

Jorge Luis
Cuamatzi Flores

Estudio de la evolución genómica en hongos a través de genómica comparativa y
evolución experimental

2024



Universidad Autónoma de Querétaro

Faculta de Ciencias Naturales

Estudio de la evolución genómica en hongos a través de genómica comparativa y
evolución experimental

Tesis

Que como parte de los requisitos
para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

Jorge Luis Cuamatzi Flores

Dirigido por:

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Co-dirigido por:

Dra. Lucía Guadalupe Morales Reyes

Querétaro, Qro a abril del 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Estudio de la evolución genómica en hongos a través
de genómica comparativa y evolución experimental

por

Jorge Luis Cuamatzi Flores

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: CNDCC-283743



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Estudio de la evolución genómica en hongos a través de genómica comparativa y evolución experimental

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

Jorge Luis Cuamatzi Flores

Dirigido por:

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Co-dirigido por:

Dra. Lucía Guadalupe Morales Reyes

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Presidente

Dra. Lucía Guadalupe Morales Reyes
Secretario

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo
Vocal

Dr. Fidel Landeros Jaime
Suplente

Dr. Eugenio Mancera Ramos
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro
Marzo de 2024
México

Agradecimientos

Gracias a CONAHCYT por la beca No. 735110 otorgada para los estudios de doctorado.

Gracias a la Facultad de Ciencia Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, así mismo gracias a la Universidad Autónoma de Querétaro por permitir formarme en su posgrado llamado Doctorado en Ciencias Biológicas.

Gracias al programa Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría de la Universidad Autónoma de Querétaro (FOPER-UAQ) por el financiamiento otorgado a través del proyecto FCN02469. De igual forma, gracias al CONCYTEQ por el financiamiento otorgado a través del proyecto NT/21/2022.

Gracias al Servicio Alemán de Intercambio Académico (*Deutscher Akademischer Austauschdienst*) por la beca No. 91835730 otorgada para hacer una estancia doctoral en el Instituto Max Planck de Biología Evolutiva (*Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie*).

Gracias al CONAHCYT por los donativos CB-2016-01 284992 y 103000, y gracias a UNAM-PAPIIT por los donativos IA201019, IN209021 e IN212524 otorgados a la Dra. Morales, con los cuales se financió parte de esta investigación.

Gracias a la Dra. Lucía Guadalupe Morales Reyes y al Dr. José Antonio Cervantes Chávez por co-dirigir mi tesis de doctorado, así como gracias por su invaluable apoyo durante esta investigación.

Gracias a mis sinodales de tesis, Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo, Dr. Fidel Landeros Jaime y Dr. Eugenio Mancera Ramos por sus valiosos comentarios que fortalecieron y enriquecieron este trabajo.

Gracias a la coordinación del Laboratorio Internacional de Investigación sobre el Genoma Humano – UNAM (LIIGH - UNAM), encabezada por el Dr. Rafael Palacios de la Lama y posteriormente por la Dra. María Ávila, por permitirme realizar este proyecto en las instalaciones de este centro de investigación.

Gracias a Alejandra Castillo, Carina Díaz, Jair García y Luis Aguilar personal técnico del LIIGH - UNAM por su apoyo durante la realización de este proyecto doctorado.

Gracias al Prof. Dr. Julien Yann Dutheil por su invaluable apoyo durante la estancia de investigación llevada a cabo en el Instituto Max Planck de Biología Evolutiva. De igual forma, gracias al Instituto Max Planck de Biología Evolutiva por permitirme llevar a cabo una estancia doctoral en sus instalaciones.

Finalmente, gracias a los compañeros del laboratorio de la Dra. Morales: Luis Dávila, Aarón de Luna, Héctor Fritz, María Trejo, José Antonio Urbán, Iván Sedeño, Luisa Sevilla, Natalia Rivera, Erick Santiago, María Fernanda Maldonado, Mariana Guerrero, Maritrini Colón, Samuel Quiñones y Fernanda Requena, por su apoyo y por los momentos de convivencia.

Índice	
Agradecimientos	3
Índice	5
Índice de figuras	8
Índice de tablas	9
Abreviaturas	10
Resumen	12
Abstract	13
I. Introducción	14
II. Antecedentes	16
II.I. Evolución de hongos patógenos.....	16
II.I.I. Bombardeo oxidativo durante las interacciones huésped-patógeno.....	18
II.II. <i>Ustilago maydis</i> : un hongo patógeno del maíz.....	20
II.II.I. Ciclo de vida de <i>U. maydis</i>	22
II.II.II. El genoma de <i>U. maydis</i>	23
II.II.III. Efectores de <i>Ustilago maydis</i>	24
II.II.V: Resistencia a estrés oxidativo en <i>U. maydis</i>	25
II.III. Evolución experimental en laboratorio.....	26
III. Hipótesis	30
IV. Objetivos	30
V. Metodología	31
V.I. Material biológico y condiciones de cultivo.....	31
V.I.I. Cepa de <i>Ustilago maydis</i>	31
V.I.II. Cepa de <i>Escherichia coli</i>	31
V.I.III. Cepa de <i>Zea mays</i>	31
V.II. Medios de cultivo.....	31
V.II.I. Medios de cultivo para <i>U. maydis</i>	31
V.II.II. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	33
V.III. Evolución experimental por 200 generaciones de <i>U. maydis</i> SG200.....	33
V.III.I. Cultivo isogénico de <i>U. maydis</i> SG200.....	34
V.III.II. Primer tratamiento de evolución experimental.....	35
V.III.II.I. Fase de choque por peróxido de hidrógeno.....	35
V.III.II.II. Fase de recuperación.....	36
V.III.III. Continuación de la evolución experimental hasta completar 20 tratamientos.....	37
V.III.IV. Estimación del número de generaciones.....	38
V.IV. Aislamiento de colonias de las líneas evolutivas.....	38

V.V. Análisis de la resistencia a H ₂ O ₂ en las colonias aisladas.....	40
V.VI. Herencia del fenotipo de resistencia al H ₂ O ₂	40
V.VI.I. Herencia posterior a 35 generaciones sin selección por H ₂ O ₂	41
V.VI.II. Herencia posterior 35 generaciones con selección por H ₂ O ₂	42
V.VII. Extracción de ADN genómico de <i>U. maydis</i>	43
V.VII.I. Cuantificación de la concentración del ADN	43
V.VII.II. Purificación de ADN para su secuenciación	44
V.VII.III. Secuenciación de lectura corta	44
V.VIII. Análisis bioinformático.....	45
V.VIII.I. Limpieza de las lecturas de secuenciación.....	45
V.VIII.II. Alineamiento de las lecturas de secuenciación al genoma de referencia de <i>U. maydis</i> ...	45
V.VIII.III. Identificación de variantes en el número de copias	46
V.VIII.III.I. Identificación del punto de ruptura de la amplificación del cromosoma 9	47
V.VIII.IV. Identificación de variantes de un solo nucleótido	48
V.VIII.IV.I. Identificación de SNV a partir de ensamble <i>de novo</i>	49
V.VIII.IV.II. Identificación de SNV con <i>bcftools</i>	51
V.VIII.V. Identificación de los genes que presentan variantes genéticas	52
V.IX. Generación de mutantes de <i>U. maydis</i> SG200 y análisis de su fenotipo	54
V.IX.I. Construcción de la molécula para interrumpir el gen UMAG_11067	54
V.IX.II. Construcción de molécula para la sobreexpresión de UMAG_11067	56
V.IX.III. Transformación de <i>Ustilago maydis</i>	58
V.IX.III.I. Generación de protoplastos	58
V.IX.III.II. Transformación de protoplastos.....	59
V.IX.III.III. Selección y purificación de cepas mutantes	60
V.X. Ensayos de respuesta a estrés	61
V.XI. Ensayos de patogenicidad	62
VI. Resultados y discusión.....	63
VI.I. <i>U. maydis</i> se adapta a concentraciones que eran inhibitorias de H ₂ O ₂	63
VI.I.I. La supervivencia de <i>U. maydis</i> incrementa durante la evolución experimental	64
VI.I.II. <i>U. maydis</i> resiste hasta 60 mM de H ₂ O ₂ después de la evolución	67
VI.I.III. La resistencia a peróxido de hidrógeno se presenta en colonias de las líneas expuestas a este agente	69
VI.II. El peróxido de hidrógeno induce variantes genómicas.....	72
VI.II.I. Amplificación del cromosoma nueve en líneas adaptadas a H ₂ O ₂	74
VI.V.I.I. Análisis del punto de ruptura de la amplificación del cromosoma nueve	77
VI.V.I.II. La amplificación del cromosoma nueve comprende una catalasa	81
VI.II.II. La exposición a H ₂ O ₂ indujo mutaciones puntuales.....	83
VI.II.I.I. Mutación no sinónima del gen UMAG_05545.....	92

VI.III. Herencia del fenotipo y genotipo en las colonias resistentes a H ₂ O ₂	93
VI.III.I La resistencia a H ₂ O ₂ persiste después de 35 generaciones	93
VI.III.II. Permanencia de las variantes genéticas con y sin selección por H ₂ O ₂	96
VI.IV. Las variantes genómicas cambian su frecuencia durante la evolución experimental	100
VI.IV.I. Incremento en la frecuencia de la mutación cr18:330,272 durante la evolución de la línea C	100
VI.IV.II. Dinámica de la variante del número de copias del cromosoma 9	102
VI.IV.III. La recurrencia y fijación de mutaciones entre líneas sugiere un error en el etiquetado de las muestras	104
VI.V. El gen UMAG_11067 que codifica una catalasa contribuye en la resistencia a H ₂ O ₂	106
VI.V.I. La expresión de UMAG_11067 incrementa con la dosis génica	107
VI.V.I.I. Duplicaciones de cromosomas como estrategia adaptativa.....	109
VI.V.II. La delección de UMAG_11067 reduce la resistencia a H ₂ O ₂	109
VI.V.III. La sobre-expresión de UMAG_11067 incrementa la resistencia a H ₂ O ₂	111
VI.VI. El aumento en la resistencia a H ₂ O ₂ disminuye la virulencia en maíz.....	113
VI.VII. La resistencia por peróxido de hidrógeno otorga resistencia a otros agentes de estrés	117
VII. Conclusiones.....	120
VIII. Bibliografía.....	122
IX. Anexos	129
Anexo I. Oligonucleótidos usados en este estudio	129
Anexo II. Variantes de un sólo nucleótido en <i>Ustilago maydis</i> SG200.....	130
Anexo III. Solapamiento de SNVs con dos técnicas de llamado de variantes.	132
Anexo IV. Genes localizados en la región amplificada del cromosoma nueve	134
Anexo V. Variantes en el número de copias de <i>U. maydis</i> en aislados silvestres	136

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i> (Kämper <i>et al.</i> , 2006).	23
Figura 2. Distribución de genotipos en evolución experimental.....	27
Figura 3. Procedimiento general para la evolución de <i>U. maydis</i> SG200.....	34
Figura 4. Dinámica de la adaptación de <i>U. maydis</i> al H ₂ O ₂	66
Figura 5. Tasa de supervivencia celular a 5 mM y 60 mM de H ₂ O ₂	68
Figura 6. Resistencia a H ₂ O ₂ en colonias derivada de las líneas evolutivas.....	71
Figura 7. Análisis de variantes en el número de copias en el genoma de <i>U. maydis</i>	75
Figura 8. Variante en el número de copias del brazo izquierdo del cromosoma 9.....	76
Figura 9. Localización del punto de ruptura de la amplificación del cromosoma 9	80
Figura 10. Porcentaje de SNVs compartidos en las líneas evolucionadas	89
Figura 11. Herencia de la resistencia a H ₂ O ₂ en las colonias de la línea C.....	95
Figura 12. Herencia de la variante en el número de copias del cromosoma 9	97
Figura 13. Perfil de herencia de los SNVs de las colonias de la línea C	99
Figura 14. Frecuencia de la mutación cr18:330,272C>A	101
Figura 15. Variante en el número de copias del cromosoma 9 en la línea C.....	103
Figura 16. Variantes en común en las colonias de las líneas expuestas a H ₂ O ₂	105
Figura 17. Expresión de UMAG_11067 en cepas con diferente dosis génica	109
Figura 18. Resistencia a H ₂ O ₂ en cepas Δ UMAG_11067.....	111
Figura 19. Resistencia a H ₂ O ₂ en cepas con copias extra de UMAG_11067	113
Figura 20. Perfil de virulencia de cepas resistentes a H ₂ O ₂	115
Figura 21. Fenotipo de las cepas evolucionadas en rosa de Bengal.....	118
Figura 22. Fenotipos de las cepas evolucionadas en otras fuentes de estrés.....	119
Figura 23. Contexto mutacional de <i>U. maydis</i> SG200.....	131
Figura 24. Aneuploidías en aislados de <i>U. maydis</i>	136

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del MC para el cultivo de <i>U. maydis</i>	32
Tabla 2. Composición del medio de cultivo YEPS ligero.....	32
Tabla 3. Composición del medio de cultivo Agar Regenerativo.....	33
Tabla 4. Concentración de H ₂ O ₂ usada en la evolución experimental.....	37
Tabla 5. Relación de colonias aisladas en cada línea evolutiva.....	39
Tabla 6. Cobertura de los genomas secuenciados.....	73
Tabla 7. Variantes en el número de copias en el cromosoma nueve por CNVnator.....	78
Tabla 8. Número de SNVs detectados a través de alineamiento múltiple de genomas....	86
Tabla 9. Número de SNVs detectados con <i>bcftools</i>	88
Tabla 10. SNVs detectados en las colonias de la línea A.....	90
Tabla 11. SNVs detectados en las colonias de la línea B.....	90
Tabla 12. SNVs detectados en las colonias de la línea C.....	90
Tabla 13. SNVs detectados en las colonias de la línea D.....	91
Tabla 14. SNVs detectados en las colonias de la línea E.....	91
Tabla 15. SNVs detectados en las colonias de la línea F.....	91
Tabla 16. Secuencia de los oligonucleótidos usados en este estudio.....	129
Tabla 17. Solapamiento final de SNVs con dos técnicas de llamado de variantes.....	132
Tabla 18. Genes en los primeros 150 kb del cromosoma 9.....	134

Abreviaturas

%GC	Porcentaje de guaninas-citosinas
°C	Grado Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
cDNA	DNA complementario
CIA	Cloroformo-alcohol isoamílico
cm	Centímetros
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
dddH₂O	Agua tri-distilada
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Fwd	Oligo sentido
h	Hora (s)
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Hyg B	Higromicina B
kb	kilobase
LB	Luria-Bertani
M	Molar
MC	Medio completo
M.M	Masa molecular
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MM	Marcador molecular
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
qPCR	PCR en tiempo real

RDH	Rompimiento de la doble hebra
Rev	Oligo reverso
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SNV	Variantes de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Variants</i>)
TE	Tris-EDTA
T_m	Temperatura de alineamiento
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
μg	Microgramos
μL	Microlitro
μM	Micromolar

Resumen

El hongo fitopatógeno *Ustilago maydis* causa la enfermedad conocida como *huitlacoche* en el maíz al suprimir las defensas de la planta huésped, dentro de las cuales se incluye el bombardeo oxidativo. Aunque hay numerosos estudios que exploran cómo *U. maydis* enfrenta el estrés oxidativo y promueve la infección, el conocimiento sobre variantes genéticas que mejoran la resistencia al estrés oxidativo y su subsecuente impacto en la virulencia sigue siendo limitado. Este estudio tuvo como objetivo identificar variantes genómicas recurrentes en cepas de *U. maydis* adaptadas al peróxido de hidrógeno y evaluar sus efectos en la virulencia.

Para lograr esto, evolucionamos en el laboratorio seis líneas derivadas de *U. maydis* cepa SG200. Tres de estas fueron expuestas periódicamente a H₂O₂ durante 200 generaciones. Las líneas evolucionadas con exposición a H₂O₂ mostraron un aumento en la resistencia a este agente. La identificación de variantes genéticas reveló la presencia de variantes de nucleótido único (SNVs) en cada línea analizada. Se identificó una SNV recurrente en un gen relacionado con la remodelación de la cromatina en cinco individuos aislados de líneas expuestas a H₂O₂. De igual forma, siete individuos aislados de líneas expuestas a H₂O₂ presentaron una amplificación en el cromosoma nueve. Esta variante empezó abarcando todo el cromosoma nueve y posteriormente se contrajo a una región más pequeña en el brazo izquierdo. En todos los casos, la amplificación contiene al único gen de *U. maydis* que codifica para una enzima catalasa. De manera interesante, el aumentar la resistencia de *U. maydis* a H₂O₂ condujo a una reducción de la virulencia.

En resumen, nuestro estudio proporciona evidencia sobre la rápida ocurrencia y selección de duplicaciones cromosómicas durante la adaptación al H₂O₂ de *U. maydis*, aunque a costa de una reducción de la virulencia.

Palabras clave: *Ustilago maydis*, virulencia, resistencia, estrés oxidativo

Abstract

The phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* causes the disease known as *huitlacoche* in maize, once plant's defenses had been suppressed, including the oxidative burst. While many studies have focused in decipher how *U. maydis* copes with oxidative stress and promotes infection, knowledge about genetic variants that enhance resistance to oxidative stress and their subsequent impact on virulence remains limited. This study aimed to identify recurrent genomic variants in *U. maydis* strains adapted to hydrogen peroxide (H₂O₂) and evaluate their effects on virulence.

To achieve this, three lines derived from *U. maydis* SG200 were evolved in laboratory. These lines were periodically exposed to increasing concentrations of H₂O₂ over 200 generations. The evolved lines exhibited a two-fold increase in resistance to H₂O₂. Genetic variant identification revealed the presence of single nucleotide variations (SNVs) in each analyzed line. A recurrent SNV in a gene related to chromatin remodeling was found in five of the isolated colonies from H₂O₂-exposed lines. Similarly, seven isolated colonies from H₂O₂-exposed lines showed an amplification on chromosome nine. This variant initially encompassed the entire chromosome, later contracting to a smaller region on the left arm. In all cases, the amplification included the sole *U. maydis* gene encoding a catalase enzyme. Interestingly, enhancing *U. maydis* resistance to H₂O₂ led to a reduction in virulence.

In summary, our study provides evidence of the rapid occurrence and selection of chromosomal duplications during *U. maydis* adaptation to H₂O₂, albeit at the expense of reduced virulence.

Keyword: *Ustilago maydis*, virulence, oxidative stress

I. Introducción

La evolución de una especie está ligada a su estilo de vida. En el contexto de las interacciones huésped-patógeno, ambos organismos desarrollan mecanismos para lograr o evadir, respectivamente, una infección exitosa. *Ustilago maydis* es un hongo basidiomiceto que infecta tanto al maíz (*Zea mays*) como a su ancestro, el teosinte. Estas dos especies han co-evolucionado durante al menos los últimos 10,000 años, resultando en que ambas han desarrollado estrategias para evadir y permitir la infección de *U. maydis* (Schweizer *et al.*, 2021; Lanver *et al.*, 2018; Depotter *et al.*, 2021; Sierra-Campos *et al.*, 2009). Durante la infección en maíz, *U. maydis* activa mecanismos de regulación transcripcional mediados a través de factores transcripcionales como *yap1* y *nlt1* con el objetivo de sobrevivir al ambiente oxidativo desencadenado por la respuesta inmune de la planta (Molina y Kahmann, 2007; Lin *et al.*, 2021). Estos factores transcripcionales desempeñan un papel esencial al coordinar las respuestas que permiten al hongo contrarrestar los efectos perjudiciales de las EROs y garantizar su supervivencia en el ambiente hostil de la planta. En paralelo con los mecanismos transcripcionales, la acumulación del disacárido trehalosa es otra estrategia durante la supervivencia de *U. maydis* al estrés oxidativo (Cervantes Chávez *et al.*, 2016).

A pesar de que hay un amplio conocimiento sobre los mecanismos empleados por *U. maydis* para sobrevivir al estrés oxidativo, se desconoce hasta qué punto este hongo puede incrementar su resistencia a este estrés y qué variantes genéticas podrían resultar en un fenotipo de alta resistencia. Con el objetivo de responder a estas interrogantes, el presente trabajo se enfocó en explorar que mecanismos emplea *U. maydis* para sobrevivir a la exposición intermitente a H₂O₂ durante doscientas generaciones de evolución experimental. Al finalizar la evolución experimental, se observó un incremento en la resistencia a H₂O₂ de las líneas expuestas, así como de los individuos descendientes de ellas, en comparación con la resistencia a H₂O₂ exhibida en la cepa inicial, y en las cepas evolucionadas en ausencia de estrés oxidativo.

Las líneas expuestas a H₂O₂ presentaron variantes genéticas, donde destaca la presencia de una amplificación en el brazo izquierdo del cromosoma 9. En dicha variante estructural se encuentra el gen UMAG_11067, que codifica una proteína catalasa, la cual es una enzima crucial para la detoxificación de H₂O₂.

El estudio de la expresión del gen de catalasa reveló una mayor expresión en cepas adaptadas a H₂O₂ que contienen la amplificación del cromosoma nueve. Adicionalmente, observamos que la interrupción del marco abierto de lectura de UMAG_11067, así como la pérdida de la región amplificada del cromosoma nueve identificada tras un procedimiento de transformación, en cepas con previamente dos y tres copias de este gen, resultó en una disminución en la resistencia a H₂O₂, llegando a los niveles de sensibilidad de la cepa inicial. Por otro lado, la generación de una mutante de *U. maydis* que posee una copia extra del gen de catalasa, reveló un fenotipo de aumento en la resistencia a H₂O₂, sin llegar al nivel observado en las cepas que evolucionaron en presencia de estrés oxidativo. Esta disparidad sugiere que los fenotipos de resistencia a H₂O₂ obtenidos a través de evolución experimental, son el resultado de un conjunto de mecanismos y no solo la amplificación del gen de la catalasa. Finalmente, nuestros análisis de patogenicidad indican que la virulencia en maíz disminuye en cepas con una elevada resistencia a H₂O₂, ya sea obtenida a través de la evolución experimental o mediante la sobre-expresión de la catalasa. Esta observación indica que el aumentar la resistencia al estrés oxidativo por los dos métodos aquí explorados tuvo implicaciones negativas en la capacidad patogénica del hongo.

En resumen, esta tesis proporciona información sobre los mecanismos moleculares que median la adaptación de este hongo a condiciones de estrés oxidativo. Los resultados obtenidos enriquecen el conocimiento sobre la biología de este patógeno, y podrían tener implicaciones importantes para el control de enfermedades en cultivos agrícolas.

II. Antecedentes

II.I. Evolución de hongos patógenos

Los hongos constituyen un grupo taxonómico perteneciente al dominio de los eucariontes, y engloban más de 2 millones de especies distintas distribuidas en diversos filos, tales como Basidiomycota, Ascomycota, Glomeromycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota y Microsporidia (Asiegbu y Kovalchuk, 2021). A pesar de la considerable diversidad de especies que componen este grupo taxonómico, se estima que únicamente se han descrito alrededor de 150,000 taxones (Phukhamsakda *et al.*, 2022).

Algunas especies fúngicas han sido domesticadas, entre ellas, destacan *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium chrysogenum*, entre otras. Estas especies suelen ser empleadas en el campo de la biotecnología para obtener productos y metabolitos de interés para el ser humano (Gibbons, 2019). De igual forma, existen especies comestibles, como *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, entre otras, que tienen un buen aporte nutricional además de la presencia de compuestos bioactivos (Kumar *et al.*, 2021).

No obstante, también se encuentran hongos patógenos como *Candida albicans*, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus* que representan una amenaza ya que pueden desencadenar patologías potencialmente mortales en seres humanos inmunocomprometidos u otros (Rokas, 2022). De igual forma, existen hongos patógenos que afectan a las plantas, como *Fusarium verticilloides*, *Zymoseptoria tritici*, *Magnaporthe oryzae* y *Ustilago maydis*, lo que resulta en pérdidas en el rendimiento y calidad de los cultivos (Dean *et al.*, 2012).

Los hongos patógenos tienen un fuerte impacto en la economía debido a que pueden afectar seriamente la salud humana, pero también causan grandes pérdidas de cultivos (Nnadi y Carter, 2021). Este grupo de hongos tienen la capacidad de sobrevivir a ambientes hostiles y eventualmente llevar a cabo la infección en el

organismo hospedero. Esto último es posible gracias a su habilidad de evadir o suprimir los mecanismos de defensa de los huéspedes a través de la acción de moléculas llamadas efectores. Hay efectores para todas las etapas de la infección y actúan a través de diversos mecanismos, con el objetivo final de promover la virulencia de los patógenos mediante la interacción con el hospedante (Jain *et al.*, 2019; Karunarathna *et al.*, 2021).

La interacción entre hongo patógeno y huésped lleva a una evolución constante de ambos organismos (Möller & Stukenbrock, 2017; Grandaubert *et al.*, 2019). Sin embargo, los hongos patógenos presentan mayor variación genética, que a menudo resulta en resistencia a los mecanismos de defensa del huésped, así como también en resistencia a fungicidas, tales como los azoles (Mount *et al.*, 2018; Habit *et al.*, 2021; Möller *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2023). Hay una gran variedad de hongos patógenos de plantas, entre ellos se encuentran, los carbones que se caracterizan por ser organismos biotróficos que adquieren sus nutrientes a partir del tejido vegetal que están infectando. De igual forma, estos organismos requieren de manera forzada llevar a cabo la infección de una planta para completar su ciclo de vida (Goulet y Saville, 2017).

El genoma de los hongos patógenos está bajo una constante evolución y diversos factores determinan la arquitectura de estos genomas, entre ellos la cantidad de elementos móviles, cambios en ploidías y re-arreglos cromosómicos (Benevenuto *et al.*, 2018). La diversidad genética en los genomas de especies patogénicas suele estar relacionada con secuencias repetidas, ya que se ha observado que estas juegan un rol vital en el nacimiento de nuevos genes (Stukenbrock y Croll, 2014).

La evolución de los hongos, así como de todos los organismos está directamente influenciada por su estilo de vida. Sin embargo, se ha reportado que los hongos patógenos suelen adaptarse de una forma más rápida en comparación con hongos no patógenos (Grandaubert *et al.*, 2019; Feurtey *et al.*, 2018). Esta idea es soportada por la alta variación genómica presente en los hongos patógenos. Aunque la interacción huésped-patógeno ha sido señalada como una fuerza

evolutiva para ambas especies, existen otros factores que determinan la rápida evolución de los hongos patógenos, entre esas condiciones destacan la presencia de elementos genéticos móviles, así como a la plasticidad de su genoma (Möller y Stukenbrock, 2017; Muszewska *et al.*, 2019).

II.I.I. Bombardeo oxidativo durante las interacciones huésped-patógeno

En la naturaleza, los organismos se encuentran de manera frecuente en condiciones de estrés, debido a factores bióticos y abióticos, tales como, cambios en la temperatura, en la presión osmótica, limitación de nutrientes e interacciones con otros organismos. Se ha demostrado, que la exposición constante de un organismo a algún tipo de estrés da lugar a mutaciones.

Durante las interacciones patógeno-hospedero se desata un bombardeo de estrés oxidativo hacia los patógenos debido a un sistema de defensa por parte de los organismos afectados. El bombardeo oxidativo implica la generación masiva de especies reactivas de oxígeno (EROs) con el propósito de eliminar al organismo invasor (Apóstol *et al.*, 2008; Komalapriya *et al.*, 2015). Este proceso se caracteriza por un desequilibrio entre la cantidad de agentes oxidantes y antioxidantes.

Aunque los organismos aerobios, en condiciones fisiológicas normales, mantienen concentraciones bajas de EROs como subproductos de las funciones mitocondriales, y estas actúan como segundos mensajeros (Barzilai y Yamamoto, 2004; Finkel y Holbrook, 2000; Mittelman y Wilson, 2010). Durante el bombardeo oxidativo, la concentración de EROs se eleva lo suficiente como para causar diversos daños a componentes celulares, tales como proteínas, lípidos, así como daño al ADN y ARN (Cadet y Davies, 2017; Rinnerthaler *et al.*, 2012; Salmon *et al.*, 2004).

Los daños causados por moléculas de la familia de especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y superóxidos, interrumpen directamente las actividades metabólicas de las células. A pesar de que el H_2O_2 es una molécula menos reactiva que otras EROs, tiene la capacidad de difundirse a través de

membranas biológicas y alcanzar el citoplasma de una manera muy sencilla. El ADN no es oxidado directamente por el H_2O_2 , este reacciona con el hierro intracelular para generar el radical hidroxilo (HO^\bullet) a través de la reacción de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet$) (Mendoza-Chamizo *et al.*, 2018). Siendo el HO^\bullet una molécula altamente oxidante, que reacciona al instante con moléculas orgánicas localizadas en la célula, como los cromosomas (Mendoza-Chamizo *et al.*, 2018). Dentro de las cuatro bases de ADN, debido a su bajo potencial redox, la guanina (G) es la más susceptible a la oxidación, dando lugar a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) y a 2-6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapiG), siendo la 8-oxoG la más mutagénica generando transversiones de GC a TA (Boiteux *et al.*, 2017).

De igual forma, otro daño al ADN causado por el estrés oxidativo es el rompimiento de la doble hebra (RDH). Un solo RDH puede causar apoptosis (Rich *et al.*, 2000), directamente inactivar genes clave o conducir a aberraciones cromosomales (Van Gent *et al.*, 2001). El RDH es reparado en células eucariotas por la acción concreta de dos mecanismos, uno basado en recombinación homóloga entre moléculas hermanas de ADN y otra en la rápida unión no homóloga de prueba y error (Khanna y Jackson, 2001; Van Gent *et al.*, 2001). La supervivencia celular después del daño oxidativo al ADN requiere de señalización, y posterior reparación (Moore *et al.*, 2019).

Debido a su estilo de vida algunos organismos se encuentran frecuentemente expuestos a estrés, como lo son las levaduras fermentativas que se encuentran en condiciones constantes de estrés osmótico, oxidativo y de temperatura (Somani *et al.*, 2019), así como aquellos organismos que son patógenos de mamíferos y de plantas, tales como la levadura patógena de humanos *Candida glabrata*, y los hongos patógenos del maíz *Sporisorium reilianum* y *Ustilago maydis* (Healey *et al.*, 2016; Mueller *et al.*, 2008; Schirawski *et al.*, 2005).

La respuesta de protección en el patógeno bajo condiciones oxidativas involucra reacciones enzimáticas que reducen los agentes oxidantes, de igual forma participan moléculas con actividad antioxidante como el ascorbato, tocoferol,

flavonoides, entre otros que contrarrestan a las EROs, finalmente, los procesos genéticos como el cambio en la expresión de genes por actividad de factores transcripcionales tal como *Yap1* y cambios en la conformación estructural de la cromatina han mostrado tener una alta relevancia en la respuesta antioxidante, esto debido a que mutaciones que llevan a la inactivación de ciertos genes producen fenotipos altamente sensibles al estrés oxidativo y que disminuyen el éxito de la patogenicidad (Campos *et al.*, 2005; Molina y Kahmann, 2007).

II.II. *Ustilago maydis*: un hongo patógeno del maíz

Ustilago maydis es un hongo basidiomiceto patógeno del maíz (*Zea mays*). Este hongo pertenece a la familia de los hongos carbón y es responsable de causar la enfermedad conocida como carbón del maíz (también llamada *huitlacoche* en México).

Este hongo es un modelo para el estudio de procesos de biología celular y molecular, e interacciones planta-patógeno (Basse y Steinberg, 2004). *U. maydis* tienen la capacidad de infectar *Zea mays* en cualquier etapa del desarrollo, y produce los síntomas de la enfermedad en todos los órganos aéreos de la planta. Esta característica de *U. maydis* contrasta con la de la mayoría de los hongos carbón, quienes usualmente producen los síntomas en los órganos reproductivos de la planta. La infección de la planta es necesaria para que *U. maydis* complete su ciclo de vida y poder asegurar progenie.

U. maydis es el responsable de causar tumores en el maíz, lo cuales son comestibles y de alto valor agregado debido a su contenido nutricional (Valverde *et al.*, 1995). Sin embargo, el éxito de la infección por *U. maydis* depende de una compleja red de señalización a diferentes niveles de organización celular. Durante las etapas tempranas de la interacción hongo-maíz, el maíz despliega diversos mecanismos de defensa, donde el más letal es el bombardeo oxidativo (Hampel *et al.*, 2016). De igual forma hay reacciones fisiológicas que derivan en cambios

osmóticos y de temperatura, razón por la cual, es vital que *U. maydis* emplee mecanismos de adaptación para sobrevivir a dichos estreses (Benevenuto *et al.*, 2018; Tanaka *et al.*, 2014).

U. maydis y *Z. mays* comparten una antigua historia evolutiva, incluso se ha observado que *U. maydis* puede infectar plantas de Teosinte, el ancestro del maíz. Se ha establecido que *U. maydis* es un hongo cosmopolita ya que está distribuido alrededor de América, Europa, África y Asia (Barnes *et al.*, 2004; Newcombe y Thomas, 2004; Munkacsi *et al.*, 2008; Depotter *et al.*, 2021; Schweizer *et al.*, 2021; Momeni y Nazari, 2022). Aunque el principal hospedero de *U. maydis* es el maíz, hay evidencia en laboratorio de que este hongo puede infectar plantas como *Arabidopsis thaliana*, sorgo, arroz, tabaco, frijol, papaya, ajo, causando formación de micelio en órganos aéreos de la planta, así como clorosis, antocianosis y necrosis, pero solo en maíz y en papaya es capaz de formar tumores (León-Ramírez *et al.*, 2004; Martínez-Soto *et al.*, 2013). A través de estudios de genómica de poblaciones aplicados a muestras aisladas del territorio mexicano, se ha observado que la diversidad genética en estos individuos es considerablemente menor a la que se presenta en aislados de Estados Unidos y Sudamérica (Munkacsi *et al.*, 2008).

A partir de 21 aislados en 5 regiones distintas de México identificaron dos poblaciones predominantes. En aislados de Oaxaca se detectaron cepas que presentan una mezcla génica de ambas poblaciones, lo cual indica intercambio de material genético en estas dos sub-poblaciones. Adicionalmente, se identificó que la cepa de referencia (Kämper *et al.*, 2006) *U. maydis* 521 que fue aislada en Estados Unidos presenta una mezcla de ambas poblaciones detectadas en México.

Finalmente se ha identificado que todos los aislados de *U. maydis* en México experimentaron reducciones en el tamaño efectivo de la población, de igual forma el estudio de coalescencia en las poblaciones mostró un cuello de botella, en ambos casos esos cambios ocurrieron hace 10,000 años, fecha en la que se estima fue domesticado el maíz (Schweizer *et al.*, 2021).

II.II.I. Ciclo de vida de *U. maydis*

El ciclo de vida de *U. maydis* se caracteriza por ser bifásico, en este se encuentran una fase saprofítica y una fase biotrófica. En la fase saprofítica, *U. maydis* crece como levadura haploide. La transición a la fase biotrófica inicia cuando dos células levaduriformes sexualmente compatibles se aparean y dan lugar a una estructura de hifa dicarionte. El apareamiento de las células haploides está mediado por un sistema receptor de feromona. Este sistema es codificado por el *locus* de apareamiento a, mientras el crecimiento de la hifa está mediado por el *locus* de apareamiento b. El filamento de la hifa dicarionte crece sobre la superficie del tejido vegetal del maíz donde empieza a formar una estructura especializada llamada apresorio. El apresorio produce una gran cantidad de efectores, entre los cuales se encuentran enzimas que degradan la pared celular de la planta, metabolitos que alteran la fisiología de la planta, entre otros. Una vez *U. maydis* ha formado el apresorio, la hifa continúa creciendo en el interior de la planta, hasta comenzar la formación de tumores. Los tumores producidos por *U. maydis* están formados por la agregación masiva de hifas. Las hifas maduras se fragmentan a través de citocinesis para dar lugar a células esféricas de pigmentación oscura llamadas teliosporas. En la etapa más madura de los tumores, éstos se rompen para liberar las teliosporas. En condiciones ambientales favorables, las teliosporas germinan para formar promicelio (Figura 1). Esta última estructura se dividirá en células unicelulares haploides que reinician el ciclo de vida de *U. maydis*.

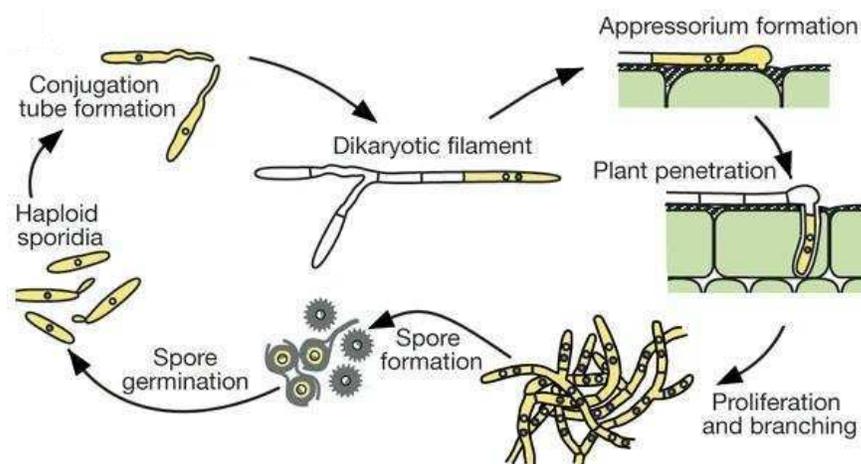


Figura 1. Ciclo de vida de *Ustilago maydis* (Kämper *et al.*, 2006).

II.II.II. El genoma de *U. maydis*

El genoma de *U. maydis* tiene un tamaño aproximado de 20.5 Mb distribuidos en 23 cromosomas nucleares, un genoma mitocondrial y tres contigs no mapeados (Kämper *et al.*, 2006). En el genoma de este hongo patógeno se localizan 6,902 genes codificantes de proteínas; adicionalmente, se han identificado dos elementos móviles del tipo retro-elementos, el primero es *TigR* y el segundo es *HobS*. Este último elemento se encuentra en al menos una copia completa o parcial en cada cromosoma (Kahmann y Kämper, 2004).

Dentro de los 6,902 genes de *U. maydis*, se encuentran genes que codifican proteínas que participan en funciones biológicas esenciales como lo es el metabolismo de fuentes de carbono y nitrógeno, replicación del ADN, síntesis de proteínas, regulación génica, entre otros (Kojic *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2013; Tollot *et al.*, 2016; Soberanes-Gutiérrez *et al.*, 2022; Sanpedro-Luna *et al.*, 2023). De igual forma, el genoma de este hongo contiene 22 grupos de genes efectores distribuidos por todo el genoma. Dichos genes participan en el proceso de virulencia de *U. maydis* en maíz codificando para proteínas que modifican la fisiología celular de la planta huésped, suprimiendo el sistema inmune de la planta, facilitando así la infección del patógeno en el huésped (Todd *et al.*, 2022).

Dentro de esos genes hay grupos con un importante rol en la patogenicidad, como los codificantes de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal, factores transcripcionales, como *Yap1*, que participan en la virulencia y resistencia a estrés oxidativo de *U. maydis* (Molina y Kahmann, 2007) y genes biosintéticos de trehalosa (*Tps1* y *Tps2*). La inactivación de estos dos últimos trae como consecuencia la pérdida de la virulencia durante su interacción con el maíz (Cervantes-Chávez *et al.*, 2016).

II.II.III. Efectores de *Ustilago maydis*

Los organismos patógenos pueden infectar a sus hospederos a través del aprovechamiento de los metabolitos del huésped. Este proceso es mediado por la acción de efectores, los cuales son moléculas tales como proteínas, metabolitos especializados y ARN de longitud reducida (Schuster *et al.*, 2024). Los efectores funcionan de varias formas, entre ellas: 1) protegen al patógeno al formar una barrera en la pared celular, 2) inactivan enzimas de las plantas o inactivan compuestos tóxicos para el patógeno, 3) suprimen la respuesta inmune, 4) alteran la fisiología de la planta para promover el crecimiento del patógeno (Depotter *et al.*, 2021). Los efectores pueden estar presentes en el apoplasto, que es el sitio donde ocurre la interacción de tejidos de ambos organismos (planta-hongo). En esta zona, se ha descrito que actúa Pit2, un efector que inhibe la actividad de proteasas que tienen como objetivo degradar proteínas de membrana de *U. maydis*, cuando el gen codificante de este efector es alterado, la virulencia se reduce notablemente (Misas Villamil *et al.*, 2019). Otro efector que actúa en la zona del apoplasto es Pep1, el cual inhibe la actividad de POX12, una enzima generadora de peróxido de hidrógeno, cuando el gen codificante de Pep1 es alterado, la virulencia reduce drásticamente (Hemetsberger *et al.*, 2012).

Algunos efectores destacan pueden translocarse al interior del tejido del maíz. Ejemplo de lo anterior es Cmu1, un efector que interrumpe la vía biosintética del ácido salicílico, una molécula clave en la defensa de la planta contra los patógenos, dirigiendo el precursor corismato a la síntesis de fenilalanina y tirosina (Djamei *et*

al., 2011). Otro efector que invade el tejido vegetal es Tin2, una proteína cinasa que altera la actividad del factor de transcripción del maíz ZmR1, lo cual lleva a una reducción en la síntesis de antocianinas (Tanaka *et al.*, 2014). Otro efector que actúa directo en el interior del tejido vegetal es See1, el cual promueve la síntesis del ADN de la planta, lo cual lleva a la generación de tumores (Redkar *et al.*, 2015).

II.II.V: Resistencia a estrés oxidativo en *U. maydis*

Durante su interacción con el maíz, *U. maydis* se enfrenta a diversas condiciones estresantes, entre las cuales el estrés oxidativo es la defensa primaria de la planta y la más devastadora. El estrés oxidativo, caracterizado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la capacidad de los sistemas antioxidantes para neutralizarlos, afecta la homeostasis redox y genera daño en todos los componentes celulares (Aguirre *et al.*, 2006; Zdraġ-Tęcza *et al.*, 2018). La producción de especies reactivas de oxígeno es una consecuencia de la respiración celular. Sin embargo, durante la interacción de *U. maydis* con su huésped, la generación de EROs puede aumentar significativamente debido a la activación del sistema inmunológico de la planta en respuesta a la infección fúngica (Campo *et al.*, 2004; Lev *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2022).

La supervivencia de *U. maydis* en el ambiente hostil producido en la planta se debe a los eficientes sistemas de defensa desarrollado por el hongo para protegerse contra el estrés oxidativo. Dentro de esos sistemas se encuentra la respuesta a estrés oxidativo a través de la regulación de aproximadamente 505 genes regulados por el factor transcripcional Yap1 (Molina y Kahmann, 2007). La delección de este gen resulta en un fenotipo de alta sensibilidad a H₂O₂, así como una reducción en la virulencia en comparación con la cepa silvestre. Estos fenotipos son atribuidos a la acumulación en exceso de H₂O₂ en las proximidades de las hifas fúngicas, lo cual afecta negativamente la proliferación celular en el tejido infectado. El fenotipo exhibido en cepas *U. maydis* $\Delta yap1$ sugiere que este gen tiene un rol clave en la detoxificación de H₂O₂ producido por la planta durante la infección.

II.III. Evolución experimental en laboratorio

La evolución adaptativa en laboratorio es una técnica útil para entender las dinámicas evolutivas de diferentes especies (Swamy y Zhou, 2019; Van den Bergh *et al.*, 2018). En este tipo de experimentos, se somete a una o varias poblaciones de una especie dada a un ambiente controlado y se observa cómo evolucionan a lo largo del tiempo. Estos experimentos permiten el estudio de la evolución en tiempo real, permitiendo obtener información precisa sobre los procesos evolutivos ocurridos en el ambiente dado.

Un ejemplo clásico de evolución experimental en laboratorio es la investigación de Lenski y colaboradores (1991), llevada a cabo en *Escherichia coli* en un medio simple con limitación de glucosa. Esta evolución comenzó en 1988 y que continua hasta nuestros días, en este periodo se han alcanzado al menos 75,000 generaciones (Lenski, 2023). Este experimento ha llevado a diferentes hallazgos, donde, uno de los más destacados es que después de 31,500 generaciones, una población de *E. coli* duplicó la región del cromosoma correspondiente al transportador *citT*, permitiendo así metabolizar citrato como fuente de carbono en condiciones aerobias (Blount *et al.*, 2008, Blount *et al.*, 2012).

Con el objetivo de mejorar las características fenotípicas de microorganismos de interés biotecnológico, se han empleado técnicas de ingeniería genética que se basan en modificaciones puntuales de secuencias nucleotídicas. La evolución adaptativa en laboratorio o evolución experimental ha incrementado su popularidad porque puede mejorar de fenotipos en microorganismos sin modificarlos genéticamente, y además permite comprender cómo evolucionan los fenómenos biológicos. Estos experimentos consisten en cultivos prolongados de células en un ambiente elegido para seleccionar aquellas cepas que han adquirido mutaciones benéficas (Figura 2). La clave de esta técnica recae en la ventaja de adecuación adquirida por las mutaciones adaptativas, que permiten que la cepa evolucionada pueda competir con su ancestro y dominar en la población (Sandberg *et al.*, 2019). Esta técnica ha llegado a ser una herramienta de gran impacto en la ingeniería

metabólica para el desarrollo y optimización de microorganismos con mejor adecuación a determinado ambiente. La evolución experimental, se ha usado para: 1) optimizar la velocidad de crecimiento, 2) incrementar la tolerancia a condiciones adversas, 3) utilizar de sustratos poco convencionales, 4) incrementar los rendimientos de producción y 5) realizar descubrimientos genéticos (Gresham y Dunham, 2014).

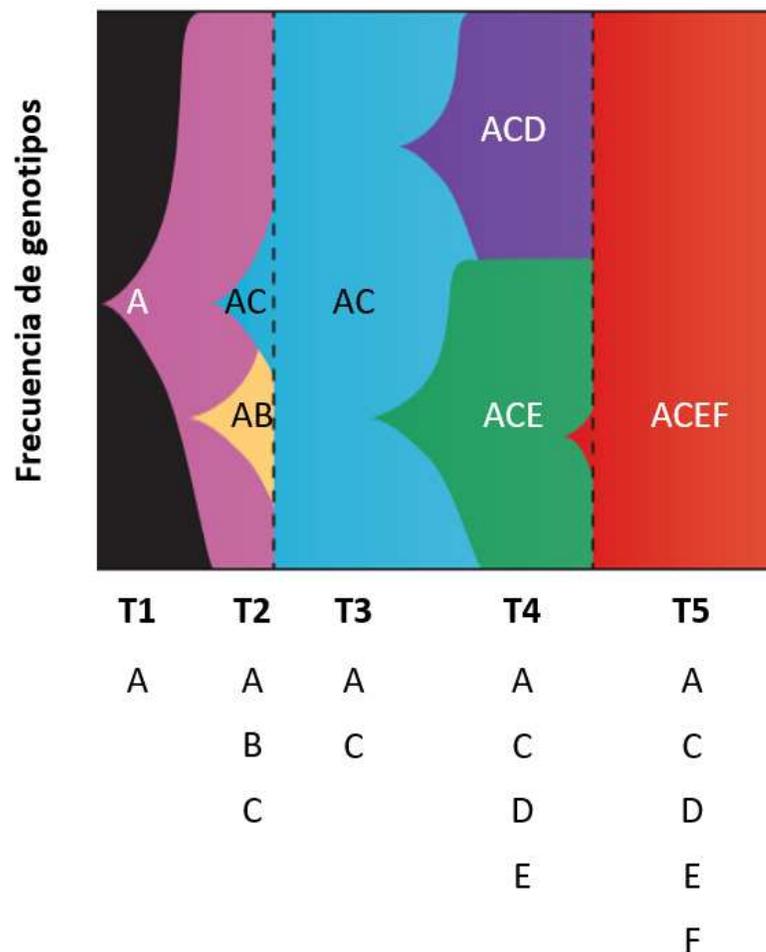


Figura 2. Distribución de genotipos en evolución experimental. La generación de variantes *de novo* da lugar a la aparición de diferentes subpoblaciones. Esas variantes irán fijándose o extinguiéndose de acuerdo con sus consecuencias en la adecuación (*adaptado de* Barrick y Lenski, 2013).

El incremento de la tolerancia a condiciones de estrés celular es uno de los aspectos más estudiados a través de la evolución experimental. Una condición de estrés puede ser causada por un ambiente complejo para el crecimiento que induce a una regulación equivocada del metabolismo, o por una exposición específica a moléculas inhibitorias del crecimiento. A través de evolución experimental se ha estudiado la respuesta a ambientes de estrés como: diferentes niveles de pH, presión osmótica, temperatura, radiación UV, inhibidores del metabolismo y estresantes nutricionales (Huang *et al.*, 2019; Huang y Kao, 2018). La evolución bajo estrés permite estudiar diversos aspectos que llevan a una célula a adquirir variantes genéticas que derivan en un fenotipo resistente a la condición estresante. El nivel de astringencia de la condición estresante (Barrick y Lenski, 2013). Para adaptarse a una condición de estrés, las células suelen reprogramar su maquinaria transcripcional. Esto se ha observado en *Saccharomyces cerevisiae*, en donde a través de evolución experimental en ambientes de estrés osmótico y oxidativo durante 300 generaciones, fueron detectados cambios en la expresión de genes de acuerdo con el tipo de estrés. 61 genes fueron afectados en la población expuesta a estrés osmótico y 348 en la población expuesta a estrés oxidativo. En ambos casos, solo 12 genes inducidos fueron compartidos en ambas condiciones lo que sugiere que los cambios en la regulación génica son específicos de acuerdo con el tipo de estrés (Dhar *et al.*, 2013).

La adquisición y herencia de mutaciones pueden llevar a un organismo a adaptarse a una condición de estrés gracias a la presencia de fenotipos con una mayor capacidad de supervivencia y proliferación a la condición dada de estrés (Van den Bergh *et al.*, 2018). Lo anterior se ejemplifica en *C. glabrata*, donde en un experimento de evolución adaptativa en laboratorio en presencia de peróxido de hidrógeno, se detectó un conjunto de mutaciones en secuencias con posible rol promotor o regulador de la transcripción. De igual forma se detectaron mutaciones en secuencias codificantes de proteínas relacionadas con la integridad de la pared celular (*EMW1*, *LRG1*, *FLC1*), proteínas que median la degradación de proteínas

mal plegadas (*YAT12*) y proteínas deshidrogenasas que se localizan en el exterior de las membranas mitocondriales durante el estrés oxidativo (*ALD6*) (Huang y Kao, 2018).

La técnica de evolución experimental ha sido aplicada en una limitada cantidad de especies, predominando bacterias y levaduras con el objetivo de monitorear los procesos evolutivos en tiempo real. A pesar de que *U. maydis* es un hongo modelo que ha servido para identificar procesos biológicos básicos como la reparación del ADN (Holliday, 1961), no se ha explotado el potencial de este organismo para entender la evolución de su resistencia a estrés oxidativo ni de su virulencia en maíz. Sin embargo, recientemente se ha empleado la evolución en laboratorio en *U. maydis* para incrementar la producción del metabolito de alto valor agregado ácido itacónico (Helm *et al.*, 2024) usando glicerol crudo derivado de la producción de biodisel como fuente de carbono. En el experimento Helm y colaboradores (2024) usaron un diseño experimental de diluciones diarias durante 11 días en un medio de cultivo que usa glicerol como única fuente de carbono, obteniendo un incremento del 72% en la tasa de crecimiento en esta fuente de carbono, respecto a la cepa sin evolucionar. A parte de una mejora en la velocidad de crecimiento, hay una reducción en el tiempo de bioconversión de glicerol por la cepa evolucionada de *U. maydis*, sin embargo, el rendimiento de producción de ácido itacónico no supero el rendimiento de la cepa sin evolucionar, probablemente debido a la generación de sub-productos (Helm *et al.*, 2024).

U. maydis es un hongo patógeno que infecta el maíz y ha desarrollado procesos para su infección. Aunque se conocen varios mecanismos de infección y se ha observado que la reducción de la virulencia puede disminuir la resistencia al estrés oxidativo, se sabe poco sobre si la virulencia ha evolucionado junto con esta resistencia. Esta tesis investiga cómo la adaptación al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno afecta el genoma y la virulencia de *U. maydis*.

III. Hipótesis

La exposición de *Ustilago maydis* a peróxido de hidrógeno inducirá mayor acumulación de variantes genéticas. Estas variantes conferirán adaptación a ambientes oxidantes, permitiendo al hongo proliferar en condiciones de estrés oxidativo.

IV. Objetivos

Objetivo general.

Investigar la capacidad de adaptación de *Ustilago maydis* a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno mediante la exposición periódica a este agente oxidante, explorando tanto los cambios fenotípicos como los genéticos, con el fin de comprender los mecanismos moleculares involucrados en la adaptación a esta condición.

Objetivos Específicos:

Objetivo I. Analizar los cambios en la resistencia a H₂O₂ en *Ustilago maydis* inducidos por la exposición repetida a peróxido de hidrógeno, contrastando la resistencia previa a la adaptación con la observada al final del experimento de evolución.

Objetivo II. Utilizar secuenciación genómica y análisis bioinformáticos para identificar las alteraciones genéticas acumuladas en *U. maydis* como resultado de la exposición periódica a H₂O₂.

Objetivo III.

Investigar la contribución en la resistencia a H₂O₂ y su efecto en la virulencia de las variantes genéticas identificadas en la adaptación de *U. maydis* a condiciones de estrés oxidativo.

V. Metodología

V.I. Material biológico y condiciones de cultivo

V.I.I. Cepa de *Ustilago maydis*

En la presente tesis se empleó la cepa *Ustilago maydis* SG200 (Kämper et al., 2006) para llevar a cabo la evolución experimental en presencia de H₂O₂, así como para la generación de cepas mutantes. *U. maydis* SG200 es una cepa haploide solo-patogénica, ya que puede infectar plantas de maíz sin haberse apareado con una cepa sexualmente compatible.

V.I.II. Cepa de *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* XL-Blue para llevar a cabo clonaciones de plásmidos recombinantes. Esta cepa se cultivó en medio LB en caldo o en placa. Se adicionó 100 µg/mL de ampicilina para el cultivo de bacterias transformadas con plásmidos que expresan el gen de resistencia a este antibiótico.

V.I.III. Cepa de *Zea mays*

La patogenicidad de *U. maydis* SG200, así como de las cepas derivadas se evaluó en plántulas de *Zea mays* de la variedad *cacahuacintle*. Las semillas de *Z. mays* fueron sembradas en mezcla de suelo general en macetas y se mantuvieron en invernadero.

V.II. Medios de cultivo

V.II.I. Medios de cultivo para *U. maydis*

Medio completo (MC)

El medio de cultivo MC (Holliday, 1961) se empleó para los cultivos de evolución experimental, los choques con H₂O₂, así como para cultivos para el aislamiento de material genético (ADN o ARN). La composición de este medio se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del MC para el cultivo de *U. maydis*.

Reactivo	1 L
Peptona bacteriológica	5.0 g
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	1.5 g
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10.0 g
Extracto de levadura	10.0 g
Solución de sales	62.5 mL

Para cultivos en placas Petri, se adicionó 2% de agar bacteriológico (20 g/L). Este medio de cultivo en caldo o suplementado con agar fue esterilizado a 121 °C durante 15 min. Este medio se suplemento con 3 µg/mL de carboxina para la sub-clonación de cepas transformantes de *U. maydis* con resistencia a carboxina. La carboxina es adicionada una vez el medio ha sido esterilizado y su temperatura es alrededor de 50 °C.

Caldo YEPS ligero

Este medio de cultivo fue empleado para los cultivos para la preparación de protoplastos de *U. maydis*. La composición de este medio se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo YEPS ligero.

Reactivo	1 L
Extracto de levadura	10.0 g
Peptona bacteriológica	4.0 g
Sacarosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	4.0 g

Medio Agar Regenerativo

Este medio se utilizó para la propagación de protoplastos de *U. maydis* una vez completada la reacción de transformación. La Tabla 3 detalla su composición.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo Agar Regenerativo

Reactivo	1 L
Extracto de levadura	10.0 g
Peptona bacteriológica	20.0 g
Sacarosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	20.0 g
Sorbitol (C ₆ H ₁₄ O ₆)	182.17 g
Agar bacteriológico	15.0 g

V.II.II. Medios de cultivo para *E. coli*

Medio Luria-Bertani (LB)

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el caldo LB (L3022-1KB, Sigma-Aldrich) a 20 g/L y agar LB (L2897-1KB, Sigma-Aldrich) a 35 g/L. Ambos medios de cultivo se esterilizaron a 121 °C durante 15 min. Estos medios fueron suplementados con 100 µg/mL de ampicilina (A5354-10ML, SigmaAldrich) para la selección de *E. coli* transformadas con plásmidos que expresan resistencia a este antibiótico.

V.III. Evolución experimental por 200 generaciones de *U. maydis* SG200

La cepa de *U. maydis* SG200 fue utilizada para la evolución experimental. El experimento de evolución se llevó a cabo solo en la fase levaduriforme de este hongo. Seis líneas derivadas de un cultivo isogénico de *U. maydis* SG200 fueron sometidas a evolución experimental, tres de ellas con exposición a H₂O₂ y las otras tres sin exposición a H₂O₂. La metodología empleada para este experimento de evolución fue adaptada de Huang y Kao, (2018).

La Figura 3 muestra el procedimiento general del experimento de evolución.

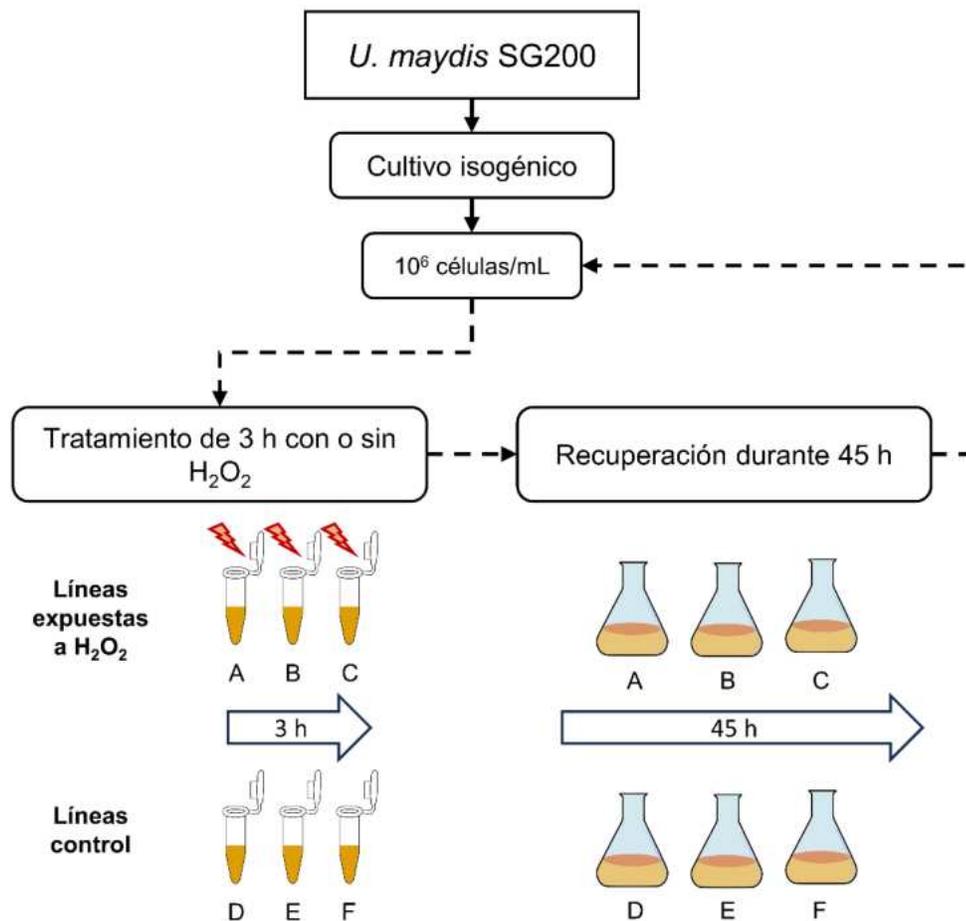


Figura 3. Procedimiento general para la evolución de *U. maydis* SG200. Las líneas A, B y C fueron expuestas a H₂O₂, mientras que las líneas D, E y F fueron el grupo control.

V.III.I. Cultivo isogénico de *U. maydis* SG200

El cultivo inicial del experimento de evolución se estableció a partir de una colonia aislada crecida en agar MC. Esta colonia fue transferida a 30 mL de caldo MC en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, el cultivo se incubó durante 24 h a 28 °C con una agitación constante de 180 rpm. Al finalizar el periodo de incubación se verificó a través de microscopía que el cultivo no estuviera contaminado.

Consecutivamente, se crio-preservaron 600 µL del cultivo inicial mezclándolos con 600 µL de glicerol al 50% y almacenando el crio-vial a -80 °C. En el resto del cultivo se determinó la concentración celular a través de conteo en hematocitómetro

(cámara de Neubauer). Posteriormente se preparó una solución de células a una concentración final de 5×10^6 células/mL en 10 mL de caldo MC, esta solución se utilizó para establecer cada línea evolutiva. El resto de las células del cultivo se usaron para extraer ADN para secuenciación masiva a través de lecturas cortas. Para esto, las células se transfirieron a un tubo cónico de 50 mL y fueron centrifugadas a 3,500 rpm durante 10 min, pasado este tiempo se descartó el sobrenadante y las células fueron suspendidas en 4 mL de solución amortiguadora TE 1X (estéril). Esa suspensión celular se dividió en 4 tubos de 2 mL (1 mL/tubo), posteriormente estos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y los tubos fueron congelados a -20 °C hasta realizar la extracción de ADN.

V.III.II. Primer tratamiento de evolución experimental

Para la evolución experimental se establecieron seis líneas evolutivas derivadas del cultivo inicial. Esas seis líneas se dividieron en dos grupos, el grupo expuesto a H_2O_2 (H1009-500ML, Sigma Aldrich) que tiene a las líneas A, B y C, y el grupo sin exposición a H_2O_2 en donde se encuentran las líneas D, E y F.

Las seis líneas se propagaron durante 20 tratamientos. Cada tratamiento comprende 48 h divididas en dos fases: la fase de choque que tuvo una duración de 3 h y la fase de recuperación que duro 45 h (ver Figura 3).

V.III.II.I. Fase de choque por peróxido de hidrógeno

Para la fase de choque, la concentración inicial de células para cada línea evolutiva fue 10^6 células en un volumen final de 1 mL. Para las líneas expuestas a H_2O_2 se mezclaron 0.200 mL de la suspensión celular a 5×10^6 células/mL, más 0.700 mL de caldo MC, más 0.100 mL de caldo MC suplementado con H_2O_2 a una concentración de 10X de acuerdo con la concentración deseada (Tabla 4). Por otro lado, en las líneas no expuestas a H_2O_2 se mezclaron 0.200 mL de células a 5×10^6 células/mL más 0.800 mL de caldo MC. Ambas mezclas se prepararon en tubos de 1.5 mL y se homogenizaron a través de agitación en vortex. Una vez preparadas las mezclas,

los tubos fueron incubados en un termo-bloque (ThermoMixer C, eppendorf) a 28 °C durante 3 h con una agitación de 300 rpm.

Cuantificación de las células que sobrevivieron a la fase de choque

Al finalizar esta fase, se estimó el número de células vivas a través de la cuantificación de unidades formadoras de colonia (UFC). Para esto 0.1 mL fueron diluidos de forma seriada hasta alcanzar el factor de dilución 1:1000. De la dilución 1:1000 se tomó 0.1 mL y se sembraron a través de difusión masiva en placas de agar MC, las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Los 0.9 mL restantes de la fase de choque fue transferida a la fase de recuperación.

V.III.II.II. Fase de recuperación

En la fase de recuperación los 0.9 mL restantes de la fase anterior fueron transferidos a 19.1 mL de caldo MC en matraces Erlenmeyer de 50 mL. Estos cultivos fueron incubados durante 45 h a 28 °C con una agitación constante de 180 rpm. Al finalizar el periodo de incubación de 45 h, 600 µL del cultivo fueron mezclados con 600 µL de glicerol al 50% y crio-preservados a -80 °C. En el resto del cultivo se cuantificó la concentración celular por conteo en hematocitómetro a través de una dilución 1:10,000. Posterior a esto, se preparó una suspensión celular a una concentración de 10^7 células/mL en 10 mL de caldo MC. 5 mL de esa suspensión celular fueron transferidos a 5 mL de caldo MC para preparar una suspensión celular a 5×10^6 células/mL, esta fue usada para iniciar la siguiente ronda de evolución experimental.

Ensayo cualitativo de resistencia a H₂O₂

En la suspensión celular a 10^7 células/mL se evaluó la resistencia al peróxido de hidrógeno a través de un ensayo cualitativo. Este ensayo consistió en la siembra a través de difusión masiva de 0.1 mL de la solución a 10^7 células/mL en agar MC. Posteriormente, se colocó en el centro de la placa Petri un disco de papel filtro estéril de aproximadamente 5 mm de diámetro, sobre este se adición 5 µL de H₂O₂ al 30%, subsecuentemente las placas fueron incubadas durante 48 h a 28 °C. Al finalizar el

periodo de incubación se cuantificó el área de inhibición producida por el H₂O₂ a través de la medición del diámetro del halo de inhibición. El área de inhibición de cada cepa derivada del experimento de evolución fue comparada contra el área de inhibición de la cepa ancestral (*U. maydis* SG200), las diferencias estadísticas fueron analizadas a través de una prueba *t* en R (R Development Core Team, 2023).

V.III.III. Continuación de la evolución experimental hasta completar 20 tratamientos

En el experimento de evolución al finalizar la primera ronda, inmediatamente se inició con la segunda. En esta ronda, las células fueron preparadas de acuerdo con lo descrito en la sección V.III.II.I, y posteriormente fueron sometidas a la fase de choque y posteriormente a la fase de recuperación. Una vez finalizada la fase de recuperación se ajustó el número de células 10⁶ para iniciar una nueva ronda. Este proceso se repitió consecutivamente hasta alcanzar 20 rondas de evolución experimental. La concentración de H₂O₂ usada en las líneas A, B y C fue en aumento cada dos rondas. La Tabla 4 presenta la concentración de H₂O₂ usada a lo largo de la evolución experimental.

Tabla 4. Concentración de H₂O₂ usada en la evolución experimental

Tratamiento	[H ₂ O ₂]	Tratamiento	[H ₂ O ₂]
1	5 mM	11	20 mM
2		12	
3	8 mM	13	30 mM
4		14	
5	11 mM	15	40 mM
6		16	
7	14 mM	17	50 mM
8		18	
9	17 mM	19	60 mM
10		20	

V.III.IV. Estimación del número de generaciones

El número de generaciones ocurridas en cada ronda de evolución experimental se estimó a partir de la cuantificación celular llevada a cabo después de la fase de choque y al finalizar la fase de recuperación. Para esto se usó la siguiente ecuación:

$$X_{Gf} = X_{Gi} \cdot e^{k \cdot x}$$

donde X_{Gf} es la concentración celular al final de la fase de recuperación, X_{Gi} es la concentración inicial del cultivo de recuperación estimada a través de la cuantificación de UFC, k es una constante de crecimiento con un valor de $\ln 2$ para una población que duplica su tamaño cada generación y x es el número de generaciones.

V.IV. Aislamiento de colonias de las líneas evolutivas

Durante la evolución experimental pueden surgir variantes genéticas con diferentes frecuencias en las líneas evolutivas, esto puede ser una interferencia al momento de identificar las variantes producidas durante el experimento. Para evitar esto, se aislaron 5 colonias de cada línea expuesta a H_2O_2 , y dos colonias de cada línea control. Las colonias se recuperaron a partir del análisis de UFC llevado a cabo al finalizar la fase de choque. Se seleccionaron las colonias que presentaron un mayor diámetro, posteriormente, estas fueron sub-clonadas dos veces. Una vez seleccionadas las colonias a sub-clonar, estas se tomaron con un asa bacteriológica estéril y se estriaron en placas con agar MC, las placas fueron incubadas durante 48 h a 28 °C. Posteriormente, se seleccionó una colonia aislada y se volvió a estriar en placas con agar MC, estas placas fueron durante 48 h a 28 °C

Después de la segunda sub-clonación, se seleccionó una colonia aislada y con un asa estéril fue transferida a 10 mL de caldo MC en tubos de cultivo de vidrio (20 mm x 150 mm), estos cultivos fueron incubados durante 24 h a 28 °C con agitación de 180 rpm. Al finalizar la incubación, se tomaron 600 μ L del cultivo y se transfirieron a un crio-vial que contenía 600 μ L de glicerol al 50%, los crio-viales fueron almacenados a -80 °C. El resto del cultivo fue transferido a tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron a 3,500 rpm durante 10 min, la pastilla de células se suspendió

en 2 mL de amortiguador TE 1X. Esa suspensión celular se dividió en dos tubos de 2 mL (1 mL/tubo), posteriormente estos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y los tubos fueron congelados a -20 °C hasta su utilización en la extracción de ADN.

En la Tabla 5 se presenta el identificador asignado a cada colonia aislada.

Tabla 5. Relación de colonias aisladas en cada línea evolutiva.

Línea	Número de Tratamiento	Generación	Colonia	Identificador
A	20	200	1	<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.1
			2	<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.2
			3	<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.3
			4	<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.4
			5	<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.5
B	20	200	1	<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.1
			2	<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.2
			3	<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.3
			4	<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.4
			5	<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.5
C	20	200	1	<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.1
			2	<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.2
			3	<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.3
			4	<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.4
			5	<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.5
D	20	200	1	<i>Um</i> -LD.1
			2	<i>Um</i> -LD.2
E	20	200	1	<i>Um</i> -LE.1
			2	<i>Um</i> -LE.2
F	20	200	1	<i>Um</i> -LF.1

V.V. Análisis de la resistencia a H₂O₂ en las colonias aisladas

Una vez que las colonias de las líneas evolutivas fueron aisladas y sub-clonadas, se procedió a caracterizar su fenotipo de resistencia H₂O₂. Para esto, cada colonia fue cultivada en 10 mL de caldo MC durante 24 h a 28 °C con agitación constante a 180 rpm. Al finalizar la incubación, los cultivos fueron centrifugados a durante 5 min a 3,500 rpm a temperatura ambiente, el sobrenadante fue descartado y la pastilla celular fue lavada con 5 mL de agua tri-distilada (dddH₂O) estéril, este proceso se repitió dos veces. Después del segundo lavado, la pastilla celular fue re-suspendida en 2 mL de dddH₂O, a partir de esta suspensión celular se hicieron diluciones seriadas hasta 1:1000. La concentración celular se cuantificó a través de conteo en hematócrito usando 10 µL de la dilución 1:1000. Una vez cuantificada la concentración celular, se preparó una solución de células en 1 mL de dddH₂O a una concentración final de 10⁷ células/mL.

La resistencia al H₂O₂ se evaluó por triplicado para cada cepa sembrando 100 µL de la suspensión celular a 10⁷ células/mL en placas con agar MC. Esta solución se distribuyó homogéneamente sobre la superficie del agar y se dejó secar. Posteriormente se colocó en el centro de la placa una gota de 5 µL de H₂O₂ sobre un disco de papel filtro estéril. Una vez que se secó la gota de H₂O₂ las placas fueron incubadas durante 48 h a 28 °C. El diámetro de la zona de inhibición producida por la presencia del H₂O₂ se cuantificó con una regla en escala milimétrica. Las placas Petri en las que se llevó a cabo el ensayo fueron fotografiadas a las 48 h en un fotodocumentador ChemiDoc 2000 usando la aplicación para cajas Petri.

V.VI. Herencia del fenotipo de resistencia al H₂O₂

Una vez evaluado el fenotipo de resistencia al H₂O₂ en las colonias aisladas de las líneas evolutivas, se evaluó la persistencia del fenotipo después de que las colonias

fueron propagadas durante 35 generaciones. Para esto se llevaron a cabo los siguientes análisis.

V.VI.I. Herencia posterior a 35 generaciones sin selección por H₂O₂

En primera instancia, se procedió a evaluar la persistencia del fenotipo de resistencia al H₂O₂ a lo largo de 35 generaciones en caldo de cultivo MC. Con tal propósito, las cepas objeto de estudio se cultivaron en agar MC, partiendo de una muestra obtenida mediante raspadura del crio-vial correspondiente. Las placas Petri fueron incubadas a 28 °C durante 48 h, posteriormente, se utilizó una colonia aislada para inocular 10 mL de caldo de cultivo MC en tubos de cultivo de vidrio, los cultivos fueron incubados durante 24 h a 28 °C con agitación constante de 180 rpm. Al finalizar el periodo de incubación, se verificó a través de microscopía que los cultivos no estuvieran contaminados por otros microorganismos.

Una vez que se verificó que los pre-cultivos no estuvieran contaminados, se llevó a cabo una dilución 1:100 de los cultivos en 10 mL de caldo de cultivo MC en tubos de vidrio. Para esto, se transfirió 0.100 mL del cultivo anterior en 9.900 mL de caldo MC, los tubos de cultivo fueron incubados con las mismas condiciones de los cultivos anteriores. Al finalizar las 24 h de incubación, los cultivos fueron diluidos 1:100 en caldo MC y posteriormente incubados con las mismas condiciones. Este proceso se repitió hasta alcanzar 35 generaciones (7 días, 5 generaciones/día).

Al finalizar las 35 generaciones, se crio-preservaron a -80 °C 600 µL de cada cultivo en 600 µL de glicerol al 50%. En el resto del cultivo se evaluó la resistencia al H₂O₂ de acuerdo con la metodología descrita en V.V. Finalmente, las placas Petri en las que se llevó a cabo el ensayo fueron fotografiadas a las 48 h.

Ambos cultivos (con y sin H₂O₂) fueron incubados durante 24 h a 28 °C con agitación de 180 rpm. Al finalizar las 24 h de incubación, se verificó que los cultivos no estuvieran contaminados y se procedió a hacer una dilución 1:100 de estos cultivos en caldo MC y en caldo MC + 5 mM de H₂O₂. Este proceso se repitió hasta alcanzar 35 generaciones.

V.VI.II. Herencia posterior 35 generaciones con selección por H₂O₂

Se planteó un experimento de herencia durante 35 generaciones con y sin H₂O₂, esto para tener una mayor comprensión de la herencia del fenotipo y del comportamiento de las posibles variantes genéticas adquiridas durante la evolución. Las cinco colonias de la línea C asiladas en la generación 200 fueron elegidas para este experimento. Para esto, esas colonias fueron crecidas en placa a partir del crio-vial, y posteriormente se estableció un pre-cultivo como se indica en la sección previa. De igual forma, se llevó a cabo una dilución 1:100 de los pre-cultivos, en cada pre-cultivo se transfirió 0.100 mL en 9.900 mL de caldo MC y en 9.900 mL suplementados con 5 mM de H₂O₂ (a 9.800 mL se agregaron 0.100 mL de una solución de H₂O₂ al 50 mM preparada en caldo MC).

Al finalizar las 35 generaciones, se crio-preservó 0.6 mL de cada cultivo. De igual forma, en el resto del cultivo se dividió en dos partes, en la primera parte se evaluó la resistencia al H₂O₂ de acuerdo con la metodología descrita en V.V. La parte restante se utilizó para extraer ADN para su posterior secuenciación a través de lecturas cortas (150 bp) en la plataforma Illumina NextSeq 500.

V.VII. Extracción de ADN genómico de *U. maydis*

El ADN de cepa inicial *U. maydis* SG200, evolucionadas y de cepas transformantes se extrajo con un protocolo basado en lisis celular por acción mecánica de perlas de vidrio. Las cepas de *U. maydis* para extracción de ADN se pusieron en caldo MC y se incubaron durante 24 h a 28 °C con agitación constante de 180 rpm. Las células en suspensión del cultivo de *U. maydis* se centrifugaron a 3,500 rpm por 5 min, el sobrenadante fue descartado y la pastilla celular se re-suspendió en 200 µL de TE 1X. Las células se transfirieron a tubos de 2 mL con rosca los cuales contenían 300 mg de perlas de vidrio (G1277-500G, Sigma Aldrich). Subsecuentemente se agregaron 400 µL de solución de lisis, 400 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (P2069-100ML, Sigma Aldrich), y luego los tubos se colocaron en un disruptor celular a máxima velocidad durante 5 min. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, al finalizar la centrifugación se transfirió la fase acuosa (≈ 400 µL) a tubos estériles de 2 mL. A la fase acuosa se le agregó 40 µL de acetato de sodio 3 M y 800 µL de etanol frío al 95%, los tubos se incubaron durante 30 min a -20 °C. Transcurrido este periodo, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó y a la pastilla de ácidos nucleicos que quedo como precipitado se le adicionó 300 µL de etanol frío al 70%. Los tubos se mezclaron por inversión durante 1 minuto y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C, posteriormente se descartó la fase líquida y se repitió el lavado con 300 µL de EtOH al 70% seguido de la centrifugación. Finalmente se dejó que los tubos se secaran a temperatura ambiente. Una vez secos el ADN se disolvió en 50 µL de agua grado biología molecular.

V.VII.I. Cuantificación de la concentración del ADN

La concentración del ADN aislado expresada en ng/µL se estimó a través de un ensayo fluorométrico en el equipo Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen™) usando el kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Q32859, ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza del ADN se estimó en el equipo Nanodrop™

2000 (Thermo Fisher Scientific) a través del cociente de las absorbancias 260/280 y 260/230.

Finalmente, la integridad del ADN se evaluó a través de electroforesis en un gel de agarosa UltraPure™ (16500500, Invitrogen) al 0.8% teñido con el fluoróforo SYBR™ Safe DNA (S33102, Invitrogen). Para esto, se usó 2 µL del ADN aislado y se mezcló con 18 mL del amortiguador de carga BlueJuice 1.1X (catalogo y proveedor). Esta mezcla fue depositada en el gel de agarosa, posteriormente, se aplicó un campo eléctrico de 90 V durante 120 min. Al finalizar este periodo, el gel fue visualizado en el fotodocumentador ChemiDoc 2000 utilizando la configuración predeterminada para SYBR Safe.

V.VII.II. Purificación de ADN para su secuenciación

Los ADN empleados para la secuenciación masiva del genoma completo fueron purificados con el kit Genomic DNA Clean&Concentrator (D4010, Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración, pureza e integridad del ADN purificado se estimaron con la metodología descrita en la sección V.VII.I.

V.VII.III. Secuenciación de lectura corta

En esta tesis se utilizaron dos tecnologías de secuenciación masiva. La primera fue secuenciación de lectura corta DNBSeg™ (DNA Nanoballs and PCR-Free Rolling Circle Replication) del Instituto de Genómica de Beijín (BGI, por sus siglas en inglés). Las muestras secuenciadas con esta tecnología corresponden a las 21 colonias aisladas del experimento de evolución, a siete poblaciones de la línea C, así como a la cepa inicial de *U. maydis* SG200. Para cada muestra se envió 1 µg de ADN de estas muestras a BGI Shenzhen, China, donde personal técnico se encargó del proceso de secuenciación. Una vez completada la secuenciación, los archivos tipo *fastq* fueron descargados desde un servidor de *Amazon Web Services* (*aws*).

De igual forma en esta tesis, se utilizó tecnología de secuenciación de lectura corta Illumina. Con esta tecnología se secuenciaron los 10 genomas resultantes de las

colonias derivadas de la línea C, después de ser propagadas durante 35 generaciones con y sin H₂O₂. Para esto, la IQA. Alejandra Castillo y la IQA. Carina Díaz (técnicos del LIIGH-UNAM) prepararon librerías Illumina NextSeq, estas librerías fueron enviadas al INMEGEN para su secuenciación en la plataforma NextSeq 500. Los archivos tipo *fastq* fueron descargados del servicio de secuenciación en la nube del INMEGEN.

Todos los archivos *fastq* fueron almacenados en el servidor de computación de alto rendimiento del LAVIS/LIIGH-UNAM.

V.VIII. Análisis bioinformático

V.VIII.I. Limpieza de las lecturas de secuenciación

En la primera etapa del procesamiento de los archivos *fastq*, se removieron lecturas y bases de baja calidad en cada genoma secuenciado. Para esto se utilizó el programa fastp v.0.20.0 (Chen *et al.*, 2018) con parámetros default. Los archivos de salida de este proceso son archivos tipo *fastq*, así como reportes *html* con información de la calidad de la secuenciación.

Este proceso fue llevado a cabo con el programa:

'https://github.com/JLuisCuamatzi/Umaydis_experimental_Evolution/tree/main/01_Cleaning/01_Cleaning.py' en el servidor HPC-LAVIS/LIIGH-UNAM.

V.VIII.II. Alineamiento de las lecturas de secuenciación al genoma de referencia de *U. maydis*

El siguiente paso en el flujo de análisis bioinformático fue alinear las lecturas limpias al genoma de referencia de *U. maydis* 521 (aislada en Minnesota, EUA), versión 2.0 (disponible en: https://fungi.ensembl.org/Ustilago_maydis/Info/Index).

Para el alineamiento de las lecturas al genoma de referencia se utilizó el programa bwa-mem v.0.7.8 (Li & Durbin, 2010) utilizando los parámetros preestablecidos. El archivo de salida de este programa es un archivo tipo *bam* (*binary alignment map*).

Estos archivos *bam* fueron utilizados como archivos de entrada para el programa Picard v.2.6.0 (Broad Institute, 2016), este programa fue utilizado para marcar y agrupar lecturas duplicadas. Los archivos *bam* resultantes de este proceso fueron convertidos a formato *cram*, estos últimos archivos fueron utilizados para el análisis de identificación de variantes genómicas (variantes de un solo nucleótido y variantes en el número de copias).

El proceso de alineamiento fue llevado a cabo con el programa:

'https://github.com/JLuisCuamatzi/Umaydis_experimental_Evolution/tree/main/01_Cleaning/02_Mapping.py', el cual se ejecutó en el servidor HPC-LAVIS/LIIGH-UNAM.

V.VIII.III. Identificación de variantes en el número de copias

El análisis de la cobertura del genoma por las lecturas de secuenciación permite la detección de variantes en el número de copias de grandes segmentos del genoma de *U. maydis*. Primero se obtuvo la cobertura de cada posición del genoma a partir del archivo *cram* (archivo que contiene información del alineamiento de las lecturas al genoma de referencia), para esto, se utilizó el comando *depth* del software *samtools* v.1.9 (Li *et al.*, 2009), estableciendo un umbral de calidad de las lecturas alineadas en escala Phred igual o mayor a 30 (-Q 30).

Los archivos de salida del paso anterior fueron archivos de texto con extensión *depth* en los cuales se indica la profundidad de cobertura de cada posición del genoma. Una vez finalizado el paso anterior, se prosiguió a calcular la cobertura normalizada para cada genoma, para esto se calculó la mediana de la profundidad de la cobertura global de todo el genoma, subsecuentemente se estimó la mediana de la profundidad de cobertura en ventanas no sobrelapantes de 1 kilobase (1 kb) para todo el genoma, finalmente, se dividió el valor de cada ventana entre el valor de la mediana de la profundidad de cobertura global.

El siguiente paso fue calcular el logaritmo base dos (\log_2) del cociente de la cobertura normalizada en cada muestra del experimento de evolución entre la

cobertura normalizada en la cepa inicial (*U. maydis* SG200). Para esto primero se ajustó el valor de la cobertura normalizada de acuerdo con el siguiente criterio: si el valor de una ventana es menor al 25% de la mediana de la cobertura normalizada global, a esa ventana se le asignó el valor de 0.1. Una vez realizado este ajuste, se dividió el valor de la cobertura normalizada de cada ventana en todas las muestras secuenciadas entre el valor de la cobertura normalizada de la respectiva ventana en la cepa *U. maydis* SG200. Posteriormente se obtuvo el \log_2 del resultado de esta división. Finalmente, el valor obtenido se graficó a lo largo de cada cromosoma del genoma de *U. maydis* usando la aplicación de mapa de calor del paquete ggplot2 (Wickham, 2016) de R (R Development Core Team, 2023).

El proceso de cálculo de cobertura fue automatizado con el programa: 'https://github.com/JLuisCuamatzi/Umaydis_experimental_Evolution/tree/main/01_Cleaning/02.1_NormalizedCoverage_and_Plotting.py', el cual se ejecutó en el servidor HPC-LAVIS/LIIGH-UNAM.

V.VIII.III.I. Identificación del punto de ruptura de la amplificación del cromosoma 9

Se llevó a cabo un análisis con el software CNVnator (Abyzov *et al.*, 2011), para determinar el punto exacto donde terminan las amplificaciones detectadas a partir del \log_2 del cociente de la cobertura normalizada. Para este análisis, CNVnator usa como archivos de entrada los archivos *cram* resultantes del alineamiento de las lecturas de secuenciación al genoma de referencia, el parámetro de tamaño de ventana se estableció en 150 pb (el tamaño de las lecturas de secuenciación). Los archivos de salida de este análisis son documentos de texto que indican el tipo de variante detectada (delección o duplicación), así como las coordenadas y el tamaño de tal variante.

El análisis con CNVnator se automatizó con el siguiente programa:

'https://github.com/JLuisCuamatzi/Umaydis_experimental_Evolution/tree/main/01_Cleaning/02.2_CNVnator.py', el cual se ejecutó en el servidor HPC-LAVIS/LIIGH-UNAM.

Posterior al análisis con CNVnator se llevó a cabo un análisis de la cobertura normalizada a resolución de una base. Esto con el objetivo de identificar los puntos de ruptura de las amplificaciones detectadas, para esto, se usaron los archivos de cobertura *depth* obtenidos en la sección V.VIII.III. La cobertura normalizada a resolución de una base (1 b) se estimó dividiendo el valor de profundidad de cobertura de cada posición entre la mediana de la profundidad de la cobertura global de esa muestra. La cobertura normalizada a resolución de una base fue graficada usando el paquete ggplot2 (Wickham, 2016) de R (R Development Core Team, 2023).

Este proceso se llevó a cabo con los programas:

'https://github.com/JLuisCuamatzi/Umaydis_experimental_Evolution/tree/main/01_Cleaning/ComputeMedianCoverage_bpResolution.py' y

'https://github.com/JLuisCuamatzi/Umaydis_experimental_Evolution/tree/main/01_Cleaning/NormalizedCoverage_bpRes.R'. Ambos fueron ejecutados en el servidor HPC-LAVIS/LIIGH-UNAM.

V.VIII.IV. Identificación de variantes de un solo nucleótido

La identificación de variantes de un solo nucleótido se llevó a cabo usando dos enfoques. En el primer enfoque las variantes de un solo nucleótido se identificaron a partir de las diferencias nucleotídicas del alineamiento múltiple de los genomas secuenciados y ensamblados *de novo* respecto al genoma de referencia. En el segundo enfoque las variantes se identificaron a partir del alineamiento de las lecturas de secuenciación al genoma de referencia.

V.VIII.IV.I. Identificación de SNV a partir de ensamblado *de novo*

Ensamblado *de novo* de los genomas secuenciados

El primer paso de este enfoque consistió en ensamblar *de novo* las lecturas de secuenciación, para esto se utilizó el software MegaHit versión 1.2.9 (Li *et al.*, 2015). Los archivos de entrada para este ensamblador fueron los archivos *fastq* limpios (archivos de salida del proceso descrito en la sección V.VIII.I), el ensamblado *de novo* ocurrió con parámetros por defecto, el archivo de salida fue un archivo tipo *fasta* que contiene los contigs del ensamblado *de novo*.

En cada ensamblado *de novo* se estimó la longitud de cada contig, para posteriormente organizar los contigs de mayor a menor basados en su longitud. Finalmente, el identificador de cada contig se renombró de acuerdo con la siguiente nomenclatura: {sample_name}.{contig#}. De igual forma, se verificó la identidad de los contigs resultantes con *U. maydis*, esto se hizo a través de un alineamiento del ensamblado *de novo* al genoma de referencia de *U. maydis* usando el software BLASTn con parámetros por defecto. Finalmente, se verificó la profundidad de cobertura y cobertura normalizada del ensamblado *de novo*, para esto, las lecturas de secuenciación fueron alineadas con bwa-mem v.0.7.8 (como se describe en V.VIII.II).

Filtrado de los ensamblados *de novo*

Cada ensamblado *de novo* se filtró de acuerdo con los siguientes criterios:

1. Se removieron aquellos contigs que tuvieran una longitud menor a 1000 pares de base.
2. Se removieron aquellos contigs que no tuvieran identidad a *U. maydis* de acuerdo con los resultados del alineamiento de BLASTn.
3. Se removieron aquellos contigs que tuvieran una cobertura normalizada menor a 0.7.

Finalmente, los ensamblados *de novo* filtrados en formato *fasta* fueron renombrados con la siguiente nomenclatura: Umaydis{#Muestra} (ejemplo: Umaydis00, Umaydis01, Umaydis02, ...).

Alineamiento múltiple de los genomas ensamblados e identificación de SNV

Los ensamblados *de novo* filtrados, así como el genoma de referencia se alinearon de forma múltiple usando el paquete TBA v.11.2 (Blanchette *et al.*, 2004), este alineamiento se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa, todos los ensamblados *de novo* se alinearon de forma pareada entre sí, obteniendo archivos *maf* como archivos de salida. En la segunda etapa, los archivos *maf* con el alineamiento pareado sirvieron como archivos de entrada para el alineamiento múltiple, de igual forma, el archivo de salida del alineamiento múltiple fue un archivo *maf*. El resultado del alineamiento múltiple fue proyectado al genoma de referencia para conocer las coordenadas de las secuencias alineadas y se escribió un nuevo archivo *maf*.

El archivo *maf* proyectado al genoma de referencia que contiene los bloques sinténicos fue re-alineado para evitar alineamientos erróneos causados por secuencias similares, este proceso se hizo utilizando los programas Mafft (Kato and Standley, 2013) y MafFilter (Dutheil *et al.*, 2014) y el resultado fue un archivo *maf*. Finalmente, este nuevo alineamiento se limpió con MafFilter para remover bloques sinténicos incompletos, así como bloques redundantes, el alineamiento final también fue exportado como archivo *maf*.

Las variantes de un solo nucleótido se identificaron a partir del último alineamiento utilizando MafFilter. Todas las posiciones que difieren respecto a la referencia se exportaron en formato VCF, anotando el genotipo para cada muestra.

Remoción de las variantes de SG200 e identificación de variantes compartidas

A partir del archivo *vcf* genotipado que contiene todas las variantes identificadas, se extrajeron las variantes que pertenecen a la cepa inicial *U. maydis* SG200. Estas

variantes fueron removidas del resto de las muestras. Una vez removidas las variantes de la cepa SG200, se llevó a cabo un análisis para identificar el porcentaje de variantes compartidas entre cada individuo secuenciado.

Análisis de las variantes en función de las lecturas que la sustentan

Una vez analizado el porcentaje de variantes compartidas entre cada muestra y debido al alto número de variantes únicas para cada muestra, se decidió analizar que la variante en cuestión fuera sustentada por las lecturas que alinean a esa posición.

Para ese análisis se extrajo el conteo de cada nucleótido (A, T, G y C) alineado a la posición donde se identificó el SNV. El análisis se llevó a cabo usando *bcftools mpileup* usando como archivo de entrada los archivos *cram* (contienen la información del alineamiento de las lecturas al genoma de referencia), y las posiciones a extraer se indicaron a través de un archivo *bed*, el resultado del análisis se exportó en un archivo de texto (*txt*). La frecuencia de cada nucleótido alineado a esa posición se procesó usando un script de R. Posteriormente, se identificó si el nucleótido detectado con mayor frecuencia corresponde al nucleótido de referencia o al nucleótido alternativo. Finalmente, las variantes identificadas se filtraron para mantener solo aquellas variantes que fueran sustentadas por al menos el 90% de las lecturas alineadas a esa posición.

V.VIII.IV.II. Identificación de SNV con *bcftools*

El segundo enfoque para la identificación de variantes de un solo nucleótido variantes se llevó a cabo a partir del alineamiento de las lecturas de secuenciación al genoma de referencia. En este proceso se incluyó un genoma de *U. maydis* SG200 secuenciado con la plataforma Illumina NextSeq 500. La identificación se llevó a cabo con el software *bcftools* (Li *et al.*, 2009). Como primer paso se utilizó la aplicación *bcftools mpileup* para convertir a formato tabular los archivos *cram* que contienen la información de lecturas alineadas a cada posición de la referencia. En este paso se establecieron filtros de calidad de alineamiento (-q) y de calidad de base (-Q) en 20 y 30 respectivamente. Estos valores están en escala Phred e

indican un 99% de confianza para el alineamiento de la lectura (-q 20) y un 99.9% de confianza en la base secuenciada (-Q 30). Una vez finalizado el paso de *bcftools mpileup*, se procedió a la identificación de variantes nucleotídicas. Para este paso, el archivo de salida de *bcftools mpileup* fue utilizado como archivo de entrada para la aplicación *bcftools call* estableciendo el parámetro de ploidía en 1 (--ploidy 1), este valor indica que el genoma secuenciado es haploide. Este último paso genera archivos *VCF* como archivos de salida.

Remoción de las variantes de *U. maydis* SG200 y filtrado por calidad

La divergencia inicial de la cepa *U. maydis* SG200 y el genoma de referencia (*U. maydis* 521) se removió de todas las cepas derivadas de SG200 en este experimento. Para esto, se obtuvo un amplio compendio de SNV para la cepa *U. maydis* SG200 a partir de su re-secuenciación con DNBSeg y con Illumina NextSeq. Este conjunto de SNPs se identificó en cada cepa y se removió, las variantes filtradas fueron exportadas como archivo de texto.

Posterior a la remoción de las variantes de *U. maydis* SG200, se llevó a cabo un filtrado por calidad de las variantes detectadas. El umbral de filtrado se estableció en 200 (QUAL > 200). Posteriormente se verificó que las variantes que pasaron este filtro fueran sustentadas por al menos el 90% de las lecturas que alinean a esa posición. De igual forma, se verificó que ninguna de estas variantes se presentará en al menos 40% de las lecturas alineadas a esa posición en la cepa *U. maydis* SG200. Una vez aplicados estos dos filtros, se analizó el porcentaje de variantes compartidas entre cada cepa.

Las variantes finales identificadas con este enfoque (*bcftools*) fueron comparadas con las variantes finales identificadas con el enfoque de alineamiento múltiple.

V.VIII.V. Identificación de los genes que presentan variantes genéticas

Se utilizó la anotación del genoma de *U. maydis* 521 v.2.0 para identificar que genes presentan variantes de un solo nucleótido o que están dentro de secuencias amplificadas. El archivo de anotación en Formato de Características Genéticas (gff

por sus siglas en inglés) se descargó del portal de EnsemblFungi (https://fungi.ensembl.org/Ustilago_maydis/Info/Index, consultado por última vez 2023-01-20).

Para cada SNV primero se identificó si este ocurría dentro de un gen o en una región intergénica. Este análisis se llevó a cabo usando el siguiente *script* de Python: 'https://github.com/JLuisCuamatzi/Umaydis_experimental_Evolution/tree/main/03_SNP_Calling/SNP_Gene_Identifying.py'. Este *script* utiliza como entrada las coordenadas de cada SNV y como resultado genera una tabla que contiene el ID de cada gen si es que el SNV está en un gen.

La identificación de genes localizados en regiones amplificadas a través de duplicaciones de cromosomas ocurrió a través de identificar la coordenada inicial y final de la región amplificada, estas coordenadas fueron buscadas en el archivo *gff* a través del siguiente *script* de R. El *script* genera una tabla en la cual se lista el ID de cada gen localizado en la región amplificada.

La función de la proteína codificada por los genes que contiene SNV o están en una región amplificada se identificó a partir de la base de datos generada por AlphaFold2 disponible en (<https://www.uniprot.org/taxonomy/237631>, consultado por última vez el 2023-01-20).

Una vez identificada la función de cada gen que presenta un SNV o que está en una región amplificada, se procedió a analizar su posible relación la adaptación a estrés oxidativo.

V.IX. Generación de mutantes de *U. maydis* SG200 y análisis de su fenotipo

La contribución del gen UMAG_11067 (único gen codificante de catalasa) se estudió a través de dos tipos de mutantes. Para el primer enfoque, se interrumpió el marco abierto de lectura de este gen a través de la inserción de un módulo que confiere resistencia a higromicina. En el segundo enfoque, se integró una copia extra del marco abierto de lectura de este gen en el *locus ip*.

V.IX.I. Construcción de la molécula para interrumpir el gen UMAG_11067

La obtención de mutantes de delección de UMAG_11067 se llevó a cabo a través del proceso de recombinación homóloga por una molécula que contiene secuencias de homología en los extremos 3' y 5'.

Para la construcción de esta molécula se utilizó la técnica de PCR de doble unión (Yu *et al.*, 2004). Como primer paso se amplificó de ADN_g de *U. maydis* SG200 las regiones 3' y 5' UTR del gen UMAG_11067. Para la región 5' UTR se amplificaron 983 pb utilizando los oligonucleótidos Cat_F.1 y Cat_R.1 y para la región 3' UTR se amplificaron 812 pb utilizando los oligonucleótidos Cat_F.2 y Cat_R.2 (la secuencia de los primers está disponible en el Anexo I, Tabla 16). El módulo de resistencia a higromicina B con tamaño de 2366 pb se amplificó a partir del vector pNEBU_HPH utilizando los oligonucleótidos HygR_F.1 e HygR_F.2. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la enzima PlatinumTM PCR SuperMix HiFi (Cat. Num. 1253016, invitrogen) en un termociclador VeritiTM 96-Well Applied BiosystemsTM. Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR Green, para esto se mezclaron 5 µL de la reacción de PCR con 5 µL de tampón de carga BlueJuiceTM al 2X y se cargaron en el gel de agarosa. En el mismo gel de agarosa se cargó el marcador de peso de ADN 1 kb Plus (Cat. Num. 10787018, Invitrogen). La aplicación del campo eléctrico para la migración de los fragmentos de ADN así como la posterior visualización ocurrieron con la metodología descrita en V.VII.I. Posterior a la comprobación del tamaño de los productos de PCR, estos fueron purificados usando el kit QIAquick[®] PCR

Purification (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante, los productos fueron cuantificados utilizando el equipo Qubit.

Los productos purificados fueron fusionados a través de PCR para obtener una molécula de 4,119 pb. En la reacción de PCR de fusión se mezclaron 20 fentomoles de cada producto. Los primeros cinco ciclos de la PCR ocurrieron en ausencia de oligonucleótidos. Se agregaron los primers Cat_F.1 y Cat_R.2 al finalizar el quinto ciclo. La reacción de PCR se prolongó durante 30 ciclos más hasta alcanzar 35 ciclos. El resultado de la PCR se visualizó a través de un gel de agarosa al 0.8%. La banda de interés fue purificada a partir del gel de agarosa usando el kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen®).

Se llevaron a cabo varias rondas de PCR de fusión para obtener al menos 10 µg del producto de interés. La molécula para transformar fue purificada y almacenada a -20 °C para su posterior uso en la transformación de *U. maydis*.

V.IX.II. Construcción de molécula para la sobreexpresión de UMAG_11067

La contribución de copias extra del gen UMAG_11067 se estudió insertando el marco abierto de lectura del gen en cuestión en el *locus ip* usando el promotor fuerte OMA y el terminador NOS.

Para esta construcción, el marco abierto de lectura de 2,299 pb del gen UMAG_11067 se amplificó a partir de ADN_g de *U. maydis* SG200 utilizando los oligonucleótidos Cat_F.15 y Cat_R.16. De igual forma se amplificó una secuencia de 276 pb del terminador NOS a partir del plásmido pUMa2625 usando los oligonucleótidos NOS_F.4 y NOS_R.4. Finalmente se amplificó una secuencia de 964 pb que se localiza en el 3' UTR del *locus IP* de *U. maydis*, esta secuencia se amplificó a partir de ADN_g de *U. maydis* SG200 con los oligonucleótidos Um_F.8 y Um_R.8. El tamaño de los productos de PCR se verificó en un gel de agarosa y posteriormente estos productos de amplificación se purificaron usando el kit QIAquick® PCR Purification y se cuantificó la concentración de cada fragmento de ADN en Qubit.

Estos tres fragmentos de ADN fueron fusionados a través de PCR de fusión utilizando 20 fmoles de cada fragmento. Los primeros cinco ciclos de la reacción de fusión ocurrieron en ausencia de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos Cat_F.15 y Um_R.8 fueron agregados a la reacción de fusión al finalizar el quinto ciclo. La reacción de PCR se prolongó hasta alcanzar 35 ciclos. El resultado de la PCR se visualizó a través de un gel de agarosa al 0.8%. La banda de interés fue purificada a partir del gel de agarosa usando el kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen®).

Este fragmento se clonó en el plásmido pUMa2625 usando sitios *NcoI* y *EcoRI*. Para esto, se digirió 1 µg de cada molécula (ADN fusionado y plásmido) con las enzimas *NcoI* y *EcoRI*. Una vez finalizada la digestión, ambos productos fueron purificados con el kit QIAquick® Nucleotide Removal (Qiagen®, Cat. No. 28306) y la concentración de los productos fue cuantificada a través de Qubit.

Las dos moléculas, plásmido e inserto fueron sometidos a una reacción de ligación con la enzima DNA T4 Ligasa con una relación equimolar 1:2 (vector:inserto) empleando 20 fmoles de cada molécula. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Una vez finalizada la reacción de ligación, se usaron 5 μ L para transformar células calcio-competentes de *E. coli* XL-Blue a través de choque térmico a 42 °C.

Las bacterias transformadas se seleccionaron en placas de agar LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina. Se seleccionaron 10 colonias para su subclonación en presencia de este antibiótico, cada colonia se subclonó dos veces. Posteriormente, las bacterias fueron transferidas a tubos de cultivo de vidrio que contenía 5 mL de caldo LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina. Los tubos fueron incubados durante 18 h a 37 °C con agitación constante de 200 rpm. Al finalizar el periodo de incubación, se crio-preservó 600 μ L del cultivo en 600 μ L de glicerol al 50%, los crio-viales fueron almacenados a -80 °C. El resto de los cultivos fueron transferidos a tubos cónicos de 15 mL y estos fueron centrifugados a 5,000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla celular fue resuspendida en 1 mL de amortiguador TE 1X. Esa suspensión celular fue transferida a tubos de 2 mL, los cuales fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 5 min. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se procedió a aislar el plásmido con el kit MiniPrep. Se cuantificó la concentración del plásmido y posteriormente se verificó la identidad del mismo a través de digestión con las siguientes enzimas de restricción: *Xho*I y *Bgl*II. Se seleccionó aquella colonia que tuviera el patrón de digestión esperado y se cultivó en 50 mL de LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina en matraces de 125 mL. Los matraces fueron incubados durante 18 h a 37 °C con agitación de 200 rpm. Al finalizar el tiempo de incubación, el plásmido pUMa2625+Cat fue aislado utilizando el kit Plasmid Maxi Kit (Qiagen®, Cat.No. 12165) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El plásmido fue secuenciado con tecnología Sanger para verificar la identidad. Una vez hecha esta verificación, se hizo una doble digestión simultánea con las enzimas

Agel + *EcoRI*. Se digirieron 10 μg del plásmido pUMa2625+Cat con 1 U de cada enzima. La reacción de digestión ocurrió a 30 °C durante 12 h. Al finalizar esta incubación, el producto de 6,186 pb se purificó a partir de un gel de agarosa al 0.6%. La concentración del producto purificado se cuantificó con Qubit y se ajustó la concentración a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

V.IX.III. Transformación de *Ustilago maydis*

V.IX.III.I. Generación de protoplastos

Las mutantes de delección de UMAG_11067 ($\Delta\text{UMAG}_{11067}$) se hicieron en *U. maydis* SG200, *UmH₂O₂^R*-LB.1 (cepa que tiene una amplificación en los primeros 39 kb del cromosoma 9) y *UmH₂O₂^R*-LC.1 (cepa que tiene una amplificación en los primeros 150 kb del cromosoma 9). La mutante de sobreexpresión (oexUMAG_11067) se realizó en *U. maydis* SG200.

Para la preparación de los protoplastos, se inoculó una colonia de cada cepa a transformar en tubos de vidrio que contenían 5 mL de caldo YEPS, los cultivos fueron incubados a 28 °C durante 16 h con agitación de 180 rpm. Al finalizar el periodo de incubación, se transfirió 100 μL de los cultivos a 100 mL de caldo YEPS en matraces de 250 mL, mismos que fueron incubados a 28 °C y 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica ($\lambda = 600 \text{ nm}$) de 0.8 unidades.

Al llegar a la densidad óptica deseada, cada cultivo fue transferido a dos tubos cónicos de 50 mL, y posteriormente fueron centrifugados a 2,500 rpm durante 7 minutos. Al finalizar la centrifugación, el sobrenadante fue descartado y la pastilla celular fue resuspendida en 15 mL de solución SCS¹, los dos tubos de cada cepa fueron juntados en un solo tubo cónico de 50 mL. Estos tubos fueron centrifugados nuevamente a 2,500 rpm durante 7 minutos y el sobrenadante fue descartado.

¹ **SCS.** 1 M Sorbitol, 20 mM Citrato de sodio pH 5.8

La pastilla celular fue resuspendida en 2 mL de SCS y se transfirió a un tubo cónico de 15 mL. A esta suspensión celular se le adicionó 2 mL de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Cat. No. L1412, SigmaAldrich) preparadas a una concentración de 100 mg/mL en TCS². La mezcla de células de *U. maydis* y enzimas líticas se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, la formación de protoplastos se monitoreó a través de microscopía. Al finalizar el periodo de incubación, los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 2,000 rpm y 4 °C, el sobrenadante fue descartado y la pastilla celular resuspendida en 1 mL de solución SCS. La suspensión celular fue transferida a tubos de centrifuga de 2 mL y se centrifugaron durante 2 minutos a 2,000 rpm y 4 °C. El paso anterior se repitió una vez más, pero en esta ocasión la pastilla fue resuspendida en 1 mL de STC³ frío y posteriormente se prepararon alícuotas de 50 µL.

V.IX.III.II. Transformación de protoplastos

Cepas ΔUMAG_11067

La transformación de los protoplastos de las cepas *U. maydis* SG200, *UmH₂O₂^R*-LB.1 y *UmH₂O₂^R*-LC.1 se llevó a cabo con el protocolo de Tsukuda *et al.*, (1988).

Se utilizó el fragmento de ADN generado en el apartado V.IX.I para la interrupción del gen UMAG_11067. Se mezcló 1 µg, 3 µg y 5 µg de esta molécula con 50 µL de los protoplastos de *U. maydis* SG200, *UmH₂O₂^R*-LB.1 y *UmH₂O₂^R*-LC.1, respectivamente. La mezcla de ADN y protoplastos se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente, se adicionó 500 µL de PEG 4,000 (40% peso/volumen en STC) y se homogenizó por pipeteo, esta mezcla se incubó en hielo durante 10 mins. Al finalizar la incubación, se adicionó 500 µL de STC frío y se homogenizó por inversión. Los tubos fueron centrifugados durante 5 min a 2,000 rpm y 4 °C, el sobrenadante fue desechado y la pastilla celular fue resuspendida en 200 µL de STC frío. La suspensión celular se depositó y se distribuyó homogéneamente con

² **TCS:** 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM Cloruro de calcio, 1 M Sorbitol

³ **STC:** 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM Cloruro de calcio, 1 M Sorbitol

un asa “L” estéril en la superficie de placas Petri con DMC-S suplementado con 200 µg/mL de higromicina B. Las placas fueron incubadas a 28 °C hasta la aparición de colonias (4-6 días).

Cepa oexUMAG_11067

La mutante de sobreexpresión (oexUMAG_11067) se llevó a cabo en *U. maydis* SG200, siguiendo el protocolo descrito por Müller, 1999. El ADN utilizado para obtener esta mutante fue obtenido de acuerdo a lo descrito en la sección V.IX.II.

Para esta transformación se depositó un volumen de 10 mL de RegAgar suplementado con 6 µg/mL de carboxina en una placa Petri estándar y se dejó solidificar. Posteriormente se vertió un volumen de 10 mL de RegAgar y también se dejó solidificar. Los protoplastos de *U. maydis* fueron mezclados con 5 µg de la molécula de ADN y 1 µL de heparina, esta mezcla se incubó en hielo durante 10 min. Al finalizar la incubación, se adicionó 500 µL de PEG 4,000 al 40% a la mezcla y se dejó en incubación en hielo durante 15 min. Al finalizar la incubación, la mezcla fue distribuida homogéneamente con un asa “L” estéril en la superficie de placas con RegAgar. Las placas fueron incubadas a 28 °C hasta la aparición de colonias (4-6 días).

V.IX.III.III. Selección y purificación de cepas mutantes

Las colonias resultantes de la transformación para la generación de las cepas Δ UMAG y la cepa oexUMAG_11067 fueron seleccionadas con un asa estéril y sembradas en una placa de MC suplementado con 200 µg/mL de HygB o 3 µg/mL de carboxina, este proceso se repitió una vez más. Las colonias fueron transferidas a tubos de cultivo con 5 mL de caldo MC suplementado con el antibiótico apropiado, estos tubos fueron incubados a 28 °C con agitación de 180 rpm durante 24 h. Al finalizar el periodo de incubación se crió preservaron 600 µL del cultivo en un criovial que contenía 600 µL de glicerol al 50% y se almacenaron a -80 °C. El resto del cultivo celular fue usado para extraer ADN genómico de acuerdo con el protocolo descrito en la sección V.VII.

V.X. Ensayos de respuesta a estrés

Las cepas de interés se inocularon en 5 mL de MC durante 24 horas a 28 °C y 180 rpm, terminado el tiempo de incubación se centrifugaron a 3,500 rpm por 5 minutos, luego las células se lavaron agua destilada estéril y se disolvió la pastilla celular en 5 mL de agua destilada estéril. Se realizó el conteo de células (cámara de Neubauer) y se ajustó a una concentración de 10^7 células/mL, a partir de ésta se realizaron diluciones seriadas hasta 10^3 células/mL. Para el ensayo de estrés en placa se utilizó MM pH 7 (30 mM Tris·HCl) con 1% de glucosa (condición control). Para la condición estresante, se suplementó con el agente indicado en cada experimento. Los tipos de estrés a los que las células se sometieron fueron: oxidativo, ácido, de pared celular, osmótico, radiación con luz ultravioleta e iónico. El medio indicado se inoculó con gotas de 10 μ L de cada dilución de células) método de goteo (Cervantes-Chávez et al., 2010). Las cajas se incubaron a 28 °C por 72 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado, con dos replicas por experimento.

V.XI. Ensayos de patogenicidad

Se inyectaron plantas de *Zea mays* de la variedad “cacahuazintle” de 7 días de edad. El pre-inóculo de las cepas se obtuvo en 10 mL de MC y se incubaron durante 20 horas a 28 °C y 150 rpm. Después se inocularon 50 mL de MC con 500 µL de células del pre-inóculo. Este cultivo se incubó por 24 horas a 28 °C en 150 rpm, pasado el tiempo de incubación se procedió al lavado de células con agua destilada estéril y se resuspendió la pastilla celular en 10 mL de agua destilada estéril. La concentración celular se determinó en la cámara de Neubauer a través de una dilución 1:10,000. Se preparó una suspensión a una concentración de 10^8 células/mL, las plantas de maíz fueron inyectadas con 300 µL de esta suspensión en la base del tallo. Los síntomas de las plantas de maíz fueron cuantificados a los 12 días posteriores a la inoculación, clasificando los síntomas en: asintomática, hojas con clorosis y producción de antocianinas, agallas pequeñas, agalla grande y muerte de la planta (Chavan & Smith, 2014).

VI. Resultados y discusión

VI.I. *U. maydis* se adapta a concentraciones que eran inhibitorias de H₂O₂

El primer objetivo de la presente tesis fue incrementar la resistencia de la cepa de *U. maydis* SG200 a H₂O₂. El peróxido de hidrógeno es una especie reactiva de oxígeno, que a altas concentraciones induce daños irreparables en diversos componentes celulares conduciendo eventualmente a la muerte celular. Sin embargo, la exposición de un organismo a una concentración moderada de H₂O₂, puede derivar en una eventual adaptación del organismo a este agente (Linder *et al.*, 2017; Huang y Kao, 2018; Qi *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

Para cumplir con este objetivo establecimos una metodología de evolución experimental, en la cual sometimos tres líneas derivadas de un cultivo isogénico de la cepa *U. maydis* SG200 a veinte ciclos de exposición intermitente a H₂O₂. De igual forma y en paralelo, otras tres líneas se mantuvieron en ausencia de H₂O₂, siendo estas líneas los controles del experimento de evolución. El experimento de evolución consistió en dos fases, en la primera fase, las células de *U. maydis* fueron expuestas a una concentración astringente de H₂O₂ durante tres horas, al finalizar esas tres horas, las células fueron transferidas a caldo de cultivo MC sin H₂O₂, esto para evitar la pérdida de la viabilidad celular.

Las líneas expuestas a H₂O₂ fueron nombradas A, B y C, mientras que las líneas sin exposición a H₂O₂ fueron nombradas D, E y F. El tratamiento para las líneas A, B y C consistió en dos fases, una fase de choque y una fase de recuperación. En la fase de choque 10⁶ células fueron expuestas durante tres horas a una concentración dada de H₂O₂, al finalizar ese periodo se estimó la tasa de supervivencia. La segunda fase inició inmediatamente después de la primera fase y consistió en transferir las células expuestas a H₂O₂ a caldo MC e incubarlas durante 45 h, pasado ese periodo, se cuantificó la concentración celular y se estableció un cuello de botella artificial reduciendo la concentración celular a 10⁶ células para iniciar el siguiente tratamiento de exposición a H₂O₂.

VI.I.I. La supervivencia de *U. maydis* incrementa durante la evolución experimental

La dinámica de la adaptación se analizó durante el curso de la evolución experimental, cuantificando la tasa de células que sobrevivían al choque por H₂O₂ y obteniendo la concentración celular obtenida después de la fase de recuperación.

Las tres líneas se iniciaron a partir de un cultivo isogénico de la cepa *U. maydis* SG200 con una concentración celular de 10⁶ células. Las primeras dos exposiciones a H₂O₂ ocurrieron a 5 mM de H₂O₂ y posteriormente, la concentración de H₂O₂ empleada para la fase de choque se incrementó en 3 unidades mM hasta alcanzar una concentración de 20 mM. Posterior a esta concentración, el incremento fue en 10 unidades mM, hasta alcanzar 60 mM.

En la Figura 4A se presenta la dinámica de crecimiento de las líneas A, B y C las cuales fueron evolucionadas bajo un régimen de exposición intermitente a H₂O₂. Se observa que la concentración celular de esas tres líneas disminuye ligeramente después de la exposición a 5 mM de H₂O₂ en el tratamiento uno y en el dos, sin embargo, en la fase de recuperación el tamaño poblacional de las tres líneas es superior a 10⁷ células, lo cual indica que en 45 horas, las líneas lograron incrementar su tamaño poblacional en un orden de magnitud. Interesantemente, la viabilidad de las tres líneas disminuyó a valores en el orden de 10⁵ células después del tratamiento 3, el cual ocurrió a 8 mM de H₂O₂. A pesar de esta disminución en la viabilidad celular después de la fase de exposición a H₂O₂, el tamaño poblacional de las tres líneas incremento en un orden de magnitud después de la fase de recuperación. Esta dinámica de supervivencia celular fue similar en el cuarto tratamiento, mismo que ocurrió a 8 mM de H₂O₂. De igual forma esta dinámica se mantuvo para los tratamientos subsecuentes, sin embargo, después de cada fase de recuperación, la concentración celular de cada línea se mantuvo en aumento hasta llegar a valores de 8.5x10⁷ células/mL. De igual forma y a pesar de que la concentración de H₂O₂ durante la fase de exposición fue en aumento, la viabilidad

celular de las células chocadas se mantuvo en el orden 10^5 células, alcanzando un valor mínimo de 5×10^4 células en la línea C en el tratamiento 18 después de una exposición a 50 mM de H_2O_2 . A pesar de lo drástico de la disminución en la viabilidad celular después del choque por H_2O_2 , así como de la disminución en la concentración celular después de la fase de recuperación, la viabilidad de la línea C aumentó después en los dos últimos choques con H_2O_2 , mismos que ocurrieron a 60 mM. Se mantuvieron tres líneas sin exposición a H_2O_2 (D, E y F), para contrastar su tasa de supervivencia a H_2O_2 después de la evolución experimental. Estas líneas control estuvieron sometidas al procedimiento de evolución experimental de dos fases, pero sin exposición a H_2O_2 en la fase de choque.

En la Figura 4B se presenta la dinámica del crecimiento de estas tres líneas durante los veinte ciclos de evolución experimental. En primera instancia se observa un incremento en el número de individuos viables después de establecer el tamaño poblacional en 10^6 células/mL e incubarlo durante tres horas. Esto se debe a que durante esas 3 horas las células no estuvieron expuestas a ningún agente que merme el crecimiento, favoreciendo así el crecimiento celular, mismo que se ve reflejado en la cuantificación de individuos viables.

De igual forma, se puede observar que hubo un aumento constante en la concentración celular después de la fase de incubación en caldo MC durante 45 h. Este resultado se atribuye a que esta fase se inició con una mayor cantidad de células en las líneas D, E y F, así como a que las células metabolizaron con mayor eficiencia los nutrientes del medio.

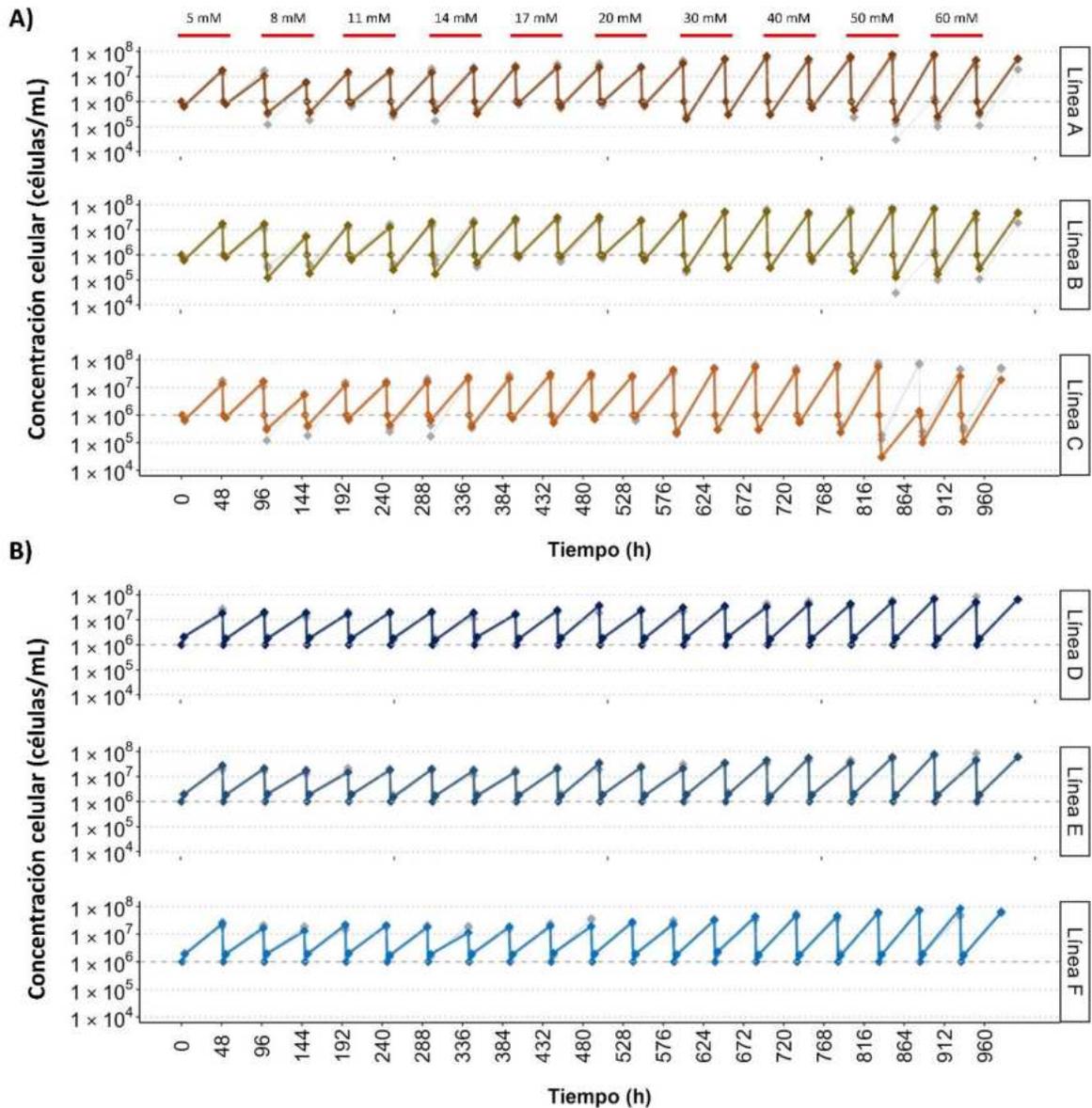


Figura 4. Dinámica de la adaptación de *U. maydis* al H_2O_2 . Las seis líneas fueron iniciadas a 1×10^6 células/mL y ajustadas a esta concentración al finalizar cada ciclo de 48 h. **A)** Líneas expuestas a H_2O_2 (A, B y C). Los puntos por debajo de 1×10^6 células/mL indican la concentración celular que sobrevivió a la fase de choque por H_2O_2 . Los puntos por arriba de 1×10^6 células/mL indican la concentración celular a la que se llegó después de la fase de recuperación. **B)** Líneas no expuestas a H_2O_2 (D, E y F). Los puntos por arriba de 1×10^6 células/mL indican la concentración celular después de ser incubadas durante tres horas en ausencia de H_2O_2 . En esta fase no se espera reducción en la concentración celular. Los puntos arriba de 1×10^7 células/mL indican la concentración celular al finalizar las 48 horas de cada ciclo.

VI.I.II. *U. maydis* resiste hasta 60 mM de H₂O₂ después de la evolución

Para evaluar el impacto de la adaptación de *U. maydis* al H₂O₂, se contrastó el porcentaje de células sobrevivientes a 5 mM y 60 mM en *U. maydis* SG200 y en las cepas de cada línea evolutiva después de los 20 tratamientos de evolución experimental.

En la Figura 5 se presentan las tasas de supervivencia a 5 mM y 60 mM de H₂O₂ de las líneas evolucionadas durante 200 generaciones, así como de la cepa inicial *U. maydis* SG200. Las tasas de supervivencia se estimaron a partir de la cuantificación de UFC y representan el porcentaje de células que sobrevivieron a la exposición a H₂O₂, tomando como referencia el número de células que sobrevivieron en la condición sin exposición a H₂O₂.

En primer lugar, se observó una tasa de supervivencia del 42% en *U. maydis* SG200 después de la exposición a 5 mM de H₂O₂. Por otro lado, la exposición a 60 mM de H₂O₂ resultó ser completamente letal para esta cepa. El análisis de la tasa de supervivencia en las líneas evolucionadas reveló un incremento promedio del 43.1% ± 8.3% en las líneas expuestas a H₂O₂ (A, B y C), cuando estas son expuestas a 5 mM de H₂O₂. De igual forma, estas líneas presentaron viabilidad a 60 mM de H₂O₂, promediando una tasa de supervivencia del 11% ± 2.3% respecto al total de las células expuestas (10⁶ células). Finalmente, en la Figura 5 se observa que la tasa de supervivencia a 5 mM de las líneas control (D, E y F) promedió 16.4% ± 2.6%, valor que es menor en comparación a la tasa de supervivencia de la cepa inicial a esa misma concentración de H₂O₂. Por otro lado, 60 mM se mantuvo como concentración letal para las líneas control. Estos resultados muestran la adaptación de *U. maydis* al peróxido de hidrógeno como resultado de la exposición intermitente a este agente. Al final de los 20 tratamientos obtuvimos células que resisten a un choque de 60 mM, mientras que en el cultivo inicial de *U. maydis* SG200 confrontado a 60 mM de H₂O₂ no se obtienen células viables.

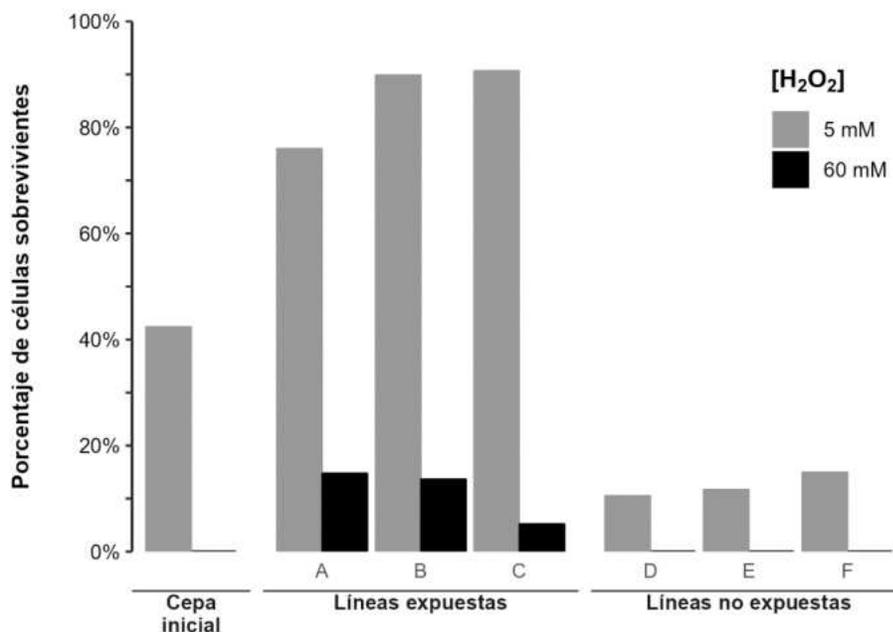


Figura 5. Tasa de supervivencia celular a 5 mM y 60 mM de H₂O₂. Al finalizar el experimento de evolución se evaluó la supervivencia celular a 5 mM y 10 mM de H₂O₂ de *U. maydis* SG200 (cepa inicial), así como de las cepas de las líneas expuestas y no expuestas a H₂O₂.

Los resultados del incremento de la viabilidad celular de *U. maydis* a 5 mM de H₂O₂ después de la evolución durante 200 generaciones, así como la habilidad de proliferar en concentraciones de H₂O₂ que previamente eran inhibitorias, son consistentes con lo reportado en *Candida glabrata* (Huang y Kao, 2018). Huang y Kao, (2018) llevaron a cabo un experimento de evolución en laboratorio en *C. glabrata* que inició a 80 mM de H₂O₂, concentración que representa el IC50 para la cepa inicial, sin embargo, después de 180 generaciones con exposición periódica a H₂O₂, *C. glabrata* incrementó su tolerancia a este agente, siendo ahora, 350 mM de H₂O₂ la concentración IC50 para *C. glabrata*. Ambos resultados, la adaptación a H₂O₂ observada en *U. maydis* reportada en la presente investigación, así como la adaptación de *C. glabrata* a este mismo agente (Huang y Kao, 2018) evidencian la habilidad de estos dos hongos patógenos para adaptarse rápidamente a un ambiente de estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Adicionalmente, la disminución en

la resistencia a H₂O₂ observada en las líneas D; E y F al finalizar los veinte tratamientos de evolución experimental podría deberse a la acumulación de mutaciones que disminuyen la adecuación ante este agente.

VI.I.III. La resistencia a peróxido de hidrógeno se presenta en colonias de las líneas expuestas a este agente

La evolución experimental de *U. maydis* SG200 demostró que la exposición intermitente a H₂O₂ deriva en líneas con una resistencia mejorada a este agente. Es importante mencionar que esta resistencia fue observada en las líneas evolutivas, mismas deben ser vistas como poblaciones ya que pueden ser la mezcla de diferentes genotipos.

Para el subsecuente análisis de identificación de variantes genéticas adquiridas durante la exposición a H₂O₂, se aislaron colonias de cada línea evolutiva al finalizar el experimento de evolución. Este aislamiento ocurrió con la intención de observar la combinación de alelos presentes en una sola celular y evitar el ruido causado por la presencia de diferentes combinaciones de alelos en los individuos de las poblaciones de las líneas evolutivas. Se aislaron cinco colonias de cada línea evolutiva expuesta a H₂O₂, mientras que para cada línea evolutiva control se aislaron dos colonias. Estas colonias fueron seleccionadas a partir de las cajas Petri donde se llevó a cabo el conteo de UFC para estimar la tasa de supervivencia después de la fase de choque. En total se obtuvieron quince colonias para las líneas expuestas a H₂O₂ y seis colonias para las líneas control, cada colonia fue subclonada dos veces en agar MC. Después de la segunda clonación, se establecieron cultivos en caldo MC durante 24 h. Al finalizar las 24 h de cultivo, se crio-preservó cada colonia en glicerol al 25% y se almacenó a -80 °C.

Con el objetivo de verificar que la resistencia a H₂O₂ observada en las líneas evolutivas se mantuviera en las colonias aisladas, se estableció un análisis cualitativo que consistió en analizar los cambios en la zona de inhibición producida

por 5 μL de H_2O_2 (30% p/p) sobre un tapete celular de 10^7 células/mL (ver Materiales y Métodos, sección V.V). Una zona de inhibición con menor área es indicativa de un aumento en la resistencia a H_2O_2 , mientras que, a mayor área de inhibición, menor es la resistencia a H_2O_2 .

La Figura 6 presenta la cuantificación de las zonas de inhibición en cada colonia aislada, así como en la cepa *U. maydis* SG200. Se observa que la zona de inhibición de las colonias aisladas en las líneas A, B y C, disminuyó respecto a la zona de inhibición de *U. maydis* SG200 ($10.6 \text{ cm}^2 \pm 0.33 \text{ cm}^2$). El mayor cambio en la resistencia se detectó en las colonias LA.1 y LC.1, donde se detectó una zona de inhibición de $2.48 \text{ cm}^2 \pm 0.15 \text{ cm}^2$ y $2.45 \text{ cm}^2 \pm 0.15 \text{ cm}^2$, respectivamente. Por otro lado, las cepas con el menor cambio en la zona de inhibición fueron LB.5 y LC.5, donde se cuantificó una zona de inhibición de $5.04 \text{ cm}^2 \pm 0.23 \text{ cm}^2$ y $5.02 \text{ cm}^2 \pm 0.19 \text{ cm}^2$, respectivamente.

Si bien, cada colonia aislada de las líneas A, B y C presentó una zona de inhibición distinta, la diferencia en la zona de inhibición en todas las colonias fue estadísticamente significativa respecto a la zona de inhibición de *U. maydis* SG200.

Por otro lado, se observó que la zona de inhibición de las colonias aisladas de las líneas control se mantuvo en el intervalo de $10.40 \text{ cm}^2 \pm 1.44 \text{ cm}^2$ a $11.56 \text{ cm}^2 \pm 1.23 \text{ cm}^2$, áreas que corresponden a las colonias LE.2 y LF.2, respectivamente. Las zonas de inhibición observadas en estas seis colonias no presentaron cambios estadísticamente significativos respecto a la resistencia de *U. maydis* SG200. Este análisis cualitativo de resistencia a peróxido de hidrógeno reveló que la resistencia a H_2O_2 fue un rasgo también presente en las colonias aisladas de las líneas que estuvieron expuestas de forma intermitente a H_2O_2 . Este fenómeno se evidenció en las colonias aisladas de dichas líneas, donde se observó una disminución significativa en la zona de inhibición, indicando una mayor resistencia.

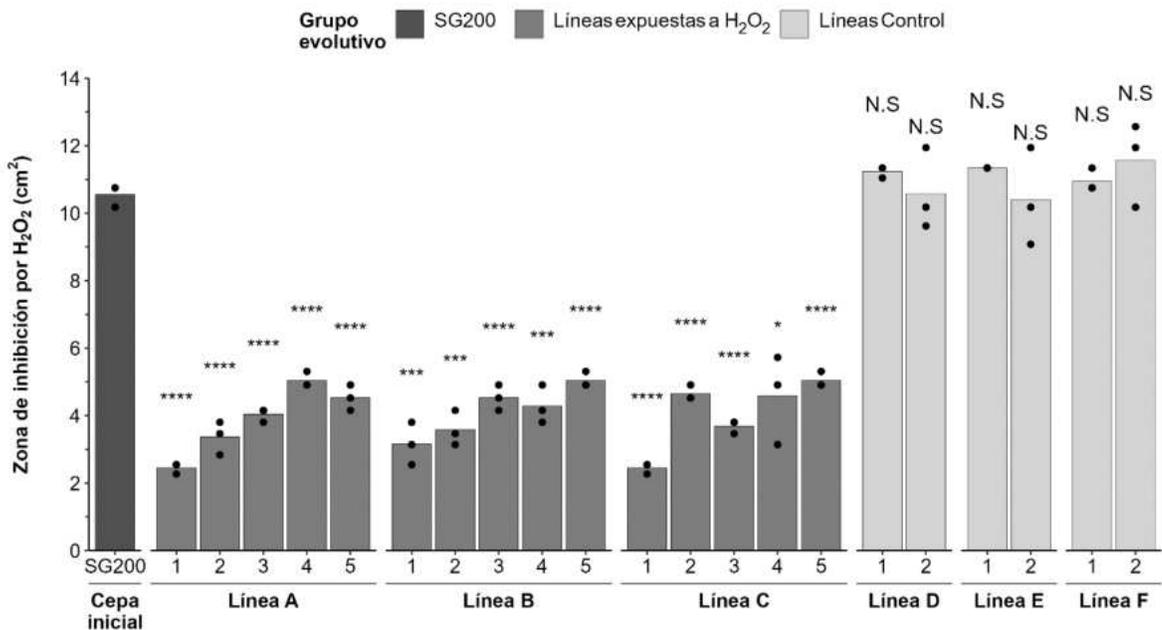


Figura 6. Resistencia a H₂O₂ en colonias derivada de las líneas evolutivas. Cada barra representa el promedio de la zona de inhibición producida por 5 μ L de H₂O₂ al 30% (p/v) de tres replicas. Una zona de inhibición más pequeña indica una mayor resistencia al H₂O₂. Los niveles de significancia estadísticos fueron estimados usando la prueba *t* a través de la comparación de medias de la zona de inhibición de las colonias bajo estudio contra la media de la zona de inhibición en *U. maydis* SG200. Las marcas de significancia indican: N.S $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

A pesar de que todas las colonias presentaron la resistencia a H₂O₂, y la diferencia de esta resistencia fue significativa respecto a la de *U. maydis* SG200, los niveles de resistencia en las colonias fueron heterogéneos. Esta heterogeneidad en la resistencia a H₂O₂ podría indicar la presencia de diferentes poblaciones coexistiendo en una misma línea evolutiva. La detección de variantes genéticas en cada colonia de cada línea es un punto crucial para el entendimiento de la variabilidad genética resultante del experimento de evolución.

VI.II. El peróxido de hidrógeno induce variantes genómicas

Los cambios genéticos inducidos en *U. maydis* tras la exposición al peróxido de hidrógeno, así como por la evolución experimental fueron detectados a partir del análisis de los genomas secuenciados. La detección de estas variantes se enfocó en colonias derivadas de cada línea evolutiva, esto con el objetivo de eliminar la interferencia de mezclas de genotipos que pudiesen estar presentes en las poblaciones evolucionadas.

Para el estudio de las variantes se secuenciaron genomas de colonias de las líneas expuestas a H₂O₂ (A, B y C) y de las líneas control (D, E y F). Para las líneas expuestas a H₂O₂ se secuenció un total de 15 colonias obtenidas inmediatamente después del tratamiento 20 ocurrido a 60 mM de H₂O₂. En las líneas control se secuenció un total de seis colonias, dos colonias por línea. El genoma de estas colonias fue secuenciado con la tecnología de lecturas cortas (longitud de 150 pb) DNBSeg (BGI). De igual forma, se secuenció el genoma de *U. maydis* SG200, punto de partida del experimento de evolución. Este genoma se secuenció con la tecnología de lectura corta DNBSeg (BGI), así como con NextSeq 500. La doble secuenciación de *U. maydis* SG200 se hizo con el objetivo de contrastar los resultados arrojados por ambas tecnologías de secuenciación, y de conocer las variantes presentes en la cepa inicial con respecto al genoma de referencia.

Las lecturas de cada genoma secuenciado fueron sometidas a un proceso de limpieza para remover lecturas de baja calidad y posteriormente fueron mapeadas al genoma de referencia de *U. maydis* v.2 (establecido a partir de la cepa *U. maydis* 521). La cobertura de cada genoma secuenciado se estimó a partir del mapeo las lecturas al genoma de referencia y los valores de cobertura oscilaron entre 152X y 220X (Tabla 6). Es importante mencionar que una alta cobertura ayuda a identificar y eventualmente remover los errores de secuenciación, así como a mejorar la confiabilidad de la identificación de variantes.

Tabla 6. Cobertura de los genomas secuenciados.

ID	Condición	Línea	Número de colonia	Mediana de cobertura
<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.1	Expuesta a H ₂ O ₂	A	1	202
<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.2			2	179
<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.3			3	187
<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.4			4	196
<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.5			5	194
<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.1	Expuesta a H ₂ O ₂	B	1	196
<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.2			2	190
<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.3			3	195
<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.4			4	188
<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.5			5	193
<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.1	Expuesta a H ₂ O ₂	C	1	195
<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.2			2	197
<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.3			3	188
<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.4			4	193
<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.5			5	192
<i>Um</i> -LD.1	Sin exposición a H ₂ O ₂	D	1	195
<i>Um</i> -LD.2			2	152
<i>Um</i> -LE.1	Sin exposición a H ₂ O ₂	E	1	198
<i>Um</i> -LE.2			2	155
<i>Um</i> -LF.1	Sin exposición a H ₂ O ₂	F	1	197
<i>Um</i> -LF.2			2	155
SG200-BGI	Cepa Inicial	-	-	193
SG200-NxtSq	Cepa Inicial	-	-	31 ^a

^a Este genoma fue secuenciado con la plataforma Illumina NextSeq 500

VI.II.I. Amplificación del cromosoma nueve en líneas adaptadas a H₂O₂

La primera etapa del estudio de variantes genéticas ocurridas en *U. maydis* después del experimento de evolución se enfocó en el análisis de la arquitectura genómica mediante el análisis de variantes en el número de copias de secuencias largas (al menos dos kilobases consecutivas). En la continuación de nuestro estudio de variantes genéticas se exploraron las sustituciones de un solo nucleótido. La detección de variantes en el número de copias se realizó calculando la cobertura normalizada en ventanas no sobrelapantes de 1 kb en cada muestra. Posteriormente, se calculó el cociente de cada ventana de cada cepa en comparación con la ventana correspondiente en la cepa inicial.

El análisis del cociente de la cobertura normalizada reveló que, en la mayoría de las colonias secuenciadas, todos los cromosomas exhiben un valor de \log_2 igual a 0, correspondiente a un número de copias igual a 1 (Figura 7). No obstante, se observó una variante en los valores de \log_2 en el brazo izquierdo del cromosoma nueve. Esta variante fue identificada en siete colonias aisladas de las tres líneas expuestas a H₂O₂. La variante del cromosoma nueve se muestra detalladamente en la Figura 8. Se observó que el cambio de cobertura inicia en el extremo izquierdo y se dirige hacia la derecha, sin llegar al extremo derecho. Dicha variante presenta diferencias en tamaño, así como en el número de copias inferidos a partir del \log_2 del cociente de la cobertura normalizada en las diferentes colonias secuenciadas.

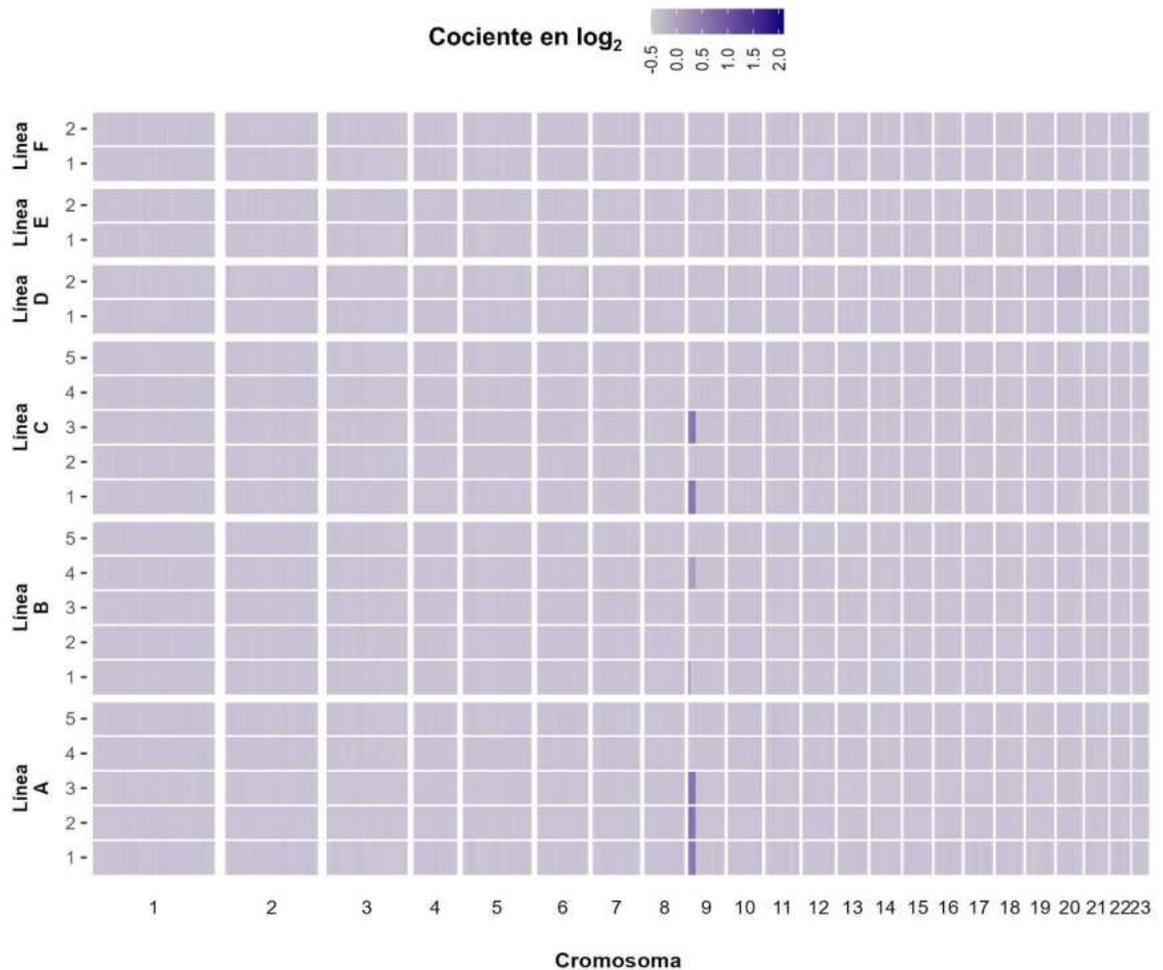


Figura 7. Análisis de variantes en el número de copias en el genoma de *U. maydis*. Análisis de la relación de la cobertura normalizada de las colonias bajo estudio respecto a la cobertura normalizada de *U. maydis* SG200.

Al analizar por líneas expuestas a H₂O₂, se observó que las colonias 1, 2 y 3 de la línea A presentaron un valor de log₂ igual a 1.58, este valor corresponde a tres copias de los primeros 150 kb del cromosoma 9 (Figura 8). Para la línea B, se detectó una amplificación en los primeros 39 kb del cromosoma 9 con un valor de log₂ igual a 0.88, en esta misma línea, la colonia 4 presentó una amplificación de 150 kb con un valor de log₂ igual a 1.58. Finalmente, en la línea C las colonias 1 y

3 exhibieron amplificación en los primeros 150 kb del cromosoma 9 con un valor de \log_2 igual a 1.58. Esta amplificación no fue detectada en las líneas control.

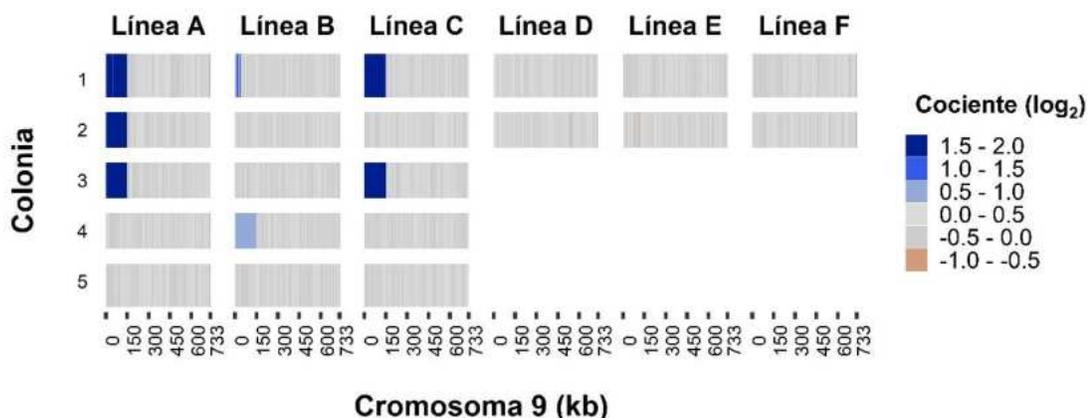


Figura 8. Variante en el número de copias del brazo izquierdo del cromosoma 9. Cociente de la cobertura normalizada de las colonias bajo estudio respecto a la cobertura normalizada de la cepa *U. maydis* SG200. El análisis ocurrió en ventanas no solapantes de una kilobase (1 kb).

La observación de una amplificación en los primeros 150 kb del cromosoma nueve en las tres líneas independientes expuestas a H₂O₂ sugiere una respuesta adaptativa a condiciones estresantes. Es importante destacar que, aunque la carga anormal de cromosomas puede ser perjudicial en mamíferos (Tosh *et al.*, 2022; Williams *et al.*, 2008), en organismos como hongos filamentosos y levaduras, la variación en el número de copias de cromosomas puede conferir ventajas adaptativas. Este fenómeno se atribuye a la duplicación de genes asociados con la respuesta al estrés o el metabolismo de fármacos, lo que permite a los organismos hacer frente a condiciones ambientales adversas (Gilchrist y Stelkens, 2019; Selmecki *et al.*, 2009).

Los resultados de la amplificación del cromosoma nueve de *U. maydis* tras la exposición a H₂O₂, son similares a lo observado por Selmecki y colaboradores (2009), en la levadura *C. albicans*, donde la exposición repetida a fluconazol deriva en la adquisición de aneuploidías en los cromosomas tres y siete, así como la

formación de un isocromosoma que contiene el brazo izquierdo del cromosoma cinco (Selmecki *et al.*, 2009). Interesantemente, los genes *ERG1* y *TAC1* que se localizan en el cromosoma cinco, participan activamente en la resistencia al fluconazol, ya que *ERG1* codifica una proteína que participa en la síntesis del componente de membrana ergosterol y *TAC1* codifica para un regulador transcripcional de las bombas de flujo de drogas, estas funciones disminuyen la entrada de fluconazol al interior de la matriz celular y este es expulsado de forma más efectiva.

VI.V.I.I. Análisis del punto de ruptura de la amplificación del cromosoma nueve

Durante el experimento de adaptación a peróxido de hidrógeno, observamos una variante en el número de copias de las primeras 150 kb del cromosoma 9. Esta amplificación llegó a alcanzar un total de 3 copias.

El análisis del cociente de la cobertura normalizada de las muestras que tienen la amplificación contra la muestra inicial en ventanas no sobrelapantes de 1 kb reveló que el aumento en el número de copias inició desde la primera ventana y se mantuvo hasta la ventana que corresponde a la posición de 150 kb. Con el objetivo de encontrar el punto exacto donde finaliza la amplificación se llevaron a cabo dos análisis, en el primero se utilizó el software CNVnator (Abyzov *et al.*, 2011) para encontrar las coordenadas de inicio y fin de variantes en el número de copias. El segundo análisis consistió en analizar el cociente de la cobertura normalizada a una resolución de par de bases. El análisis de CNVnator identificó en cada colonia secuenciada un conjunto de variantes en el número de copias. De las variantes identificadas se removieron las ya presentes en *U. maydis* SG200, y posteriormente se filtraron de acuerdo con el valor de profundidad de cobertura, usando un umbral de ≤ 0.3 para deleciones y ≥ 1.7 para duplicaciones. Finalmente se filtraron por el valor de *e-value*, manteniendo aquellas con un *e-value* igual o menor a 0.05. En siete colonias de las quince secuenciadas que derivaron de las líneas expuestas a

H₂O₂, se identificó la presencia de una duplicación en las primeras 150 kb del cromosoma nueve. En la Tabla 7 se presenta la información de coordenadas, número de copias y *e-value* detectados por CNVnator en el cromosoma nueve en las muestras analizadas. Los resultados de CNVnator sobre que colonias presentan esta variante coinciden con los hallazgos obtenidos con el análisis del cociente de las coberturas normalizadas en ventanas no solapantes de 1 kb.

Tabla 7. Variantes en el número de copias en el cromosoma nueve por CNVnator.

Línea	Cepa	Coordenadas de la variante (pb)	Número de copias	<i>e-value</i>
SG200	SG200	-	-	
Línea A	<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.1	1 - 149,100	3	0
	<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.2	1 - 148,950	3	0
	<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.3	1 - 149,100	3	0
	<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.4	-	-	
	<i>UmH₂O₂^R</i> -LA.5	-	-	
Línea B	<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.1	601 - 38,850	2	0
	<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.2	-	-	
	<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.3	-	-	
	<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.4	1 - 148,950	2	0
	<i>UmH₂O₂^R</i> -LB.5	-	-	
Línea C	<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.1	1 - 149,100	3	0
	<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.2	-	-	
	<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.3	1 - 149,100	3	0
	<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.4	-	-	
	<i>UmH₂O₂^R</i> -LC.5	-	-	
Línea D	<i>Um</i> -LD.1	-	-	
	<i>Um</i> -LD.2	-	-	
Línea E	<i>Um</i> -LE.1	-	-	
	<i>Um</i> -LE.2	-	-	
Línea F	<i>Um</i> -LF.1	-	-	
	<i>Um</i> -LF.2	-	-	

El análisis con CNVnator reveló dos puntos de ruptura distintos para la variante que comprende los primeros 150 kb. En las colonias *UmH₂O₂^R-LA.2* y *UmH₂O₂^R-LB.4*, el punto de ruptura fue identificado en la posición 148,950, mientras que para las colonias *UmH₂O₂^R-LA.1*, *UmH₂O₂^R-LA.3*, *UmH₂O₂^R-LC.1* y *UmH₂O₂^R-LC.3*, el punto de ruptura fue identificado en la posición 149,100. Para todos los casos anteriores la coordenada de inicio fue detectada en la posición 1. Adicionalmente, se observó que en la colonia *UmH₂O₂^R-LB.1*, la variante del número de copias solo comprende la secuencia ubicada de la posición 601 a la posición 38,850.

De igual forma, CNVnator detectó que la variante en las tres colonias de la línea A, así como en las dos colonias de la línea C, el número de copias es igual a 3. Por otro lado, en las dos colonias de la línea B, el número de copias fue estimado en 2. Los resultados de CNVnator confirman los resultados obtenidos previamente a través del análisis de las coberturas normalizadas respecto a la presencia de una variante en el número de copias del brazo izquierdo del cromosoma nueve. De igual forma, proveen información más detallada acerca de las coordenadas de inicio y fin de la amplificación.

Se llevó a cabo un análisis del cociente de las coberturas normalizadas a resolución de un par de base (1 pb), con el objetivo de tener un mejor panorama sobre el punto donde acaba la amplificación de los primeros 150 kb. En este análisis se analizaron la cobertura de las colonias *UmH₂O₂^R-LB.4* y *UmH₂O₂^R-LC.1*, misma que presentan un número de copias de 2 y 3 en los primeros 150 kb del cromosoma nueve, respectivamente. En la Figura 9 se muestra el log₂ del cociente de la cobertura normalizada para las dos colonias bajo estudio. Esta figura se enfoca en la zona del término de la amplificación de los primeros 150 kb del cromosoma nueve, razón por la cual solo se grafica de la posición 140 kb a 155 kb. Se aprecia que, a pesar de la presencia de fluctuaciones, los valores de cobertura de la posición 140,000 (140 kb) a la posición 146,250 (146.25 kb) de ambas muestras, se mantienen en un intervalo de 0.6 a 1.2 para *UmH₂O₂^R-LB.4*, y de 1.4 a 2.0 para *UmH₂O₂^R-LC.1*. Interesantemente, se aprecia que a partir de la posición 146,250 (146.25 kb), la

cobertura en ambas muestras empieza a mostrar un descenso hasta la posición 148,000. Para ambas muestras el descenso fue de 0.8 unidades, sin embargo, a partir de ese punto, el cociente de la cobertura aumentó ligeramente en aproximadamente 0.4 unidades. Finalmente, ese cociente de cobertura desciende a valores cercanos a 0 a partir de las posiciones 148,950 y 149,100, para $UmH_2O_2^R$ -LB.4 y $UmH_2O_2^R$ -LC.1, respectivamente.

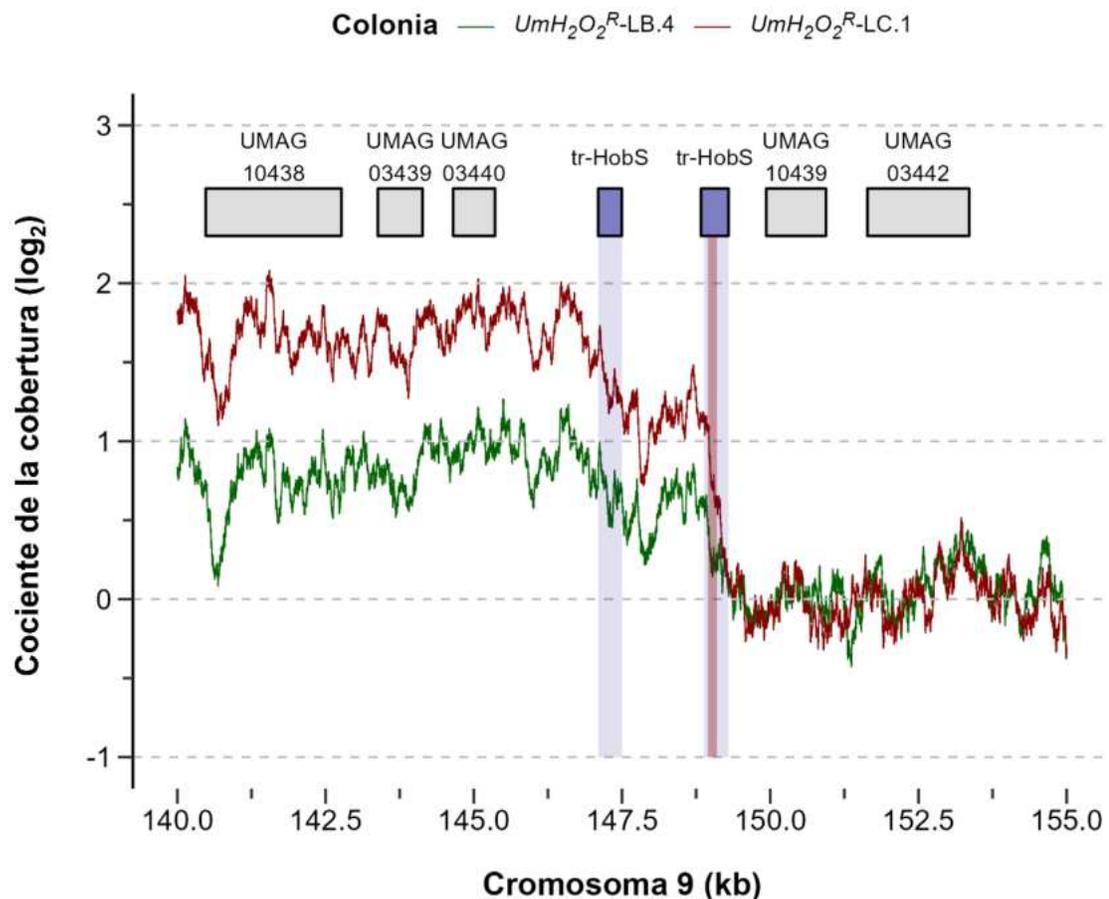


Figura 9. Localización del punto de ruptura de la amplificación del cromosoma 9. Cociente de la cobertura normalizada a resolución de par de base en las colonias $UmH_2O_2^R$ -LB.4 y $UmH_2O_2^R$ -LC.5, respecto a la cobertura normalizada de *U. maydis* SG200. Este gráfico solo presenta de la kilobase 140 a la 155 del cromosoma 9. En la parte superior se indican en rectángulos grises los genes localizados en la zona mostrada, así como los fragmentos correspondientes a los repetidos terminales (*terminal repeats*) del retroelemento HobS.

Una vez identificada la región donde la cobertura tiende a cero, se procedió a identificar qué tipo de secuencias se encuentran en las regiones del punto de ruptura de la amplificación. En la región que corresponde de la posición 140,000 al punto de ruptura (148,950 o 149,100, según la colonia analizada) están presentes los siguientes tres genes UMAG_10438, UMAG_03439 y UMAG_03440. Este último gen está localizado de la base 144,651 a la base 145,358, y a partir de esta última posición y hasta la base 151,640 (posición fuera de la secuencia amplificada) no hay genes anotados.

El análisis exhaustivo de esa secuencia en BLAST reveló la presencia de dos remanentes de las repeticiones directas de 750 pb del retrotransposon HobS. Estas secuencias muestran alineamientos de más de 400 pb con un 91% y 412 pb con un 90% de identidad, respectivamente, y podrían ser responsables de la inestabilidad genómica de la región y su triplicación.

Aunque no hay mucho conocimiento sobre el rol de secuencias móviles de *U. maydis*, se ha identificado que este hongo posee en su genoma al menos dos tipos de elementos móviles, *TigR* y *HobS* (Kämper *et al.*, 2006). Este último elemento se encuentra presente, ya sea de forma completa o parcial, en cada cromosoma de *U. maydis* (Kahmann y Kämper *et al.*, 2004).

VI.V.I.II. La amplificación del cromosoma nueve comprende una catalasa

La amplificación de las primeras 150 kb del cromosoma 9 en las líneas expuestas a H₂O₂ sugiere que esta variante fue producida por la exposición a este agente y que podría estar participando en la adaptación observada. Se ha observado que, aunque las amplificaciones cromosómicas de fragmentos largos resultan en un aumento en la dosis génica de todos los genes localizados en esa secuencia, el efecto benéfico de estos fenómenos a menudo suele estar restringido a pocos genes (Selmecki *et al.*, 2006).

Los primeros 150 kb del cromosoma nueve contienen 55 genes codificantes de proteínas (ver Tabla 18, Anexo IV). Dentro de estos genes destaca principalmente el gen UMAG_11067 que se localiza en las coordenadas 18,661 - 20,910 (-), y que codifica para una enzima catalasa, la cual cataliza la degradación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2). A pesar del papel de la catalasa en la degradación del H_2O_2 , los datos de Molina y Kahmann, (2006) muestran que este gen no es regulado por *Yap1*.

Adicionalmente, también destaca la presencia de dos genes que se localizan en la región telomérica de este mismo cromosoma. Esos genes corresponden a UMAG_11065 y UMAG_03394 que se localizan en las coordenadas 1,263 – 1,886 (-) y 5,960 – 8,836 (-), respectivamente. Estos dos genes pertenecen a la familia de RecQ helicasa (Sánchez-Alonso y Guzmán, 1998; Dutheil *et al.*, 2020), enzimas que en eucariontes tienen un rol en el mantenimiento y reparación del ADN (Vindigni y Hickson, 2009). A pesar de que la reparación del ADN es un proceso crucial para la supervivencia de una célula, el hecho de que *U. maydis* tenga otros 10 genes RecQ distribuidos en otros cromosomas podría indicar que aumentar las copias de estos no sea tan relevante en la resistencia a H_2O_2 . Dutheil y colaboradores (2020), observaron que los genes RecQ que presentan mayores niveles de expresión, tanto en cultivo axénico como en etapas tempranas del desarrollo biotrófico de *U. maydis* son los genes UMAG_10980 y UMAG_03869, que se localizan en el cromosoma 22 (398,220 – 400,499) y en el cromosoma 10 (687,301 – 690,648), respectivamente. En ese mismo estudio, reportaron que UMAG_11065 y UMAG_03394, ambos localizados en el cromosoma nueve, presentan los niveles de expresión más bajos de todos los genes de la familia RecQ. Por otro lado, en el genoma de *U. maydis* solo se encuentra anotado un gen que codifica para una enzima catalasa. Este gen es UMAG_11067, mismo que se ve afectado de forma directa por la amplificación del cromosoma nueve. La enzima codificada por este gen está clasificada como katG, y es una enzima bifuncional con actividad de catalasa y peroxidasa de amplio espectro, oxidando varios donantes de electrones, incluyendo NADP(H).

El rol de la enzima catalasa de *U. maydis* permanece poco explorado, sin embargo, se ha reportado que la actividad de esta enzima aumenta cuando hay acumulación de especies reactivas de oxígeno como consecuencia de la interrupción del gen *UmRrm75* (Rodríguez-Piña *et al.*, 2019). De igual forma, de acuerdo con los datos de Lanver y colaboradores (2018) de RNA-Seq, esta enzima presenta altos niveles de expresión en condiciones de cultivo axénico, así como durante las etapas tempranas del desarrollo biotrófico de *U. maydis*.

La ocurrencia de una amplificación en el cromosoma nueve de *U. maydis*, específicamente en la región en la que se localiza el único gen que codifica para la enzima catalasa es congruente con lo observado en experimentos de evolución en laboratorio llevados a cabo en la levadura *S. cerevisiae*, en donde se observó que la exposición repetida a 100 mM de H₂O₂ resulta en la amplificación de 200 kb del cromosoma siete, específicamente en la región donde se localiza el gen *CTT1* que codifica para una catalasa citosólica (Zhang *et al.*, 2019). De igual forma, se ha observado que la exposición de *S. cerevisiae* a H₂O₂ induce el aumento en número de copias del cromosoma cuatro, en la región en la que se localiza el gen *TSA2*, el cual codifica para una enzima tiorredoxina peroxidasa, la cual también lleva a cabo la degradación de H₂O₂ a agua y alcoholes (Linder *et al.*, 2017). Estos hallazgos indican que aumentar el número de copias de genes que codifican para enzimas que degradan el peróxido de hidrógeno es una estrategia que permite la supervivencia y eventual adaptación al ambiente oxidativo inducido por el H₂O₂.

VI.II.II. La exposición a H₂O₂ indujo mutaciones puntuales

En primera instancia, se analizó la ocurrencia de variantes de un solo nucleótido en las colonias derivadas de ambos grupos de líneas sometidas a evolución experimental. Previo a la identificación de variantes, estimamos cuál es el número de SNVs que se podrían esperar como resultado de nuestro experimento de evolución después de 200 generaciones. Para esto empleamos la tasa de mutación

reportada por Schweizer et al., (2021) para hongos “carbones” del maíz de 5.23×10^{-9} sustituciones por sitio por nucleótido por generación.

$$\frac{5.23 \times 10^{-9} \text{ sustituciones}}{\text{sitio} \cdot \text{generación}} \cdot \frac{200 \text{ generaciones}}{\text{generación}} \cdot \frac{20500000 \text{ sitios}}{\text{sitio}} = \frac{21 \text{ sustituciones}}{\text{generación}}$$

El cálculo para 200 generaciones arrojó un valor de 21 sustituciones, mismas que podrían ser consideradas como el número esperado de sustituciones a encontrar en nuestro experimento de evolución. Cabe mencionar que esta tasa fue obtenida como una tasa general para hongos clasificados como “carbones” del maíz, y puede haber una sobre o sub-estimación al obtener estimados para las diferentes especies de este grupo.

Las variantes de un solo nucleótido (SNV) fueron detectadas a través de dos métodos. En el primer método cada genoma secuenciado fue ensamblado *de novo*, y esos ensamblajes fueron filtrados para remover *contigs* con las siguientes características: que tuvieran una longitud menor a 1,000 pb, que tuvieran una cobertura normalizada menor a 0.7 y que no tuvieran identidad con *U. maydis*. Estos ensamblajes fueron sometidos a un alineamiento múltiple y después a un proceso de filtrado en el que se removieron bloques que presentan secuencias ambiguas. La longitud final del alineamiento fue de 19.27 Mb. Las variantes de un solo nucleótido fueron identificadas a partir de este alineamiento y exportadas en un archivo VCF.

Como primer resultado de este proceso de identificación de variantes, se encontró que el número de SNV en todas las muestras analizadas osciló en el intervalo de 1,557 SNV a 2,223 SNV. Este alto número de SNVs está directamente influenciado por la presencia de los SNVs presentes en *U. maydis* SG200 al momento de iniciar el experimento de evolución (1,579 SNVs). Esos SNVs en *U. maydis* SG200 corresponden a la divergencia de esta cepa con la cepa a partir de la cual se estableció el genoma de referencia (*U. maydis* 521).

Para identificar las variantes ocurridas durante la evolución experimental, se removieron todas aquellas variantes también presentes en la cepa inicial *U. maydis*

SG200. El número de SNV remanentes para cada muestra a través del enfoque de alineamiento múltiple osciló de 84 a 739 (Tabla 8). Estos números están hasta 31 veces arriba de los 21 SNV estimados a partir de la tasa de mutación. Debido a estos valores tan fuera de rango, se verificó que cada SNV estuviera sustentado por más del 90% de las lecturas que alinean a esa posición. El resultado de esta verificación redujo el número de SNV en cada muestra, oscilando ahora de 0 a 8 (Tabla 8), estos valores se encuentran en el intervalo de lo esperado a partir del cálculo hecho con la tasa de mutación.

Aunque el proceso de refinamiento produjo la cantidad esperada de SNVs, aún permanece cierto nivel de incertidumbre debido a que en cada muestra más del 90% de las variantes originalmente identificadas carecen de respaldo en las lecturas correspondientes a esa posición. Un análisis minucioso de cada paso de este proceso de llamado de variantes reveló que el ensamble *de novo* genero contigs con bases incorrectas. La presencia de estas bases fue la razón del elevado número de SNVs. Estos resultados indican que es crucial refinar los ensamblajes *de novo* generados con MegaHit. El proceso de refinamiento involucra alinear las lecturas de secuenciación al ensamble *de novo* y corregir aquellas bases que sean diferentes al consenso de las bases alineadas. Este proceso se podría llevar a cabo con herramientas como Racon (Vaser *et al.*, 2017) o JASPER (Guo *et al.*, 2023).

Para reducir esta incertidumbre sobre el llamado de variantes a partir del alineamiento múltiple de genomas, se llevó a cabo un segundo llamado de variantes, en esta ocasión usando el conjunto de herramientas bioinformáticas de *bcftools* (Li *et al.*, 2009).

El análisis de SNVs con *bcftools* emplea el archivo de alineamiento de las lecturas de secuenciación al genoma de referencia. En este análisis se establecieron parámetros de calidad de alineamiento de la lectura y de calidad de base 20 y 30, respectivamente. Los umbrales para estos umbrales están en escala Phred, donde una puntuación de 20 indica una fiabilidad del 99.00%, mientras que una puntuación de 30 indica una fiabilidad del 99.90%.

Tabla 8. Número de SNVs detectados a través de alineamiento múltiple de genomas.

Número de SNVs detectados a partir del alineamiento múltiple de genomas				
Línea	Colonia	Total de SNVs identificados	# de SNVs sin el contexto de SG200	# SNVs soportados por más del 90% de las lecturas alineadas
A	1	1,597	267	4
	2	1,624	263	1
	3	2,004	548	1
	4	1,954	530	1
	5	1,679	295	2
B	1	1,701	273	4
	2	1,695	255	0
	3	1,613	266	5
	4	1,892	520	0
	5	2,079	560	2
C	1	1,954	562	4
	2	2,231	658	1
	3	1,561	191	7
	4	2,289	642	0
	5	1,759	327	1
D	1	1,589	200	0
	2	1,715	319	3
E	1	2,315	739	0
	2	1,651	243	1
F	1	1,987	543	2
	2	1,572	84	1

Este análisis resultó en un conjunto de SNVs que van de 878 a 925 SNVs en cada muestra. De igual forma, a este conjunto de SNVs se les removió el conjunto de SNVs detectados en *U. maydis* SG200 con dos tecnologías de secuenciación, DNBSeg e Illumina NextSeq 500 (ver Anexo II. Variantes de un sólo nucleótido en

Ustilago maydis SG200). Este filtrado removió más del 94% de las variantes identificadas en cada muestra.

Después del filtrado de variantes, el resultado para todas las muestras osciló de 17 a 55. Posteriormente, ese conjunto de SNVs fue filtrado de acuerdo con los valores de calidad absoluta asignada por *bcftools*. Este segundo paso de filtrado removió del 85% al 100% de las variantes identificadas, quedando así una cantidad de SNVs de 0 a 8 (Tabla 9). Finalmente, se hicieron dos verificaciones más, en primera instancia se verificó que estas variantes estuvieran soportadas por al menos el 90% de las lecturas alineadas a esa posición, y en segunda instancia se verificó que en *U. maydis* SG200, esas variantes no se presenten en al menos el 40% de las bases alineadas a esa posición. Esta última verificación se llevó a cabo, ya que, se detectaron regiones genómicas que están cubiertas al doble, respecto a la mediana del genoma, que además presentan posiciones donde el aproximadamente el 50% de las lecturas sustentan el nucleótido de referencia, y el otro 50% sustentan un nucleótido alternativo. Las regiones en cuestión podrían señalar dos secuencias notablemente similares, diferenciándose únicamente en una posición. Estas secuencias se encuentran colapsadas en una única anotación en el genoma de referencia.

La comparación de los conjuntos de SNVs identificados con *bcftools* y el MAFFilter después de los respectivos procesos de filtrados resultó en un solapamiento del 99% de SNVs en los individuos analizados (ver Tabla 17, Anexo III). Este alto nivel de solapamiento de SNVs aumentó la confianza del conjunto final de variantes de un solo nucleótido identificadas. Una vez que se obtuvo este conjunto de variantes de un solo nucleótido, se analizó el porcentaje de SNVs compartidos entre individuos aislados de la misma línea. De manera sorpresiva se obtuvo un bajo porcentaje de similitud entre los individuos de cada línea (Figura 10). Estos resultados podrían sugerir que la mayor parte de los SNVs son únicos para cada colonia, sin embargo, este dato contrasta con la expectativa de encontrar SNVs compartidos entre colonias aisladas de una misma línea.

Tabla 9. Número de SNVs detectados con *bcftools*. Se presenta el número total de SNVs identificados sin el contexto de SG200, así como el número de SNVs soportados por más del 90% de las lecturas alineadas.

Número de variantes de un solo nucleótido identificados por <i>bcftools</i>				
Línea	Colonia	Total de SNVs identificados	# de SNVs sin el contexto de SG200	# SNVs soportados por más del 90% de las lecturas alineadas
A	1	913	39	4
	2	893	30	1
	3	909	33	1
	4	878	18	1
	5	897	25	2
B	1	897	31	4
	2	901	32	0
	3	892	37	5
	4	894	35	0
	5	899	32	2
C	1	899	41	5
	2	902	33	1
	3	925	53	8
	4	894	29	0
	5	899	32	1
D	1	893	28	0
	2	909	45	2
E	1	889	25	0
	2	913	42	1
F	1	901	39	3
	2	923	55	1

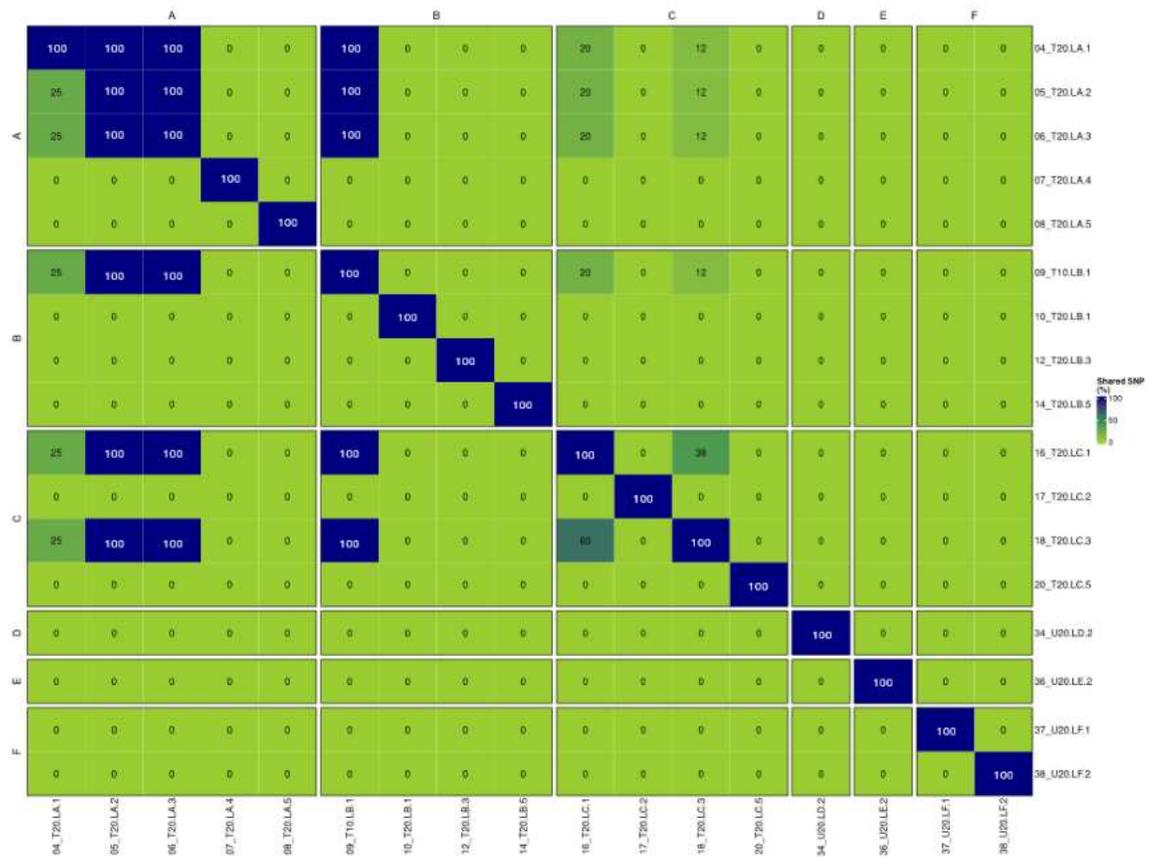


Figura 10. Porcentaje de SNVs compartidos en las líneas evolucionadas. El porcentaje indica la cantidad de SNVs compartidos entre individuos de la misma línea e individuos de otras líneas. Los SNVs aquí representados fueron obtenidos con bcftools.

A pesar de esta disparidad, se procedió a analizar si el H₂O₂ indujo una mayor acumulación de SNVs en las líneas expuestas a este agente, esto en comparación con las líneas control. El análisis estadístico con la prueba *t* resultó en que no hay diferencias estadísticas entre la cantidad de SNVs obtenidos en ambos grupos (*p*-value = 0.165), sugiriendo que, a pesar de su rol como agente mutagénico, el H₂O₂ no indujo una acumulación de SNVs en nuestro experimento de evolución. Las tablas 10, 11 y 12 presentan los SNVs detectados en las colonias de la línea A, B y C, respectivamente.

Tabla 10. SNVs detectados en las colonias de la línea A.

Coordenadas del SNV	Gen	Nt Subs	Aa Subs	Colonias Línea A				
				1	2	3	4	5
Chr18:330,272	UMAG_05545	C > A	T > N	1	1	1	0	0
Chr6:422,186	UMAG_10293	C > A	Y > *	1	0	0	0	0
Chr7:106,141	UMAG_11482	G > T	² M > I	1	0	0	0	0
Chr10:29,678	UMAG_03645	G > A	W > *	1	0	0	0	0
Chr15:425,843	UMAG_05022	C > T	P > L	0	0	0	1	0
Chr8:193,967	UMAG_10396	C > T	Syn.	0	0	0	0	1
Chr17:546,384	Intergénica	C > T	NA	0	0	0	0	1

Tabla 11. SNVs detectados en las colonias de la línea B.

Coordenadas del SNV	Gen	Nt Subs	Aa Subs	Colonias Línea B				
				1	2	3	4	5
Chr2:1,719,805	UMAG_01390	G > T	G > C	1	0	0	0	0
Chr4: 666,509	UMAG_06294	C > T	D > H	1	0	0	0	0
Chr11:325,426	UMAG_03972	A > C	L > R	1	0	0	0	0
Chr21:294,513	UMAG_06084	G > A	Syn.	1	0	0	0	0
Chr2:1,003,811	UMAG_01141	C > T	V > I	0	0	1	0	0
Chr6:19,532	Intergénico	T > A	NA	0	0	1	0	0
Chr14:320,210	Intergénico	T > A	NA	0	0	1	0	0
Chr22:194,991	UMAG_06210	A > G	H > R	0	0	1	0	0
Chr23:323,817	UMAG_06461	C > T	Q > *	0	0	1	0	0
Chr3:1,408,451	Intergénico	C > A	NA	0	0	0	0	1
Chr22:362,952	Intergénico	C > T	NA	0	0	0	0	1

Tabla 12. SNVs detectados en las colonias de la línea C.

Coordenadas del SNV	Gen	Nt Subs	Aa Subs	Colonias Línea C				
				1	2	3	4	5
Chr18:330,272	UMAG_05545	C > A	T > N	1	0	1	0	0
Chr08:464,088	UMAG_10823	T > A	E > D	1	0	1	0	0
Mt ^a :15246	Intergénico	G > A	NA	1	0	1	0	0
Chr1:2,430,690	UMAG_00813	G > C	G > R	1	0	0	0	0
Chr7:451,382	Intergénico	C > T	NA	0	1	0	0	0
Chr2:236,311	Intergénico	G > T	NA	0	0	1	0	0
Chr5:1,222,742	UMAG_10160	G > T	¹ Syn.	0	0	1	0	0

Chr11: 404,834	UMAG_12250	C > A	P > H	0	0	0	0	0
Chr10:623,352	Intergénico	T > A	NA	1	0	0	0	0
Chr3:101,539	Intergénico	C > A	NA	0	0	1	0	0
Chr5:76,058	UMAG_02050	C > G	G > R	0	0	1	0	0
Chr20:106,401	UMAG_05834	G > T	C > F	0	0	1	0	0

Por otro lado, las tablas 13, 14 y 15 presentan los SNVs detectados en las colonias de las líneas D, E y F, respectivamente.

Tabla 13. SNVs detectados en las colonias de la línea D.

Coordenadas del SNV	Gen	Nt Subs	Aa Subs	Colonias	
				Línea D	
				1	2
Chr12:498,742	UMAG_04253	T > G	T > P	0	1
Chr12:508,357	Intergénico	A > T	NA	0	1

Tabla 14. SNVs detectados en las colonias de la línea E.

Coordenadas del SNV	Gen	Nt Subs	Aa Subs	Colonias	
				Línea E	
				1	2
Chr1:680,919	Intergénico	C > T	NA	0	1

Tabla 15. SNVs detectados en las colonias de la línea F.

Coordenadas del SNV	Gen	Nt Subs	Aa Subs	Colonias	
				Línea F	
				1	2
Chr5:11,465	UMAG_06491	T > C	Syn.	1	0
Chr20:462,416	Intergénico	C > T	NA	1	0
Chr1:370,990	UMAG_10036	T > A	N > I	0	1

A pesar de que el peróxido de hidrógeno no parece inducir la acumulación de SNVs, se detectó una mutación en el cromosoma 18:330,272C>A en cinco colonias aisladas de las líneas expuestas a H₂O₂. Esta mutación resultó en la sustitución del

aminoácido treonina por asparagina en la posición 505 (505T>N). del gen UMAG_05545.

VI.II.I.I. Mutación no sinónima del gen UMAG_05545

A pesar del bajo número de variantes de un solo nucleótido para todas las muestras, se detectó una mutación presente en más de un individuo secuenciado. Esta mutación se trata de una transversión de C por A, ocurrida en la posición 330,272 del cromosoma 18 (18:330272C>A). Esta sustitución nucleotídica ocurrió en el gen UMAG_05545, el cual de acuerdo con el modelado de AlphaFold2, codifica para una enzima histona lisina metiltransferasa con dominio Dot1, misma que es ortóloga de la proteína Dot1 de *S. cerevisiae*. La mutación fue catalogada como mutación no sinónima ya que condujo a la sustitución del aminoácido treonina (T) por asparagina (N) en la posición 505 de la cadena de aminoácidos (505T>N). Este cambio de aminoácido ocurrió en el dominio catalítico, lo cual podría causar un efecto directo en la actividad de la enzima. Interesantemente esta mutación se detectó en individuos de la línea A y de la línea C, más no en la B. Adicionalmente, no se presentó en ningún individuo del grupo de líneas control.

La existencia de esta mutación llama la atención por varios aspectos. En primer lugar, se sitúa en el dominio catalítico de una proteína remodeladora de la cromatina, lo cual podría provocar una perturbación en la actividad que conduce a cambios epigenéticos. Asimismo, esta mutación resulta intrigante dado que se ha observado que la interrupción de genes *dot1* en hongos patógenos impacta tanto en la virulencia como en la resistencia al H₂O₂ (Ng *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2019).

Las metiltransferasas de histona-lisina modifican las histonas mediante la metilación de residuos de lisina (Freitag, 2017; Martin & Zhang, 2005). Estas enzimas se clasifican por la presencia de un dominio SET (que indica que cualquier residuo de lisina en la cola de histona es metilado) o un dominio DOT1 (el cual metila la lisina 79 en la histona H3) (Freitag, 2017; Lai *et al.*, 2022). La identificación de una mutación en el dominio DOT1 de UMAG_05545 después de la adaptación de *U.*

maydis a H₂O₂ sugiere una posible participación de un mecanismo epigenético en la resistencia observada a H₂O₂.

Adicionalmente, los genes *dot1* están relacionados con el silenciamiento de genes localizados en la región subteloamérica, de igual forma, las inactivaciones del dominio catalítico llevan a la represión del silenciamiento subteloamericano en levaduras y *Penicillium oxalicum* (Ng *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2019). Por otro lado, el papel de Dot1 ha sido poco explorado en hongos patógenos de plantas; sin embargo, Liang y colaboradores (2017) reportaron que la eliminación del gen *dot1* en *Aspergillus flavus* resulta en una reducción de la virulencia en semillas de maíz. Adicionalmente, la virulencia de *Fusarium verticillioides* se ve reducida tras la eliminación del gen *dim5*, que codifica una histona-lisina metiltransferasa con dominio SET. En este caso, la mutante no presentó alteraciones en la sensibilidad al H₂O₂, pero redujo su virulencia en las plantas (Gu *et al.*, 2017).

La presencia de una SNV en el gen UMAG_05545, que codifica una histona-lisina N-metiltransferasa putativa DOT1, puede estar contribuyendo en el aumento a la resistencia H₂O₂. Sin embargo, el papel de esta mutación debe evaluarse en la cepa inicial de nuestro experimento (*U. maydis* SG200), así como en las cepas silvestres (*U. maydis* FB1 y *U. maydis* FB2).

VI.III. Herencia del fenotipo y genotipo en las colonias resistentes a H₂O₂

VI.III.I La resistencia a H₂O₂ persiste después de 35 generaciones

La resistencia observada a H₂O₂ fue consecuencia de la exposición periódica a este agente. De igual forma se identificó un conjunto de variantes genéticas en las cepas adaptadas a H₂O₂.

La estabilidad de la resistencia a H₂O₂, así como la estabilidad de las variantes genéticas adquiridas durante la adaptación se estudió solo en las cinco colonias de la línea C. Estas colonias fueron seleccionadas ya que todas presentaron resistencia a H₂O₂, pero solo dos de ellas presentaron la variante de los 150 kb del

brazo izquierdo del cromosoma nueve. Esto indicaría que hay otros mecanismos responsables de la resistencia en las tres colonias restantes. Esos mecanismos podrían ser del tipo espacio-temporales tales como la regulación de genes. Evaluar que ocurre con los genotipos y fenotipos proveerá información acerca de la naturaleza de la resistencia, ya que hay dos posibles escenarios, uno en el que la resistencia se mantiene ya que no se espera que la resistencia a un agente estresante tenga una desventaja evolutiva (Gillespie, 2001). El otro posible escenario es que la resistencia adquirida durante la adaptación se pierda eventualmente (Parlevliet, 2002).

Con el objetivo de identificar que ocurre con la resistencia a H₂O₂, las cinco colonias de la línea fueron propagadas durante 35 generaciones en ausencia de H₂O₂ y en presencia de 5 mM de H₂O₂. En primera instancia se evaluó la persistencia del fenotipo de resistencia a H₂O₂ en ambas condiciones en las cinco colonias de la línea C. Posteriormente, se secuenció el genoma de las cepas después del periodo de 35 generaciones en presencia y en ausencia de H₂O₂, y sobre esas secuencias se analizó que ocurrió con las variantes previamente detectadas. La resistencia a H₂O₂ se evaluó a través de la cuantificación de la zona de inhibición producida por una gota de 5 µL de H₂O₂ (30% p/p) colocada en el centro de un tapete celular de 10⁷ células/mL. Al comparar las áreas de inhibición producidas en los tres momentos, se observó que las cinco colonias presentaron una disminución en el área de la zona de inhibición causada por el H₂O₂, respecto a la zona de *U. maydis* SG200.

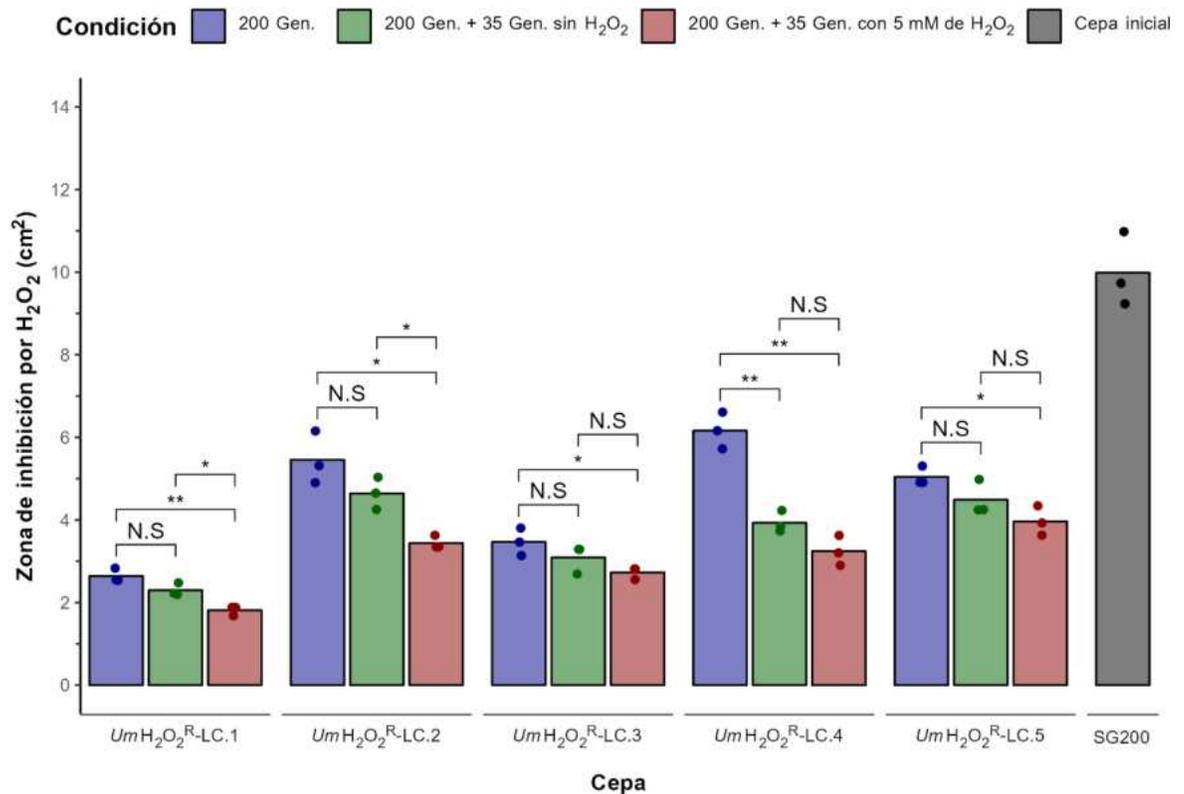


Figura 11. Herencia de la resistencia a H₂O₂ en las colonias de la línea C. La resistencia a H₂O₂ fue estimada a partir de los cambios producidos en la zona de inhibición causada por 5 μ L H₂O₂. Las barras representan el promedio de tres replicas. Se presenta la resistencia a H₂O₂ de *U. maydis* SG200. Los valores de significancia estadística fueron estimados con la prueba de comparación de medias *t*. Las marcas de significancia indican: N.S $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

La resistencia a H₂O₂ observada en las colonias antes de la propagación durante 35 generaciones, fue consistente con la resistencia observada en esas colonias inmediatamente después de su aislamiento. Interesantemente, la resistencia a H₂O₂ presentó fluctuaciones después de la propagación por 35 generaciones, tanto en la propagación en caldo CM (en ausencia de H₂O₂), como en caldo CM suplementado con 5 mM de H₂O₂ (Figura 11). A pesar de tales fluctuaciones en la resistencia a H₂O₂, solo la cepa *UmH₂O₂^R-LC.4* presentó una diferencia estadística significativa, respecto a la resistencia observada en esa misma cepa en las 200 generaciones.

Para el resto de las cepas, los cambios en la resistencia a H₂O₂ no fueron estadísticamente significativos.

Interesantemente, la propagación durante 35 generaciones en presencia de 5 mM de H₂O₂ condujo a un aumento estadísticamente significativo en la resistencia a H₂O₂ en las cinco cepas bajo estudio, esto en comparación con la resistencia observada en esas mismas cepas en la generación 200. Estos resultados subrayan la capacidad de adaptación y evolución de *U. maydis* frente a la presión selectiva que ejerce el H₂O₂.

VI.III.II. Permanencia de las variantes genéticas con y sin selección por H₂O₂

La estabilidad de las variantes genéticas se estudió en las cinco colonias de la línea C después de 35 generaciones en presencia y en ausencia de H₂O₂. Para lograr esto, se secuenció con la tecnología de lectura corta NextSeq 500 (Illumina) el ADN genómico de los cultivos finales.

El análisis de variantes en el número de copias a partir del cociente de la cobertura normalizada reveló que la amplificación de los primeros 150 kb del cromosoma 9 presente en las colonias *UmH₂O₂^R-LC.1* y *UmH₂O₂^R-LC.3*, se mantiene tanto para la propagación por 35 generaciones en ausencia de H₂O₂ como para la propagación por 35 generaciones en presencia de 5 mM de H₂O₂ (Figura 12). Interesantemente, se observó que el cultivo durante 35 generaciones con 5 mM de H₂O₂ indujo la duplicación de todo el cromosoma 9 en la colonia *UmH₂O₂^R-LC.5*. Esta duplicación completa del cromosoma nueve es consistente con lo observado en el análisis de la dinámica de la variante en el número de copias del mismo cromosoma. En donde, observamos que la variante de 150 kb comienza con una duplicación entera de dicho cromosoma. Esta inestabilidad del cromosoma nueve puede estar vinculada a la presencia del gen codificante de catalasa, sugiriendo que el aumento en el número de copias de este gen podría representar el mecanismo principal de adaptación a H₂O₂ en *U. maydis*.

Adicionalmente, se plantea la posibilidad de que la continuidad en la propagación a lo largo del tiempo pueda eventualmente restringir la duplicación al primer tramo de 150 kb de este cromosoma o incluso a una secuencia más reducida.

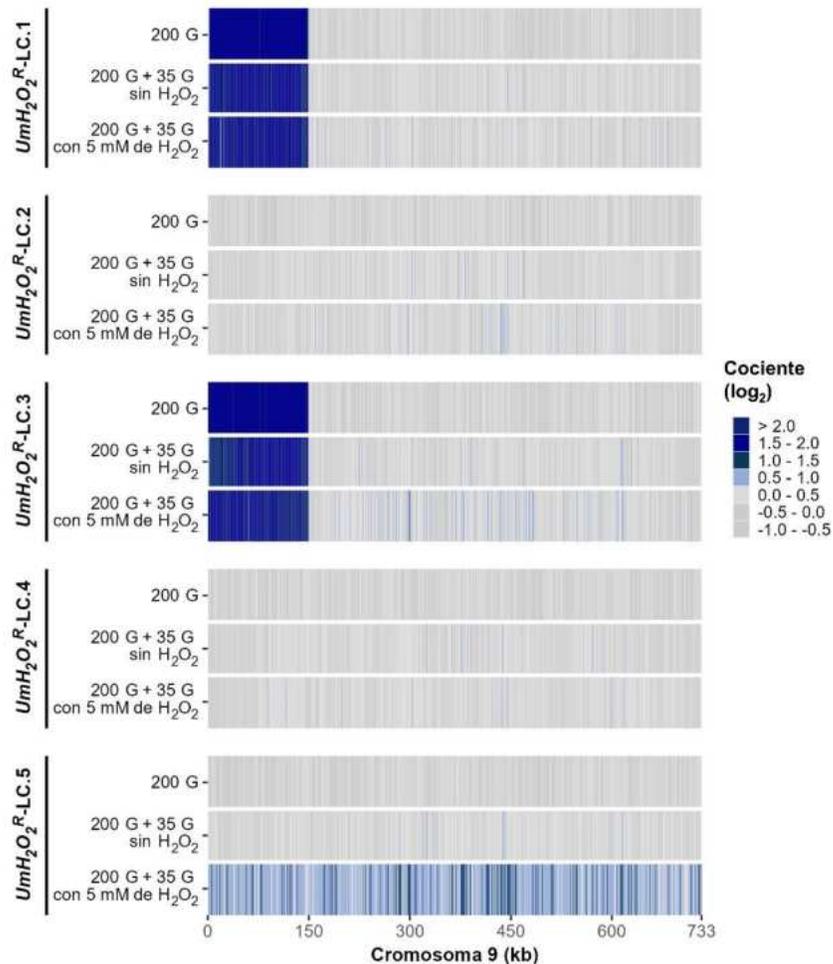


Figura 12. Herencia de la variante en el número de copias del cromosoma 9. La variante del número de copias del cromosoma nueve en las cinco colonias de la línea C se monitoreó en tres momentos: inmediatamente después de su aislamiento (200 G), después de 35 generaciones en ausencia de H₂O₂ (200 G + 35 G sin H₂O₂), y después de 35 generaciones en presencia de 5 mM de H₂O₂ (200 G + 35 G con 5 mM de H₂O₂). La escala de color indica el valor del cociente de las coberturas normalizadas entre la colonia analizada y la cepa inicial.

En relación con las variantes de un solo nucleótido en las cinco colonias aisladas de la línea C en la generación 200, el 73% de estas variantes persiste tras 35 generaciones de propagación sin H₂O₂. Asimismo, el 66% de las variantes se mantiene después de 35 generaciones en presencia de 5 mM de H₂O₂.

La Figura 13 muestra el perfil de herencia de los SNVs de cada colonia bajo estas condiciones. La colonia *UmH₂O₂^R*-LC.1, con 5 SNVs en la generación 200, conserva solo 4 después de 35 generaciones, tanto con como sin H₂O₂. Solo un SNV (Chr10:623,352T>A) permanece en ausencia de H₂O₂. Por otro lado, la colonia *UmH₂O₂^R*-LC.2 mantiene su único SNV en ambas condiciones de propagación. Por otro lado, la colonia *UmH₂O₂^R*-LC.3, con ocho SNVs después de su aislamiento, retiene solo cinco después de 35 generaciones, independientemente de la presencia de H₂O₂. La colonia *UmH₂O₂^R*-LC.4 no presenta SNVs después de su aislamiento, y esto se mantiene tras 35 generaciones con o sin H₂O₂. Finalmente, la colonia *UmH₂O₂^R*-LC.5 presenta una sola variante de un nucleótido después de su aislamiento, la cual persiste solo en condiciones de propagación sin H₂O₂ durante 35 generaciones; en presencia de 5 mM de H₂O₂, este SNV no se detecta.

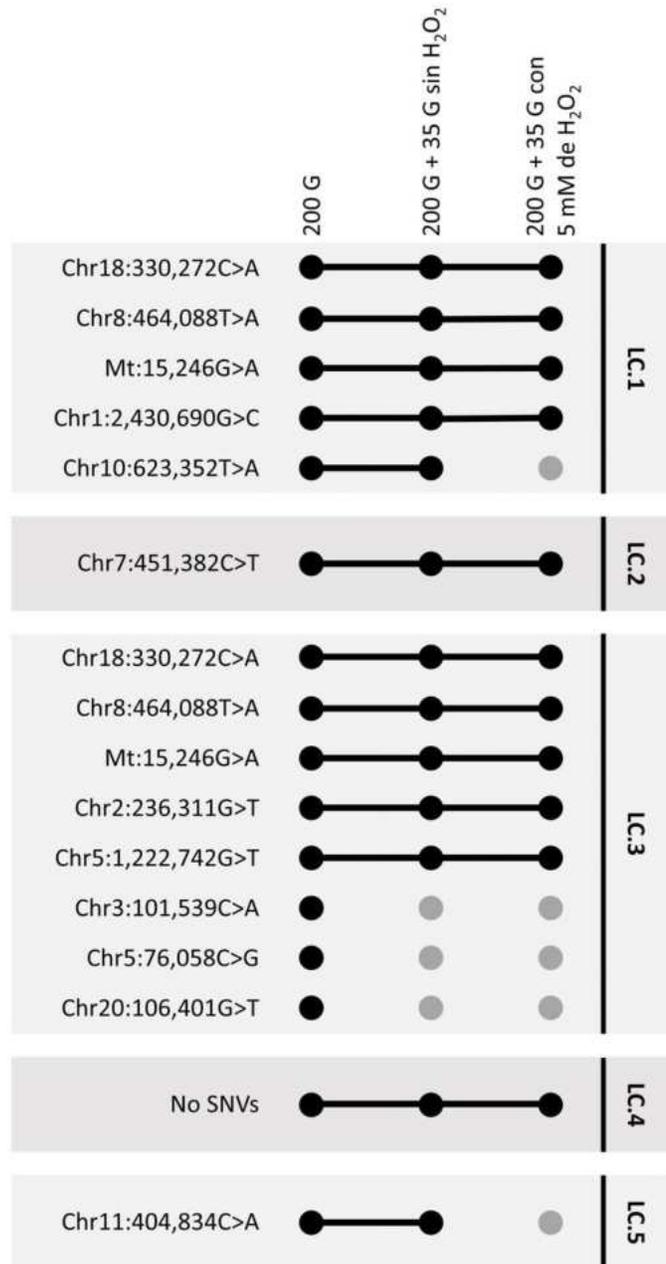


Figura 13. Perfil de herencia de los SNVs de las colonias de la línea C. La herencia de las variantes de un solo nucleótido detectadas en las cinco colonias de la línea C en la generación 200 (200 G) se monitoreó tanto después de 35 generaciones sin H₂O₂ (200 G + 35 G sin H₂O₂), así como en 35 generaciones con 5 mM de H₂O₂ (200 G + 35 G con 5 mM de H₂O₂).

VI.IV. Las variantes genómicas cambian su frecuencia durante la evolución experimental

La evolución experimental en laboratorio, además de permitir obtener organismos adaptados a ambientes específicos, también permite monitorear la dinámica de las variantes genéticas detectadas al finalizar el experimento. Como resultado de la exposición a H₂O₂ de tres líneas derivadas de *U. maydis* SG200, observamos dos variantes presentes en más de un individuo secuenciado, la primera consiste en una variante de un solo nucleótido en UMAG_05545 (cromosoma 18:330,272C>A) identificada en 5 de 15 colonias aisladas de las líneas expuestas a H₂O₂. La segunda variante engloba a las primeras 150 kb del brazo izquierdo del cromosoma 9, misma que se identificó en 7 de 15 colonias secuenciadas.

Para identificar el momento en el que se produjeron estas variantes, se secuenciaron siete puntos de la línea evolutiva C en diferentes momentos del experimento de evolución. Los cultivos secuenciados se obtuvieron al finalizar la fase de recuperación de los tratamientos 2, 3, 5, 7, 10, 14 y 20, que a su vez corresponden a las generaciones 20, 30, 50, 70, 100, 140 y 200, respectivamente. Es importante remarcar que estos cultivos no son isogénicos ya que se iniciaron a partir de las células que sobrevivieron a la exposición a H₂O₂ (ver metodología sección V.III.II.II). Debido a esto, se espera que haya una mezcla de poblaciones con diferentes genotipos en los cultivos secuenciados.

VI.IV.I. Incremento en la frecuencia de la mutación cr18:330,272 durante la evolución de la línea C

En la Figura 14 se ilustra la frecuencia de los diferentes alelos en el cromosoma 18 en la posición 330,272. Esta posición es donde ocurrió el SNV recurrente en el gen UMAG_05545. Se observó que en esa posición el nucleótido de referencia citosina (C) es el que está presente con una frecuencia mayor al 98% en las generaciones 20 y 30. Sin embargo, se observa que en la generación 50, la frecuencia del nucleótido de referencia disminuye a 90%, mientras que el nucleótido adenina (A)

se presenta en aproximadamente el 10% de las lecturas alineadas en esta posición genómica. Posteriormente, la frecuencia de dicho nucleótido (A) mostró un aumento continuo y consistente a lo largo del curso del experimento, detectándose en un 20% en la generación 70, en un 38% en la generación 100, en un 90% en la generación 140 y alcanzando el 100% en la generación 200. Es importante mencionar, que la presencia de esta sustitución (C > A) en un 90% en la generación 140 podría sugerir que dicha variante alcanzó el 100% incluso antes de llegar a la generación 200. Sin embargo, la ausencia de puntos secuenciados entre la generación 140 y 200 nos impide saber el momento exacto en el que ocurrió la fijación de la variante en la línea C.

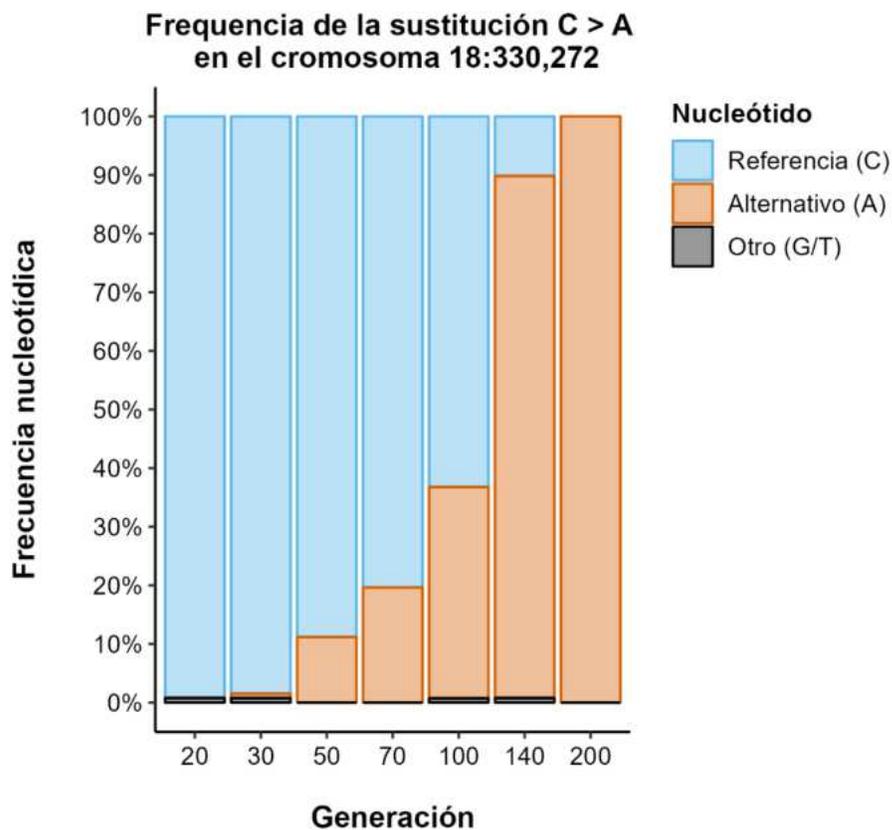


Figura 14. Frecuencia de la mutación cr18:330,272C>A. Frecuencia de la sustitución nucleotídica en siete puntos muestreados de la línea C durante la evolución en H₂O₂.

VI.IV.II. Dinámica de la variante del número de copias del cromosoma 9

Con el objetivo de identificar el momento en el cual se produce la variante en el número de copias de los primeros 150 kb del cromosoma nueve, se examinó el cociente entre la cobertura normalizada de los puntos secuenciados de la línea C y la cobertura normalizada de la cepa inicial *U. maydis* SG200.

El análisis del cociente de coberturas normalizadas del cromosoma 9 reveló que este cromosoma permanece sin alteraciones en el número de copias en las generaciones 20 y 30 (Figura 15). La primera variante en el número de copias del cromosoma nueve, se detectó en la generación 50 y abarcó todo el cromosoma aumentando la cobertura normalizada de la muestra con respecto a la cepa inicial. El valor promedio de dicho cociente en \log_2 fue de 0.59 para el cromosoma completo, correspondiente a un total de 1.5 copias de dicho cromosoma. Una explicación al valor de 1.5 copias del cromosoma 9 sería que el 50% de las células poseen dos copias del cromosoma 9, mientras que el otro 50% de las células mantienen una sola copia. El aumento en el cociente de la cobertura normalizada de todo el cromosoma 9 se mantuvo en la generación 70, con un valor de \log_2 igual a 1.0. Este valor indica la presencia de dos copias del cromosoma 9 en todas las células del cultivo. De igual forma, este aumento de cobertura con valor de \log_2 igual a 1.0 se mantuvo en la generación 100. En esta misma generación se detectó un segundo aumento de cobertura, en este caso en la secuencia correspondiente a los primeros 150 kb del cromosoma 9. De acuerdo con los datos obtenidos, la generación 100 fue el último punto en donde se detectó el aumento en el cociente de la cobertura normalizada en todo el cromosoma 9.

El siguiente punto analizado corresponde a la generación 140, y en este momento se detectó que el aumento de cobertura abarca solamente los primeros 150 kb del brazo izquierdo del cromosoma 9 alcanzando una proporción \log_2 de 1.58. El resto del cromosoma (151 kb a 733 kb) permaneció en un \log_2 igual 0, significando que no hay alteraciones en el número de copias de esa secuencia. De igual forma, el patrón de aumento del cociente de cobertura en los primeros 150 kb del cromosoma

9 fue identificado en la generación 200, aunque en este momento el valor del cociente en \log_2 fue igual a 2.0, indicando la presencia de 4 copias de esa secuencia.

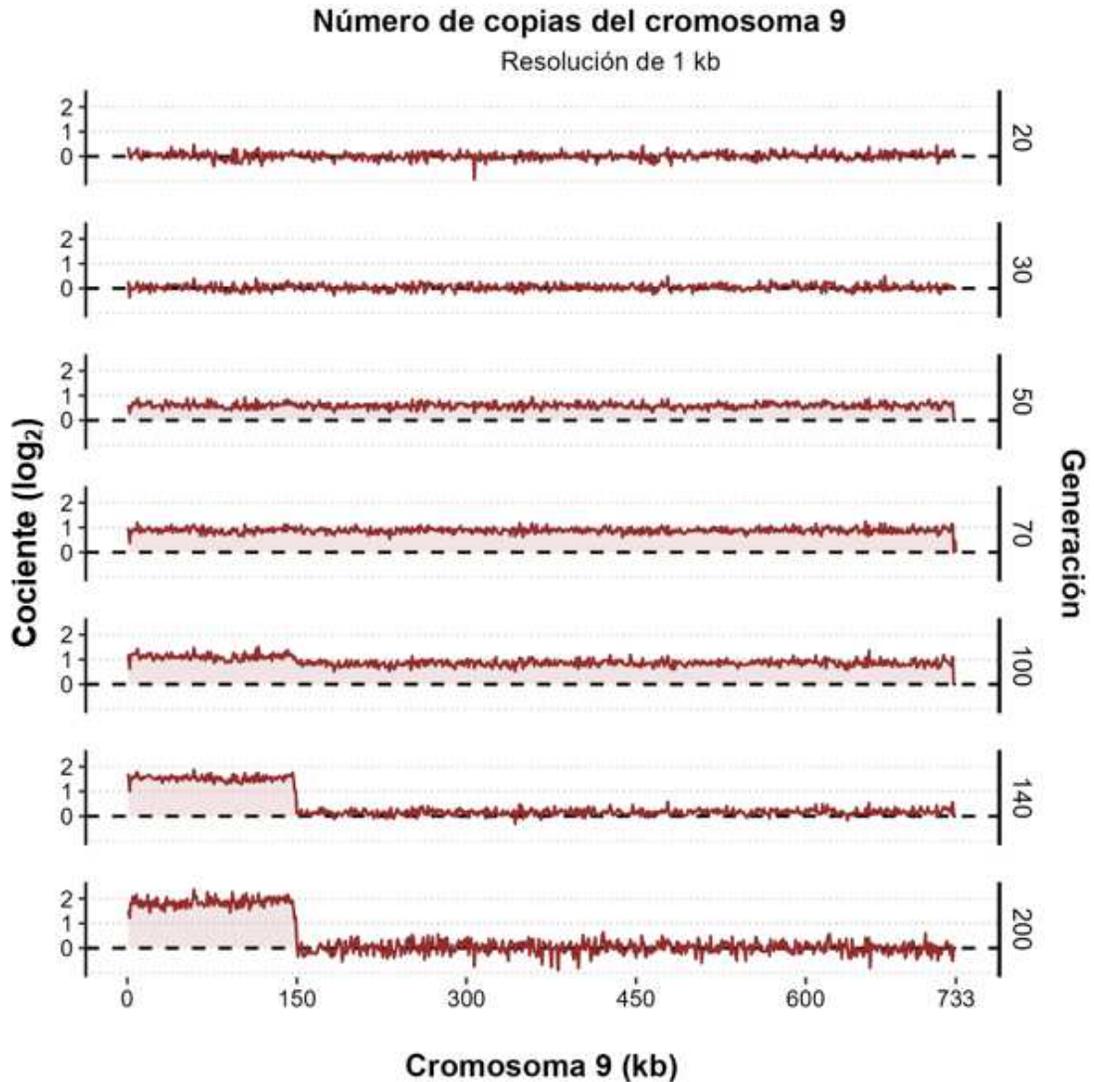


Figura 15. Variante en el número de copias del cromosoma 9 en la línea C. Análisis en logaritmo base 2 (\log_2) del cociente de la cobertura normalizada del cromosoma en las muestras de la línea C respecto a la cobertura normalizada del mismo cromosoma en la cepa inicial *U. maydis* SG200.

VI.IV.III. La recurrencia y fijación de mutaciones entre líneas sugiere un error en el etiquetado de las muestras

Los cambios en frecuencias de variantes en poblaciones, así como la presencia de estas variantes en colonias derivadas de esas poblaciones es un resultado común en experimentos de evolución de laboratorio (Barrick & Lenski, 2013; Huang & Kao, 2018; Martínez *et al.*, 2023; Martínez & Lang, 2023). El análisis de variantes genéticas en colonias derivadas de las líneas evolutivas reveló la presencia de dos variantes presentes en más de una colonia. Estas variantes consistieron en una sustitución nucleotídica ocurrida en el cromosoma 18:330,272C>A, así como de las variantes en el número de copias ocurridas en los primeros 150 kb del cromosoma nueve, las cuales variaron tanto en tamaño, como en número de copias (Figura 16).

La presencia de la mutación del cromosoma 18: 330,272C>A (ocurrida en el gen UMAG_05545) en individuos de dos líneas expuestas a H₂O₂ podría ser un indicio de que esta variante fue inducida por la exposición intermitente a H₂O₂. Sin embargo, el hecho de que esta variante solo esté presente en tres de cinco colonias analizadas de la línea A, así como en dos de cinco colonias analizadas de la línea C, genera incertidumbre sobre el correcto etiquetado de las colonias.

El motivo de esta duda recae en que la probabilidad de que ese nucleótido en específico sea mutado es de aproximadamente de 2.55×10^{-16} . Esta probabilidad fue calculada tomando como referencia el tamaño del genoma de *U. maydis*, así como la tasa de mutación del grupo de hongos carbonos. Adicionalmente, otro motivo para dudar de la veracidad de que está mutación se presente en más de dos líneas es el hecho de que esta sustitución no está en los cinco individuos de la línea A, ni en los cinco individuos de la línea C. De igual forma, es importante mencionar que esta mutación fue identificada en colonias que también exhiben la variante en el número de copias de los primeros 150 kb del cromosoma nueve, y en todos los casos tal variante alcanzó un total de tres copias (Figura 16).

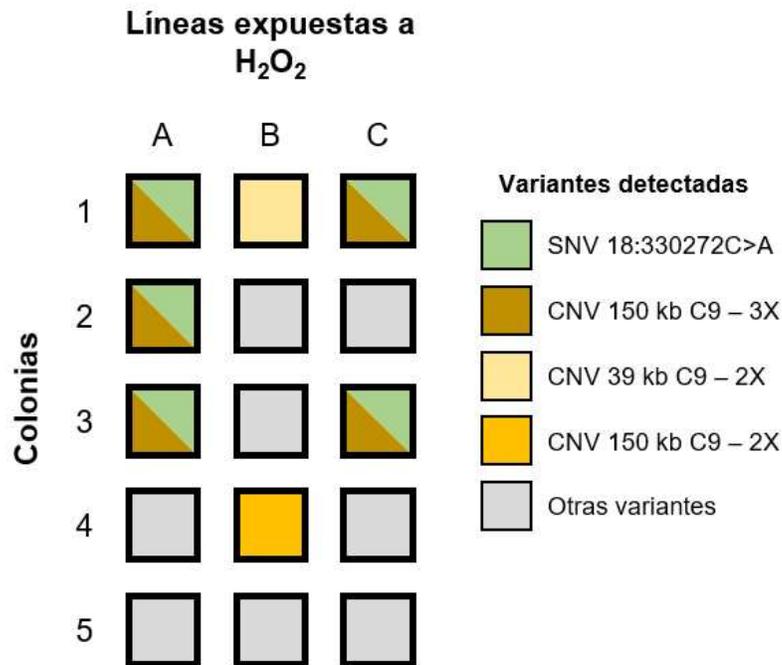


Figura 16. Variantes en común en las colonias de las líneas expuestas a H₂O₂. Se presentan las variantes que ocurrieron en más de un individuo de diferentes líneas expuestas a H₂O₂.

El número total de colonias que presentan la mutación del cromosoma 18:330,272C>A es de cinco, cifra que corresponde al número total de individuos aislados por cada línea expuesta a H₂O₂. Esto sugiere que esas cinco colonias pertenecen a la misma línea evolutiva, ya que todas portan esta mutación puntual y también la variante de los primeros 150 kb del cromosoma nueve. Adicionalmente, los resultados del monitoreo de fijación de esta mutación en poblaciones de la línea C, revelaron que al final del experimento, la sustitución del cromosoma 18:330,272C>A se encuentra con una frecuencia del 100%. Esto indicaría que todas las células en cultivo poseen esa variante, indicando así que todas las colonias derivadas de esta población deberían ser portadoras de dicha variante.

Los resultados anteriores dejan la posibilidad de que las tres colonias de la línea A pertenezcan a la línea C. Sin embargo, la falta de información de la dinámica de

variantes en poblaciones de la línea A y de línea B, es un impedimento para poder aseverar que la mutación del cromosoma 18:330,272C>A es exclusiva de la línea C.

A pesar del incremento en la resistencia a H₂O₂ de las líneas A, B y C, tanto a nivel poblacional como en sus respectivas colonias, la probabilidad de que los mismos eventos mutacionales ocurran en estas líneas continúa siendo baja. Sin embargo, la fuerte selección llevada a cabo por las concentraciones ascendentes de H₂O₂, así como los fuertes cuellos de botella experimentados en cada población, podrían ser los causantes de la recurrencia de variantes entre líneas evolutivas. Nuestros resultados sobre recurrencia de variantes en líneas independientes contrastan con lo obtenido por Blount y colaboradores, (2012). En su estudio, a pesar de mantener doce poblaciones de *E. coli* a lo largo de 30,000 generaciones, solo una de estas poblaciones exhibió variante genética que habilita la asimilación de citrato como fuente de carbono. Esa misma variante genética no se ha presentado en las otras once poblaciones, incluso después de 75,000 generaciones (Lenski, 2023).

Para concluir que las variantes observadas en las colonias de cada línea han ocurrido de manera independiente, es esencial realizar análisis de secuenciación en las líneas A y B en diferentes puntos a lo largo del experimento para estudiar la frecuencia de las variantes. Además, se debe aislar un mayor número de colonias del punto final de cada línea y llevar a cabo los correspondientes análisis genéticos en dichas colonias.

VI.V. El gen UMAG_11067 que codifica una catalasa contribuye en la resistencia a H₂O₂

Después de la exposición continua de *U. maydis* SG200 a H₂O₂, se detectó la variante genética que aumentó el número de copias de una secuencia localizada en el brazo izquierdo del cromosoma nueve. Esta variante estuvo presente en 7 de las

15 colonias analizadas, con tamaños que oscilaron entre 39 kb y 150 kb, y con una variante de 2 y 3 copias.

El análisis de la línea C reveló la dinámica de esta variante en el número de copias a lo largo de la evolución experimental. Inicialmente, se observó un aumento en el número de copias del cromosoma completo, que posteriormente se limitó a los primeros 150 kb del brazo izquierdo. Este aumento en el número de copias del cromosoma nueve tuvo un impacto directo en la dosis génica de los genes presentes en la secuencia amplificada. En todos los casos, se identificó al gen UMAG_11067, que codifica para la enzima catalasa (*katG*). Esta enzima posee actividades de peroxidasa (cataliza la oxidación de hidroperóxidos orgánicos) y catalasa (cataliza la degradación de H₂O₂ a H₂O y O₂).

Dado el papel crucial de la catalasa en la degradación de H₂O₂, se decidió investigar en detalle en qué medida el aumento de la dosis génica de UMAG_11067, como resultado de la variante en el número de copias, contribuye a la resistencia a H₂O₂. Para lograr esto, se exploró el efecto de la dosis génica de UMAG_11067 en la expresión del mismo. Adicionalmente, se evaluó la resistencia a H₂O₂ en mutantes en las cuales se interrumpió el marco abierto de lectura, así como en una mutante que carga una copia extra de este gen bajo un promotor fuerte.

VI.V.I. La expresión de UMAG_11067 incrementa con la dosis génica

La amplificación del brazo izquierdo del cromosoma nueve incrementó el número de copias de los genes presentes en esa secuencia. Una consecuencia esperada de este fenómeno es el aumento en los niveles de transcrito de los genes correspondientes (Torres *et al.*, 2007; Pavelka *et al.*, 2010).

El efecto en la expresión génica del incremento en el número de copias de UMAG_11067 fue evaluado en las cepas *U. maydis* SG200, *UmH₂O₂^R*-LB.1 y *UmH₂O₂^R*-LC.1, mismas que de acuerdo con los análisis de cobertura, contienen una, dos y tres copias, respectivamente, del gen en cuestión. Estas cepas fueron

expuestas durante tres horas a 10 mM de H₂O₂, posteriormente, la expresión de UMAG_11067 fue cuantificada a través de RT-qPCR. Los datos de expresión fueron normalizados usando el modelo de Pfaffl, (2002). La expresión de UMAG_11067 después de la exposición a 10 mM de H₂O₂ fue normalizada respecto a la expresión en ausencia de H₂O₂ (condición basal) y respecto a la expresión del gen endógeno eIF2B. El análisis de la expresión de UMAG_11067 reveló que a más copias de este gen hay una mayor expresión del mismo (Figura 17). La cepa *UmH₂O₂^R*-LB.1, que contiene dos copias de UMAG_11067, mostró un incremento estadísticamente significativo (prueba *t*, *p-value* = 0.031) de 0.738 veces, respecto a la expresión de *U. maydis* SG200. De igual forma, la cepa *UmH₂O₂^R*-LC.1 mostró un incremento estadísticamente significativo (prueba *t*, *p-value* = 0.010) de 2.1 respecto a la expresión en *U. maydis* SG200.

A pesar de que ambas cepas con copias extra de UMAG_11067 mostraron incrementos en la expresión de este gen estadísticamente significativos respecto a *U. maydis* SG200, la diferencia en los niveles de expresión de ambos genes también fue estadísticamente significativa (prueba *t*, *p-value* = 0.015). Los resultados sobre la expresión de UMAG_11067 sugieren que el aumento en el número de copias de UMAG_11067 conlleva un incremento en su expresión, pero la relación no es necesariamente proporcional.

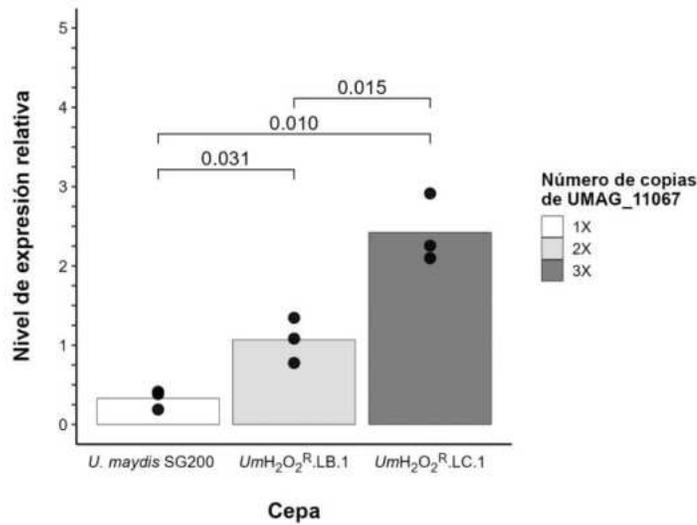


Figura 17. Expresión de UMAG_11067 en cepas con diferente dosis génica. Los niveles de expresión relativos fueron estimados respecto a la expresión de la condición basal (cultivo en ausencia de H₂O₂) y usando como gen normalizador el gen endógeno eIF2B. Las diferencias estadísticas entre los niveles de expresión fueron estimadas usando una prueba *t* de comparación de medias.

VI.V.I.I. Duplicaciones de cromosomas como estrategia adaptativa

La región duplicada del cromosoma 9 en *U. maydis* contiene el gen UMAG_11067, que codifica una catalasa que contribuye a la desintoxicación del peróxido de hidrógeno. Este hallazgo es consistente con informes previos en levaduras, donde se han documentado amplificaciones cromosómicas de regiones que contienen genes relacionados con la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (EROs), como la tioredoxina peroxidasa citoplásmica (*tsa2*) y la catalasa citosólica (*ctt1*) (Zhang *et al.*, 2019) (Linder *et al.*, 2017).

En la naturaleza, la ocurrencia de duplicaciones cromosómicas generalmente resulta en una disminución de la aptitud en comparación con cepas de laboratorio (Hose *et al.*, 2015; Pompei y Lagomarsino, 2023). A pesar de no haber reportes de amplificaciones cromosómicas en respuesta a estrés en *U. maydis*, fue posible identificar variantes en el número de copias de cromosomas en 50 aislados haploides de *U. maydis* (Depotter *et al.*, 2021; Schweizer *et al.*, 2021). El análisis de la frecuencia de aneuploidías en estos genomas reveló que 10 aislados de México presentan alteraciones en el número de copias en diferentes cromosomas (Anexo V, Figura 24). Sin embargo, solo una muestra presenta una duplicación completa del cromosoma 9. El impacto de estas aneuploidías en la adecuación, así como en la expresión génica, permanece desconocido.

VI.V.II. La delección de UMAG_11067 reduce la resistencia a H₂O₂

El rol del gen UMAG_11067 se estudió a través de dos enfoques. En el primer enfoque se interrumpió el marco abierto de lectura del gen UMAG_11067 a través de la inserción de un módulo que confiere resistencia a higromicina B. En el segundo

enfoque se exploró la contribución de UMAG_11067 en el aumento de la resistencia a H₂O₂ a través de la inserción de una copia del marco abierto de lectura en el *locus ip*.

El efecto de la interrupción del marco abierto de lectura de UMAG_11067 se evaluó en las cepas *U. maydis* SG200, *UmH₂O₂^R-LB.1* (2 copias) y *UmH₂O₂^R-LC.1* (3 copias), mismas donde previamente se estudió el impacto del número de copias de este gen la expresión del mismo. La transformación de las cepas antes mencionadas resultó en un total de 5, 9 y 3 colonias, respectivamente, que presentaron la resistencia a higromicina B. La correcta interrupción del gen UMAG_11067 se verificó con PCR. Las cepas elegidas para hacer el análisis de sensibilidad a H₂O₂, fueron aquellas en las que no se detectó ningún producto de amplificación de la secuencia de UMAG_11067. En ambos casos, es importante mencionar que las alteraciones en la resistencia a H₂O₂ no solo se deben a la interrupción del gen UMAG_11064, sino también a la pérdida de copias adicionales en el brazo izquierdo del cromosoma nueve. Esta pérdida fue identificada mediante secuenciación de lectura corta y un análisis posterior de coberturas normalizadas. La pérdida de las copias extras se podría atribuir al estrés experimentado por la célula durante el evento de transformación.

La resistencia al H₂O₂ de *U. maydis* SG200 y *U. maydis* SG200 Δ UMAG_11067 no mostró cambios estadísticamente significativos (prueba *t*, *p*-value = 0.691), como se observa en la Figura 18. Sin embargo, la inactivación de UMAG_11067 en las colonias evolucionadas en H₂O₂ reveló alteraciones significativas en la resistencia. En *UmH₂O₂^R-LB.1*, colonia con dos copias de UMAG_11067, se evidenció una disminución significativa en la resistencia al H₂O₂ (prueba *t*, *p*-value = 0.017) en comparación con la condición previa a la mutación. De manera similar, en *UmH₂O₂^R-LC*, la resistencia disminuyó significativamente (prueba *t*, *p*-value = 2.1x10⁻⁴) en comparación con la resistencia previa a la interrupción del gen.

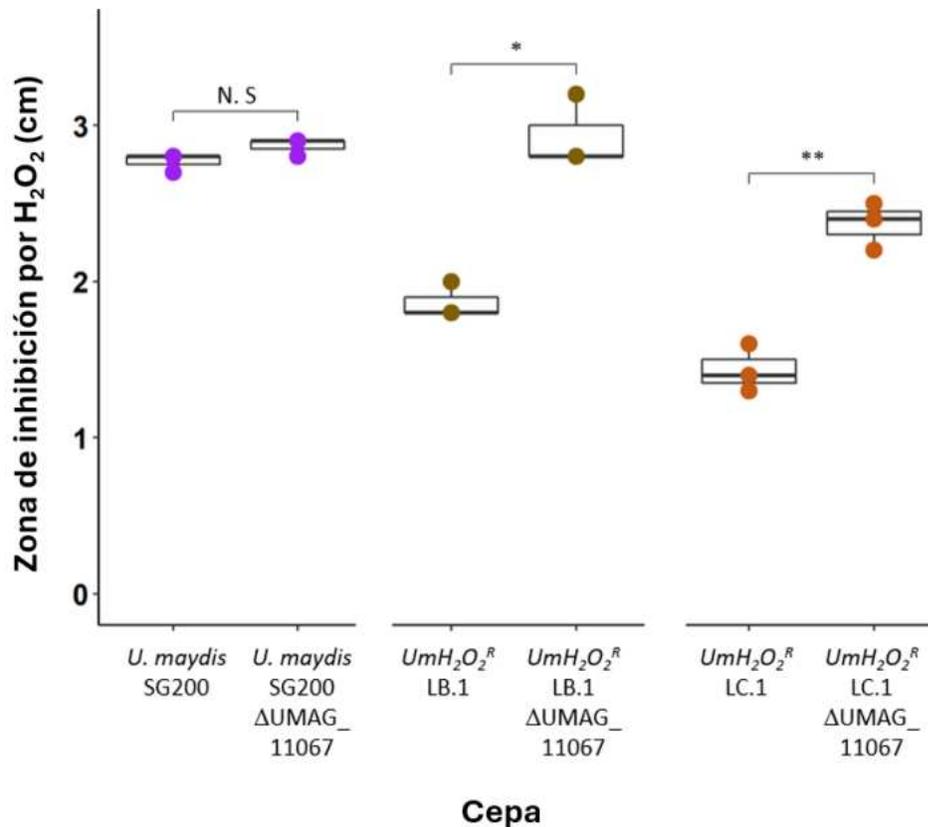


Figura 18. Resistencia a H₂O₂ en cepas Δ UMAG_11067. El gen UMAG_11067 fue inactivado en las cepas *U. maydis* SG200, *UmH₂O₂^R*-LB.1 y *UmH₂O₂^R*-LC.1, que tienen una, dos y tres copias de UMAG_11067, respectivamente. El análisis de secuencia de lectura corta reveló que la copia extra adquirida por amplificación del brazo izquierdo del cromosoma se perdió durante la preparación de protoplastos y/o durante la transformación. Las diferencias estadísticas fueron calculadas con prueba *t* de comparación de medias. Las marcas de significancia indican: N.S $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

VI.V.III. La sobre-expresión de UMAG_11067 incrementa la resistencia a H₂O₂

La presencia de cromosomas extras o largos segmentos de estos suele tener un impacto significativo en la adecuación celular. Aunque tradicionalmente se ha asociado con desajustes en la función celular debido a la alteración en la dosis cromosómica, el número anormal de cromosomas o fragmentos de estos ha emergido como un fenómeno frecuente en experimentos de evolución experimental en hongos filamentosos y levaduras. Recientemente, se ha propuesto que esta

condición anormal del número de cromosomas puede actuar como un mecanismo adaptativo. En este sentido, surge la interrogante acerca de si existe un gen o conjunto de genes que desempeñan un papel fundamental en la determinación de la adaptación celular frente a la aneuploidía, así como la relación entre el aumento en el número de copias cromosómicas y los niveles incrementados de expresión génica que podrían estar asociados a este fenómeno. Estos aspectos plantean cuestionamientos relevantes en la comprensión de la dinámica celular y evolutiva en presencia de cromosomas adicionales.

La presencia de una variante en el número de copias de una secuencia de al menos 39 kb en el cromosoma nueve y que se extiende hasta los 150 kb es un fuerte indicio de que uno o varios genes localizados en esa región participan en la adaptación observada a H₂O₂. Para investigar si el aumento en el número de copias y la expresión génica de UMAG_11067 contribuyó a la resistencia contra el peróxido de hidrógeno, llevamos a cabo un análisis fenotípico de una cepa que sobreexpresa el gen UMAG_11067 (oexUMAG_11067). Para lograr esto, insertamos una copia adicional de UMAG_11067 en el *locus ip* bajo el control de un promotor fuerte. La Figura 19 muestra el porcentaje de células sobrevivientes después de la exposición al choque de 10 mM de H₂O₂. Las cepas oexUMAG_11067 y *UmH₂O₂^R*-LC.1 mostraron un aumento en la resistencia a H₂O₂ de 8.0% y 38.6%, respectivamente en comparación con la cepa *U. maydis* SG200. Este resultado sugiere que aumentar los niveles de expresión del gen de la catalasa mejora la resistencia al H₂O₂, ya sea a través de la amplificación del cromosoma que la contiene o a través de la inserción de una copia extra.

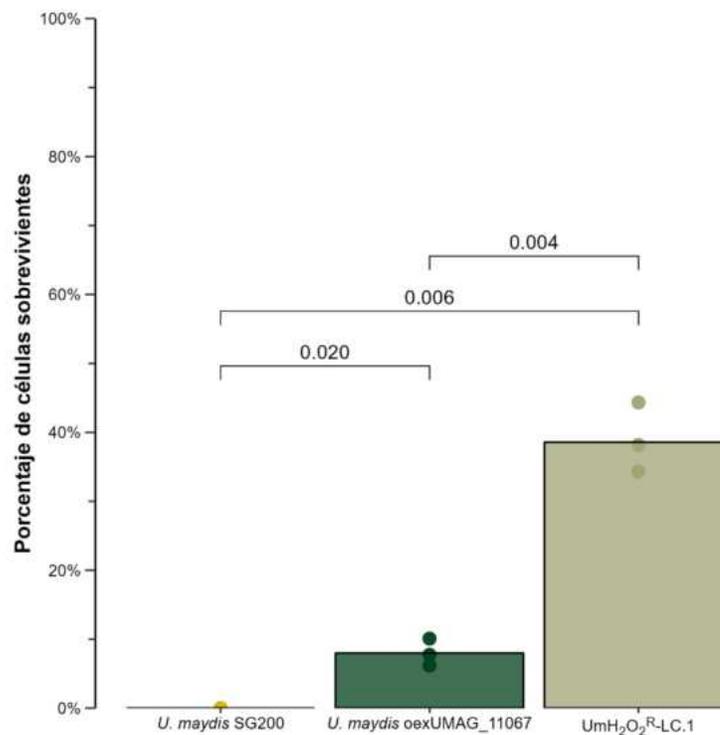


Figura 19. Resistencia a H₂O₂ en cepas con copias extra de UMAG_11067. La resistencia a H₂O₂ se evaluó cuantitativamente a través de la estimación de UFC que sobrevivieron a un choque de 10 mM durante 3 h. La cepa *U. maydis* oexUMAG_11067 posee una copia extra de este gen insertada en el *locus ip* bajo control del promotor fuerte OMA. La cepa UmH₂O₂^R-LC.1 tiene tres copias de UMAG_11067 como resultado de la amplificación del brazo izquierdo del cromosoma nueve. Las diferencias estadísticas fueron estimadas usando la prueba *t*.

VI.VI. El aumento en la resistencia a H₂O₂ disminuye la virulencia en maíz

La infección exitosa de *U. maydis* en maíz se atribuye a la sofisticada maquinaria que despliega este hongo con el objetivo de evadir o suprimir el sistema inmune de la planta. Durante el desarrollo biotrófico de *U. maydis*, el mecanismo de respuesta antioxidante es un componente clave en las primeras etapas de la infección. La interrupción del gen *yap1*, genera un fenotipo de alta sensibilidad a H₂O₂ en cultivo *in vitro* y una notable reducción de la virulencia en maíz. Estos resultados subrayan

la relación entre la resistencia al estrés oxidativo y la virulencia del hongo (Molina y Kahmann, 2004).

U. maydis infecta maíz debido a que este hongo posee un complejo sistema que se encarga de desplegar mecanismos para disminuir o evadir el sistema inmune de la planta. El mecanismo de respuesta antioxidante durante el desarrollo biotrófico de *U. maydis* es uno de los procesos claves durante las etapas tempranas de la infección. Se ha observado que la interrupción del gen *yap1* de *U. maydis* resulta en una alta sensibilidad a H₂O₂ en condiciones de cultivo *in vitro*, sin embargo, también resulta en una notable disminución en la virulencia en maíz (Molina y Kahmann, 2004). Estos resultados sugieren que la resistencia a H₂O₂, impacta de forma directa en la virulencia de *U. maydis*.

Como resultado del experimento de evolución obtuvimos cepas que presentan una elevada resistencia a H₂O₂. De igual forma, observamos un incremento en la resistencia a H₂O₂ a través de la inserción de una copia extra de UMAG_11067 con un promotor fuerte. Con el objetivo de evaluar si una elevada resistencia a H₂O₂ resulta en una elevada virulencia, se procedió a llevar a cabo un ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz variedad *Cacahuazintle*. En este ensayo de patogenicidad se evaluó la virulencia de *U. maydis* SG200, *U. maydis* oexUMAG_11067 y *UmH₂O₂^R*-LC.1. Las plántulas de maíz fueron infectadas con la cepa correspondiente al séptimo día post-germinación, una vez infectadas, las plántulas fueron mantenidas en un invernadero durante 12 días.

Los síntomas de virulencia producidos por cada cepa de *U. maydis* fueron recolectados a los 12 días post-infección. Los síntomas analizados fueron clorosis, inflamación de ligula, tumores pequeños (< 2 mm), tumores normales (2 mm a 7 mm), tumores grandes en el tallo (> 7 mm), tumores grandes (> 7 mm) y plantas muertas. El análisis comparativo de la patogenicidad de las cepas con resistencia mejorada a H₂O₂ contra la patogenicidad de *U. maydis* SG200 reveló una disminución estadísticamente significativa en la virulencia exhibida por *U. maydis*

oexUMAG_11067 (χ^2 , p -value = 2.64×10^{-4}) y $UmH_2O_2^R$ -LC.1 (χ^2 , p -value = 4.8×10^{-3}).

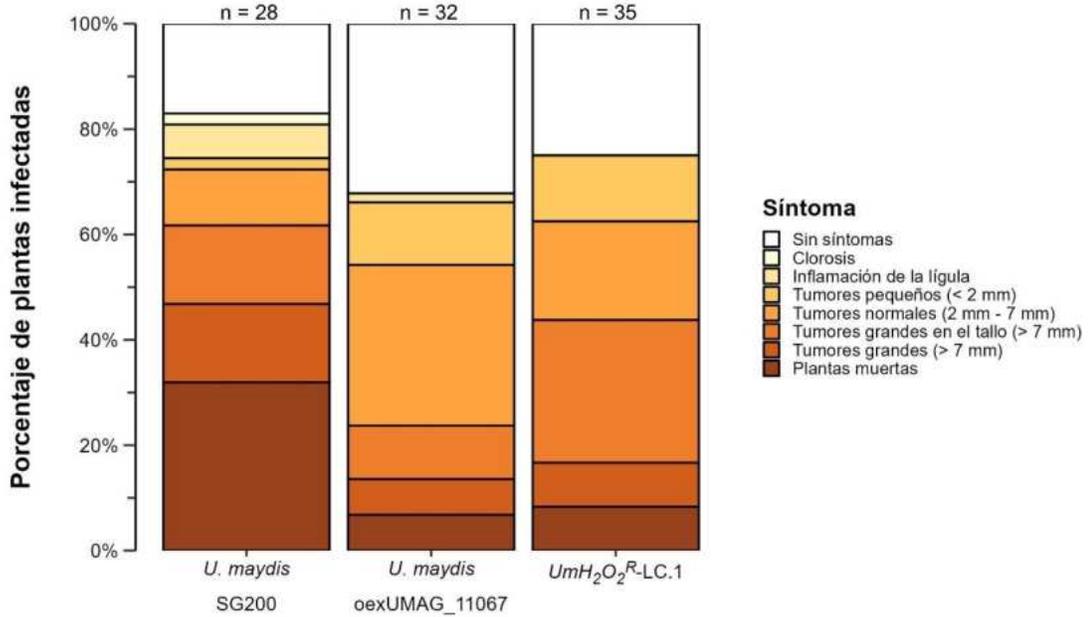


Figura 20. Perfil de virulencia de cepas resistentes a H₂O₂. La virulencia fue cuantificada a los 12 dpi. La escala de color representa lo severo de los síntomas. El valor de n indica el número de plantas que fueron infectadas con la cepa bajo estudio.

En ambas cepas, se observó una disminución en la cantidad de plantas muertas, así como en la cantidad de plantas que presentan tumores grandes (Figura 20). Respecto al síntoma de tumores grandes ocurridos en el tallo de la planta, la cepa *U. maydis* oexUMAG_11067 mostró una reducción en la cantidad de plantas con este tipo de tumores, mientras que, $UmH_2O_2^R$ -LC.1 mostró una mayor cantidad de plantas con estos tumores. Adicionalmente, las cepas resistentes a H₂O₂ presentaron una mayor proporción de plantas con tumores normales, plantas con inflamación en la lígula. Finalmente, la proporción de plantas sin síntomas aumentó para *U. maydis* oexUMAG_11067, como para $UmH_2O_2^R$ -LC.1. En todos los casos

la comparación de síntomas fue respecto a la sintomatología cuantificada en *U. maydis* SG200.

A pesar de que las cepas *U. maydis* oexUMAG_11067 y *UmH₂O₂^R*-LC.1 presentan diferencia en la cantidad de plantas con tumores grandes en el tallo, la sintomatología general entre ambas plantas difiere de manera significativa (χ^2 , p -value = 0.299). Estos resultados indican que la virulencia en maíz se ve afectada al aumentar la resistencia a H₂O₂, ya sea vía por la presencia de una copia extra de UMAG_11067 con un promotor fuerte (*U. maydis* oexUMAG_11067) o a través de evolución adaptativa en H₂O₂ (*UmH₂O₂^R*-LC.1). De igual forma, estos resultados constituyen un avance significativo en la comprensión de los mecanismos de virulencia de este hongo y abre nuevas perspectivas para el desarrollo de estrategias de manejo de enfermedades en cultivos de maíz.

Nuestros resultados indican que tanto las cepas *UmH₂O₂^R*-LC.1 como oexUMAG_11067 muestran una disminución en la virulencia. La reducción de la virulencia es un fenómeno reportado en una cepa de *Candida albicans* con resistencia a H₂O₂ (Pradhan *et al.*, 2017). Esta cepa que también sobre-expresa catalasa tuvo una demanda excesiva de hierro, ya que el hierro es cofactor de esta enzima. La baja disponibilidad de este ion en tejidos murinos resultó en una disminución de la virulencia, sin embargo, los niveles de virulencia fueron restaurados a través de la administración de hierro en el individuo murino (Pradhan *et al.*, 2017).

La catalasa es una enzima que depende del hierro como cofactor. En el caso de *U. maydis*, se ha observado que la virulencia en maíz está directamente influenciada por la capacidad del hongo para captar iones Fe⁺ del maíz (Eichhorn *et al.*, 2006). De igual forma, existe la posibilidad de que las cepas que tienen un mayor número de copias del gen UMAG_11067 eleven la demanda de hierro de *U. maydis*, dejando la posibilidad de que los niveles basales de hierro en el maíz no sean los adecuados para cumplir con esta demanda. Adicionalmente, la alta demanda de hierro por parte

de la catalasa resultaría en una reducción de este ion para otros procesos metabólicos esenciales, tales como la síntesis de ADN y la respiración celular.

A pesar de que no hay datos precisos sobre la concentración de hierro en plantas de maíz, y si esta concentración cumple con los requisitos de cepas con alta expresión de catalasa, aumentar el contenido de hierro en la planta podría potencialmente revertir la reducción de la virulencia. Sin embargo, la provisión de hierro externo podría inhibir la expresión de todo el conjunto de genes relacionados con el transporte de hierro, ya que estos están regulados por la concentración de este ion (Eichhorn *et al.*, 2006).

VI.VII. La resistencia por peróxido de hidrógeno otorga resistencia a otros agentes de estrés oxidativo

Se evaluó si la resistencia adquirida a estrés oxidativo en el experimento influye en la resistencia a otros tipos de estrés que afectan a la célula. En estrés osmótico, iónico, térmico, estrés por pH y estrés por almacenamiento, no hubo efecto ventajoso en los linajes expuestos a peróxido de hidrógeno ni en los linajes control. Sin embargo, se presentó un efecto notable de resistencia a otras fuentes causante de estrés oxidativo, así como a UV en las líneas evolucionadas en H₂O₂.

En rosa de bengal a 30 µg/mL, UV_{λ=254} (250 µJ/cm²), *tert*-butil hidroperóxido 5 µM, menadiona a 10 µM y peróxido de hidrógeno a 5 mM, 10 mM y 30 mM, las colonias con alteraciones en el cromosoma 9, que son 3 colonias de la línea A con triplicaciones (colonia 1, 2 y 3), dos colonias de la línea B (colonia 1 y 4) con duplicaciones y 2 colonias de la línea C con triplicaciones (colonia 1 y 3) presentan un crecimiento ligeramente superior a aquellas colonias que no acarrean la variante estructural (Figura 21).

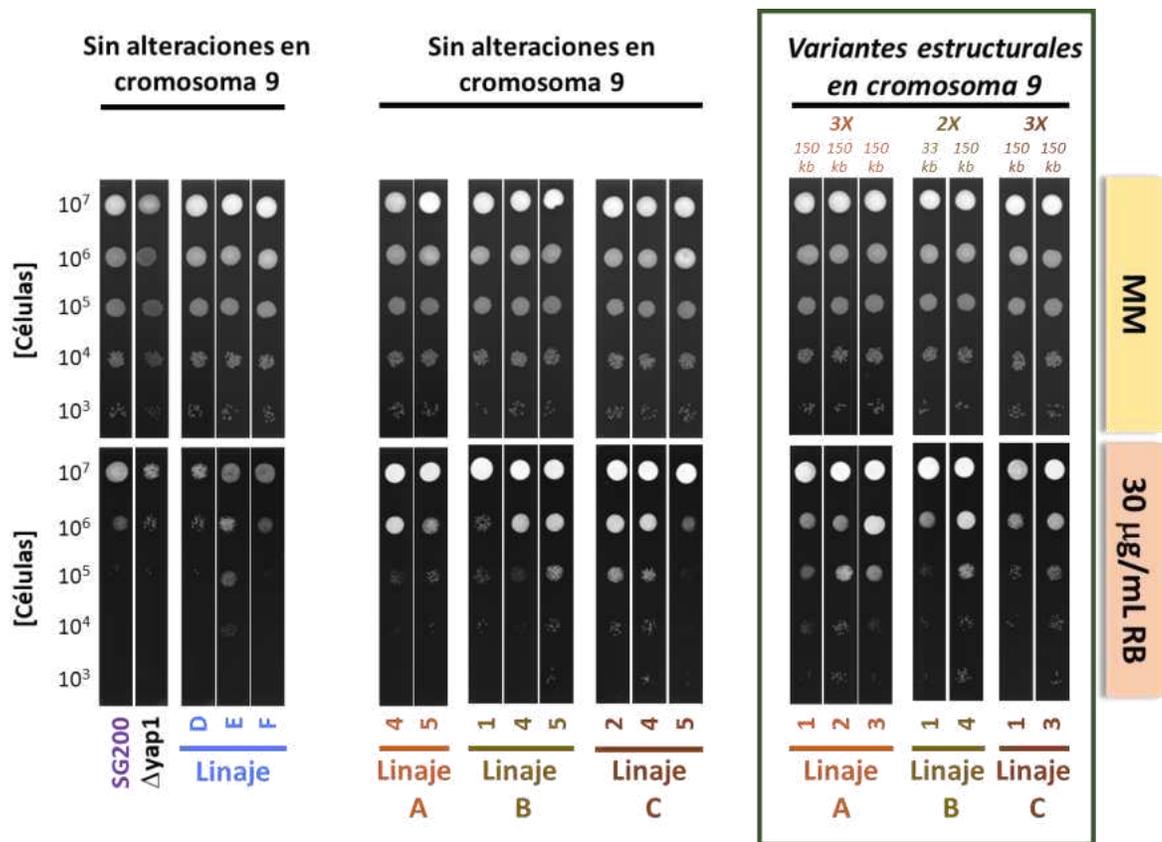


Figura 21. Fenotipo de las cepas evolucionadas en rosa de Bengal.

Por otro lado, estas condiciones de estrés afectan notablemente el crecimiento de *U. maydis* SG200 y las líneas control. Este resultado indica que la resistencia a peróxido de hidrógeno otorga resistencia a otros agentes inductores de estrés oxidativo, y que la aneuploidía detectada en el cromosoma 9 puede tener incidencia directa en la adaptación de *U. maydis* al estrés oxidativo. Las cepas que fueron expuestas a H₂O₂ no mostraron fenotipo ventajoso ante agentes de estrés osmótico, iónico, térmico, por pH y almacenamiento (Figura 22).

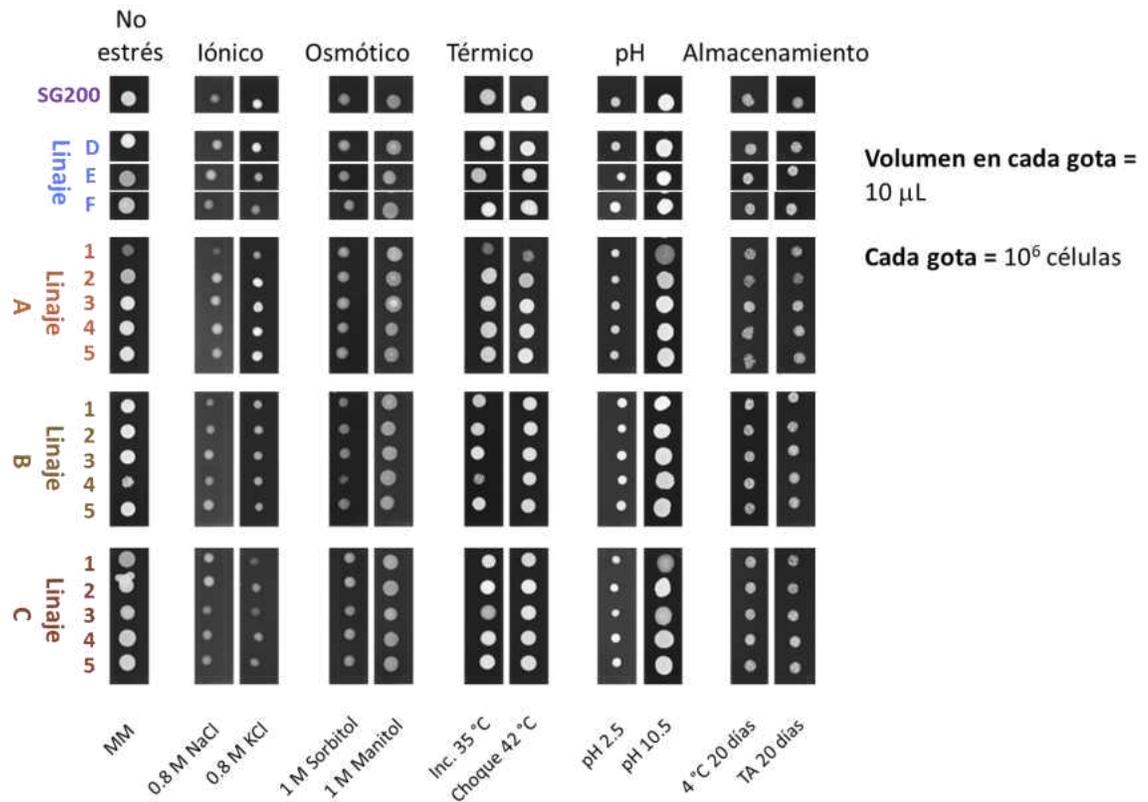


Figura 22. Fenotipos de las cepas evolucionadas en otras fuentes de estrés. Estrés iónico, osmótico, térmico, pH y almacenamiento.

Nuestros resultados de resistencia ante otras fuentes de estrés exhibidos por cepas resistentes a H₂O₂, contrastan con lo observado en *S. cerevisiae* donde la evolución de esta levadura ante estrés oxidativo le da ventaja ante condiciones de estrés osmótico, sin embargo, la evolución en estrés osmótico no resulta en resistencia a estrés oxidativo (Dhar *et al.*, 2013).

VII. Conclusiones

- Tres líneas independientes derivadas de *U. maydis* SG200 resisten a una exposición de hasta 60 mM de H₂O₂ después de 200 generaciones de evolución experimental. Esa concentración de H₂O₂ resulta letal para la cepa no evolucionada, así como para líneas evolucionadas sin exposición a H₂O₂.
- Las líneas evolucionadas en presencia de H₂O₂ acumularon variantes únicas ausentes en las líneas control, entre las que destaca una variante en el número de copias del brazo izquierdo del cromosoma nueve.
- La variante del cromosoma nueve inició con una duplicación completa de dicho cromosoma, para luego reducirse a los primeros 150 kb. En todos los casos el gen UMAG_11067 codificante de catalasa aumentó su número de copias.
- La expresión del gen UMAG_11067 es mayor en las colonias que presentan la variante en el número de copias del cromosoma nueve.
- La ausencia de las copias extra del fragmento de 150 kb, así como la interrupción del marco de lectura de UMAG_11067 resultó en la pérdida de la resistencia a H₂O₂ previamente adquirida.
- La inserción de una copia extra del gen UMAG_11067 incrementa la resistencia a H₂O₂ de *U. maydis* SG200, pero no a los niveles observados después de la evolución en laboratorio.
- El incremento en la resistencia a H₂O₂ en las cepas oexUMAG_11067 y *UmH₂O₂^R*-LC.1, resultó en una disminución en la virulencia en maíz.

Perspectivas

- Cuantificar la actividad enzimática de catalasa y de otras enzimas peroxidadasas en las cepas con resistencia a H₂O₂.
- Aislar y secuenciar un amplio conjunto de colonias de las líneas A, B y C en la generación 200 para tener un mejor panorama de la frecuencia de variantes de un solo nucleótido en cada línea.
- Generar una cepa mutante con la sustitución nucleotídica del gen UMAG_05545 que codifica para una histona lisina *N*-metiltransferasa y evaluar su fenotipo de resistencia a H₂O₂, así como su virulencia.
- Identificar a través de lecturas largas (secuenciación con Oxford Nanopore) si la secuencia amplifica de 150 kb del cromosoma nueve se encuentra insertada en algún otro sitio del genoma.
- Generar mutantes que tenga un plásmido autoreplicativo de alto número de copias y que exprese el gen UMAG_11067 (catalasa) para evaluar su contribución a la resistencia a H₂O₂.
- Propagar en un medio sin selección por H₂O₂ durante 200 generaciones o más a las cepas adaptadas a H₂O₂ con el objetivo de identificar si la resistencia y las variantes genéticas se pierden eventualmente.

VIII. Bibliografía

- Abyzov, A., Urban, A. E., Snyder, M., & Gerstein, M. (2011). CNVnator: an approach to discover, genotype, and characterize typical and atypical CNVs from family and population genome sequencing. *Genome research*, 21(6), 974-984.
- Aguirre, J., Hansberg, W., & Navarro, R. (2006). Fungal responses to reactive oxygen species. *Medical Mycology*, 44(sup1), 101-107.
- Apostol, I., Heinstein, P. F., & Low, P. S. (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction. *Plant physiology*, 90(1), 109-116.
- Asiegbu, F. O., & Kovalchuk, A. (2021). An introduction to forest biome and associated microorganisms. In *Forest Microbiology* (pp. 3-16). Academic Press.
- Barnes, C. W., Szabo, L. J., May, G., & Groth, J. V. (2004). Inbreeding levels of two *Ustilago maydis* populations. *Mycologia*, 96(6), 1236-1244.
- Barrick, J. E., & Lenski, R. E. (2013). Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Reviews Genetics*, 14(12), 827-839.
- Barzilai, A., & Yamamoto, K. I. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA repair*, 3(8-9), 1109-1115.
- Basse, C. W., & Steinberg, G. (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Molecular plant pathology*, 5(2), 83-92.
- Benevenuto, J., Teixeira-Silva, N. S., Kuramae, E. E., Croll, D., & Monteiro-Vitorello, C. B. (2018). Comparative genomics of smut pathogens: insights from orphans and positively selected genes into host specialization. *Frontiers in Microbiology*, 9, 660.
- Boiteux, S., Coste, F., & Castaing, B. (2017). Repair of 8-oxo-7, 8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 179-201.
- Blount, Z. D., Barrick, J. E., Davidson, C. J., & Lenski, R. E. (2012). Genomic analysis of a key innovation in an experimental *Escherichia coli* population. *Nature*, 489(7417), 513-518.
- Broad Institute. (2016). Picard tools. Broad Institute, GitHub Repository: <https://github.com/broadinstitute/picard>.
- Cadet, J., & Davies, K. J. (2017). Oxidative DNA damage & repair: an introduction. *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 2-12.
- Campo, S., Carrascal, M., Coca, M., Abián, J., & San Segundo, B. (2004). The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: a proteomics approach. *Proteomics*, 4(2), 383-396.
- Campos, É. G., Jesuino, R. S., Dantas Ada, S., Brigido Mde, M., & Felipe, M. S. (2005). Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet Mol Res*, 4(2), 409-429.
- Cervantes-Chávez, J. A., Ali, S., & Bakkeren, G. (2011). Response to environmental stresses, cell-wall integrity, and virulence are orchestrated through the calcineurin pathway in *Ustilago hordei*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(2), 219-232.
- Cervantes-Chávez, J. A., Valdés-Santiago, L., Bakkeren, G., Hurtado-Santiago, E., León-Ramírez, C. G., Esquivel-Naranjo, E. U., ... & Ruiz-Herrera, J. (2016). Trehalose is required for stress

- resistance and virulence of the Basidiomycota plant pathogen *Ustilago maydis*. *Microbiology*, 162(6), 1009-1022.
- Chavan, S., & Smith, S. M. (2014). A rapid and efficient method for assessing pathogenicity of *Ustilago maydis* on maize and teosinte lines. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (83), e50712.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890.
- 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.
- Depotter, J. R., Zuo, W., Hansen, M., Zhang, B., Xu, M., & Doehlemann, G. (2020). Effectors with different gears: divergence of *Ustilago maydis* effector genes is associated with their temporal expression pattern during plant infection. *Journal of Fungi*, 7(1), 16.
- Dhar, R., Sägesser, R., Weikert, C., & Wagner, A. (2013). Yeast adapts to a changing stressful environment by evolving cross-protection and anticipatory gene regulation. *Molecular biology and evolution*, 30(3), 573-588.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., ... & Kahmann, R. (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature*, 478(7369), 395-398.
- Dowle, M., & Srinivasan, A. (2023). data.table: Extension of `data.frame`. <https://CRAN.R-project.org/package=data.table>
- Dutheil, J. Y., Münch, K., Schotanus, K., Stukenbrock, E. H., & Kahmann, R. (2020). The insertion of a mitochondrial selfish element into the nuclear genome and its consequences. *Ecology and Evolution*, 10(20), 11117-11132.
- Eichhorn, H., Lessing, F., Winterberg, B., Schirawski, J., Kamper, J., Muller, P., & Kahmann, R. (2006). A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *The Plant Cell*, 18(11), 3332-3345.
- Feurtey, A., & Stukenbrock, E. H. (2018). Interspecific gene exchange as a driver of adaptive evolution in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 72, 377-398.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
- Freitag, M. (2017). Histone Methylation by SET Domain Proteins in Fungi. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 413-439.
- Galhardo, R. S., Hastings, P. J., & Rosenberg, S. M. (2007). Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 42(5), 399-435.
- Gibbons, J. G. (2019). How to train your fungus. *Mbio*, 10(6), 10-1128.
- Gillespie, S. H. (2001). Antibiotic resistance in the absence of selective pressure. *International journal of antimicrobial agents*, 17(3), 171-176.
- Goulet, K. M., & Saville, B. J. (2017). Carbon acquisition and metabolism changes during fungal biotrophic plant pathogenesis: insights from *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 39(3), 247-266.
- Grandaubert, J., Dutheil, J. Y., & Stukenbrock, E. H. (2019). The genomic determinants of adaptive evolution in a fungal pathogen. *Evolution Letters*, 3(3), 299-312.

- Gresham, D., & Dunham, M. J. (2014). The enduring utility of continuous culturing in experimental evolution. *Genomics*, 104(6), 399-405.
- Gu, Q., Ji, T., Sun, X., Huang, H., Zhang, H., Lu, X., Wu, L., Huo, R., Wu, H., & Gao, X. (2017). Histone H3 lysine 9 methyltransferase FvDim5 regulates fungal development, pathogenicity and osmotic stress responses in *Fusarium verticillioides*. *FEMS Microbiology Letters*, 364(19).
- Guo, A., Salzberg, S. L., & Zimin, A. V. (2023). JASPER: A fast genome polishing tool that improves accuracy of genome assemblies. *PLoS computational biology*, 19(3), e1011032.
- Habig, M., Lorrain, C., Feurtey, A., Komluski, J., & Stukenbrock, E. H. (2021). Epigenetic modifications affect the rate of spontaneous mutations in a pathogenic fungus. *Nature communications*, 12(1), 5869.
- Hampel, M., Jakobi, M., Schmitz, L., Meyer, U., Finkernagel, F., Doehlemann, G., & Heimel, K. (2016). Unfolded protein response (UPR) regulator Cib1 controls expression of genes encoding secreted virulence factors in *Ustilago maydis*. *PLoS One*, 11(4), e0153861.
- Healey, K. R., Zhao, Y., Perez, W. B., Lockhart, S. R., Sobel, J. D., Farmakiotis, D., ... & Perlin, D. S. (2016). Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance. *Nature communications*, 7(1), 11128.
- Helm, T., Stausberg, T., Previati, M., Ernst, P., Klein, B., Busche, T., ... & Noack, S. (2024). Itaconate Production from Crude Substrates with *U. maydis*: Scale-up of an Industrially Relevant Bioprocess. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 29.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M., & Doehlemann, G. (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS pathogens*, 8(5), e1002684.
- Holliday, R. (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genetics Research*, 2(2), 204-230.
- Huang, M., & Kao, K. C. (2018). Identifying novel genetic determinants for oxidative stress tolerance in *Candida glabrata* via adaptive laboratory evolution. *Yeast*, 35(11), 605–618.
- Huang, M., Khan, J., Kaur, M., Vanega, J. D. T., Patiño, O. A. A., Ramasubramanian, A. K., & Kao, K. C. (2019). CgSTE11 mediates cross tolerance to multiple environmental stressors in *Candida glabrata*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.
- Kassambara, A. (2020). rstatix: Pipe-friendly framework for basic statistical tests (R package version 0.6. 0.).
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., ... & Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(7115), 97-101.
- Karunaratna, S. C., Maharachchikumbura, S. S., Ariyawansa, H. A., Shenoy, B. D., & Jeewon, R. (2021). Emerging Fungal Plant Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 765549.
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics*, 27(3), 247-254.
- Knaus, B. J., & Grünwald, N. J. (2017). VCFR: a package to manipulate and visualize variant call format data in R. *Molecular ecology resources*, 17(1), 44-53.
- Komalapriya, C., Kaloriti, D., Tillmann, A. T., & Yin, Z. (2015). Integrative Model of Oxidative Stress Adaptation in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *PLoS ONE*, 1–32.

- Kumar, K., Mehra, R., Guiné, R. P., Lima, M. J., Kumar, N., Kaushik, R., ... & Kumar, H. (2021). Edible Mushrooms: A comprehensive review on bioactive compounds with health benefits and processing aspects. *Foods*, 10(12), 2996.
- Lai, Y., Wang, L., Zheng, W., & Wang, S. (2022). Regulatory roles of histone modifications in filamentous fungal pathogens. *Journal of Fungi*, 8(6), 565.
- Lanver, D., Tollot, M., Schweizer, G., Lo Presti, L., Reissmann, S., Ma, L. S., ... & Kahmann, R. (2017). *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 409-421.
- Lee, D. H., Feist, A. M., Barrett, C. L., & Palsson, B. Ø. (2011). Cumulative number of cell divisions as a meaningful timescale for adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli*. *PloS One*, 6(10), e26172
- Lenski, R. E. (2023). Revisiting the Design of the Long-Term Evolution Experiment with *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Evolution*, 91(3), 241-253.
- León-Ramírez, C. G., Cabrera-Ponce, J. L., Martínez-Espinoza, A. D., Herrera-Estrella, L., Méndez, L., Reynaga-Peña, C. G., & Ruiz-Herrera, J. (2004). Infection of alternative host plant species by *Ustilago maydis*. *New Phytologist*, 164(2), 337-346.
- Lev, S., Hadar, R., Amedeo, P., Baker, S. E., Yoder, O. C., & Horwitz, B. A. (2005). Activation of an AP1-like transcription factor of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* in response to oxidative stress and plant signals. *Eukaryotic Cell*, 4(2), 443-454.
- Li, H., & Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26(5), 589–595.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079.
- Li, Y., Hu, Y., Zhao, K., Pan, Y., Qu, Y., Zhao, J., & Qin, Y. (2019). The Indispensable Role of Histone Methyltransferase PoDot1 in Extracellular Glycoside Hydrolase Biosynthesis of *Penicillium oxalicum*. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Liang, L., Liu, Y., Yang, K., Lin, G., Xu, Z., Lan, H., ... & Wang, S. (2017). The putative histone methyltransferase DOT1 regulates aflatoxin and pathogenicity attributes in *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 9(7), 232.
- Lin, J.-S., Happel, P., & Kahmann, R. (2021). Nuclear status and leaf tumor formation in the *Ustilago maydis*–maize pathosystem. *New Phytologist*, 231(1), 399-415.
- Linder, R. A., Greco, J. P., Seidl, F., Matsui, T., & Ehrenreich, I. M. (2017). The stress-inducible peroxidase TSA2 underlies a conditionally beneficial chromosomal duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(9), 3177-3184.
- Martin, C., & Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(11), 838-849.
- Martínez, A. A., Conboy, A., Buskirk, S. W., Marad, D. A., & Lang, G. I. (2023). Long-Term Adaptation to Galactose as a Sole Carbon Source Selects for Mutations Outside the Canonical GAL Pathway. *Journal of Molecular Evolution*, 91(1), 46-59.
- Martínez, A. A., & Lang, G. I. (2023). Identifying Targets of Selection in Laboratory Evolution Experiments. *Journal of Molecular Evolution*, 91(3), 345-355.

- Martínez-Soto, D., Robledo-Briones, A. M., Estrada-Luna, A. A., & Ruiz-Herrera, J. (2013). Transcriptomic analysis of *Ustilago maydis* infecting *Arabidopsis* reveals important aspects of the fungus pathogenic mechanisms. *Plant signaling & behavior*, 8(8), e25059.
- Masel, J., & Trotter, M. V. (2010). Robustness and evolvability. *Trends in Genetics*, 26(9), 406–414.
- McKinney, W. (2010). Data Structures for Statistical Computing in Python. *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*, 51–56.
- Mendoza-Chamizo, B., Løbner-Olesen, A., & Charbon, G. (2018). Coping with reactive oxygen species to ensure genome stability in *Escherichia coli*. *Genes*, 9(11), 565.
- Misas Villamil, J. C., Mueller, A. N., Demir, F., Meyer, U., Ökmen, B., Schulze Hüynck, J., ... & Doehlemann, G. (2019). A fungal substrate mimicking molecule suppresses plant immunity via an inter-kingdom conserved motif. *Nature communications*, 10(1), 1576.
- Mittelman, D., & Wilson, J. H. (2010). Stress, genomes, and evolution. *Cell Stress and Chaperones*, 15, 463-466.
- Molina, L., & Kahmann, R. (2007). An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *The Plant Cell*, 19(7), 2293-2309.
- Möller, M., Habig, M., Lorrain, C., Feurtey, A., Hauelsen, J., Fagundes, W. C., ... & Stukenbrock, E. H. (2021). Recent loss of the Dim2 DNA methyltransferase decreases mutation rate in repeats and changes evolutionary trajectory in a fungal pathogen. *PLoS Genetics*, 17(3), e1009448.
- Möller, M., & Stukenbrock, E. H. (2017). Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 756-771.
- Moore, S., Berger, N. D., Luijsterburg, M. S., Pielt, C. G., Stanley, F. K. T., Schröder, C. U., Fang, S., Chan, J. A., Schriemer, D. C., Nagel, Z. D., van Attikum, H., & Goodarzi, A. A. (2019). The CHD6 chromatin remodeler is an oxidative DNA damage response factor. *Nature Communications*, 10(1), 241.
- Mount, H. O., Revie, N. M., Todd, R. T., Anstett, K., Collins, C., Costanzo, M., Boone, C., Robbins, N., Selmecki, A., & Cowen, L. E. (2018). Global analysis of genetic circuitry and adaptive mechanisms enabling resistance to the azole antifungal drugs. *PLOS Genetics*, 14(4), e1007319.
- Mueller, O., Kahmann, R., Aguilar, G., Trejo-Aguilar, B., Wu, A., & de Vries, R. P. (2008). The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 45, S63-S70.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M., & Kahmann, R. (1999). The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, 34(5), 1007-1017.
- Munkacsy, A. B., Stoxen, S., & May, G. (2008). *Ustilago maydis* populations tracked maize through domestication and cultivation in the Americas. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1638), 1037–1046.
- Muszewska, A., Steczkiewicz, K., Stepniewska-Dziubinska, M., & Ginalska, K. (2019). Transposable elements contribute to fungal genes and impact fungal lifestyle. *Scientific Reports*, 9(1), 4307.
- Nnadi, N. E., & Carter, D. A. (2021). Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLoS Pathogens*, 17(4).
- Parlevliet, J. E. (2002). Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica*, 124(2), 147-156.

- Payne, J. L., & Wagner, A. (2018). The causes of evolvability and their evolution. *Nature Reviews Genetics*, 20(January), 24–38.
- Phukhamsakda, C., Nilsson, R. H., Bhunjun, C. S., De Farias, A. R. G., Sun, Y.-R., Wijesinghe, S. N., Raza, M., Bao, D.-F., Lu, L., Tibpromma, S., Dong, W., Tennakoon, D. S., Tian, X.-G., Xiong, Y.-R., Karunarathna, S. C., Cai, L., Luo, Z.-L., Wang, Y., Manawasinghe, I. S., ... Hyde, K. D. (2022). The numbers of fungi: Contributions from traditional taxonomic studies and challenges of metabarcoding. *Fungal Diversity*, 114(1), 327-386.
- Qi, L., Wu, X.-C., & Zheng, D.-Q. (2019). Hydrogen peroxide, a potent inducer of global genomic instability. *Current Genetics*, 65(4), 913-917.
- Redkar, A., Villajuana-Bonequi, M., & Doehlemann, G. (2015). Conservation of the *Ustilago maydis* effector *see1* in related smuts. *Plant Signaling and Behavior*, 10(12).
- Rich, T., Allen, R. L., & Wyllie, A. H. (2000). Defying death after DNA damage : Abstract : Nature. *Nature*, 407(6805), 777–783.
- Rinnerthaler, M., Büttner, S., Laun, P., Heeren, G., Felder, T. K., & Klinger, H. (2012). Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), 8658–8663.
- Rokas, A. (2022). Evolution of the human pathogenic lifestyle in fungi. *Nature Microbiology*, 7(5), 607-619. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01112-0>
- Ruiz-Herrera, J., & Marlínez-Espinoza, A. D. (1998). The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology*, 1(2), 149–158.
- 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, 701-709.
- Salmon, T. B., Evert, B. A., Song, B., & Doetsch, P. W. (2004). Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research*, 32(12), 3712-3723.
- Sandberg, T. E., Salazar, M. J., Weng, L. L., Palsson, B. O., & Feist, A. M. (2019). The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metabolic Engineering*, 56, 1-16.
- Schirawski, J., Heinze, B., Wagenknecht, M., & Kahmann, R. (2005). Mating type loci of *Sporisorium reilianum*: novel pattern with three a and multiple b specificities. *Eukaryotic cell*, 4(8), 1317-1327.
- Schuster, M., Schweizer, G., Reissmann, S., Happel, P., Assmann, D., Roessel, N., ... & Kahmann, R. (2024). Novel secreted effectors conserved among smut fungi contribute to the virulence of *Ustilago maydis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, (ja).
- Schweizer, G., Haider, M. B., Barroso, G. V, Rössel, N., Münch, K., Kahmann, R., & Dutheil, J. Y. (2021). Population Genomics of the Maize Pathogen *Ustilago maydis*: Demographic History and Role of Virulence Clusters in Adaptation. *Genome Biology and Evolution*, 13(5), 1–17.
- Sierra-Campos, E., Velázquez, I., Matuz-Mares, D., Villavicencio-Queijeiro, A., & Pardo, J. P. (2009). Functional properties of the *Ustilago maydis* alternative oxidase under oxidative stress conditions. *Mitochondrion*, 9(2), 96-102.
- Somani, A., Box, W. G., Smart, K. A., & Powell, C. D. (2019). Physiological and transcriptomic response of *Saccharomyces pastorianus* to cold storage. *FEMS Yeast Research*, 19(4), 1–12.

- Stukenbrock, E. H., & Croll, D. (2014). The evolving fungal genome. *Fungal Biology Reviews*, 28(1), 1-12.
- Sun, L., Li, H., Yan, T., Fang, T., Wu, H., Cao, Y., Lu, H., Jiang, Y., & Yang, F. (2023). Aneuploidy Mediates Rapid Adaptation to a Subinhibitory Amount of Fluconazole in *Candida albicans*. *Microbiology Spectrum*, 11(2), e03016-22.
- Swamy, K. B. S., & Zhou, N. (2019). Experimental evolution: its principles and applications in developing stress-tolerant yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(5), 2067–2077.
- Tanaka, S., Brefort, T., Neidig, N., Djamei, A., Kahnt, J., Vermerris, W., Koenig, S., Feussner, K., Feussner, I., & Kahmann, R. (2014). A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *eLife*, 3, 1–27.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., & Holloman, W. K. (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Molecular and cellular biology*.
- Van den Bergh, B., Swings, T., Fauvart, M., & Michiels, J. (2018). Experimental Design, Population Dynamics, and Diversity in Microbial Experimental Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(3), 1–54.
- Van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H. J., & Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews Genetics*, 2(3), 196–206.
- Vaser, R., Sović, I., Nagarajan, N., & Šikić, M. (2017). Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome research*, 27(5), 737-746.
- Wickham, H. (2016). Ggplot2: Elegant graphics for data analysis.
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & Vaughan, D. (2023). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>
- 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.
- Zadrag-Tęcza, R., Maślanka, R., Bednarska, S., & Kwolek-Mirek, M. (2018). Response mechanisms to oxidative stress in yeast and filamentous fungi. *Stress response mechanisms in fungi: theoretical and practical aspects*, 1-34.
- Zhang, K., Zheng, D.-Q., Sui, Y., Qi, L., & Petes, T. D. (2019). Genome-wide analysis of genomic alterations induced by oxidative DNA damage in yeast. *Nucleic Acids Research*, 47(7), 3521-3535.
- Zou, K., Li, Y., Zhang, W., Jia, Y., Wang, Y., Ma, Y., ... & Du, W. (2022). Early infection response of fungal biotroph *Ustilago maydis* in maize. *Frontiers in Plant Science*, 13, 970897.

IX. Anexos

Anexo I. Oligonucleótidos usados en este estudio

Tabla 16. Secuencia de los oligonucleótidos usados en este estudio.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' – 3')	Templado	Tamaño del producto (pb)	Propósito
Oex-Um11067_1	¹ ttt CCATGG AGTCACTCGGTCAAATGGGAGAG	<i>U. maydis</i> gDNA	2299	To amplify the UMAG_11067 ORF
Oex-Um11067_2	² ttgaaacgatacGAGCGGAGCATGGTTAGAACC			
Oex-NOS _t _1	² ATGCTCCGCTCgatcgttcaaacattggcaataaagttcttaag	Plásmido	276	To amplify NOS terminator for further fusion with UMAG_11067 ORF
Oex-NOS _t _2	² GGACAGCACCGCgatctagtaacatagatgacaccgcgcgc	pUMa2625		
Oex-IP _{locus} _1	² gttactagatcGCGGTGCTGTCCCG	<i>U. maydis</i> gDNA	964	To amplify a sequence downstream of the <i>IP locus</i> for HR.
Oex-IP _{locus} _2	³ tt GAATTC GCAACGGATTCTACGATACCTGG			
⁴ oex-Verif_1	CCTGCTTGACTTGTGACCATGCC	oexUMAG_11067 gDNA	4086	To verify insertion of the overexpression cassette in <i>IP locus</i>
⁴ oex-Verif_2	CGACTTTGCCTGGTGTGAC			
⁴ oex-Verif_1	CCTGCTTGACTTGTGACCATGCC	oexUMAG_11067 gDNA	1760	To verify insertion of the overexpression cassette in <i>IP locus</i>
⁴ oex-Verif_3	CTGGAGCAGTTCATGATGGTAAG			
⁴ oex-Verif_4	CGCTGAACAGATCCTCATTGACC	oexUMAG_11067 gDNA	1877	To verify insertion of the overexpression cassette in <i>IP locus</i>
⁴ oex-Verif_5	CATCAAATCAACGTCAGCCGTCG			
q-Um11067_1	CGATGGCTTCCGCAATTA	<i>U. maydis</i> cDNA	146	To quantify gene expression of UMAG_11067 by qPCR
⁵ q-Um11067_2	CGTTGTAGTTGAGACCAAGAG			
q-Um04869_1	CTTGCTACGGTCCAACATTC	<i>U. maydis</i> cDNA	149	To quantify gene expression of UMAG_11067 by qPCR
⁵ q-Um04869_2	TCGCTACTCTCCCTACTCAA			

Anexo II. Variantes de un solo nucleótido en *Ustilago maydis* SG200

Para refinar el análisis de variantes de un solo nucleótido se estableció un conjunto amplio de SNVs en la cepa *U. maydis* SG200. Este conjunto de datos se obtuvo a partir de la secuenciación de la cepa *U. maydis* SG200 con dos tecnologías de secuenciación de nueva generación DNBSeg y NextSeq, ambas de lectura corta. El alineamiento de las lecturas de secuenciación al genoma de referencia de *U. maydis*, mostró valores de mediana de cobertura de 193 y 31 para DNBSeg y NextSeq, respectivamente. Las variantes de un solo nucleótido fueron identificadas usando *bcftools* de acuerdo con la metodología descrita en materiales y métodos.

El análisis de SNVs reveló la presencia de 883 y 962 SNVs en los conjuntos de datos de secuenciación obtenidos mediante la tecnología DNBSeg y NextSeq, respectivamente. Se identificaron 801 SNVs compartidos entre ambos conjuntos, mientras que 82 SNVs fueron exclusivos de DNBSeg y 161 SNVs fueron específicos de NextSeq (Figura 23). El número total de SNVs detectados para la cepa *U. maydis* SG200 fue de 1,044. Cabe destacar que estos SNVs fueron utilizados como el contexto mutacional de referencia para *U. maydis* SG200 y, consecuentemente, se excluyeron de cada genoma analizado del experimento de evolución. Este enfoque metodológico aseguró una evaluación precisa de las variantes genómicas que ocurrieron durante el curso de la evolución experimental, al eliminar la influencia de las variantes preexistentes en la cepa inicial.

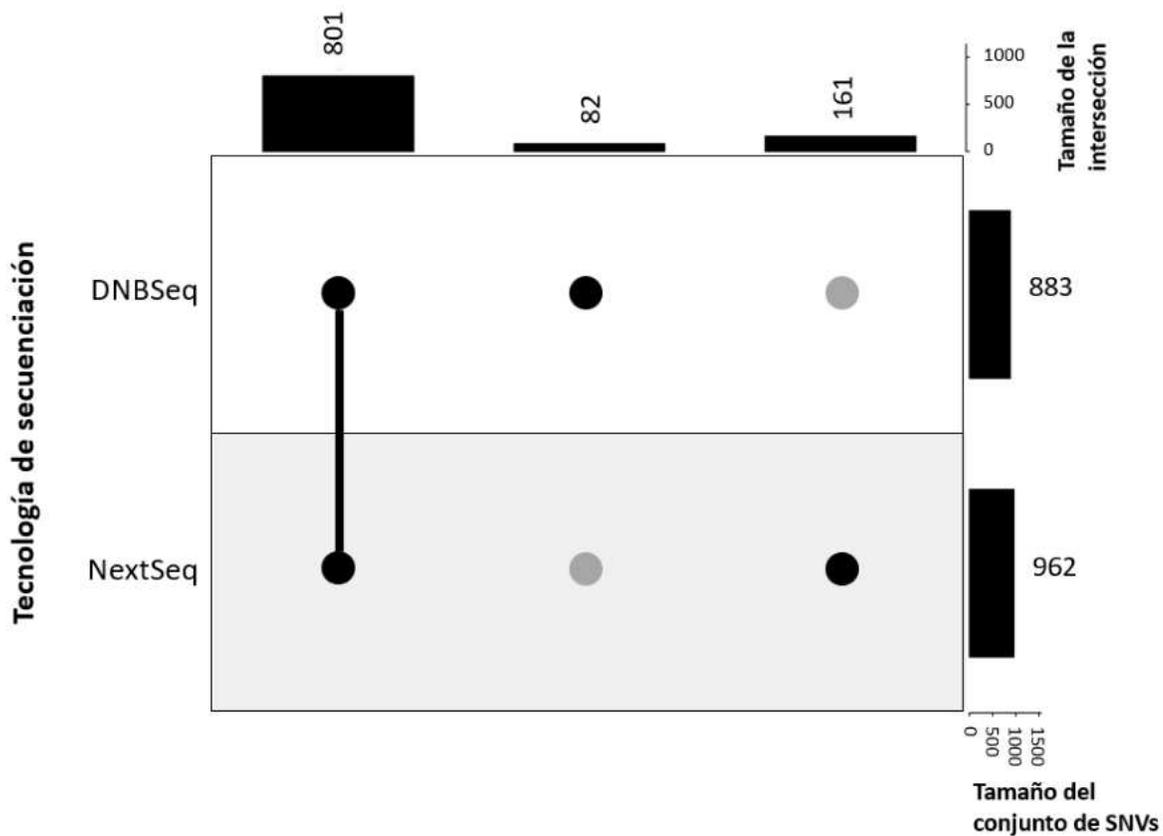


Figura 23. Contexto mutacional de *U. maydis* SG200. Análisis de variantes de un solo nucleótido (SNVs) en la cepa *U. maydis* SG200 a partir de datos de secuenciación obtenidos con las tecnologías de secuenciación DNBSeg y NextSeq.

Anexo III. Solapamiento de SNVs con dos técnicas de llamado de variantes.

Tabla 17. Solapamiento final de SNVs con dos técnicas de llamado de variantes. Los SNVs fueron identificados con *bcftools* y con un alineamiento múltiple de genomas. Los SNVs en común detectados por ambas técnicas fue el conjunto final de SNVs reportado para cada muestra analizada.

Muestra (UmH ₂ O ₂ ^R)	Alineamiento		
	<i>bcftools</i> SNV	múltiple de genomas SNV	Solapamiento final SNV
LA.1	Chr6:422,186C>A	Chr6:422,186C>A	Chr6:422,186C>A
	Chr7:106,141G>T	Chr7:106,141G>T	Chr7:106,141G>T
	Chr10:29,678G>A	Chr10:29,678G>A	Chr10:29,678G>A
	Chr18:330,272C>A	Chr18:330,272C>A	Chr18:330,272C>A
LA.2	Chr18:330,272C>A	Chr18:330,272C>A	Chr18:330,272C>A
LA.3	Chr18:330,272C>A	Chr18:330,272C>A	Chr18:330,272C>A
LA.4	Chr15:425,843C>T	Chr15:425,843C>T	Chr15:425,843C>T
LA.5	Chr8:193,967C>T	Chr8:193,967C>T	Chr8:193,967C>T
	Chr17:546,384C>T	Chr17:546,384C>T	Chr17:546,384C>T
LB.1	Chr2:1,719,805G>T	Chr2:1,719,805G>T	Chr2:1,719,805G>T
	Chr4:666,509C>T	Chr4:666,509C>T	Chr4:666,509C>T
	Chr11:325,426A>C	Chr11:325,426A>C	Chr11:325,426A>C
	Chr21:294,513G>A	Chr21:294,513G>A	Chr21:294,513G>A
LB.2	-	-	-
LB.3	Chr2:1,003,811C>T	Chr2:1,003,811C>T	Chr2:1,003,811C>T
	Chr6:19,532T>A	Chr6:19,532T>A	Chr6:19,532T>A
	Chr14:320,210T>A	Chr14:320,210T>A	Chr14:320,210T>A
	Chr22:194,991A>G	Chr22:194,991A>G	Chr22:194,991A>G
	Chr23:323,817C>T	Chr23:323,817C>T	Chr23:323,817C>T
LB.4	-	-	-
LB.5	Chr3:1,408,451C>A	Chr3:1,408,451C>A	Chr3:1,408,451C>A
	Chr22:362,952C>T	Chr22:362,952C>T	Chr22:362,952C>T
LC.1	Chr1:2,430,690G>C	Chr1:2,430,690G>C	Chr1:2,430,690G>C
	Chr8:464,088T>A	Chr8:464,088T>A	Chr8:464,088T>A
	Chr10:623,352T>A	Chr10:623,352T>A	Chr10:623,352T>A

	Chr18:330,272C>A Mt:15,246G>A	Chr18:330,272C>A Mt:15,246G>A	Chr18:330,272C>A Mt:15,246G>A
LC.2	Chr7:451,382C>T	Chr7:451,382C>T	Chr7:451,382C>T
LC.3	Chr2:236,311G>T Chr3:101,539C>A Chr5:76,058C>G Chr5:1,222,742G>T Chr8:464,088T>A Chr18:330,272C>A Chr20:106,401G>T Mt:15,246G>A	Chr2:236,311G>T Chr3:101,539C>A Chr5:76,058C>G Chr5:1,222,742G>T Chr8:464,088T>A Chr18:330,272C>A Chr20:106,401G>T Mt:15,246G>A	Chr2:236,311G>T Chr3:101,539C>A Chr5:76,058C>G Chr5:1,222,742G>T Chr8:464,088T>A Chr18:330,272C>A Chr20:106,401G>T Mt:15,246G>A
LC.4	-	-	-
LC.5	Chr11:404,834C>A	Chr11:404,834C>A	Chr11:404,834C>A
LD.1	-	-	-
LD.2	- Chr12:498,742T>G Chr12:508,357A>T	Chr6:1,020,303A>G Chr12:498,742T>G Chr12:508,357A>T	Chr12:498,742T>G Chr12:508,357A>T
LE.1	-	-	-
LE.2	Chr1:680919C>T	Chr1:680919C>T	Chr1:680919C>T
LF.1	Chr5:11,465T>C Chr10:465,379T>G Chr20:462,416C>T	Chr5:11,465T>C - Chr20:462,416C>T	Chr5:11,465T>C - Chr20:462,416C>T
LF.2	Chr1:370,990T>A	Chr1:370,990T>A	Chr1:370,990T>A

Anexo IV. Genes localizados en la región amplificada del cromosoma nueve

Tabla 18. Genes en los primeros 150 kb del cromosoma 9. La función asociada fue identificada a partir de las predicciones de la estructura tridimensional con AlphaFold2.

Gen ID	Cromosoma	Coordenada de inicio	Coordenada de fin	Nombre/función de la proteína
UMAG_11064	9	333	1019	NUMOD1 domain-containing protein
UMAG_11065	9	1263	1886	C2H2-type domain-containing protein
UMAG_11066	9	2298	2987	WAPL domain-containing protein
UMAG_03392	9	3495	4106	Dickkopf_N domain-containing protein
UMAG_03393	9	5222	5713	Secreted protein
UMAG_03394	9	5960	8836	C2H2-type domain-containing protein
UMAG_03394	9	5960	8836	C2H2-type domain-containing protein
UMAG_03395	9	9601	9909	Uncharacterized protein
UMAG_03396	9	10280	12949	Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein
UMAG_03397	9	13883	15544	ANK_REP_REGION domain-containing protein
UMAG_03398	9	17198	18403	Beta-lactamase domain-containing protein
UMAG_11067	9	18661	20910	Catalase-peroxidase (CP) (EC 1.11.1.21) (Peroxidase/catalase) katG
UMAG_03400	9	22405	24039	Choline transport protein
UMAG_11068	9	25487	27595	Amine oxidase (EC 1.4.3.-)
UMAG_03402	9	29107	30555	Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase
UMAG_03403	9	31391	35074	Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein
UMAG_03404	9	36098	37963	Aldedh domain-containing protein
UMAG_12229	9	38711	39698	LigB domain-containing protein
UMAG_03406	9	39955	40611	HIG1 domain-containing protein
UMAG_03407	9	41321	43299	PepX_C domain-containing protein
UMAG_03408	9	43548	44996	FAD_binding_3 domain-containing protein
UMAG_03409	9	46868	48238	Fumarylacetoacetase (EC 3.7.1.2) (Fumarylacetoacetate hydrolase)
UMAG_11070	9	51232	52709	Lipase (EC 3.1.1.3)
UMAG_03411	9	53059	54262	10689
UMAG_03412	9	57435	57986	Polyketide_cyc domain-containing protein
UMAG_03413	9	58434	59900	Probable acetate kinase (EC 2.7.2.1) (Acetokinase)
UMAG_03414	9	60333	63014	Putative xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase

UMAG_03415	9	63773	65584	FAD/NAD(P)-binding domain-containing protein
UMAG_03416	9	66490	67638	Putative carbon source-regulated protein (Arabinase)
UMAG_03417	9	68105	70060	Amidase (EC 3.5.1.4)
UMAG_03418	9	73227	77300	Protein kinase domain-containing protein
UMAG_03419	9	78531	82406	C2H2-type domain-containing protein
UMAG_11071	9	83183	84454	LEA_2 domain-containing protein
UMAG_03421	9	84690	87908	Related to NOC3 protein
UMAG_03422	9	88357	89853	J domain-containing protein
UMAG_11072	9	91256	92035	Uncharacterized protein
UMAG_11073	9	93182	95641	G_PROTEIN_RECEP_F1_2 domain-containing protein
UMAG_03424	9	95924	96718	DUF1421 multi-domain protein
UMAG_03425	9	97271	99088	AB hydrolase-1 domain-containing protein
UMAG_11074	9	99565	103188	Structural maintenance of chromosomes protein 5
UMAG_11075	9	104302	105708	DUF3752 domain-containing protein
UMAG_11076	9	106025	108424	WW domain-containing protein
UMAG_11077	9	108655	110157	Monooxygenase
UMAG_11078	9	112872	113587	Cupin_2 domain-containing protein
UMAG_03431	9	115769	118843	PUM-HD domain-containing protein
UMAG_11079	9	119898	120182	DUF4219 domain-containing protein
UMAG_11080	9	120428	120769	Zf-CCHC_6 domain-containing protein
UMAG_11081	9	121934	122261	Transposase
UMAG_03433	9	124542	126080	RB_A domain-containing protein
UMAG_03434	9	126285	129137	Replication factor C subunit 1
UMAG_03435	9	129863	132493	Arrestin_C domain-containing protein
UMAG_03436	9	132886	134571	Abhydro_lipase domain-containing protein
UMAG_03437	9	136530	138758	Related to BDF1-sporulation protein
UMAG_10438	9	140478	142766	RING-type domain-containing protein
UMAG_03439	9	143381	144134	RNase H type-1 domain-containing protein
UMAG_03440	9	144651	145358	Uncharacterized protein
UMAG_10439	9	149932	150940	Protein-ribulosamine 3-kinase (EC 2.7.1.172)
UMAG_03442	9	151640	153355	HECT domain-containing protein
UMAG_03443	9	154095	154728	UBC core domain-containing protein
UMAG_10440	9	154864	156117	Ferrochelatase
UMAG_10441	9	156892	157830	Putative SNAP receptor
UMAG_03445	9	158697	159403	Glutathione S-transferase

Anexo V. Variantes en el número de copias de los cromosomas de *U. maydis* en aislados silvestres

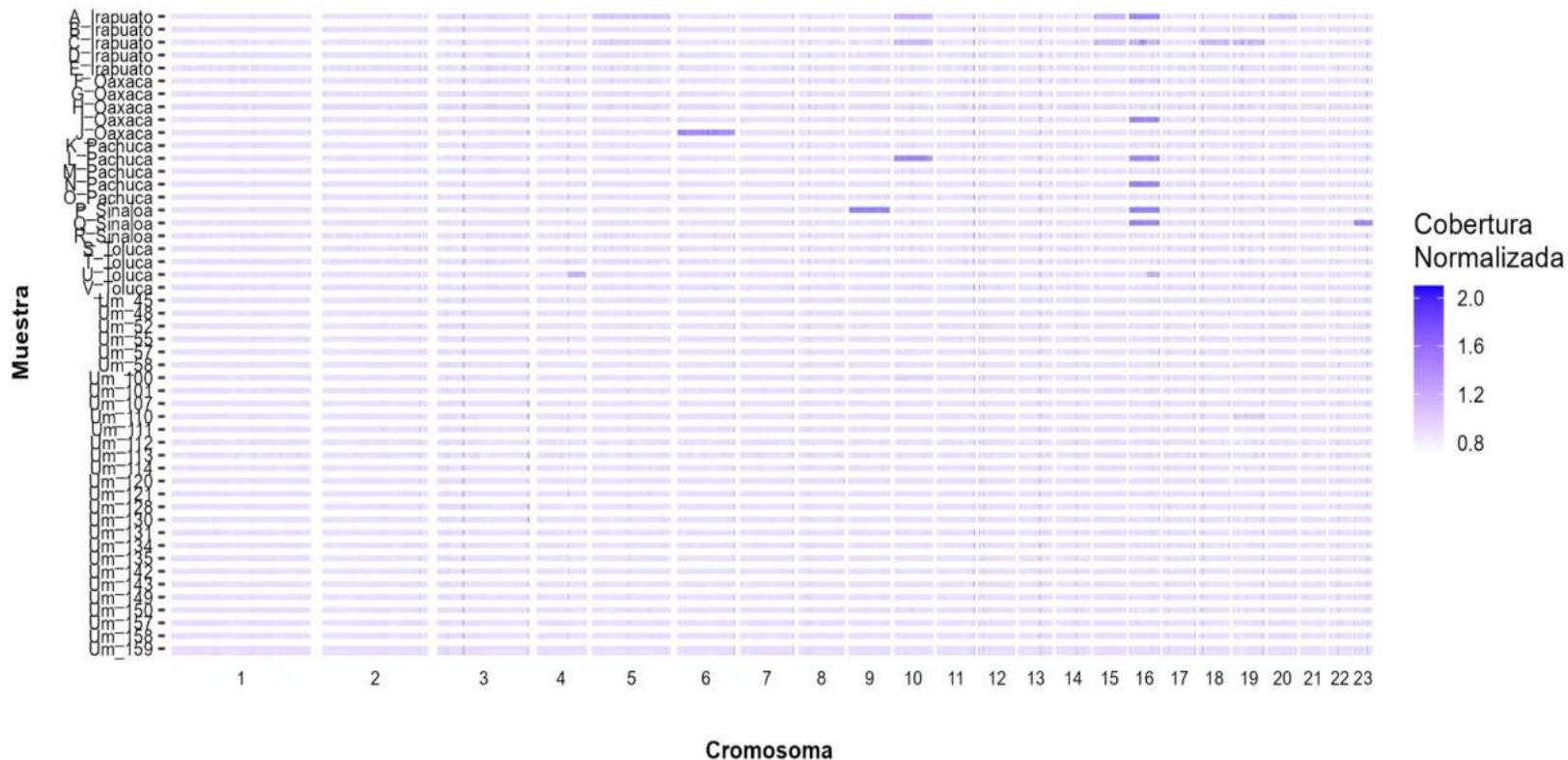


Figura 24. Aneuploidías en aislados de *U. maydis*. Los aislados de ‘A_Irapuato’ a ‘V_Toluca’ corresponden a los reportados por Schweizer *et al.*, 2021. Los aislados de Um_45 a Um_159 corresponden a los reportados por Depotter *et al.*, 2021. Todos los genomas secuenciados fueron obtenidos de cultivos haploides.