48 horas, se considera una reacción fuz positiva por el crecimiento tipo algodonoso de las colonias, éstas fueron fotografiadas con una cámara CANON EOS Rebel T3i.

6.16 Comprobación de la cepa complementada (*a1b1*) proveniente del análisis de la progenie

6.16.1 Comprobación por sensibilidad a Higromicina B

Se estriaron las colonias transformantes del fragmento de 4042 pb (778-780), del fragmento de 3439 pb (806-810), la cepa parental ($\Delta 404$, resistente a Higromicina B), y la cepa silvestre FB1, siguiendo la metodología mencionada en el punto 6.10.

6.16.2 Prototrofia a uracilo

Se realizó la prueba de crecimiento en tubos con MM7 (30 mM Tris-HCl) con y sin uracilo (1 mg·mL⁻¹), se incubaron a 28° durante 48 horas

6.16.3 Comprobación por PCR de la integración homóloga del gen *PYR4*

Las cepas obtenidas del sexo (*a1b1*) comprobadas por la reacción fuz positiva, se crecieron en MC líquido para realizar la extracción de ADN como ya se mencionó anteriormente. La reacción de PCR se realizó con los oligonucleótidos 2187 y 2189, con la enzima DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, el producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

6.17 Análisis fenotípico de las cepas complementadas (*a1b1*) recuperadas de la progenie

Con las cepas complementadas se procedió a realizar los ensayos fenotípicos en las mismas condiciones y agentes estresantes que los ensayos realizados a las mutantes $\Delta pyr4$. Para el estrés osmótico: 1.4 M de cloruro de potasio (KCl), 1.3 M de cloruro de sodio (NaCl), 1.2 M de manitol y 1.8 M de sorbitol. Estrés oxidativo; 4 μ M de menadiona, 1.5 mM de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y 400 μ M de tert-butil-hidroperóxido (tBOOH).

6.18 Ensayo de la transición dimórfica

Las cepas de interés se crecieron en 5 mL de MC líquido, 28°C durante 18-24 horas, del cultivo anterior se transfirió un volumen de 200 μ L de células en 10 mL de MC líquido y se incubó a 28°C durante 18-24 horas. Pasado el tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 6,500 rpm durante 5 minutos, la pastilla de células se re-suspendió en 10 mL de ADS, se realizó un periodo de ayuno dejando a las células en incubación durante 3 horas a 28°C en agitación a 150 rpm y se incubaron a 4°C durante 48 horas (Ruiz-Herrera, *et al.*, 1995). El MM7 y MM3 con 1% de glucosa (apéndice) suplementado con uracilo (1 mg·mL⁻¹) se inoculó con 200 μ L de estas células. Los tubos se incubaron a 28°C durante 24 horas a 150 rpm. Posteriormente, 50 μ L de células se tiñeron con calcoflúor White (CFW, 18909 Sigma-Aldrich®); 150 μ L) y se observaron en el objetivo 40X en el microscopio triocular EPI-fluorescente Mod. G506T UNICO®, las imágenes fueron capturadas con el programa ScopelImage 9.0.

6.19 Ensayos de patogenicidad

Se usaron semillas maíz de la variedad “cacahuazintle”, estas se desinfectaron (ver apéndice) y fueron sembradas en macetas con mezcla de suelo general (Cinvestav-Unidad Irapuato) en condiciones de invernadero. Las plántulas de maíz se inyectaron a los 7-10 días de edad. Las cepas de interés se sembraron en MC (5 mL) suplementado de los antibióticos correspondientes.

Se incubaron de 18-24 horas a 28°C a 150 rpm. Posteriormente, se inocularon 50 mL de MC con 800 µL del cultivo anterior en las mismas condiciones de incubación. Se realizó un lavado de células con agua destilada estéril, y se ajustó la cantidad de células a 1×10^7 células·mL⁻¹ (cámara de Neubauer). Se mezcló un volumen de cada cepa sexualmente compatible (1:1), se procedió a inocular cada planta con 300 µL de dicha suspensión esto en la base del tallo con una jeringa para insulina. Se inocularon 100 plantas por cada mezcla de cepas, los signos se evaluaron en cada planta a los 14 días, según Chavan & Smith, 2014. Los signos del daño se clasificaron en 5 grados; asintomático (I), clorosis y antocianinas (II), tumor pequeño (III), tumor grande (IV) y muerte de la planta (V). Los datos se analizaron con la prueba Kruskal-Wallis con el post-test Dunn ($P \leq 0.05$) en el programa PRISM de GraphPad. Las plantas fueron fotografiadas con una cámara CANON EOS Rebel T3i.

6.20 Diseño de un cassette de interrupción con el gen *PYR4* como marcador de selección

Para poder implementar el gen *PYR4* y demostrar que su uso es viable como marcador de selección auxotrófico en *U. maydis*, se seleccionó el gen *HOG1* para deletar. Para ello se diseñaron oligonucleótidos para el gen *HOG1* y para el gen *PYR4*, además de sus respectivas regiones UTR 5' y 3'. Para la comprobación de la integración homóloga del cassette de interrupción, se diseñaron oligonucleótidos anidados y externos en el gen *HOG1* basados en la metodología de (Davidson *et al.*, 2002). El PCR se realizó en el termociclador BioRad®T100 y con la enzima DNA Taq polimerasa Expand™ Long Range dNTPack (Roche).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis *in silico* del gen *PYR4*

Para diseñar los oligonucleótidos y estudiar la función de la dihidroorotato deshidrogenasa (*PYR4*) de *U. maydis*, se realizó la búsqueda de la secuencia de nucleótidos en la base de datos de NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/DQ869012.1?report=genbank>. Este gen está ubicado en el cromosoma 8, tiene un marco de lectura abierto de 2033 pb, el cual no está interrumpido por intrones. Está flanqueado por el gen *UMAG_10642* (río arriba) que codifica para una proteína relacionada con los complejos de ribonucleoproteínas en el procesamiento y empalme de ARN. Río abajo por el gen *UMAG_03216* que codifica la fosfoinositol 3 quinasa (Figura 4).

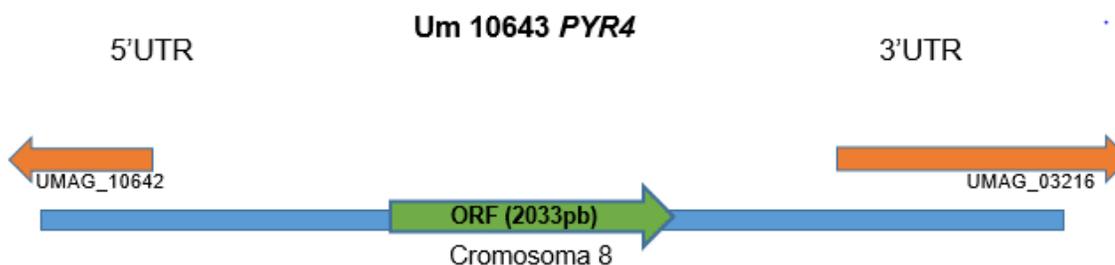


Figura 34. Esquema del gen *PYR4*. Representación del gen *PYR4*. Las flechas denotan el ORF, verde *PYR4*. El gen está ubicado en el cromosoma 8. A los extremos se muestran los genes vecinos que flanquean a este gen, *UMAG_10642* y *UMAG_03216*.

En la búsqueda de la secuencia proteica codificada por el gen *PYR4* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/112950051>, encontramos que está compuesta por 677 aminoácidos, el dominio DHOD fue delimitado en el sitio de NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. El dominio DHOD abarca de la posición 105-490 (Figura 5), cataliza la oxidación de dihidroorotato a orotato, es la única reacción redox realizada en la biosíntesis *de novo* del uridín-monofosfato (UMP), el cual es la base de todos los nucleótidos de pirimidina (Witz, *et al.*, 2012).

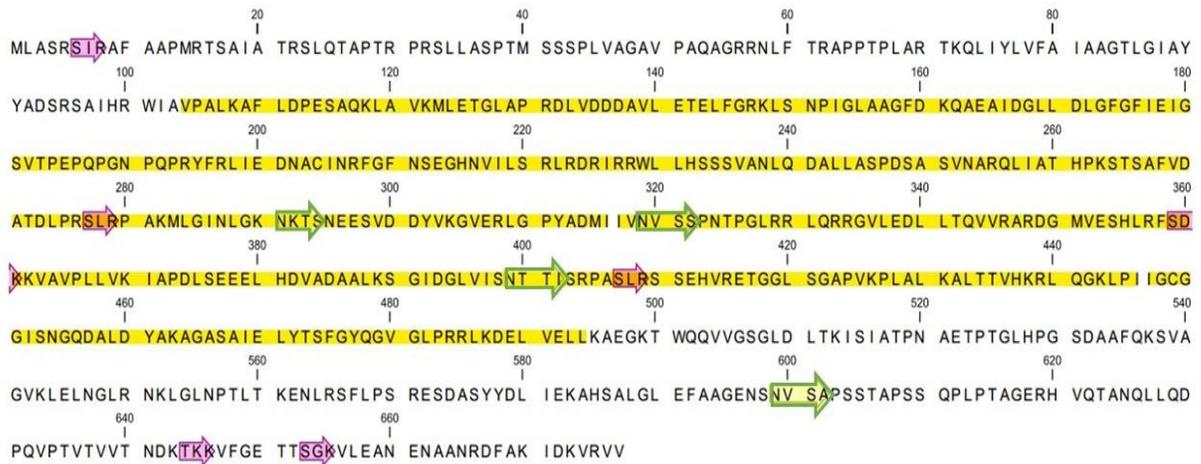


Figura 45. Dominios de la proteína DHODH de *U. maydis*. Secuencia de aminoácidos de Pyr4. La proteína está formada por 677 aminoácidos, las flechas rosas indican los sitios probables de fosforilación por la quinasa C, las flechas verdes indican los sitios probables de N-glicosilación. En amarillo se muestra la región del dominio DHOD_2 (105-490).

La biosíntesis de pirimidina de *ново* es una vía importante y conservada entre organismos procariontes y eucariotes. Realizamos una comparación entre la síntesis de uracilo en *S. cerevisiae* y en *U. maydis*, así como la búsqueda de los genes homólogos en *U. maydis*, (Tabla 2). El gen *URA2* de *S. cerevisiae* es un gen bifuncional ya que cataliza los dos primeros pasos enzimáticos en la biosíntesis de novo de pirimidinas, el gen *URA4* codifica para la enzima Dihidroorotasa que cataliza el tercer paso enzimático convirtiendo el carbamoil-L-aspartato en Dihidroorotato, la Dihidroorotato deshidrogenasa codificada por el gen *URA1* cataliza el cuarto paso convirtiendo el ácido dihidroorótico en ácido orótico, la Fosforribosiltransferasa orotato es una isoenzima que cataliza la quinta etapa convirtiendo el orotato en orotidina-5-fosfato *URA5* tiene un gen parálogo *URA10* el cual surgió de la duplicación del genoma completo, el sexto paso es llevado a cabo por la enzima Orotidina-5-fosfato descarboxilasa (OMP) convirtiendo OMP en monofosfato de uridina (UMP) y por último la enzima Uridilato quinasa codificada por el gen *URA6* convierte el monofosfato de uridina (UMP) en uridina-5-difosfato (Assis de Gontijo, *et al.*, 2014). (Tabla 2).

La función de *PYR4* que codifica para la enzima Dihidroorotato deshidrogenasa en *U. maydis* ha sido descrita en algunos organismos y específicamente en este hongo, se deleta el gen da como resultado la pérdida de la patogenicidad y la auxotrofia a uracilo (Zameitat, *et al.*, 2007).

Sin embargo, se desconoce cómo se comportan las mutantes $\Delta pyr4$ respecto a condiciones de estrés *in vitro* así como la probable causa de que se afecte de manera severa la patogenicidad. Así mismo, no ha sido estudiada la opción de uso de este gen como marcador de selección, por ejemplo, la extensión de la región 5'UTR y 3'UTR necesaria para obtener la versión del gen suficiente para complementar el fenotipo de producido por la deleta del gen *PYR4*.

Tabla 2 Genes que participan en la vía de síntesis de las pirimidinas en *U. maydis*

ID	Gen	Enzima	Homólogo en levadura
um10967	<i>PYR1</i>	Carbamoilfosfato sintetasa	<i>URA2</i>
UMAG_15005 Cromosoma 9	<i>PYR2</i>	Aspartato transcarbamilasa	<i>URA2p</i>
UMAG_01521 Cromosoma 3	<i>PYR3</i>	Dihidroorotasa	<i>URA4</i>
Um10643 Cromosoma 8	<i>PYR4</i>	Dihidroorotato deshidrogenasa	<i>URA1</i>
UMAG_10021	<i>PYR5</i>	Fosforribosiltransferasa orotato	<i>URA5/URA10</i>
UMAG_04214 Cromosoma 12	<i>PYR6</i>	Orotidina-5-fosfato descarboxilasa	<i>URA3</i>
UMAG_11125		Uridilato quinasa	<i>URA6</i>

La secuencia de proteína Pyr4 se utilizó para realizar un análisis tipo BLASTp en la base de datos del NCBI, esto con la finalidad de obtener las secuencias homólogas reportadas en otros organismos y posteriormente, se realizó un alineamiento de secuencias en el programa CLC Main Workbench. Para ello utilizamos las secuencias de: *Ustilago hordei*, *Sporisorium reilianum*, *Puccinia graminis*, *Puccinia tritici*, *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum*, catalogados como los hongos fitopatógenos más importantes por la revista Molecular Plant Pathology basándose en su importancia científica y daños económicos producidos en la agricultura (Dean, *et al.*, 2012).

Además, también se incluyeron las secuencias correspondientes a *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae*. Con dicha información se realizó un cladograma para analizar la distribución y el agrupamiento en clados, dada por la similitud en las secuencias de los diferentes organismos (Figura 6).

Se observó que Pyr4 de *U. maydis* se agrupó con las secuencias de *U. hordei* y *S. reilianum*, estos tres hongos son clasificados dentro del grupo de los “carbones” por sus características infectivas, además dentro del mismo clado se encuentra *Puccinia*, en términos históricos, la roya producida por *P. graminis* ha sido una de las más importante por dañar cultivos de trigo (Jin, 2011), de esta manera se agruparon así los hongos basidiomicetos.

Por otro lado, tenemos a *M. oryzae* y *N. crassa*, éstos se agruparon en un clado externo el cual corresponde al phylum de *ascmycota*, *M. oryzae* es el agente causal de la enfermedad de la quemazón del arroz considerada la más destructiva (Fernandez & Orth, 2018).

Por otro lado, se observó que *B. cinerea* y *F. oxysporum* aunque son también ascomicetos, no se agruparon con ninguna de las secuencias de los otros organismos analizados.

Además, se incluyó la secuencia homologa de la proteína Pyr4 pero de la levadura *S. cerevisiae* (*URA1*), este organismo es considerado un organismo modelo. importante para estudiar aspectos de células eucariotas (Duina, *et al.*, 2014). Además de que las mutantes auxotróficas se han empleado con frecuencia en experimentos de ingeniería genética y biología molecular (Zhang, *et al.*, 2014).

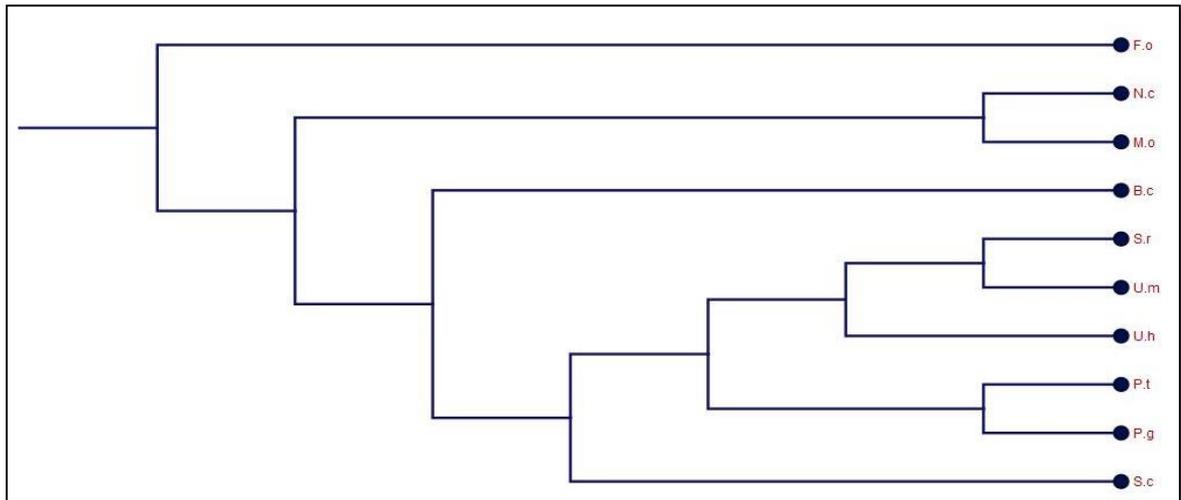


Figura 56. Cladograma de Pyr4. Se alinearon secuencias de la proteína Pyr4 de hongos fitopatógenos más importantes, así como las de las levaduras *S. cerevisiae* y *N. crassa*. F.o; *Fusarium oxysporum*, N.c; *Neurospora crassa*, M.o; *Magnaporthe oryzae*, B.c; *Botrytis cinerea*, S.r; *Sporisorium reilianum*, U.m; *Ustilago maydis*, U.h; *Ustilago hordei*, P.t; *Puccinia tritici*, P.g; *Puccinia graminis* y S.c; *Saccharomyces cerevisiae*. El cladograma se realizó en el programa CLC Main Workbench.

7.2 Comprobación de la auxotrofia a uracilo de las cepas mutantes $\Delta pyr4$

Para comprobar la auxotrofia a uracilo de la colección de cepas *ura⁻ Δ404*, *Δ405*, *Δ406*, crecimos a las cepas en MM7 adicionado con uracilo $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y sin uracilo, de esta manera fue posible comprobar que las cepas podían crecer solamente en el medio al que le fue añadido el uracilo de manera exógena. Como control se utilizó la cepa silvestre FB1 del sexo *a1b1* ya que esta cepa tiene la capacidad de crecer en ambos medios. Se demostró así que las cepas mutantes tienen interrumpido el gen *PYR4* de tal forma que no pueden crecer sin uracilo adicionado al medio mínimo (Figura 7).

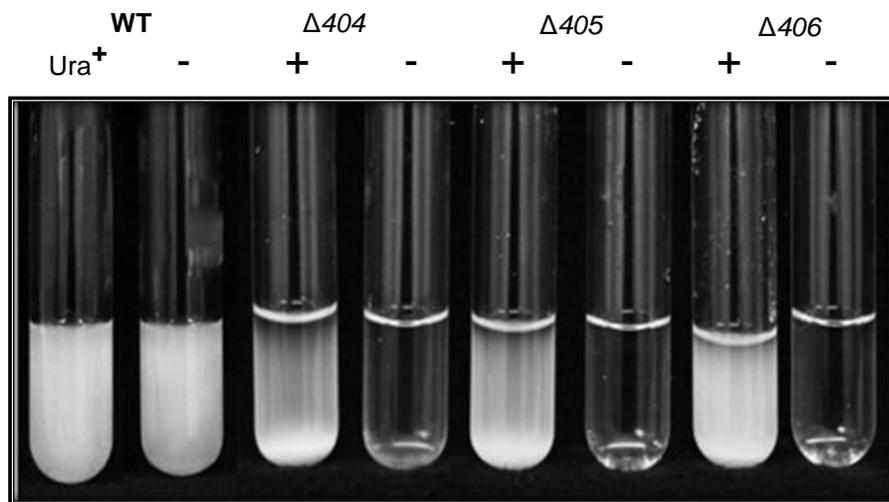


Figura 67. Comprobación de la auxotrofia a uracilo. Las cepas $\Delta 404$, $\Delta 405$ y $\Delta 406$ se crecieron en medio MM7 (adicionado con $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de uracilo (Ura⁺) o en el mismo medio sin uracilo (Ura⁻). Como control se incluyó a la cepa silvestre FB1. Los cultivos se incubaron 24 h a 28°C en agitación constante. Los tubos se fotografiaron con la cámara CANON EOS Rebel T3i. El experimento se realizó por triplicado.

7.3 Concentración óptima de uracilo para permitir el crecimiento de las mutantes

Para determinar la concentración a usar de uracilo en los experimentos posteriores y definir la concentración en la que pueden crecer las cepas mutantes $\Delta pyr4$ en MM7, las cepas de interés se sembraron en placas de MM7 con cantidades variables de uracilo: $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se utilizaron las 3 cepas mutantes y el control positivo la cepa silvestre WT del sexo *a1b1*, como control se incluyó una caja con medio completo, puesto que crecerán ambos tipos de cepas sin necesidad de agregar uracilo exógeno.

Se observó que la cepa WT creció en todas las concentraciones de uracilo analizadas, como era lo esperado. En las cajas de MM7 en donde la concentración más baja de uracilo fue de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ no se observó un crecimiento uniforme en las diferentes diluciones en las cepas $\Delta pyr4$, mientras que en la concentración más alta que fue de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ se observó crecimiento uniforme hasta la dilución de 10^4 células mL^{-1} , cabe mencionar que esta concentración se utilizó para realizar experimentos posteriores, tanto en medio líquido como en sólido, puesto que no hay diferencia en el crecimiento (Figura 8).

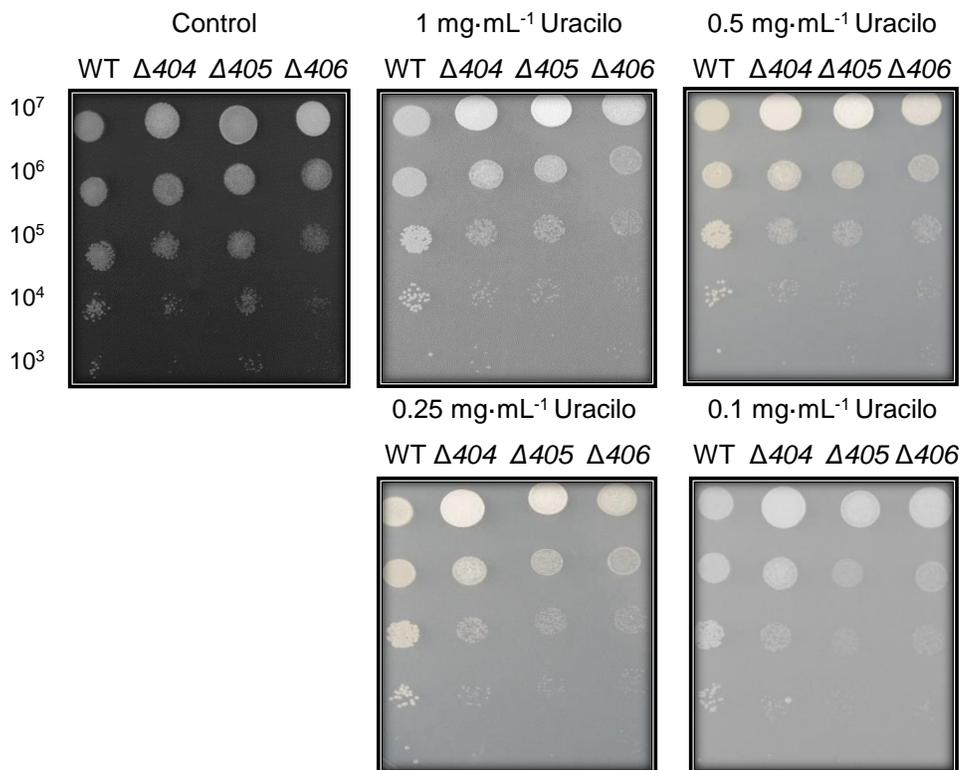


Figura 7.8. Determinación de la concentración de uracilo para permitir el crecimiento de las cepas $\Delta pyr4$. Las células se sembraron en MM7 con la cantidad de uracilo indicada en cada panel. Cepas $\Delta pyr4$ ($\Delta 404$ - $\Delta 406$), cepa FB1 WT control positivo. Las cajas se incubaron a 28°C durante 48 h. Se fotografiaron con la cámara CANON EOS Rebel T3i. El experimento se realizó por triplicado.

7.4 Selección en ácido-5-fluororótico (5-FOA)

En los experimentos de manipulación genética, la selección de cepas mutantes se realiza empleando un marcador de selección adecuado, además de los marcadores de resistencia a los antibióticos que por lo general son los más usados, el gen *URA3* es empleado como marcador de selección auxotrófico en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, este gen codifica la orotidina 5-fosfato descarboxilasa. Dicha enzima participa en la síntesis *de novo* de los ribonucleótidos de pirimidina, su interrupción resulta en la auxotrofia a uracilo y en la resistencia al ácido 5-fluororótico (Hamedi, *et al.*, 2013). Utilizamos el 5-FOA como agente de selección, en MM7 se agregó de manera exógena el 5-FOA en presencia de uracilo (1 mg·mL⁻¹) y en otra placa se agregó solamente el uracilo, las cepas de interés se estriaron en dichos medios. Se incluyó la cepa 758 complementada con fragmento de 4042 pb del gen *PYR4* y la cepa 806 complementada con el fragmento de 3439 pb del gen *PYR4* (ver más adelante) y la cepa silvestre FB1, la mutante $\Delta pyr4 \Delta 405$ (Figura 9).

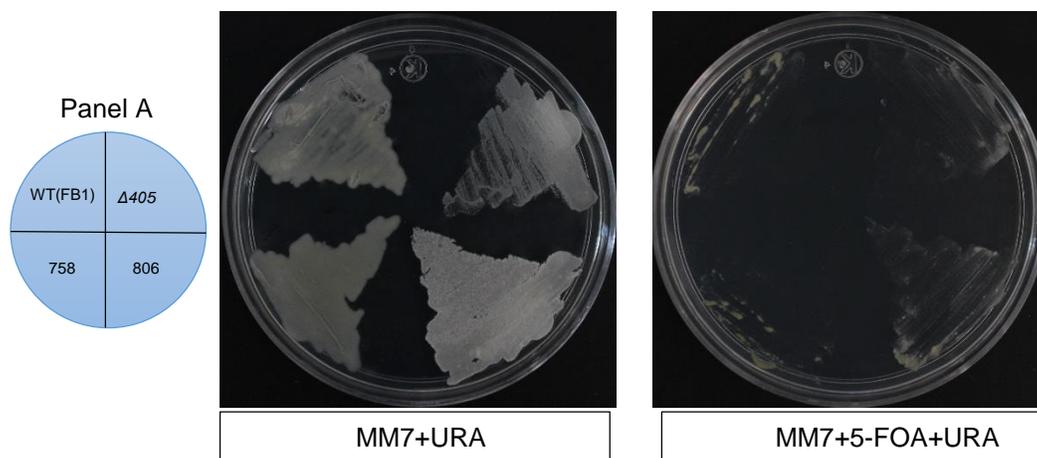


Figura 89. Selección en 5-FOA. Las cepas indicadas en el panel A se sembraron en MM7 con y sin 5-FOA y uracilo $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las placas se incubaron a 28° durante 48 h. Las cajas se fotografiaron con la cámara CANON EOS Rebel T3i.

En la caja con MM7+Ura usada como control, todas las cepas son capaces de crecer si problema, la mutante $\Delta pyr4$ creció sin dificultades por la adición del uracilo de manera exógena, sin embargo, cuando se agregó el 5-FOA a la caja, ninguna cepa fue capaz de crecer. La literatura indica que en presencia del agente selectivo 5-FOA, las cepas mutantes en el gen *URA3* resultan ser resistentes al dicho agente, por lo que pueden crecer. Mientras que las cepas no afectadas en dicho gen el 5-FOA resulta tóxico (Hamedi, *et al.*, 2013).

En el caso de las mutantes $\Delta pyr4$ de *U. maydis*, su auxotrofia está dada por la mutación del gen *PYR4*, en *S. cerevisiae* el gen homólogo es *URA1* (Assis de Gontijo, *et al.*, 2014) la cepa mutante resultó ser sensible al 5-FOA, debido a que se encuentra interrumpida en otro paso de la vía de síntesis en donde involucra *URA1* y no a *URA3*. Además de que la enzima en *U. maydis* que codifica el gen *PYR4* es la dihidroorotato deshidrogenasa al contrario de *S. cerevisiae* (*URA3*) que se trata de la orotidina 5-fosfato descarboxilasa, aunque ambas participan en la síntesis de uracilo, pero en diferentes pasos enzimáticos. Cabe señalar que en *U. maydis*, el homólogo del gen *URA3* es *PYR6*.

Este experimento ayuda a corroborar que la enzima con la que trabajamos es la correcta, por tal manera no fue capaz de crecer en el agente de selección 5-FOA.

7.5 Análisis fenotípico de las cepas mutantes

Para analizar el comportamiento de las cepas auxótrofas a uracilo en respuesta a dos condiciones de estrés, osmótico y oxidativo, se procedió a someter a las cepas de interés bajo las condiciones de estrés mencionadas. El estrés osmótico para observar la respuesta a diferentes solutos en una concentración determinada, además que se relaciona con la turgencia celular. Mientras que el estrés oxidativo para observar la respuesta a los diferentes agentes oxidantes, de

igual manera que en el osmótico a concentraciones determinadas, relacionadas con la respuesta del hongo y la capacidad de infectar a la planta del maíz.

El potencial osmótico es uno de los factores más importantes para el desarrollo de los hongos, ya que la disminución del factor reduce el crecimiento, aumenta la tasa de respiración y la energía se gasta para mantener la turgencia de las células (Martínez-Villareal, *et al.*, 2016). Este tipo de estrés se realizó, puesto que es importante conocer el comportamiento de éstas mutantes a una situación similar que se enfrentará al momento del hongo infectar la planta.

En este experimento podemos observar nuestra caja control de MM7 con uracilo $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sin agentes de estrés, las cepas $\Delta pyr4$ crecieron de manera proporcional, es decir, un poco menos en comparación con la cepa silvestre FB1. Sin embargo, al someter las cepas a las condiciones de estrés osmótico, la mutantes $\Delta pyr4$ se comportaron de manera sensible ante el efecto de estos agentes: 1.4 M de KCl, 1.3 M de NaCl, 1.2 M de manitol y 1.8 M de sorbitol (Figura 10).

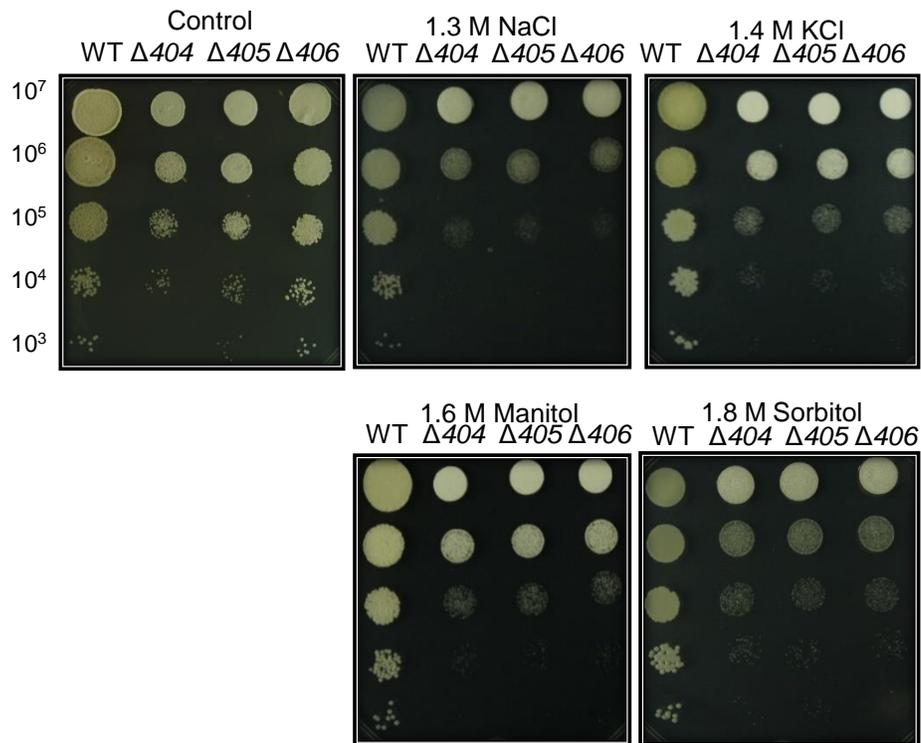


Figura 940. Respuesta a estrés osmótico de las cepas mutantes $\Delta pyr4$. Se sembraron diluciones seriadas de las cepas FB1 y mutantes $\Delta pyr4$ ($\Delta 404$, $\Delta 405$ y $\Delta 406$). Se inocularon gotas de $10 \mu\text{l}$ sobre placas de MM7 con el agente estresante indicado. Las placas se incubaron a 28°C durante 96 horas. Se fotografiaron con una cámara CANON EOS Rebel T3i. El experimento se realizó por triplicado.

Este resultado indica que la interrupción del gen *PYR4* conduce a una respuesta de sensibilidad bajo éstas condiciones de estrés osmótico, comparada con la cepa silvestre.

La exposición a NaCl o KCl impone un estrés osmótico y catiónico, lo que provoca la pérdida de agua, reducción en el tamaño de las células y la pérdida de la presión de turgencia (Kühn & Klipp, 2012).

En un estudio previo relacionado al estrés osmótico y la patogenicidad en *U. maydis*, la deleción gen *UmTco1*, homólogo del gen *Tco1* de *Cryptococcus neoformans*, este gen codifica para una histidina quinasa importante para el desarrollo de la patogénesis, en este experimento se realizó una mutante $\Delta umtco1$, las cepas mostraron crecimiento retardado en comparación con la cepa control bajo condiciones de estrés osmótico, además en las pruebas de patogenicidad, éstas mutantes no fueron capaces de desarrollar todos los signos de la enfermedad, puesto que se limitó a la producción reducida de antocianinas (Hong Yun, *et al.*, 2017).

Ademas está documentado que la reducción del potencial osmótico en hongos fitopatogenos reduce el crecimiento y el desarrollo de éstos (Cervantes-García *et al.*, 2003) por ejemplo en estudios realizados con *Macrophomina phaseolina* hongo fitopatógeno para el frijol, se observó en experimentos *in vitro* con solutos como NaCl, KCl y sacarosa reducción de la patogenicidad así como su crecimiento, ademas el estrés osmótico provocó acumulación de osmolitos y polioles como el sorbitol, el manito, el glicerol, entre otros (Tijerina-Ramírez, *et al.*, 2014).

El estrés biótico, como resultado de las interacciones planta-patógeno, induce la acumulación de especies reactivas de oxígeno por parte de la planta como una respuesta de defensa, causando un daño oxidativo severo al patógeno, el cual debe de ser capaz de poder resistir este daño, si es así esto favorecerá su proliferación dentro de la planta con el consiguiente desarrollo de la enfermedad (Jamil Samsatly, 2018).

Para determinar la respuesta de las mutantes $\Delta pyr4$ ante el estrés oxidativo, se realizó este experimento con las siguientes condiciones oxidantes: 4 μ M de menadiona, 1.5 mM de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y 400 μ M de tert-butil-hidroperóxido (tBOOH)). En este tipo de estrés a diferencia del osmótico fue mucho más severo, puesto que la sensibilidad de las cepas auxótrofas ante dichas concentraciones con cada agente fue mucho más evidente (Figura 11).

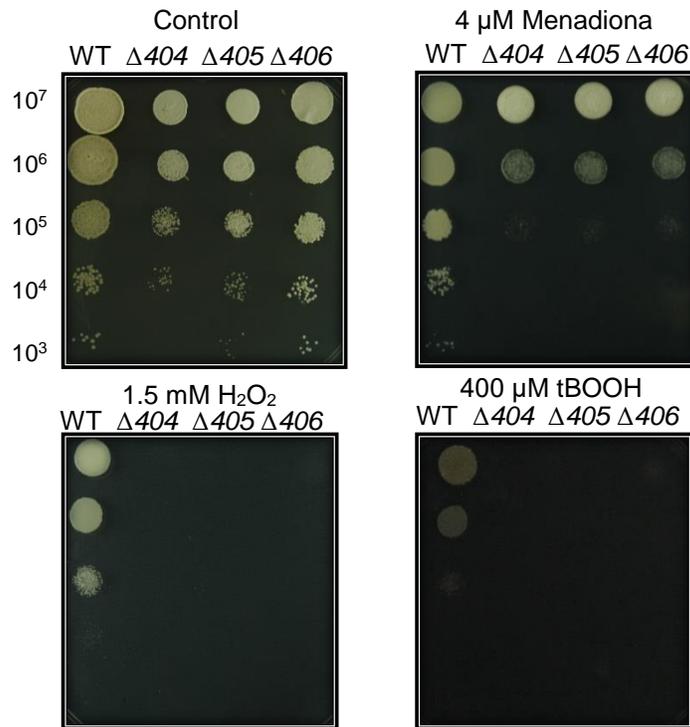


Figura 1044. Respuesta a estrés oxidativo de las cepas mutantes *Δpyr4*. Se prepararon diluciones seriadas de las cepas FB1 y mutantes *Δpyr4* (*Δ404*, *Δ405* y *Δ406*). Se sembraron gotas de 10 μ l sobre placas de MM7 con el agente estresante indicado. Las placas se incubaron a 28°C durante 96 horas. Las cajas se fotografiaron con una cámara CANON EOS Rebel T3i. El experimento se realizó por triplicado.

Una de las primeras acciones de las plantas después del reconocimiento de patógenos, es la respuesta hipersensible, que conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno, principalmente superóxido (O_2^-) y H_2O_2 , en el sitio de intento de invasión (Jamil Samsatly, 2018). En este experimento se observó que las mutantes *Δpyr4* no fueron capaces de crecer en presencia de 1.5 mM de H_2O_2 , mientras que a ésta concentración se observó un crecimiento considerable de la cepa silvestre, un resultado similar fue observado en presencia de tBOOH, mientras que la concentración de 4 μ M de menadiona prácticamente no inhibió el crecimiento de la cepa silvestre, pero fue muy claro el efecto observado en las mutantes *Δpyr4*. Señalando así la importancia de la síntesis de uracilo en respuesta al estrés oxidativo.

Las mutaciones en el gen *URA3* en *S. cerevisiae* da como resultado auxotrofia a uracilo y está relacionada con la sensibilidad a este tipo de estrés, puesto que se observó que las mutantes crecen con dificultad en un medio mínimo con uracilo combinado con diferentes factores de estrés (Swinnen, *et al.*, 2015).

7.6 Amplificación del gen silvestre *PYR4* de *U. maydis* por “PCR”

Se diseñaron diferentes pares de oligonucleótidos para amplificar el gen completo *PYR4* que incluyera sus regiones regulatorias. El primer par amplifica un producto de PCR de 4042 pb con 1183 pb de región promotora, y 806 pb de región terminadora utilizando los oligonucleótidos 2187 y 2189 (Tabla 3). Para comprobar la identidad del producto de PCR amplificado se realizó una digestión enzimática con *EcoRI*, *HindIII* y *XhoI* de manera independiente (Figura 12).

Además, se realizó la amplificación de una versión más corta del gen, utilizando los oligonucleótidos 2192 y 2189 (Tabla 2), que amplifica 3439 pb, posee 594 pb de región promotora y 806 pb de región terminadora. De la misma manera que el fragmento anterior, se realizó una digestión enzimática para comprobar su identidad (Figura 13).

Tabla 3. Pares de oligonucleótidos y sus características

Oligonucleótidos	Amplificación	T _m	T elongación
<u>2187/2189</u>	4042 pb	60.8°C	4'15"
2188/2189	3742 pb	63°C	3'45"
<u>2192/2189</u>	3439 pb	65°C	3'30"
2192/2201	3107 pb	66°C	3'10"

Posteriormente estos dos fragmentos se utilizaron para realizar la transformación genética de las cepas $\Delta pyr4$ de *U. maydis*, y comprobar así la función de este gen.

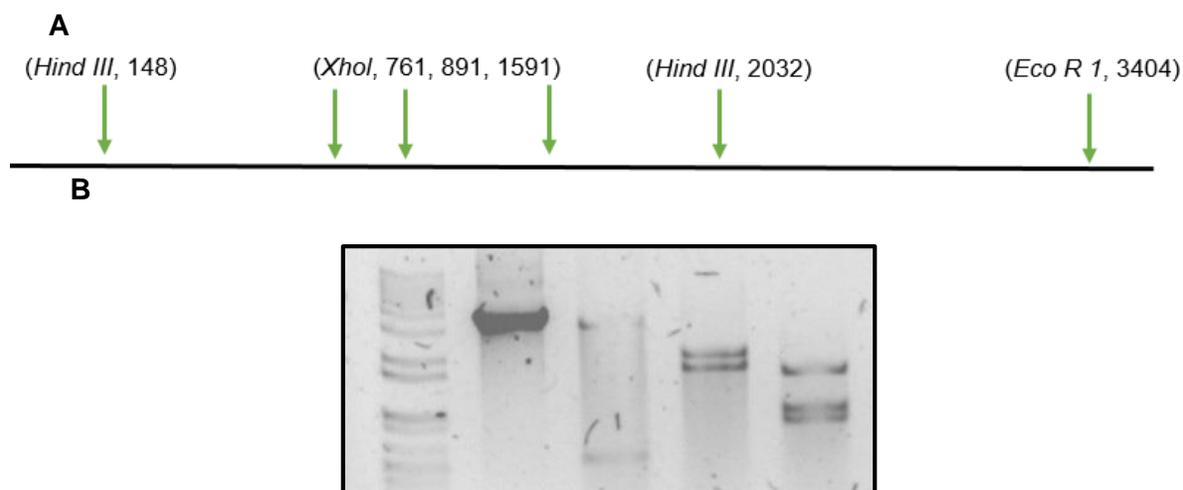


Figura 1142. Amplificación del gen silvestre *PYR4* (4042 pb) y análisis por restricción. A) Mapa de restricción del gen *PYR4* fragmento de 4042 pb. B) Electroforesis de la amplificación y la digestión del gen silvestre *PYR4*. M marcador de peso molecular, carril 1 amplificación del gen silvestre (4042 pb), carril 2 digestión con *EcoRI*, carril 3, digestión con *HindIII* y carril 4 digestión con *XhoI*.

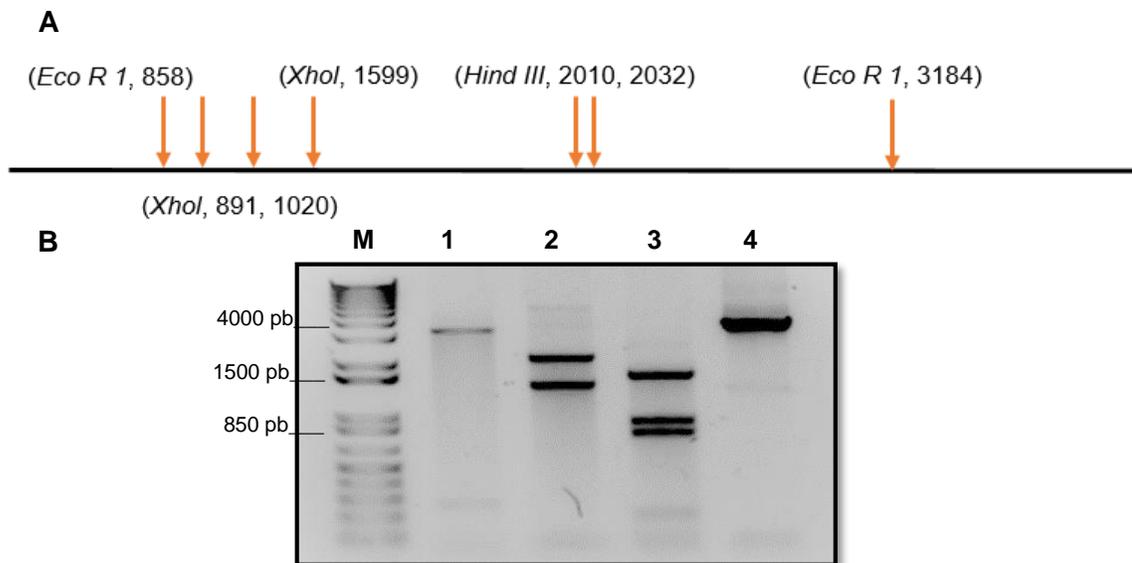


Figura 1243. Amplificación del gen silvestre *PYR4* (3439 pb) y análisis de restricción. A) Mapa de restricción del gen *PYR4* fragmento de 3439 pb. B) Electroforesis de la digestión y la amplificación del gen silvestre *PYR4*. carril M marcador de peso molecular, carril 1 amplificación del gen silvestre *PYR4* 3439 pb, carril 2 digestión con *EcoRI*, carril 3, digestión con *HindIII* y carril 4 digestión con *XhoI*.

7.7 Análisis de la región promotora de los fragmentos 4042 y 3439 pb del gen *PYR4*

Con la finalidad de identificar los elementos génicos presentes en la región promotora del gen *PYR4*, se analizó en el software (<http://www.yeasttract.com/tfsbindingsites.php>). Como se mencionó anteriormente la secuencia promotora del fragmento de 4042 pb es de 1183 pb, en ésta se localizaron 73 sitios de unión a diferentes factores de transcripción (Figura 14A). Por otro lado, en el caso del fragmento de 3439 pb que posee una región promotora más pequeña con tan solo 579 pb, se localizaron solamente 32 sitios de unión a factores de transcripción (Figura 14B).

Los factores de transcripción son aquellas proteínas necesarias para iniciar el proceso de transcripción, la principal función de éstos además de tener una función enzimática, es reconocer los promotores (Leake, 2018). Cabe señalar que con las dos versiones del gen se llevó a cabo la transformación genética de manera exitosa, esto indica que en el caso del fragmento de 3439 pb, la región promotora posee los elementos necesarios que le permiten al gen transcribirse de manera correcta, ya que, al tener 32 sitios de unión, estos son suficientes para llevar a cabo la expresión del gen *PYR4*.

7.8 Complementación genética de *U. maydis*

La transformación de *U. maydis* se realizó por medio de protoplastos de la cepa $\Delta 406$ (*a2b2*). Para ello, utilizamos como DNA transformante el producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos (2187 y 2189) que amplifican un fragmento de 4042 pb, así como el fragmento de 3439 pb obtenido con los oligonucleótidos (2192 y 2189). Se recuperaron varias transformantes de los dos eventos de transformación (Tabla 1). Para determinar la complementación de éstas transformantes, se realizaron tres pruebas: 1) Sensibilidad en medio con Higromicina B. 2) Crecimiento en un medio con uracilo y sin uracilo para observar la prototrofia. 3) Por PCR para determinar la presencia del gen *PYR4*.

Para determinar la sensibilidad a Higromicina B, las transformantes se estriaron en MC sólido con 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del antifúngico. Como control se incluyó la cepa FB2 y la cepa mutante $\Delta 406$ (Figura 15).

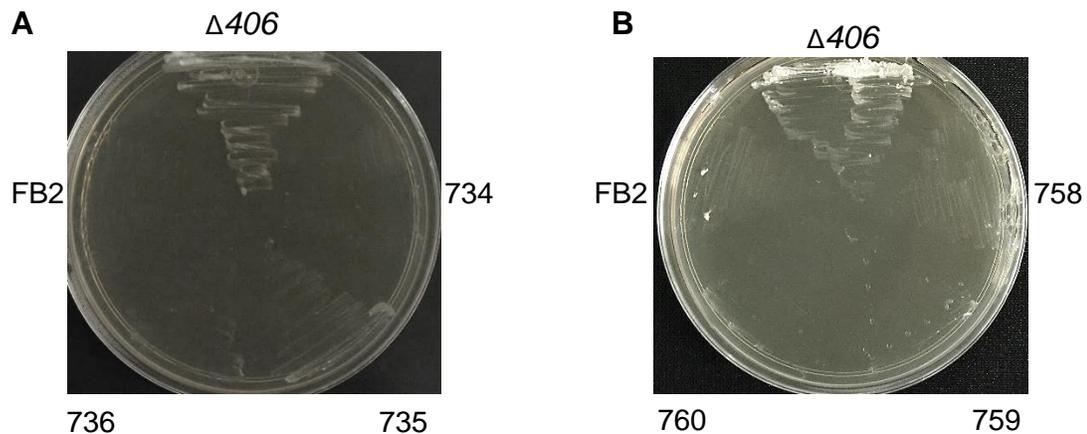


Figura 1445. Análisis de sensibilidad a Higromicina B. Las cepas se estriaron en MC con Higromicina B 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cepa $\Delta 406$ y FB2 controles. A) Cepas 734-736 complementadas con la versión de 3439 pb del gen *PYR4*. B). Cepas 758-760 complementadas con la versión de 4042 pb. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 h. Las cajas se fotografiaron con una cámara CANON EOS Rebel T3i. El experimento se realizó por triplicado

Observamos que la cepa silvestre no es capaz de crecer en este medio de cultivo, como era lo esperado. Contrariamente, la mutante $\Delta 406$ creció sin ninguna dificultad, puesto que la mutación se obtuvo con el gen de resistencia a Higromicina B. En el caso de las transformantes 734, 735, 736 (Figura 15A) 758, 759 y 760 (Figura 15B) observamos que no son capaces de crecer en este medio, debido a la presencia del Higromicina B. Este resultado indicó que la recombinación del fragmento de 4042 pb y del 3439 pb ocurrió en el *locus PYR4* (*Um10643*), puesto que se eliminó el gen de resistencia a Higromicina B (HPH) y en su lugar se integró el fragmento que codifica para el gen silvestre *PYR4*.

Así mismo, las cepas se crecieron en MM7 a 28°C con uracilo y sin uracilo, de esta manera observamos que las cepas complementadas crecieron en ambos medios de cultivo de forma similar a la cepa silvestre. Este ensayo no permitió determinar que recuperaron la capacidad para crecer en MM sin uracilo, esto debido a que portan el gen silvestre *PYR4*, el cual se debe de transcribir y traducir correctamente. De tal manera tanto la versión de 4042 que contiene 1183 pb de región promotora, así como la versión corta que contiene una región promotora de 594 pb, nos indica que es suficiente para que el gen sea funcional y pueda ser utilizado como marcador de selección (Figura 16).

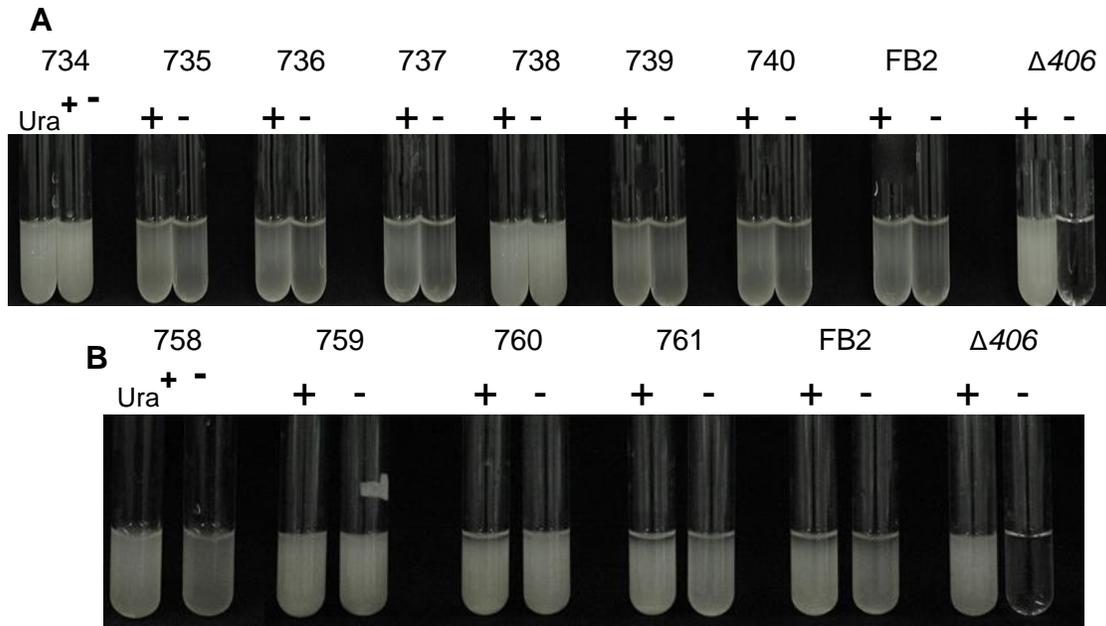


Figura 1546. Prototrofia a uracilo. Las cepas se crecieron en medio MM7 adicionado con 1 mg·mL⁻¹ de uracilo (Ura⁺) o MM7 sin uracilo (Ura⁻). Como control se incluyó a la cepa silvestre FB2 y la mutante Δ406. A) Cepas 734-740; complementadas con la versión de 3439 pb del gen *PYR4*. B) Cepas 758-761; complementadas de la versión de 4042 pb del gen *PYR4*. Los cultivos se incubaron 24 h a 28°C en agitación constante. Los tubos se fotografiaron con la cámara CANON EOS Rebel T3i. El experimento se realizó por triplicado.

Respecto a la reacción de PCR se utilizó el par de oligonucleótidos 2192 y 2189 que amplifican el fragmento de 3439 pb del gen *PYR4* fue posible identificar la presencia del gen *PYR4* en ambos tipos de cepas complementadas (Figura 17), corroborando así que la sensibilidad a Higromicina B y la prototrofia a uracilo se debe a la re-integración del gen *PYR4* en el locus *Um10646*. Es decir, producto de la integración homóloga.

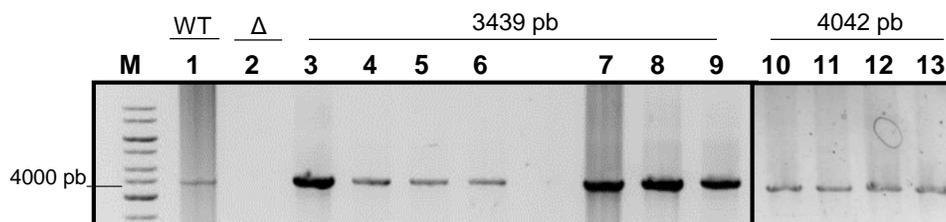


Figura 1647 Figura 17. Identificación por PCR del gen *PYR4*. Amplificación de la versión de 3439 pb del gen *PYR4*. Carril 1 cepa WT, carril 2 mutante auxótrofa $\Delta 406$, carriles 3-9 $\Delta pyr4$ complementadas 734-740 con el fragmento de 3439 pb. Carriles 10-13 $\Delta pyr4$ complementadas 758-761 complementadas con el fragmento de *PYR4* de 4042pb. M, marcador de peso molecular, 1 kpb.

7.9 Análisis fenotípico de las cepas complementadas

Con las cepas complementadas obtenidas de los eventos de transformación genética, se procedió a realizar el análisis fenotípico previamente conducido en las cepas auxótrofas $\Delta pyr4$. El estrés osmótico: 1.4 M de KCl, 1.3 M de NaCl, 1.2 M de manitol y 1.8 M de sorbitol. Las cepas se crecieron en MM7, se incluyó a la cepa silvestre FB2 y la mutante $\Delta 406$ como controles, la cepa 758 correspondiente a las cepas complementadas con el fragmento 4042 pb, y la cepa 734 correspondiente al fragmento de 3439 pb del gen *PYR4* (Figura 18).

En este análisis se observó crecimiento similar en la caja con NaCl hasta la dilución 10^5 en las dos cepas complementadas comparando con la cepa silvestre, mientras que en la cepa $\Delta 406$ se observó ligeramente la sensibilidad a este agente. Igualmente se observó el mismo fenotipo en la caja con KCl, sin embargo, es este caso fue más contrastante la sensibilidad de la cepa mutante con respecto a las cepas complementadas (Figura 18). En el caso del sorbitol y manitol, la cepa WT y las complementadas crecieron en todas las diluciones, y se observó la sensibilidad por parte de la cepa mutante. Los resultados de análisis fenotípico demostraron que las cepas complementadas, ya sea con el fragmento de 4042 pb y las obtenidas con el fragmento de 3439 pb se comportaron de manera similar a la cepa silvestre FB2, demostrando así que el fenotipo observado es debido a la delección del gen *PYR4*, cabe mencionar que este no es revertido simplemente por la adición de uracilo al medio de cultivo, puesto que las cajas de los primeros ensayos de estrés están suplementadas con este compuesto, y en ellas es posible observar el defecto para responder de una manera adecuado al estrés osmótico. Destacando así que este resultado es debido a la reintegración el gen *PYR4*.

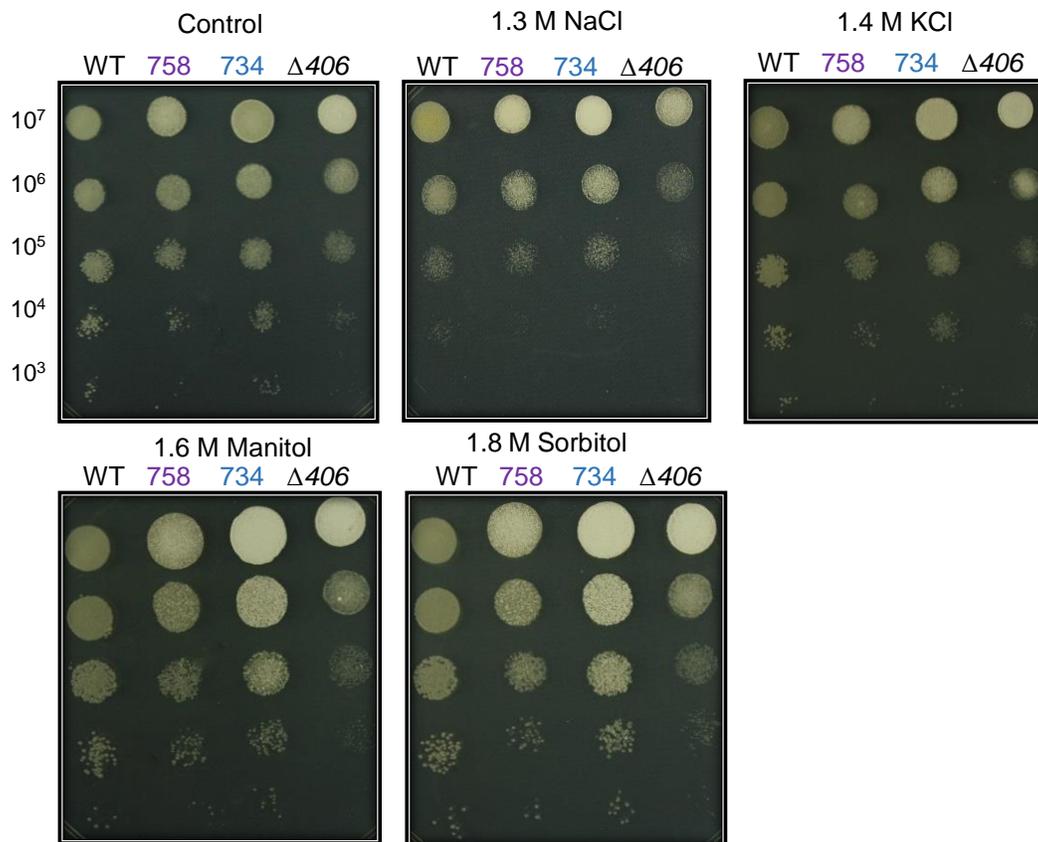


Figura 1748. Respuesta a estrés osmótico de las cepas complementadas. Se prepararon diluciones seriadas de las cepas FB2 y complementadas; 758 cepa $\Delta pyr4$ complementada con el fragmento de 4042 pb del gen *PYR4*, cepa 734 $\Delta pyr4$ complementada con el fragmento de 3439 pb del gen *PYR4* y la cepa $\Delta 406$ ($\Delta pyr4$). Se sembraron 10 μ l de cada dilución sobre placas de MM7 con el agente estresante indicado. Las placas se incubaron a 28°C durante 96 horas y se fotografiaron con una cámara CANON EOS Rebel T3i. El experimento se realizó por triplicado.

Para realizar las pruebas de estrés oxidativo, utilizamos 4 μ M de menadiona, 1.5 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y 400 μ M de tert-butil-hidroperóxido (tBOOH). En este ensayo fue más evidente la sensibilidad en las cepas $\Delta pyr4$ (Figura 19). En el estrés con menadiona se observó un fenotipo similar de las dos cepas complementadas comparando con la cepa FB2, puesto que solamente crecieron hasta la dilución 10^6 , mientras que la mutante solo creció muy poco en la dilución 10^7 . Respecto al H_2O_2 , las cepas complementadas solo crecieron en la primera dilución 10^7 en contraste con la cepa FB2 que creció una dilución más, mientras que la mutante $\Delta pyr4$ no creció en esta condición. Por último, en el tBOOH, las cepas crecieron hasta la dilución 10^5 de forma general, en este experimento se observó un fenotipo similar a la cepa silvestre FB2 con las cepas complementadas, debido a la reintegración del gen *PYR4* (Figura 19).

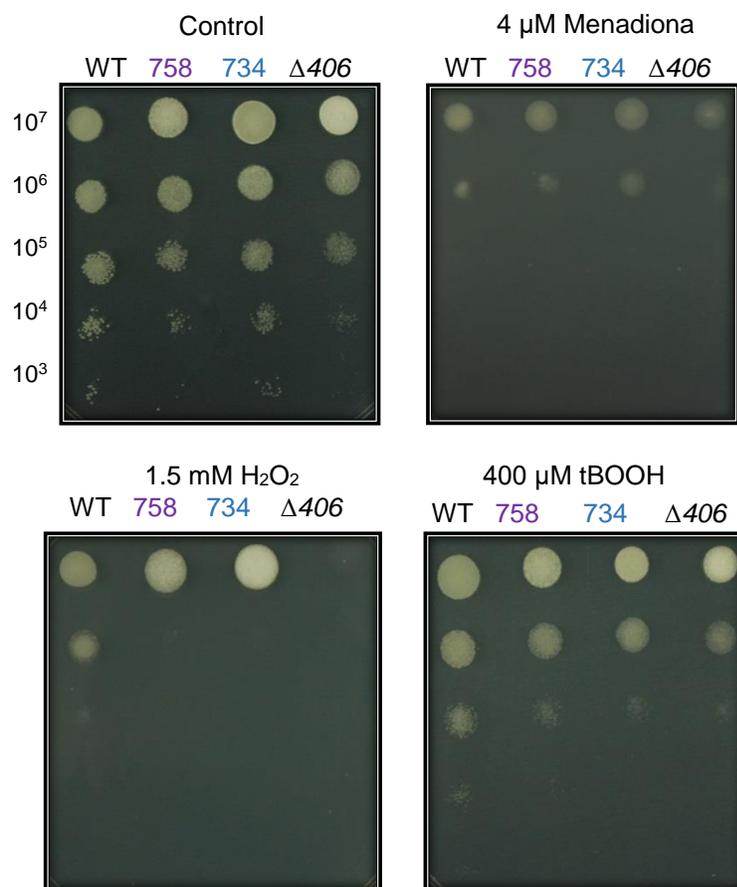


Figura 1849. Respuesta a estrés oxidativo de las cepas complementadas. Se prepararon diluciones seriadas de las cepas FB2 y complementadas, Cepa 758 $\Delta pyr4$ complementada con el fragmento de 4042 pb del gen *PYR4*, cepa 734 $\Delta pyr4$ complementada con el fragmento de 3439 pb del gen *PYR4* y la cepa $\Delta 406$ ($\Delta pyr4$). Se sembraron 10 μ l de cada dilución sobre placas de MM7 con el agente estresante indicado. Las placas se incubaron a 28°C durante 96 horas y se fotografiaron con una cámara CANON EOS Rebel T3i. El experimento se realizó por triplicado.

7.10 Complementación de cepas $\Delta pyr4$ del sexo *a1b1* por análisis de la progenie

Como se mencionó anteriormente, el fondo genético de la cepa $\Delta 406$ $\Delta pyr4$ que se complementó exitosamente corresponde al sexo *a2b2*. Para obtener las cepas complementadas del sexo opuesto *a1b1*, empleamos el análisis de la progenie obtenida por recombinación en la planta. Para ello infectamos plantas de maíz con las cruces $\Delta 404$ (*a1b1*) x 758 (*a2b2*) complementada con el fragmento de 4042 pb del gen *PYR4* y la cruce $\Delta 404$ (*a1b1*) x 734 (*a2b2*) complementada con el fragmento de 3439 pb del gen *PYR4*. Posterior a un mes de la infección, recuperamos los tumores maduros y procedimos a su procesamiento (Materiales y Métodos). Las teliosporas seleccionadas fueron aquellas que crecieran en MC y que al mismo tiempo fueran sensibles a Higromicina B, lo cual implica que ocurrió la recombinación en el locus *PYR4* y por lo tanto perdieron la resistencia al antifúngico. Posteriormente se realizó la reacción fuz para determinar el sexo de las cepas, puesto

que nuestro interés está orientado a aquellas cepas que sean *a1b1*: Para ello, realizamos la reacción de apareamiento, se cruzaron las cepas sensibles a Higromicina B con las cepas silvestre FB1 y FB2, de manera que solo seleccionamos aquellas que dieron reacción fuz positiva con la cepa FB2 (Figura 20).

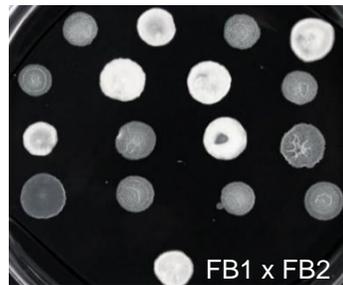


Figura 1920. Reacción fuz. Ensayo de apareamiento en MC con carbón activado al 1%. Las cepas sensibles a Higromicina B obtenidas de la germinación de teliosporas se cruzaron con la cepa FB2. Como control se incluyó la cruce entre las cepas FB1xFB2. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente por 24 h y se fotografiaron con una cámara CANON EOS Rebel T3i.

7.11 Determinación del genotipo *PYR4* en las cepas complementadas procedentes del análisis de la progenie.

Posterior a identificar las cepas complementadas del sexo *a1b1*, se procedió a realizar los experimentos correspondientes para comprobar que portan el gen *PYR4*. Las cepas seleccionadas se crecieron en MC con Higromicina B para comprobar su sensibilidad (Figura 21). Como se observó en la Figura 16, tenemos que las cepas recuperadas, así como el control FB1 no son capaces de crecer en presencia del antifúngico, mientras que la cepa $\Delta pyr4$ que es resistente a este compuesto, sí lo hace. corroborando de esta manera que recuperamos cepas con el genotipo URA^+ , hyg^S .

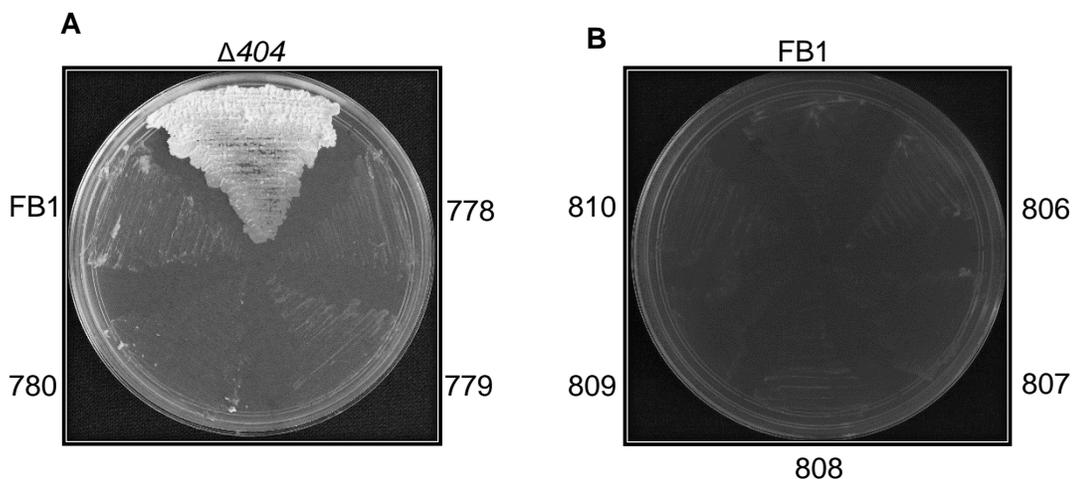


Figura 2024. Análisis de sensibilidad a Higromicina B. Las cepas se estiraron en MC con Higromicina B 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. 1. Cepa $\Delta 404$ y FB1 controles. A) Cepas 778-760 $\Delta pyr4$ complementadas con la versión de 4042 pb del gen *PYR4*. B). Cepas 806-810 $\Delta pyr4$ complementadas con la versión de 3439 pb del gen *PYR4*. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 h y se fotografiaron con una cámara CANON EOS Rebel T3i. El experimento se realizó por triplicado.

De igual manera, procedimos a comprobar su capacidad para crecer en medio mínimo sin uracilo. Es decir, que sean protótrofas a este compuesto, como podemos observar, todas las cepas crecen de manera similar en el medio de cultivo que carece de uracilo, así como en el medio que fue suplementado con uracilo. En contraste con la cepa $\Delta pyr 404$ que es auxótrofa a éste (Figura 22).

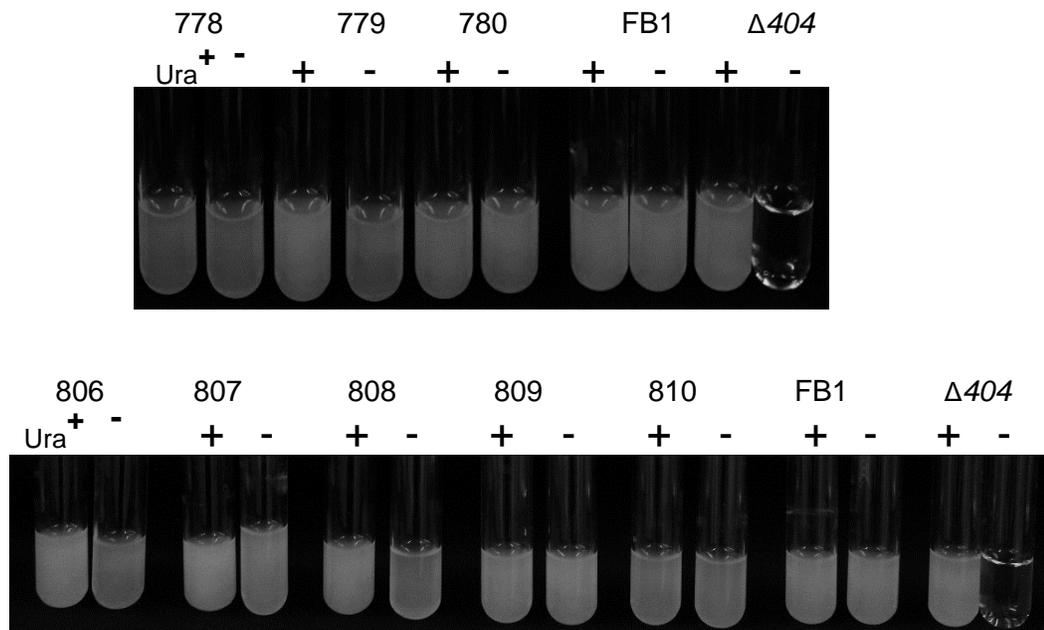


Figura 2122. Prototrofia a uracilo. Las cepas se crecieron en medio MM7 (30 mM Tris·HCl) adicionado con 1 mg·mL⁻¹ de uracilo (Ura⁺) o en el mismo medio sin uracilo (Ura⁻). Como control se incluyó a la cepa silvestre FB1 y la mutante $\Delta 404$. A) Cepas 779-780; $\Delta pyr4$ complementadas con la versión de 4042 pb del gen *PYR4*. B) Cepas 806-810; $\Delta pyr4$ complementadas de la versión de 3439 pb. Los cultivos se incubaron 24 h a 28°C en agitación constante. Los tubos se fotografiaron con la cámara CANON EOS Rebel T3i. El experimento se realizó por triplicado.

Por último, para tener la evidencia molecular de la presencia del gen, procedimos a realizar el PCR con los oligonucleótidos 2192 y 2189 que amplifican el fragmento del gen correspondiente a 3439 pb (Figura 23).

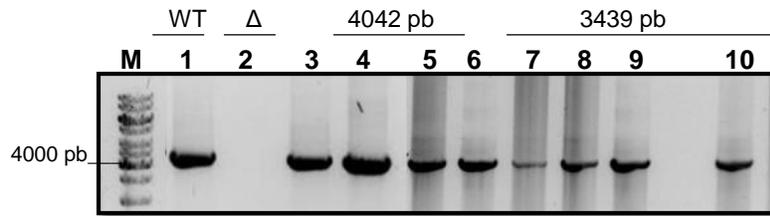
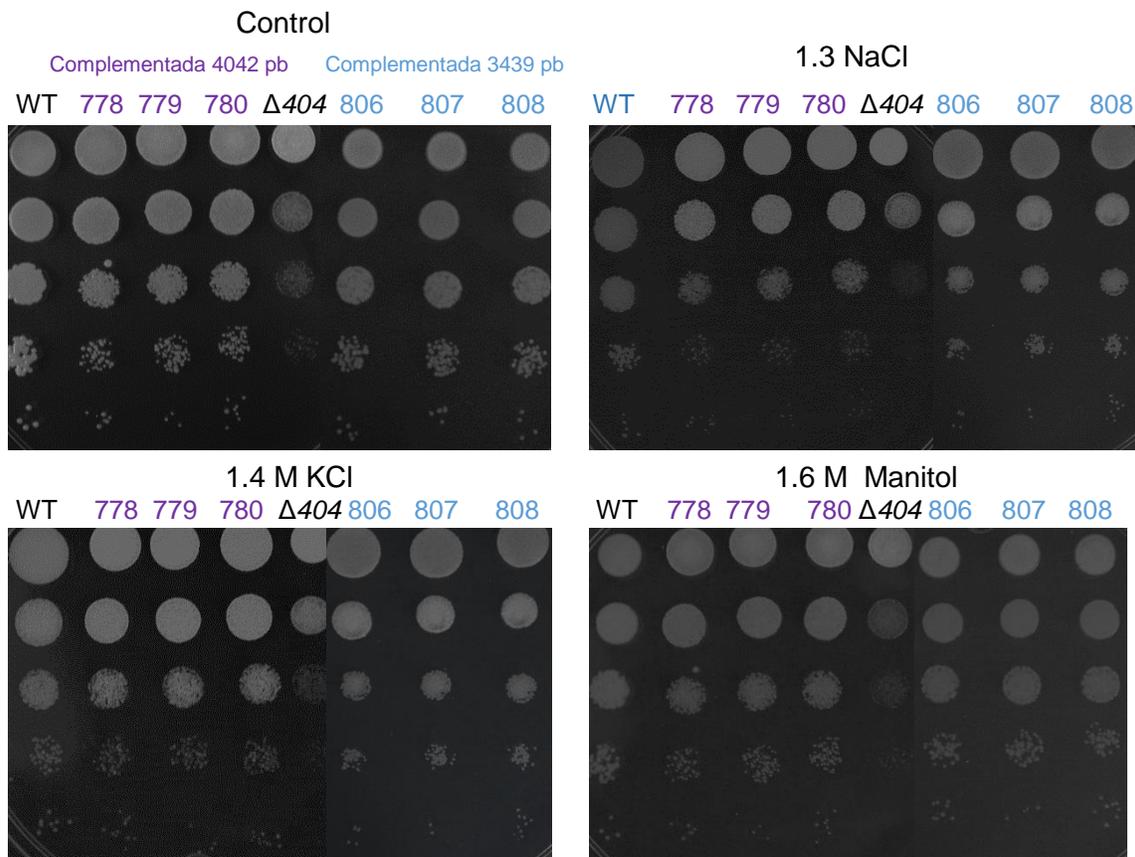


Figura 2223. Amplificación por PCR del gen *PYR4*. Amplificación de la versión de 3439 pb del gen *PYR4*. Carril 1 cepa WT, carril 2 mutante auxótrofa $\Delta 404$, carriles 3-5 cepas 778-780 complementadas obtenidas por progenie del fragmento de 4042 pb del gen *PYR4*. Carriles 6-10 cepas 806-810 complementadas obtenidas por progenie del fragmento de 3439 pb del gen *PYR4*. M, marcador de peso molecular, 1 kpb.

7.12 Análisis fenotípico de las cepas *a1b1* obtenidas del análisis de la progenie

De la misma manera en que se realizó el experimento del análisis fenotípico en las cepas complementadas por transformación genética, se hizo para las cepas *a1b1* obtenidas por recombinación en la planta. Para el estrés osmótico se utilizó 1.4 M de KCl, 1.3 M de NaCl, 1.2 M de manitol y 1.8 M de sorbitol. Las cepas se crecieron en MM7, se usaron las cepas silvestres FB1 y mutante $\Delta 404$ como control, las cepas 778-780 complementadas con el fragmento 4042 pb del gen *PYR4*; las cepas 806-808 complementadas con el fragmento de 3439 pb del gen *PYR4*. En este caso, las cepas complementadas mostraron un crecimiento similar a la cepa silvestre FB1 en todas las condiciones de estrés osmótico (Figura 24).



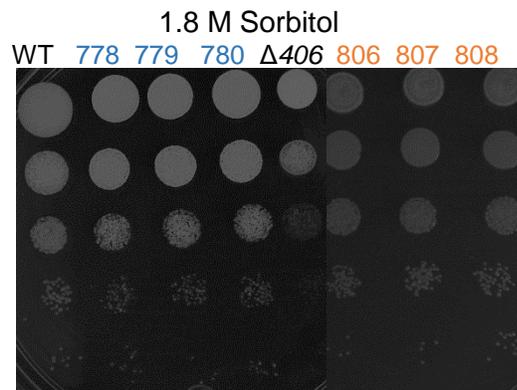


Figura 2324. Respuesta a estrés osmótico. Se prepararon diluciones seriadas de las cepas FB1 y complementadas; 778-780 Δ pyr4 complementada con el fragmento de 4042 pb del gen *PYR4*, cepa 806-810 Δ pyr4 complementada con el fragmento de 3439 pb del gen *PYR4* y la cepa Δ 404 (Δ pyr4). Se sembraron gotas de 10 μ l de cada dilución sobre placas de MM7 con el agente estresante indicado. Las placas se incubaron a 28°C durante 96 horas. Las cajas se fotografiaron con una cámara CANON EOS Rebel T3i. El experimento se realizó por triplicado.

El hecho de seleccionar cepas complementadas por análisis de progenie y no por transformación genética hace referencia a la versatilidad y eficacia que tiene *U. maydis* como modelo de experimentación, puesto que cabe recordar que en *U. maydis* es necesario tener mutantes en el gen de interés en las dos cepas de sexo complementario, si es necesario analizar la patogenicidad, o bien usar la cepa solopatogénica SG200, que por sí misma es capaz de producir la infección (Kamper, *et al.*, 2006).

Para el estrés oxidativo se siguió la misma metodología mostrada para los ensayos previos. Las cepas complementadas se comportaron de manera similar a la cepa control FB1 (Figura 25). En el caso de la menadiona las cepas crecieron hasta la dilución 10^4 en comparación con las cepas de transformación por protoplastos que crecieron hasta la concentración 10^6 . En el caso del H_2O_2 y del tBOOH, las cepas crecieron solamente en la dilución 10^7 y un poco en la dilución 10^6 comportándose de manera similar a la cepa silvestre, a excepción del H_2O_2 condición en la que las cepas crecieron un poco en la dilución 10^6 (Figura 25).

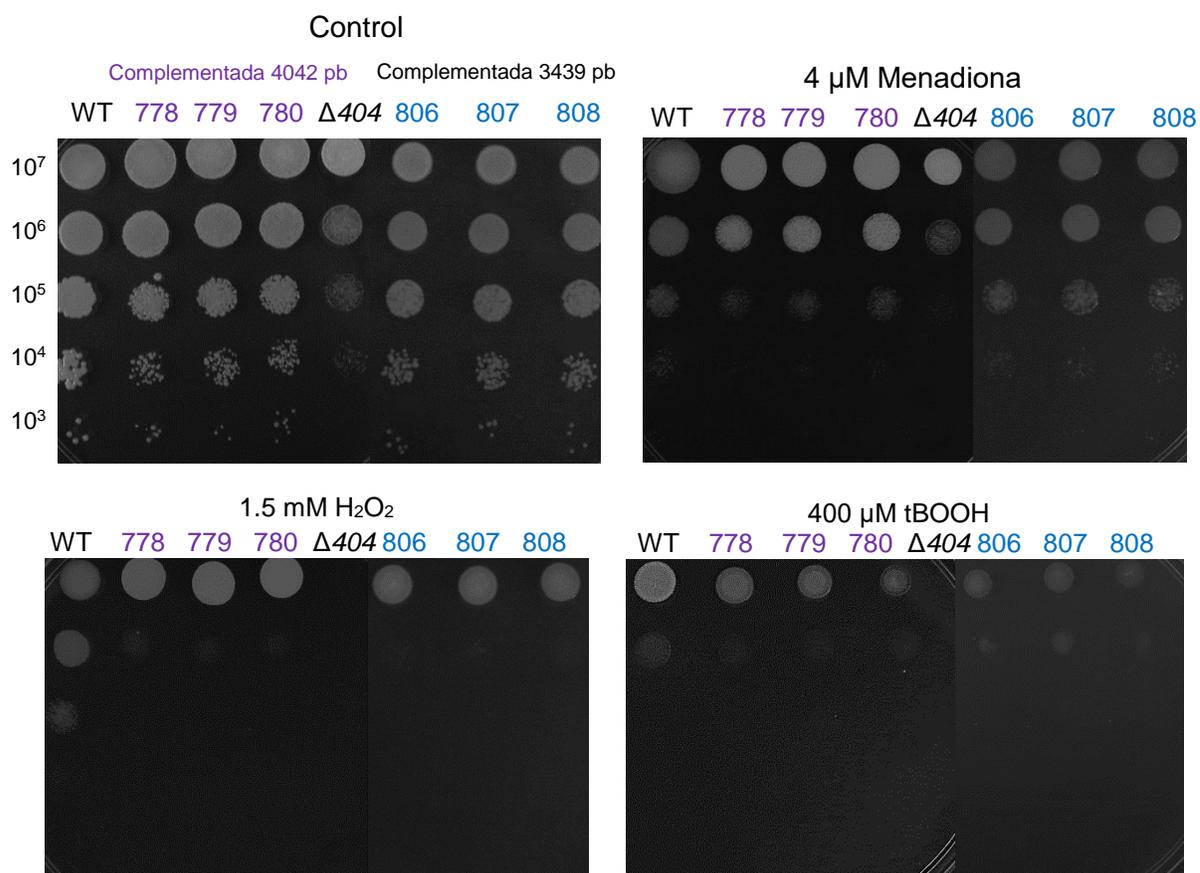


Figura 2425. Respuesta a estrés oxidativo. Se prepararon diluciones seriadas de las cepas FB1 y complementadas; 778-780 $\Delta pyr4$ complementada con el fragmento de 4042 pb del gen *PYR4*, cepa 806-810 $\Delta pyr4$ complementada con el fragmento de 3439 pb del gen *PYR4* y la cepa $\Delta 404$ ($\Delta pyr4$). Se sembraron gotas de 10 μ l de cada dilución sobre placas de MM7 con el agente estresante indicado. Las placas se incubaron a 28°C durante 96 horas. Las cajas se fotografiaron con una cámara CANON EOS Rebel T3i. El experimento se realizó por triplicado.

7.13 Dimorfismo

U. maydis presenta dos morfologías, una que haploide y saprofita que se caracteriza por presentar forma de levadura, y una fase dicariótica patógena, que se caracteriza por mostrar forma de hifa (Brefort, *et al.*, 2009). En condiciones de laboratorio podemos estudiar el cambio dimórfico controlando el pH del medio de cultivo, cuando se crece al hongo en un pH de 7 (MM7) se obtiene la forma de levadura. Mientras que cuando se crece a pH 3 (MM3), la morfología obtenida es la micelial (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995).

En el experimento se analizó la transición dimórfica en las cepas mutantes $\Delta pyr4$ y en las cepas complementadas, como control se incluyó a la cepa FB1. Se observó que todas las cepas crecieron de la forma correspondiente a ambos pH, en comparación con las cepas silvestre (Figura 26). Sin embargo a pH 3 la cepa mutante $\Delta 404$ se pudo observar que las hifas son más delgadas

en comparación con el control, a diferencia de las cepas complementadas 734 y 778 del fragmento 3439 pb y 4042 pb respectivamente en el cual se puede observar que las hifas crecieron más gruesas similares al control FB1, las hifas de las mutantes se observan mucho más delgadas, dato que podría estar estrechamente relacionado con el proceso de patogenicidad y con la sensibilidad a los tipos de estrés sometidas, es decir las hifas al ser más delgadas les cuesta más trabajo poder penetrar a la planta y por lo tanto poder infectarla.

Aunque de manera general, la auxotrofía a uracilo, no comprometió el que pudieran llevar a cabo este proceso de diferenciación celular. La importancia de este dato radica en qué, si una cepa mutante es monomórfica a la levadura, no será capaz de infectar a la planta, puesto que es una característica imprescindible para llevar a cabo el proceso de infección (García-Pedrajas, *et al.*, 2010).

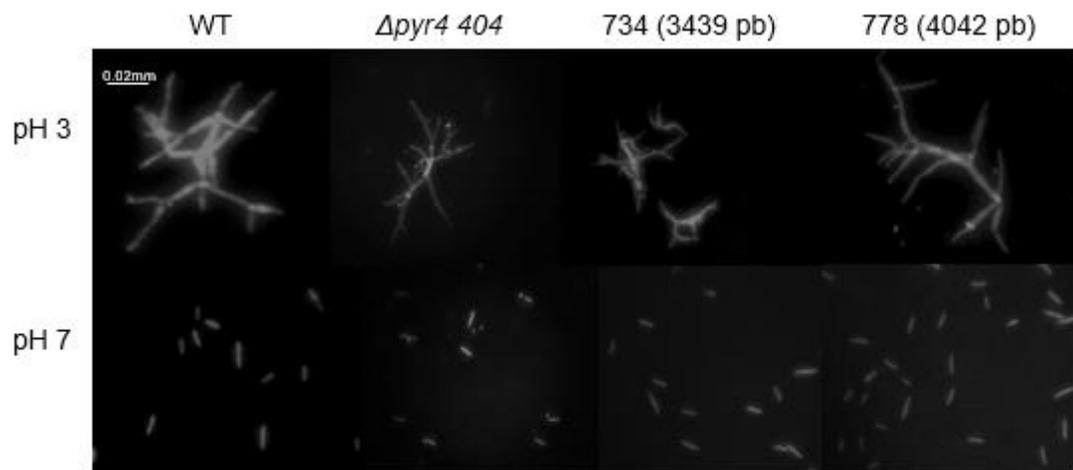


Figura 2526. Dimorfismo en *U. maydis*. Células de las cepas (WT) FB1, ($\Delta pyr4$) $\Delta 404$, 734 (complementada con el fragmento de 4042 del gen *PYR4*), 778 (complementada con el fragmento de 3439 pb del gen *PYR4*) crecidas en MM7 y MM3. Las células se tiñeron con calcoflúor white y se fotografiaron con el microscopio triocular EPI fluorescente Mod. M834FLR AMSCOPE® con el objetivo 40X.

7.14 Las cepas $\Delta pyr4$ son incapaces de producir síntomas de enfermedad en maíz

Cuando las plantas de maíz son infectadas con cepas sexualmente compatibles de *U. maydis* FB1 x FB2, los signos son registrados 14 días después de la inoculación según lo reportado por (Chavan & Smith, 2014) (Figura 27).

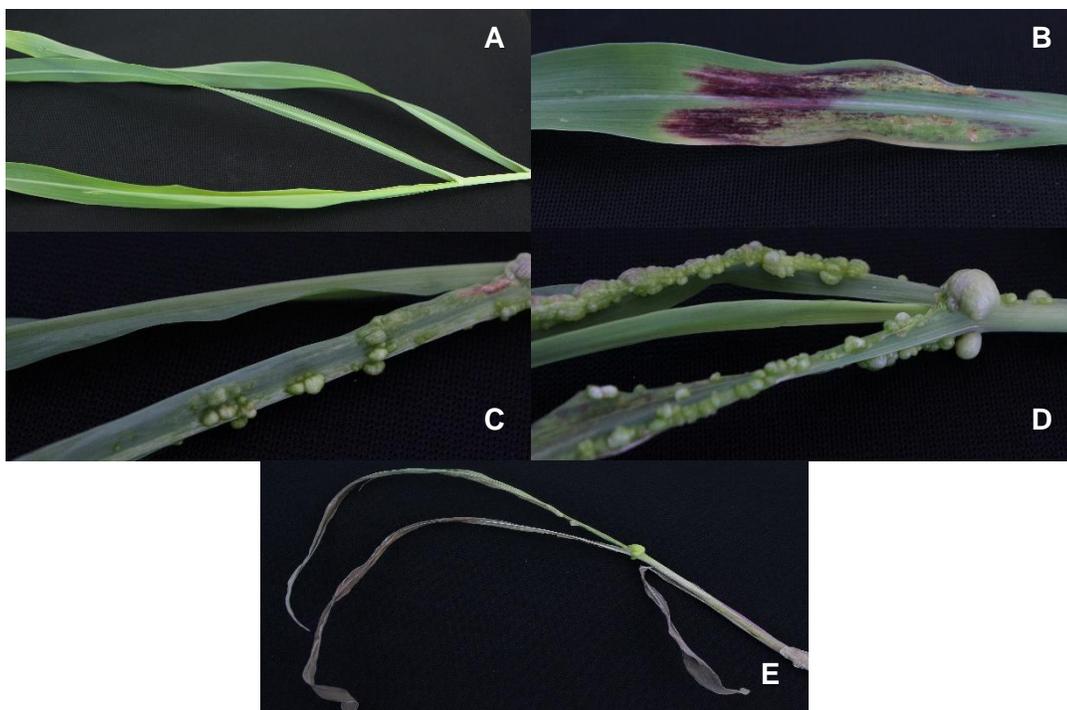


Figura 2627. Signos en plantas de maíz infectadas con *U. maydis*. Las fotografías muestran los signos de la enfermedad a los 14 días posteriores a la inoculación, correspondientes a los parámetros utilizados en el análisis de la infección de las plantas de maíz. A) Asintomática. B) clorosis y antocianinas. C) agallas pequeñas < 2mm. D) Agallas grandes > 2mm. E) Muerte. Chavan & Smith, 2014.

Para determinar la importancia de la función del gen *PYR4* durante el proceso de patogenicidad, se infectaron plantas de maíz de la variedad cacahuazintle con las cruces mutantes $\Delta pyr4$ sexualmente compatibles ($\Delta 404 \times \Delta 405$), cepa mutante x cepa complementada tanto del fragmento del gen *PYR4* de 4042 pb ($\Delta 404 \times 758$; $\Delta 404 \times 734$) como del fragmento de 3439 pb del gen *PYR4* ($\Delta 406 \times 778$; $\Delta 406 \times 806$). Así como con cepas complementadas x cepas complementadas (778x734; 806x734), cepas mutantes x silvestres y complementada por silvestre (FB1x758; FB1x734). Como control se infectaron 100 plantas con las cruces FB1xFB2 y 100 plantas con agua destilada estéril como control negativo.

Las cepas mutantes $\Delta 404 \times \Delta 405$, no fueron capaces de producir agallas en el maíz, el signo observado fue el segundo según la escala de Chavan, que corresponde a clorosis y antocianinas (Figura 28), dicho resultado coincide con lo previamente descrito por (Zameitat, *et al.*, 2007) ya que ellos realizaron la delección del gen *PYR4* y reportaron la ausencia de patogenicidad en las cepas mutantes. Podemos destacar así la importancia del uracilo para llevar a cabo la infección completa, ya que a pesar de ser una base nitrogenada podría estar implicado en alguna otra vía de señalización

importante en el proceso de infección de la planta. Considerando la presencia del sitio de unión del factor de transcripción Yap1 en la región promotora de *PYR4*.

Cuando las plantas fueron infectadas con una cepa mutante x una silvestre (FB2 x $\Delta 404$), estas cruzas fueron capaces de producir agallas pequeñas, este dato sugiere la naturaleza recesiva de la mutación (Figura 28). Así mismo, se muestra la importancia de la síntesis de uracilo en la patogenicidad del maíz, resultado que se complementa con nuestras observaciones fenotípicas. Recordemos que la adición del uracilo a las cajas de estrés oxidativo u osmótico, no es capaz de revertir el fenotipo observado. Por lo cual, el uracilo debe de estar implicado en alguna otra parte del proceso infectivo, o de la capacidad del hongo para sobrevivir en la planta, por ejemplo, responder efectivamente a la ráfaga oxidativa producida por la planta (Molina et al., 2007).

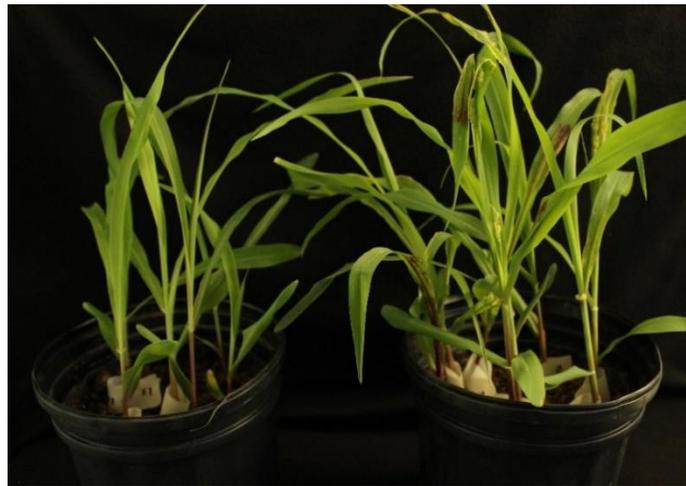


Figura 2728. Fenotipo en plantas infectadas. Izquierda, planta infectada con las mutantes $\Delta 404$ x $\Delta 405$. Derecha, planta infectada con las cepas FB2 x $\Delta 404$. Fotografías tomadas 14 días después de la infección.

Es posible que ante la incapacidad de sintetizar uracilo, el hongo no sea capaz de obtenerlo de la planta en suficiente cantidad. Sin embargo, cabe recordar que las mutantes *pyr4* son sensibles a estrés osmótico y oxidativo además de que las hifas fenotípicamente presentaron una morfología más delgada, es un indicativo de que la ausencia de este gen, está afectando a la célula para responder ante dichos insultos. Las cepas que no son capaces de tolerar el estrés oxidativo, muestran un alto grado de afectación en la patogenicidad, como es el caso de las mutantes en el factor de transcripción Yap1 en este hongo. Yap1 es encargado de regular la expresión de genes en respuesta a estrés oxidativo, en experimentos *in vitro*, no tolera la presencia de H_2O_2 , y en planta no produce síntomas de enfermedad (Molina et al., 2007). Un fenotipo similar fue descrito en las mutantes Yap1 en el hongo *Alternaria alternata*, ya que reduce la virulencia en cultivos de cítricos, puesto que Yap1 participa en la vía regulatoria de respuesta regulatoria de ROS (Chung, 2012), en

el hongo *Monilinia fructicola* patógeno del genero Rosaceae (Yu, *et al.*, 2017) y en el hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* (Viefhues, *et al.*, 2015)

De igual manera es importante resaltar el fenotipo observado ante el estrés osmótico, cuando el hongo trata de penetrar a la planta, este se encuentra con un cambio drástico respecto a la concentración de compuestos sintetizados en la planta, situación que incrementa la presión osmótica, y por lo tanto la célula no puede penetrar, o le es más difícil entrar a la planta y crecer entre las células (Salmerón-Santiago, *et al.*, 2011). Además, *U. maydis* produce un apresorio, estructura que permite penetrar con mayor facilidad a la planta, el cual debe de tener cierta turgencia. Las tetrasparinas que son proteínas que en hongos controlan la función del apresorio como es el caso de *B. cinerea* la mutante en la proteína Bcpls1 implicada en dicha función no es patógena. El apresorio en cepas silvestres permite la penetración del hongo en la planta, sin embargo, en las mutantes Bcpls1 no se observaron eventos de penetración exitosos lo que sugiere que el apresorio no es funcional (Gourgues, *et al.*, 2004).

Por otro lado, los síntomas observados por la cruce de cepas silvestres x cepas complementada con el fragmento 4042 pb del gen *PYR4* (FB1 x 758) y del fragmento de 3439 pb del gen *PYR4* (FB1 x 734), y de cepas complementadas x cepas complementadas (778 del fragmento 4042 pb del gen *PYR4*) x (734 del fragmento 3439 pb del gen *PYR4*) en comparación con las cepas control FB1 x FB2 mostraron un fenotipo similar (Figura 29) es decir los signos que observamos fueron los obtenidos cuando se inocula maíz con una cruce silvestre. Este resultado nos indica que la integración del gen *PYR4* está de alguna manera relacionado con la patogenicidad, puesto que al re-integrar el gen silvestre, estas cepas son capaces de producir de nueva cuenta la enfermedad.



Figura 28-29. Fenotipo en plantas infectadas con las cepas complementadas. A) Planta infectada con el control FB1x758, la flecha muestra una agalla en la base del tallo. B) Planta infectada con las cepas complementadas 806x734. Las fotografías fueron tomadas 14 días después de la infección.

Se infectaron varias combinaciones de cepas, tanto de las obtenidas por transformación genética, por obtención de progenie con mutantes y con silvestres, de tal manera que las combinaciones nos arrojaran diferentes resultados, así como comprobar cómo afecta la patogenicidad de las cepas en las plantas, como control negativo se infectaron 100 plantas con agua destilada estéril. Tanto las cepas control FB1 x FB2 se comportaron de manera similar con las cepas complementadas x silvestres y silvestres x silvestres, mostradas en la gráfica (Figura 30).

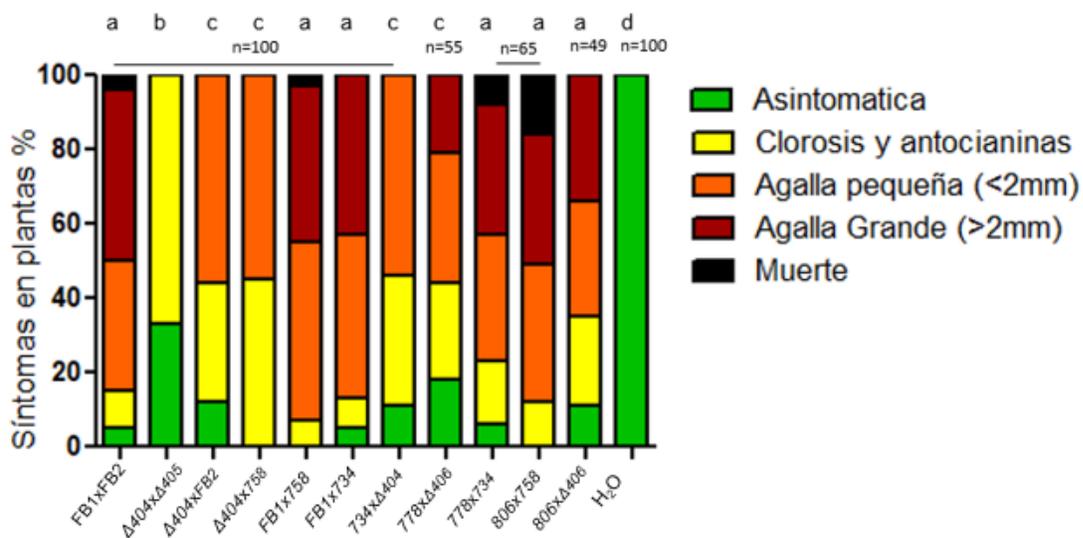


Figura 2930. Cuantificación del análisis de patogenicidad. Las cepas utilizadas para la infección fueron: FB1x7B2 como control. n= número de plantas infectadas. Los datos se analizaron con el método estadístico Kruskal-Wallis, Dunn ($p \leq 0.005$).

Por otro lado, sabemos que la molécula de trehalosa que es un disacárido protector, la ausencia de trehalosa produce cepas sensibles a la presencia del H_2O_2 , de igual manera, estos solo son capaces de producir pequeños tumores en planta de maíz, por lo que la virulencia está severamente afectada (Cervantes-Chávez *et al.*, 2016). Así mismo, en *U. maydis*, las mutantes *odc-* que no producen putrescina, que es una poliamina central de la cual derivan otras poliaminas, son avirulentas (Guevara-Olvera, *et al.*, 1997; Valdés Santiago *et al.*, 2009), cabe mencionar que en la planta de maíz existen tanto trehalosa, poliaminas, al igual que uracilo, pero no sabemos qué tan disponible están para que el hongo pueda obtenerlas y cumpla sus funciones. En el caso de las mutantes *odc-*, estas son incapaces de llevar a cabo la transición dimórfica, debido a la ausencia de putrescina, puesto que una vez que se suministra de manera exógena *in vitro*, es posible llevar a cabo la transición (Valdés-Santiago, *et al.*, 2010).

Cabe señalar que la capacidad de crecer en forma de hifa, es indispensable para producir síntomas de la enfermedad. En el caso de las mutantes *pyr4*, estas no se vieron afectadas en la transición dimórfica, por lo que este punto crucial queda descartado, sin embargo, fenotípicamente las hifas se mostraron más delgadas en comparación con la cepa silvestre, resultado relacionado con el proceso de patogenicidad en la planta.

Además de que fueron sensibles a dos tipos de estrés muy importantes respecto a la virulencia, el cual fue revertido por la complementación usando el gen *PYR4*, por lo que muestra la relación que existe entre la patogenicidad y la síntesis de uracilo en este hongo.

7.15 Diseño de un cassette para interrupción del gen *HOG1* usando al gen *PYR4* como marcador de selección

Para demostrar la utilidad del gen *PYR4* como marcador de selección se dispuso a construir un cassette de interrupción, como gen problema se utilizó *HOG1* (High Osmolarity Glycerol), en *Saccharomyces cerevisiae* este gen es requerido para responder al estrés osmótico, en la cascada de señalización SAPK estrés activado por quinasa, por sus siglas en inglés “The Stress Activated MAP Kinase” (Nikolau, *et al.*, 2009).

Se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar el gen *PYR4* y el gen *HOG1*, para amplificar la región promotora y terminadora del gen *HOG1*, y parte del gen *PYR4* incluyendo el ORF, además de genes anidados y genes externos para comprobar la integración (Tabla 4).

Tabla 4. Pares de oligonucleótidos para el cassette de inserción y sus características

Oligonucleótidos	Amplicón	Tm	T elongación
<u>2206/2209</u>	1028 pb	66°C	1'10"
<u>2210/2213</u>	1051 pb	67.5°C	1'10"
<u>2208/2211</u>	3479 pb	60°C	3'40"

El cassette se formó interrumpiendo el gen *HOG1* para insertar el gen *PYR4* (Figura 31).



Figura 3034. Mapa del diseño del cassette de interrupción. En los extremos de color verde se muestra el promotor y el terminador del gen *HOG1*, en rosa el gen *PYR4*, las flechas indican los pares de oligonucleótidos de cada fragmento de ADN.

Ademas se logró amplificar por PCR la región promotora, la terminadora de *HOG1* asi como la secuencia de *PYR4* que ira insertada en dicho cassette (Figura 32). Se pretende realizar la fusión de dichas secuencias mediante un PCR de doble fusión para posteriormente realizar una transformación genetica.

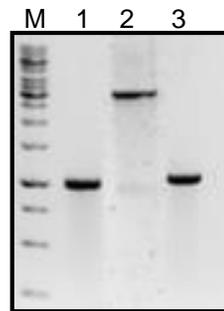


Figura 3132. Amplificación por PCR. Amplificación de cada segmento para la conformación del cassette. M marcador de peso molecular 1 kpb. Carril 1: promotor *HOG1*, carril 2: Gen *PYR4* y carril 3: Terminador *HOG1*.

Para la interrupción o sobreexpresión de genes en hongos en levaduras se requieren aproximadamente 50 pb de secuencias de ADN homologas (Jae-Hyuk, *et al.*, 2004), mientras que para la alteración de genes por reemplazo homólogo en hongos filamentosos se requieren secuencias más largas 500 pb o más, la construcción de cassettes generalmente se realizan en varias etapas de clonación que requieren mucho tiempo y son un tanto tediosas. Existen técnicas de fusión de PCR que puede usarse para construir cassettes de ADN combinado con dos o tres fragmentos de ADN, mediante la amplificación individual del promotor, un terminador y parte del gen incluyendo el ORF. La fusión de estos tres fragmentos permitirá ensamblar el cassette de interrupción y posteriormente podremos verificar su funcionalidad al obtener la mutantes $\Delta hog1$.

8 CONCLUSIONES

- La auxotrofia a uracilo en las cepas $\Delta pyr4$ en *U. maydis* es debida a la deleción del gen *PYR4*, ésta es revertida por la adición exógena de uracilo.
- Las cepas auxótrofas a uracilo mostraron sensibilidad al estrés osmótico y oxidativo, lo cual no es revertido por la presencia de uracilo en el medio de cultivo.
- Tanto el fragmento del gen *PYR4* de 4042 pb como el de 3439 pb mostraron ser funcionales al revertir el fenotipo en las mutantes $\Delta pyr4$, por lo que podrían ser utilizados como gen marcador de selección.
- El dimorfismo se ve afectado de manera en relación a que las hifas son más delgadas por la deleción del gen *PYR4*.
- El proceso infectivo se ve afectado por la auxotrofia a uracilo, puede estar relacionado con la sensibilidad a estrés osmótico y oxidativo mostrado por las mutantes $\Delta pyr4$.

9 PERSPECTIVAS

- Realizar la deleción del gen *HOG1* utilizando como gen marcador *PYR4*.
- Comparar el porcentaje de recombinación homóloga al utilizar el gen *PYR4* y el gen de resistencia a Higromicina B al deletar el gen *HOG1* con ambos cassettes de interrupción.
- Realizar la eliminación del marcador de resistencia al antifúngico, mediante el bloqueo del gen usando la técnica de *knock-out*.

10 Apéndice

Todas las soluciones y medios de cultivo se prepararon en agua destilada estéril en los casos que se requiere se esteriliza 15 minutos/15 libras en autoclave.

Medio Completo (MC) 1000 mL

5 g Peptona

1.5 g Nitrato de amonio

10 g Extracto de levadura

62 mL Solución de Sales

10 g Glucosa

20 g Agar Bacteriológico (Para medio solido)

Carbón activado 1% (Cuando se hace la reacción fuz)

Triton X100 al .5% (Cuando se realiza la germinación de teliosporas)

Esterilizar por autoclave.

Sulfato de Cobre 3% 100 mL

3 g Sulfato de cobre

Esterilizar por autoclave.

Medio Mínimo pH 7 (MM pH 7) 1000 mL

1% Glucosa

3 g Nitrato de potasio

62.5 mL Solución de sales

30 mM Tris·HCl pH 7

2% Agar bacteriológico (Medio sólido)

1 mg·mL⁻¹ Uracilo (Cuando sea necesario)

Esterilizar por autoclave.

Medio Mínimo pH 3

1% Glucosa

3 g Nitrato de amonio

62.5 mL Solución de Sales

Agustar pH con HCl

Medios y reactivos para la transformación

Medio a base de nitrógeno de levadura (YNB) (Para la transformación)

500 mL

3.35 g YNB

31 mL Solución de Sales
45.5 g Sorbitol
1.5 g Nitrato de amonio
2% Agar (Medio sólido)
1 mg·mL⁻¹ Uracilo (Cuando sea necesario)

Esterilizar por autoclave.

SCS 100 mL

0.59 g Citrato de Sodio
18.22 g Sorbitol

Esterilizar por autoclave.

STC 100 mL

1.11 g Cloruro de Calcio
18.22 g Sorbitol
1 mL Tris·HCl pH 7.5 1M

Esterilizar por autoclave.

Amortiguador II 50 mL

25 mM Tris·HCl pH 7.5
1 M Sorbitol
25 mM Cloruro de Calcio

Esterilizar por autoclave.

Enzimas Líticas

Se pesan 100 mg y disuelven en 1 mL de amortiguador II

Esterilizar por filtración.

Heparina

15 mg Heparina en 1 mL STC

Esterilizar por filtración.

40% PEG

4 g Polietilenglicol

10 mL STC * Almacenar en frío. Esterilizar en autoclave.

Reactivos para la extracción de DNA

Tris EDTA (TE)

10 mM Tris·HCl pH 8

1 mM EDTA

Esterilizar por autoclave.

TSNTE

2% Tritón X100

1% SDS

100 mM Cloruro de Sodio

10 mM Tris·HCl pH 8

1 mM EDTA

Esterilizar por autoclave.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (2008). *Plant Pathology*. Gainesville: Elsevier.
- Ando, A., Sakuradani, E., Horinaka, K., Ogawa, J., & Shimizu, S. (2009). Transformation of an oleaginous zygomycete *Mortierella alpina* 1S-4 with the carboxin resistance gene conferred by mutation of the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase. *Current genetics*, 55(3), 349.
- Assis de Gontijo, F., Pascon, R. C., Fernandes, L., Machado, J., Alspaugh, A., & Vallim, M. (2014). The role of the novo pyrimidine biosynthetic pathway in *Cryptococcus neoformans* high temperature growth and virulence. *Fungal Genetics and Biology*, 70, 12-23.
- Becker, B., & Cooper, M. A. (2012). Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS chemical biology*, 8(1), 105-115.
- Berg, L. E., Miller, S. S., Dornbusch, M. R., & Samac, D. A. (2017). Seed Rot and Damping-off of Alfalfa in Minnesota Caused by *Pythium* and *Fusarium* Species. *Plant disease*, 101(11), 1860-1867.
- Boote, K. J., Jones, J. W., Mishoe, J. W., & Berger, R. D. (1983). Coupling pests to crop growth simulators to predict yield reductions. *Phytopathology*, 73, 1581-1587.
- Borovinskaya, M. A., Shoji, S., Fredrick, K., & Cate, J. H. (2008). Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA*, (8) 1590-1599.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., & Reissmann, S. (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annual review of phytopathology*, 47, 423-445.
- Choi, J., & Kim, S. H. (2017). A genome tree of life for the fungi kingdom. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35), 9391-9396.
- Christopherson, R. I., Lyons, S. D., & Wilson, P. K. (2002). Inhibitors of de novo nucleotide biosynthesis as drugs. *Accounts of chemical research*, 35(11), 961-971.
- Chung, K. R. (2012). Stress Response and Pathogenicity of the Necrotrophic Fungal Pathogen *Alternaria alternata*. *Scientifica*, 1-17.
- Deacon, J. V. (2006). *Fungal Biology*. Reino Unido: Backwell.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.
- Dortet, L., Girlich, D., Virlouvet, A. L., Poirel, L., Nordmann, P., Iorga, B. I., & Naas, T. (2017). Characterization of BRPMBL, the bleomycin resistance protein associated with the Carbapenemase NDM. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(3), e02413-16.
- Duina, A. A., Miller, M. E., & Keeney, J. B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197(1), 33-48.

- Fernandez, J., & Orth, K. (2018). Rise of a cereal killer: the biology of *Magnaporthe oryzae* biotrophic growth. *Trends in microbiology*, 26(7), 582-597.
- Fraiture, M. A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D., & Roosens, N. H. (2014). An innovative and integrated approach based on DNA walking to identify unauthorised GMOs. *Food Chemistry*, 147, 60-69.
- García-Pedrajas, M. D., Baeza-Montañez, L., & Gold, S. E. (2010). Regulation of *Ustilago maydis* dimorphism, sporulation, and pathogenic development by a transcription factor with a highly conserved APSES domain. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(2), 211-222.
- Gourgues, M., Brunet, S. A., Lebrun, M. H., & Levis, C. (2004). The tetraspanin BcPls1 is required for a pre-sporium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Molecular Microbiology*, 51(3), 619-629.
- Guevara-Olvera, L., Xoconostle-Cázares, B., & Ruiz-Herrera, J. (1997). Cloning and disruption of the ornithine decarboxylase gene of *Ustilago maydis*: evidence for a role of polyamines in its dimorphic transition. *Microbiology*, 143(7), 2237-2245.
- Hamedi, H., Misaghi, A., Hossein Modarressi, M., Zahraei Salehi, T., Khorasanizadeh, D., & Khalaj, V. (2013). Generation of a uracil auxotroph strain of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* as a host for the recombinant preprotein production. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 5(1), 29-34.
- Holliday, R. (2004). Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA repair*, 3(6), 671-682.
- Yun, Y. H., Oh, M. H., Kim, J. Y., & Kim, S. H. (2017). UmTco1, a hybrid histidine kinase gene, is essential for the sexual development and virulence of *Ustilago maydis*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(5), 1010-1022.
- Idnurm, A., & Meyer, V. (2018). The CRISPR revolution in fungal biology and biotechnology, and beyond.
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y., & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology*, 41(11), 973-981.
- Jamil Samsatly, T. R. (2018). Antioxidant genes of plants and fungal pathogens are distinctly regulated during disease development in different *Rhizoctonia solani* pathosystems. *PLOS one*, 13 (2), 1-24.
- Jin, Y. (2011). Role of *Berberis* spp. as alternate hosts in generating new races of *Puccinia graminis* and *P. striiformis*. *Euphytica*, 105-108.
- Juárez-Montiel, M., Romero-Maldonado, A., Monreal-Escalante, E., Becerra-Flora, A., Korban, S., Rosales-Mendoza, S., & Jiménez-Bremont, J. F. (2015). The Corn Smut ('Huitlacoche') as a New Platform for Oral Vaccines. *PLoS One*, 10 (7), 1-14.

- Kalivoda, E. J., Horzempa, J., Stella, N. A., Sadaf, A., Kowalski, R. P., Nau, G. J., & Shanks, R. M. (2011). New vector tools with a hygromycin resistance marker for use with opportunistic pathogens. *Molecular biotechnology*, 48(1), 7-14.
- Kühn, C., & Klipp, E. (2012). Zooming in on yeast osmoadaptation. *Advances in Systems Biology*, 293-310.
- Kumari, A. (2018). Pyrimidine de novo synthesis. In A. Kumari, *Sweet Biochemistry* (pp. 101-103). USA: Academic Press.
- Lanver, D., Tollot, M., Schweizer, G., Presti, L. L., Reissmann, S., Ma, L. S., ... & Kahmann, R. (2017). Ustilago maydis effectors and their impact on virulence. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 409.
- Leake, M. C. (2018). Transcription factors in eukaryotic cells can functionally regulate gene expression by acting in oligomeric assemblies formed from an intrinsically disordered protein phase transition enabled by molecular crowding. *Transcription*, 9(5), 298-306.
- Mapelli, V. (2014). An Overview on selection marker genes for transformation of *saccharomyces cerevisiae*. *Yeast metabolic engineering*, 3-15.
- Martínez-Espinoza, A. D., García-Pedrajas, M. D., & Gold, S. E. (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal genetics and biology*, 35(1), 1-20
- Martínez-Villarreal, R., Garza-Romero, T. S., Moreno-Medina, V. R., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2016). Bases bioquímicas de la tolerancia al estrés osmótico en hongos fitopatógenos: el caso de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Revista argentina de microbiología*, 48(4), 347-357.
- Matsufuji, Y., Nakagawa, T., Fujimura, S., Tani, A., & Nakagawa, J. (2010). Transcription factor Stb5p is essential for acetaldehyde tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of basic microbiology*, 50(5), 494-498.
- Maxon, M. E., & Herskowitz, I. (2001). Ash1p is a site-specific DNA-binding protein that actively represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1495-1500.
- Molina, L., & Kahmann, R. (2007). An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *The Plant Cell*, 19(7), 2293-2309.
- Nikolau, E., Agrafioti, I., Stumpf, M., Stansfield, I., & Brown, A. J. (2009). Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 44.
- Noguchi, C., Watanabe, D., Zhou, Y., Akao, T., & Shimoi, H. (2012). Association of constitutive hyperphosphorylation of Hsf1p with a defective ethanol stress response in *saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Applied and environmental microbiology*, 385-392.

- Nyilasi, I., Kristó, K. E., Pálffy, B., Hegyi, M., Chandrasekaran, M., Kadaikunnan, S., . (2015). Hygromycin B, carboxin and nourseothricin susceptibility of polynsaturated fatty acid producing *Mortierella* and *Umbrelopsis* strains. *Acta Biol Szeged*, 11-18.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.
- Olicón-Hernández, D., Araiza-Villanueva, M., Pardo, J., Aranda, E., & Guerra-Sánchez, G. (2019). New Insights of *Ustilago maydis* as Yeast Model for Genetic and Biotechnological Research: A Review. *Curr Microbiol*, 1-10.
- Ou, S. H. (1980). Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. *Annual review of phytopathology*, 18(1), 167-187.
- Perez-Nadales, E., Nogueira, M. F. A., Baldin, C., Castanheira, S., El Ghalid, M., Grund, E., ... & Naik, V. (2014). Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal genetics and biology*, 70, 42-67.
- Pronk, J. T. (2002). Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5), 2095-2100.
- PubChem. (2019, Marzo 29). *National Center for Biotechnology Information*. Retrieved from National Center for Biotechnology Information: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1174>
- Rica, U. N. (2019, Abril 17). *Manual de plaguicidas de centroamérica*. Retrieved from Manual de paguicidas de centroamérica: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/104-carboxin>
- Rosas-Quijano, R., & Gaillardin, C. (2011). El sistema Cre/loxP1 como una herramienta genética en *Yarrowia lipolytica*. *Revista mexicana de micología*, 33, 17-27.
- Herrera, J. R. (2014). *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. *Nova Scientia*, 1(1), 118-135.
- Ruiz-Herrera, J., León, C. G., Guevara-Olvera, L., & Cárabez-Trejo, A. (1995). Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology*, 141(3), 695-703.
- Ryder, L. S., & Talbot, N. J. (2015). Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. *Current opinion in plant biology*, 26, 8-13.
- Salmerón-Santiago , K. G., Pardo, J. P., Flores Herrera, O., Mendoza-Hernández, G., Miranda-Arango, M., & Guerra-Sánchez, G. (2011). Response to osmotic stress and temperature of the fungus *Ustilago maydis*. *Archives of Microbiology*, 193(10), 701.
- Sauer, N. J., Mozoruk, J., Miller, R. B., Warburg, Z. J., Walker, K. A., & Beethan, P. R. (2016). Oligonucleotide-direct mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, 496-502.
- Schultheisz, H. L., Szymczyna, B. R., Scott, L. G., & Williamsom, J. R. (2010). Enzymatic de Novo Pyrimidine Nucleotide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 297-304.

- Sidney, H. (2000). Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action. *J. Nat. Prod*, 158-168.
- Swinnen, S., Goovaerts, A., Schaerlaekes, K., Dumortier, F., Verdyck, P., Souvereyns, K., . . . Thevelein, J. M. (2015). Auxotrophic Mutations Reduce Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to Very High Levels of Ethanol Stress. *Eukaryotic Cell*, 884-897.
- Tijerina-Ramírez, N., Lira-Méndez, K., Moreno-Medina, V. R., González-Prieto, J., & Mayek-Pérez, N. (2014). Efecto de estrés osmótico in vitro en el crecimiento, patogenicidad y producción de osmolitos en *Macrophomina phaseolina*. *Revista mexicana de micología*, 31-39.
- Valdés-Santiago, L., Guzmán-de-Peña, D., & Ruiz-Herrera, J. (2010). Life without putrescine: disruption of the gene-encoding polyamine oxidase in *Ustilago maydis* odc mutants. *FEMS yeast research*, 10(7), 928-940.
- Valdez-Morales, M., Barry, K., Fahey Jr, G. C., Domínguez, J., de Mejia, E. G., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2010). Effect of maize genotype, developmental stage, and cooking process on the nutraceutical potential of huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Food Chemistry*, 119(2), 689-697.
- Viefhues, A., Schlathoelter, I., Simon, A., Viaud, M., & Tudzynski, P. (2015). Unraveling the function of the response regulator BcSkn7 in the stress signaling network of *Botrytis cinerea*. *Eukaryotic cell*, 14(7), 636-651.
- Witz, S., Jung, B., Fürst, S., & Möhlmann, T. (2012). De novo pyrimidine nucleotide synthesis mainly occurs outside of plastids, but a previously undiscovered nucleobase importer provides substrates for the essential salvage pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(4), 1549-1559.
- Wyatt, G. A., Kiers, E. T., Gardner, A., & West, S. A. (2014). A biological market analysis of the plant-mycorrhizal symbiosis. *Evolution*, 68(9), 2603-2618.
- Yu, P. L., Wang, C. L., Chen, P. Y., & Lee, M. H. (2017). YAP1 homologue-mediated redox sensing is crucial for a successful infection by *Monilinia fructicola*. *Molecular plant pathology*, 18(6), 783-797.
- Zambanini, T., Hartmann, S. K., Schmitz, L. M., Büttner, L., Tehrani, H. H., Geiser, E., ... & Schwarzländer, M. (2017). Promoters from the itaconate cluster of *Ustilago maydis* are induced by nitrogen depletion. *Fungal biology and biotechnology*, 4(1), 11.
- Zameitat, E., Freymark, G., Dietz, C. D., Löffler, M., & Bölker, M. (2007). Functional expression of human dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) in pyr4 mutants of *Ustilago maydis* allows target validation of DHODH inhibitors in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(10), 3371-3379.
- Zhang, G. C., Kong, I. I., Kim, H., Liu, J. J., Cate, J. H., & Jin, Y. S. (2014). Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae* strain by using RNA-guided Cas9 nuclease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(24), 7694-7701.

Zhou, C., Xi, L., Mao, W., Wan, J., Li, Y., Wang, Y., & Bao, D. (2017). Establishment of uracil auxotrophic dikaryotic strains of *Lentinula edodes*. *Breeding Science*, 67(2), 135-139.