

Adriana Ramírez  
Martínez

Análisis *in silico* de los genes que catalizan la biosíntesis de poliaminas y estudio de los cambios en el proceso de apareamiento, morfología y expresión génica en *Sporisorium reilianum* en respuesta a la adición de putrescina exógena

2024



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Análisis *in silico* de los genes que catalizan la biosíntesis de poliaminas y estudio de los cambios en el proceso de apareamiento, morfología y expresión génica en *Sporisorium reilianum* en respuesta a la adición de putrescina exógena

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

ADRIANA RAMÍREZ MARTÍNEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

NOVIEMBRE 2024

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



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

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

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

### Bajo los siguientes términos:



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



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



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

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

### Avisos:

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

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



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Ciencias Biológicas

Análisis *in silico* de los genes que catalizan la biosíntesis de poliaminas y estudio de los cambios en el proceso de apareamiento, morfología y expresión génica en *Sporisorium reilianum* en respuesta a la adición de putrescina exógena

**Tesis**

Como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Biológicas

**Presenta**

Adriana Ramírez Martínez

**Dirigido por**

DC. José Antonio Cervantes Chávez

**Codirigido por**

DC. Laura Valdés Santiago

DC. José Antonio Cervantes Chávez  
Presidente

DC. Laura Valdés Santiago  
Secretario

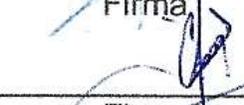
DC. Bertha Isabel Carvajal Gámez  
Vocal

DC. Fidel Landeros Jaime  
Suplente

DC. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo  
Suplente

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

Esquivel Naranjo Edgardo U.  
Firma

## RESUMEN

*Sporisorium reilianum* es un hongo fitopatógeno que produce en el maíz la enfermedad conocida como “carbón de la espiga”. Antes de que el proceso de infección por *S. reilianum* se realice es necesario que se lleven a cabo diversos procesos celulares entre ellos el apareamiento; durante el proceso del apareamiento es necesaria la participación de distintas moléculas, entre ellas las poliaminas, estas están presentes en todos los organismos, son moléculas de bajo peso molecular con carga positiva a pH fisiológico, esta carga positiva les permite interactuar con algunas moléculas que poseen carga negativa, tales como el ADN, ARN, proteínas, entre otras, así como participar de manera indirecta en ciclos metabólicos. En este trabajo se realizó un análisis *in silico* para identificar a las enzimas participantes en el metabolismo de poliaminas en *S. reilianum*, obteniendo que esta vía se encuentra conservada y la única ruta para la biosíntesis de poliaminas es la de la ornitina descarboxilasa, además este hongo no producir espermina. Se realizaron también ensayos de adición de putrescina exógena a pH 3 y 7 en células haploides y en condiciones de apareamiento, observando que a una concentración de 5 mM acelera la producción de tubos de conjugación, mientras que a 10 mM se observa una disminución del crecimiento celular. Posteriormente se realizaron análisis de expresión génica bajo las condiciones anteriormente mencionadas mediante RT-PCR semicuantitativo de punto final, se observó que la adición de putrescina exógena provoca cambios en la expresión, como un aumento en la expresión relativa de los genes que participan en la síntesis de poliaminas en *S. reilianum*.

**Palabras clave:** apareamiento; carbón de la espiga; expresión génica; poliaminas; putrescina; *Sporisorium reilianum*, ustilaginales.

## ABSTRACT

*Sporisorium reilianum* is a phytopathogenic fungus that causes the “spike smut” in maize plant. To give rise to the infectious process, *S. reilianum* must be able to perform many cellular processes, among them, mating; during these processes the intervention of diverse molecules is necessary, and between these participating molecules we find the polyamines. The polyamines are present in all living organisms, these are molecules with low molecular weight with a positive charge at physiological pH hence this charge is able to interact with negative charged molecules such as DNA, RNA, proteins, etc., as well as participate indirectly in some metabolic cycles. In this work we performed an *in silico* analysis to identify the involved enzymes we obtained that this route is conserved in *S. reilianum*, and the only mechanism to synthesize polyamines is by the ornithine decarboxylase way and also this fungi does not produce spermine. We also performed exogenous putrescine addition assays under pH 3 and 7 conditions in haploids cells and at mating conditions observing that the 5 mM condition accelerates production of conjugation hyphae, whilst at 10 mM condition there was a diminution of cellular growth. Subsequently, we performed genic expression under the abovementioned conditions via semiquantitative endpoint RT-PCR, realizing that the addition of exogenous putrescine makes changes in the genetic expression as the increase of relative expression of some of the genes involved in the polyamine synthesis in *S. reilianum*.

**Key words:** genetic expression; mating; polyamines; putrescine; spike smut; *Sporisorium reilianum*, ustilaginales

*En memoria de Raúl Ramírez Cancino*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias al Dr. José Antonio por su paciencia y su apoyo durante toda esta ardua etapa, por permitirme estar en el laboratorio y terminar este trabajo de tesis, y por darme la oportunidad de obtener la bella experiencia de la docencia.

Gracias a la Dra. Laura Valdés por su apoyo en las revisiones, sus palabras de aliento y su tiempo dedicado para la finalización de este trabajo.

Gracias a la Dra. Bertha, Dr. Fidel y Dr. Ulises por su tiempo y apoyo en la realización de este trabajo de tesis.

Gracias al M. en C. Salvador Ramírez por su apoyo en todo lo que se requirió en el laboratorio.

Gracias a la Psic. Jarety de la UAQ por su apoyo, seguimiento y empatía.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Dani, Isaac, y Martín por hacer amena la estancia, por las salidas, pláticas y muchos cafés (y cervezas). A Víctor García por siempre resolver las dudas y tips para los RT-PCRs y ARN. A mis compañeros de maestría Rox, Esteban y Liz. A Erick por su apoyo y cariño incondicional, sus pláticas tan divertidas, su comida, y a su familia por abrirme las puertas de su hogar.

Gracias a mis papás, Raúl y Graciela, que a pesar de que Raúl no pueda estar de manera presente en la culminación de esta etapa, es el pilar y motor de todo lo que sé y soy; a Grace por su apoyo económico y amor incondicional; y a mis hermanas Valeria y Natalia.

Gracias a la UAQ por permitirme ejercer como docente administrativo durante el tiempo que terminaba el trabajo de tesis, y a quienes fueron mis alumnos de química inorgánica.

Gracias al apoyo FONDEC FNB202227.

Gracias a CONAHCYT por la beca otorgada número 1145544.

## Índice de contenido

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES.....	1
2.1 Hongos fitopatógenos.....	1
2.1.1 Los Ustilaginales.....	3
2.2 Generalidades de <i>Sporisorium reilianum</i> .....	4
2.2.1 Reproducción y ciclo de vida.....	8
2.2.2 Infección en las plantas de maíz .....	9
2.3 Morfogénesis y diferenciación celular en hongos .....	10
2.4 Las poliaminas.....	12
2.4.1 Funciones de las poliaminas .....	14
2.4.2 Influencia de las poliaminas en los procesos diferenciativos.....	15
2.5 Enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas en hongos .....	16
2.5.1 Ornitina descarboxilasa .....	16
2.5.2 Espermidina/espermina- <i>N</i> <sup>1</sup> -acetiltransferasa .....	17
2.5.3 Poliamina oxidasa .....	18
2.5.4 <i>S</i> -adenosil metionina descarboxilasa .....	19
2.5 Regulación de la síntesis de poliaminas en hongos .....	20
2.6 Efecto de la interrupción química y genética en la biosíntesis de poliaminas en hongos.....	21
III. HIPÓTESIS.....	23
IV. OBJETIVO GENERAL.....	24
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25

6.1 Material biológico y condiciones de cultivo .....	25
6.2 Análisis <i>in silico</i> de los genes involucrados en la biosíntesis de poliaminas en <i>Sporisorium reilianum</i> .....	25
6.3 Ensayos de apareamiento con adición de putrescina exógena.....	25
6.4 Extracción de ARN total.....	26
6.5 Infección de plantas de maíz .....	27
6.6 Síntesis de ADN complementario (ADNc) .....	27
6.7 Preparación de protoplastos por medio de enzimas líticas.....	28
6.7.1 Protocolo I para formación de protoplastos.....	28
6.7.2 Protocolo II para formación de protoplastos.....	29
6.8 Transformación de protoplastos .....	30
6.8.1 Protocolo I para transformación de protoplastos.....	30
6.8.2 Protocolo II para transformación de protoplastos.....	30
6.9 Extracción de ADN genómico .....	31
6.10 Análisis de transformantes por PCR.....	32
6.11 Prueba de auxotrofia a putrescina en transformantes.....	32
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
7.1 Identificación <i>in silico</i> de los genes involucrados en la síntesis de poliaminas en <i>Sporisorium reilianum</i> .....	33
7.2 Análisis filogenético de enzimas clave en la biosíntesis de las PA en hongos basidiomicetos.....	37
7.3 Efecto de la aplicación exógena de putrescina sobre la morfología y apareamiento en <i>S. reilianum</i> en pH 7 en medio líquido .....	41
7.4 Efecto de la aplicación exógena de putrescina en el apareamiento en <i>S. reilianum</i> a pH 7 en medio sólido .....	46

7.5 Efecto de la aplicación exógena de putrescina sobre el apareamiento en <i>S. reilianum</i> a pH 3 en MM líquido .....	49
7.6 Análisis de expresión de los genes involucrados en biosíntesis de poliaminas en respuesta la adición de putrescina exógena a 0.1, 5 y 10 mM .....	55
7.7 Expresión del gen <i>SrEf1α in planta</i> .....	58
7.8 Obtención y aislamiento de transformantes <i>Srodc-</i> .....	59
VIII. CONCLUSIONES .....	69
IX. REFERENCIAS .....	72
X. APÉNDICE .....	97
10.1 Preparación de medios de cultivo .....	97
10.2 Preparación de Soluciones .....	99
10.3 Extracción de ADNp a mini escala (Miniprep): .....	101
11.4 Electroforésis .....	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del basidiomiceto <i>S. reilianum</i> y su proceso infeccioso en <i>Zea mays</i> .....	6
Figura 2. Apareamientos en <i>S. reilianum</i> .....	8
Figura 3. Síntomas por infección de <i>S. reilinaum</i> en <i>Z. mays</i> .....	9
Figura 4. Representación de distintos cambios morfológicos presentados en hongos .....	11
Fig. 5. Vía de la biosíntesis de las poliaminas .....	13
Fig. 6. Algunos de los roles principales de las PA en los procesos celulares .....	15
Figura 7. Mecanismo de descarboxilación de la L-ornitina por medio de la enzima ornitina descarboxilasa PLP dependiente para dar lugar a la poliamina putrescina .....	16
Figura 8. Retro-conversión de espermina a espermidina vía SSAT y PAO. Modificado de Pegg (2008).....	18
Figura 9. Oxidación de una diamina vía poliamina oxidasa. Modificado de Kaur et al. (2009).....	19
Figura 10. Mecanismo de biosíntesis de PAs donde entra en acción la S-adenosil metionina descarboxilasa. ....	20
Figura 11. Esquema de la acción inhibitoria de la antizima sobre la ODC en presencia de altos niveles de poliaminas en la célula.....	21
Figura 12. Propuesta de la vía metabólica de poliaminas en <i>S. reilianum</i> con base en los resultados obtenido mediante la caracterización <i>in silico</i> .....	36

Figura 13. Análisis filogenético de la enzima ODC en basidiomicetos.....	38
Figura 14. Análisis filogenético de la enzima PAO en basidiomicetos.....	39
Figura 15. Análisis filogenético de la enzima SAMDC en basidiomicetos.....	40
Figura 16. Efecto de la putrescina exógena en morfología y apareamiento en <i>S. reilianum</i> en MM líquido pH 7 a las 24 h de incubación.....	42
Figura 17. Porcentaje de células con presencia de formación de tubos de conjugación en medio mínimo líquido a pH 7 a las 24 horas de incubación.....	43
Figura 18. Efecto de la putrescina exógena en morfología y apareamiento en <i>S. reilianum</i> en MM líquido pH 7 a las 72 h.....	44
Figura 19. Porcentaje de células con presencia de formación de tubos de conjugación en medio mínimo líquido a pH 7 a las 72 horas de incubación.....	45
Figura 20. Efecto de la putrescina exógena en morfología y apareamiento en <i>S. reilianum</i> en MM sólido pH 7 a las 48 h.....	46
Figura 21. Porcentaje apareamiento en medio mínimo sólido a pH 7 a las 48 horas de incubación.....	47
Figura 22. Efecto de la putrescina exógena en morfología y apareamiento en <i>S. reilianum</i> en MM sólido pH 7 a las 72 h.....	48
Figura 23. Porcentaje apareamiento en medio mínimo sólido a pH 7 a las 72 horas de incubación.....	49
Figura 24. Efecto de la putrescina exógena en morfología y apareamiento en <i>S. reilianum</i> en MM líquido pH 3 a las 24 h.....	50
Figura 25. Porcentaje apareamiento en medio mínimo líquido a pH 3 a las 24 horas de incubación.....	51

Figura 26. Efecto de la putrescina exógena en morfología y apareamiento en <i>S. reilianum</i> en MM líquido pH 3 a las 72 h.....	52
Figura 27. Porcentaje apareamiento en medio mínimo sólido a pH 3 a las 72 horas de incubación.....	53
Figura 28. Análisis de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de PAs mediante RT-PCR semi-cuantitativo.....	55
Figura 29. Expresión relativa de los genes involucrados en la biosíntesis de poliaminas durante el apareamiento de <i>S. reilianum</i> bajo la adición de Put exógena a diferentes concentraciones (0.1, 5, 10 mM) en MM pH 7 48 h. Los datos se graficaron con el software ORIGIN. ....	56
Figura 30. PCR usando DNA de planta de maíz infectada por <i>S. reilianum</i> .....	58
Figura 31. Cassette de interrupción <i>Srodc</i> con el gen de selección HPH.....	59
Figura 32. Plásmido pJET que contiene el cassette <i>Srodc</i> .....	59
Figura 33. Evento de transformación con el protocolo I en DCMS .....	60
Figura 34. Evento de transformación con el protocolo II en medio RegAg .....	61
Figura 36. Escrutinio molecular de la posible mutante cepa 1207 con los oligonucleótidos que amplifican para el las regiones 5' y 3' no codificante de ODC más una región del gen HPH.....	63
Figura 35. Escrutinio molecular de la posible mutante cepa 1207 con los oligonucleótidos que amplifican para el ORF de SrODC .....	64
Figura 37. Pruebas de auxotrofia en transformantes de la cepa 1207 en MM pH 7 48 h de incubación a 26° C.....	65

Figura 38. Loci del gen *ODC* en la región genómica de distintas especies de basidiomicetos .....67

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos y especificaciones de los amplicones .....28

Tabla 2. Identificación *in silico* de los genes involucrados en la vía de biosíntesis de poliaminas en *S. reilianum*.....33

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
ADC	Arginina descarboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARG	Arginasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Az	Antizima
Azi	Inhibidor de la antizima
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
f. sp.	Forma especial ( <i>forma specialis</i> )
Dpi	Días post infección
g, mg, µg, ng	gramo, miligramo, microgramo, nanogramo
h, min, s	Hora(s), minuto(s), segundo(s)
L, mL, µL	Litros, mililitro, microlitros
M, mM	Molar, milimolar
MC	Medio Completo
MM	Medio Mínimo
mm, µm	Milímetro, micrómetro
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ODC	Ornitina descarboxilasa
ORF	Marco abierto de lectura (Open Reading Frame)
PA	Poliaminas
PAO	Poliamina oxidasa

Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Put	Putrescina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa
SAM	S-adenosilmetionina
SAMs	S-adenosilmetionina sintetasa
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
Sol'n	Solución
Sp	Especie ( <i>specie</i> )
Spe	Espermidina
Spds/Sch	Espermidina sintasa/Sacaropina deshidrogenasa
Spm	Espermina
T <sub>a</sub>	Temperatura ambiente
TH	Temperatura de hibridación
WT	Cepa silvestre (Wild Type)

## **I. INTRODUCCIÓN**

*Sporisorium reilianum* es un hongo basidiomiceto fitopatógeno perteneciente a los Ustilaginales también conocidos como carbones o tizones, estos son patógenos de las gramíneas provocando grandes pérdidas del cultivo. Una de las características de los basidiomicetos es la producción de 4 basidiosporas haploides a partir de una telioespora, las cuales se aparearán con una basidiospora sexualmente compatible para formar una hifa dicariótica (2n) la cual le permitirá al hongo ingresar a la planta e infectarla (Ghareeb et al., 2019a; Martinez et al., 1999). *S. reilianum*, junto con *Ustilago maydis*, otro basidiomiceto perteneciente a los Ustilaginales, han tomado una gran relevancia en campo de la biotecnología y biología molecular al ser modelos de estudio muy versátiles y de corto ciclo de vida, además de apoyar en el estudio fitológico (Schirawski et al., 2021).

Dentro de los procesos y moléculas estudiadas en estos modelos se encuentran las poliaminas, las cuales son moléculas alifáticas con carga positiva a pH fisiológico debido a sus grupos amino. Se ha observado que estas moléculas juegan un papel importante en varios procesos ya sean celulares, diferenciativos, interacciones con moléculas de carga negativa como el ADN, ARN y algunas proteínas, así como en los procesos de apareamiento y virulencia (Valdés-Santiago, et al., 2012a; Valdés-Santiago, et al., 2012b).

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 Hongos fitopatógenos**

Los hongos son organismos eucariontes heterótrofos de importancia ecológica, comprenden el segundo lugar de organismos vivos en la tierra, no contiene clorofila, su pared celular está compuesta principalmente por glucanos y quitina, su reproducción puede ser asexual o sexual, algunos pueden presentarse de manera unicelular (levaduras) o multicelular (hifa y micelio) y se les conoce como los “degradadores” de materia orgánica. Dentro del estudio fitosanitario se pueden clasificar en patógenos y no patógenos. Los hongos patógenos de plantas o fitopatógenos son aquellos que infectan a las plantas de importancia agrícola

menoscabando el umbral económico. Los hongos fitopatógenos representan pérdidas económicas y de cultivo en la industria agrícola, e incluso algunos llegan a representar un riesgo de salud humana debido a las micotoxinas que producen a causa de que contaminan los alimentos (Merényi et al., 2023; Salvatore & Andolfi, 2021; Richards et al., 2017).

Alrededor del 85% de las enfermedades en plantas son causadas por hongos, se sabe que aproximadamente de 10,000 especies de las más de 100,000 conocidas son causantes de estas infecciones llegando a afectar a más de 10,000 especies de plantas (Chandrasekaran et al., 2016; Kumar et al., 2016). Los hongos fitopatógenos se pueden clasificar en necrótrofos, que son los que matan al hospedero y se alimentan de la planta ya muerta; y los biotrófos, los cuales se desarrollan en el tejido vegetal vivo sin llegar a causar la muerte del hospedero (Sodikov et al., 2022; Doehlemann et al., 2017).

La infección comienza cuando el hongo penetra las células de la planta vía apresorios, los cuales son estructuras diferenciadas y especializadas en romper la pared celular vegetal por acción de varias enzimas y fuerza física que produce el fitopatógeno para lograr ingresar al interior del hospedero (Ryder et al., 2022). Para penetrar esta barrera, los fitopatógenos secretan enzimas degradadoras de pared celular (CWDEs por sus siglas en inglés) y enzimas activadoras de carbohidratos (CAZymes), siendo estas enzimas factores de infección importantes al momento de atacar al hospedero (Rafiei et al., 2021). Una vez que el hongo llega a colonizar la planta, puede usar un amplio arsenal de metabolitos secundarios que le permitirán invadir al hospedero para así completar su ciclo de vida. Algunas de las herramientas que usan los hongos fitopatógenos son: proteínas efectoras, las cuales son moléculas que interactúan entre el patógeno y el hospedero para suprimir el sistema inmune de la planta, permitiendo que el hongo colonice exitosamente a ésta; toxinas, las cuales detienen el crecimiento vegetal, dañando y destruyendo los tejidos; y reguladores de crecimiento, los cuales perturban el nivel hormonal de la planta debilitando su sistema inmune, por ejemplo, auxinas,

citocinas, o el ácido jasmónico (Seong & Krasileva, 2023; Sodikov et al., 2022; Cimmino et al., 2014).

Algunos de los fitopatógenos más estudiados son: los Magnoporthales, dentro los cuales se encuentra *Magnaporthe oryzae* conocido como la quema o tizón del arroz, representando la mayor amenaza a los cultivos de arroz en el mundo; los Heliotales los cuales contiene a varios de los principales fitopatógenos más agresivos, dentro los cuales se encuentra *Botrytis cinerea*, conocido como podredumbre noble o de la vid, este hongo afecta principalmente a los cultivo vinícolas representando una amenaza económica; algunos Hypocreales, dentro de los cuales encontramos a *Fusarium sp.* afectando a varias especies de importancia en el sector agrícola como las gramíneas, provocando pérdida de los cultivos, algunas especies son patógenos de humanos y puede resultar en casos de contaminación alimentaria; y los Ustilaginales, conocidos en el sector agrícola como carbones, dentro de los cuales se encuentra a *Ustilago maydis*, conocido como carbón del maíz o huitlacoche, causando tumores en la mazorca del maíz, considerándosele en algunas arte del mundo como una plaga mientras que en México es considerado como parte valiosa de la gastronomía nacional dándole un valor agregado a los cultivos infectados por este hongo, es también uno de los modelos fúngicos más conocidos y estudiados, y a *S. reilianum*, conocido como carbón de la espiga, a diferencia de *U. maydis*, éste provoca pérdida total de la mazorca debido a que las telioesporas sustituyen a los granos del maíz (Bi et al., 2023; Devanna et al., 2022; Ferris & Walbot, 2021; Seepe et al., 2021).

El estudio de los hongos fitopatógenos y la identificación de vías metabólicas fundamentales implicadas en los procesos de desarrollo celular nos permite entender de mejor manera las enfermedades agrícolas provocadas por éstos y nos permite diseñar estrategias que permitan su control (Peng et al., 2021).

### **2.1.1 Los Ustilaginales**

Los ustilaginales, también conocidos como tizones o carbones, son hongos basidiomicetos cosmopolitas que afectan principalmente a los cultivos agrícolas,

aunque se ha llegado a reportar casos donde infectan humanos (Sugita et al., 2003; Hu et al., 2021). Pertenecen a la clase Ustilaginomycetes, subclase Ustilaginomycetidae, se caracterizan por producir esporas especializadas (telioesporas) de color marrón (Astiz-Gassó, 2017). La mayoría cuentan con una *forma specialis* (*f sp.*), que es específica de un hospedero, por ejemplo, *Sporisorium reilianum* cuenta con dos *f sp.*, una específica para el maíz (*Zea mays* [SRZ]) y otra específica para el sorgo (*Sorghum bicolor* [SRS]) (Li et al., 2017; Zuther et al., 2012).

Uno de los ustilaginales más conocidos es *U. maydis* el cual tiene una alta importancia biocultural en México y es uno de los modelos fitopatógenos más ampliamente estudiados. *U. maydis* provoca tumores marrones en la mazorca sustituyendo a los granos de maíz, es considerado una enfermedad a nivel mundial, a excepción de México, donde se le considera una *delicatessen* y le da valor agregado al maíz portador del hongo (León-Ramírez et al., 2014). *U. maydis* y *S. reilianum* pertenecen a la misma familia y se les considera filogenéticamente cercanos, por lo que en este trabajo se tomó en consideración importante los trabajos realizados en *U. maydis* como guía para trabajar con *S. reilianum* (Storfie & Saville, 2021).

## **2.2 Generalidades de *Sporisorium reilianum***

*Sporisorium reilianum* es un hongo basidiomiceto biotrófico dimórfico descrito en norteamérica en 1906 por G. P. Clinton (Clinton, 1902). Este hongo produce una enfermedad en zonas de agricultura extensiva de maíz. Se sugiere que la especie que infecta al maíz pudo haber derivado de la forma que infecta al sorgo (Poloni & Schirawski, 2016).

La enfermedad producida por *S. reilianum* es conocida como “carbón de la espiga”. En México es un problema de interés agrícola debido a las pérdidas de cultivo y económicas que conlleva (CESAVEM, 2015). El proceso de infección comienza cuando la temperatura y humedad son óptimas para la germinación de las

telioesporas diploides ( $2n$ ) uninucleadas que se pueden encontrar en el suelo, posteriormente dan lugar a una estructura conocida como promicelio, que por medio de la cariogamia da lugar a cuatro basidioesporas haploides ( $n$ ) de distinta compatibilidad sexual, esto es lo que se le considera como la fase saprofítica con reproducción por gemación, su morfología se ha descrito como “lemon-shape” (forma de limón) en su estadio esporídico haploide; posteriormente la germinación continúa vía mesocotilo ó vía raíz donde dos basidioesporas sexualmente compatibles se fusionan para dar lugar a las hifas dicarióticas ( $n+n$ ) infecciosas que son capaces de penetrar a la planta vía una estructura especializada denominada apresorio la cual se forma en la punta de la hifa, la infección del tejido es progresiva mediante su sistema vascular y la presencia del micelio fúngico se observa en el tejido de la planta (Dittiger et al., 2023).

La infección no es evidente hasta la etapa de floración, mientras tanto se pueden observar manchas cloróticas e incluso acumulación de antocianinas en los tallos u hojas de la planta, los cuales pueden ser confundidos con síntomas de desnutrición o alguna otra enfermedad. Una vez florecida la planta, esta enfermedad se distingue por las masas carbonosas de esporas llamadas soro que sustituyen el desarrollo del polen y de los granos volviendo inutilizable a la mazorca del maíz y a sus espigas (Radwan et al., 2019). Las telioesporas son esparcidas al suelo y a otros cultivos sanos mediante diversos métodos de dispersión (aire, lluvia, actividad humana o animal) continuando así el ciclo de vida (**Fig. 1**) (Márquez-Licon et al., 2021; Sánchez-Pale et al., 2017).

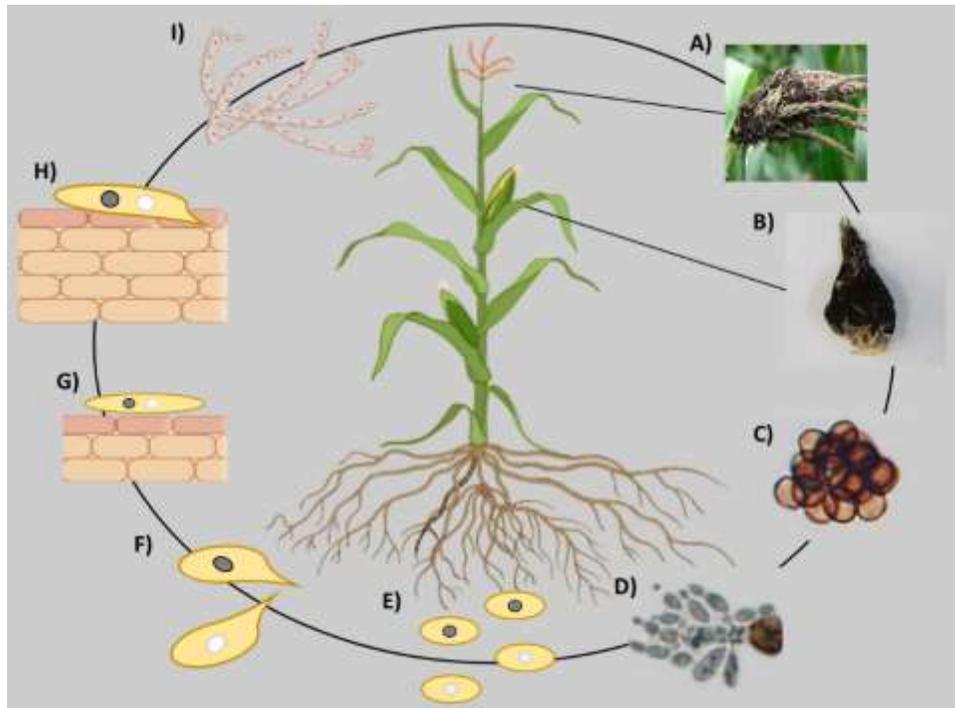


Figura 1. Ciclo de vida del basidiomiceto *S. reilianum* y su proceso infeccioso en *Zea mays*. A) Espiga del maíz infectada con telioesporas de *S. reilianum* (Cesavem, 2015). B) Mazorca de maíz infectada con telioesporas de *S. reilianum* (Cortesía de Cervantes-Chávez). C) Telioesporas de *S. reilianum* (Márquez-Licona, 2018). D) Basidioesporas (Márquez-Licona, 2018). E) Representación de las 4 basidioesporas. Cada núcleo de color representa un sexo distinto. Gris a1b1, blanco a2b2. F) Representación del apareamiento de dos esporas sexualmente compatibles formando los tubos de conjugación. G) Representación de la hifa dicariótica (amarillo) y la raíz vegetal (naranja). H) Penetración de la raíz vegetal vía apresorio. I) Proliferación de las hifas dicarióticas infecciosas por la planta.

*S. reilianum* posee características especiales que lo hacen un modelo de estudio apto para diferentes fenómenos que involucran la investigación sobre fitopatogenicidad, así también como los mecanismos moleculares que esto implica, gracias a su relativamente pequeño genoma, corto ciclo de vida, fácil manipulación en el laboratorio, diferentes estilos de vida tales como saprobiótico o patogénico,

diferentes morfologías: levaduriforme o micelio. Con su genoma secuenciado y también con la disponibilidad de los genomas de sus hospederos (maíz y sorgo), *S. reilianum* es un modelo de estudio ideal para la interacción hongo-hospedero a un nivel molecular (Schirawski et al., 2010; Schnable et al., 2009). Su genoma se organiza en 23 cromosomas, con un tamaño de 18,476,874 pares de bases con 6,673 genes codificantes, 230 genes no codificantes y 8 pseudogenes (EnsemblFungi, European Nucleotide Archive, 2024).

En los basidiomicetos la meiosis ocurre en células especializadas que son los basidios resultando en la formación de esporas (basidioesporas). La fusión de las células haploides sucede cuando se aparean en respuesta a señales químicas (feromonas) y posteriormente ocurre la formación del micelio dicariótico. *S. reilianum* tiene reproducción sexual, permitiéndole al hongo tener ciertas ventajas sobre la reproducción asexual generando variación genética que le permita adaptarse a su entorno, incrementando la eficiencia de su selección natural perdiendo alelos, genes y factores de virulencia que no le benefician (Ghareeb et al., 2015). Los genes de apareamiento permiten que los núcleos de individuos genéticamente compatible se fusionen dando lugar al núcleo dicariótico que experimentará la meiosis antes de la formación de las esporas sexuales y posterior ocurre la formación del micelio diploide (Poloni & Schirawski, 2016).

Francisco-Ramírez et al. (2011) realizaron una caracterización del comportamiento espacial de *S. reilianum* en el Estado de México, y observaron que el hongo no cuenta con una distribución uniforme en el área de cultivo, sino aleatoria y que existe la probabilidad de que este hongo haya llegado a las localidades mediante material contaminado, principalmente siendo los híbridos comerciales, cabe mencionar que el maíz nativo cuenta con mayor resistencia a este patógeno (Márquez-Licona et al., 2020). Hasta el momento no se han realizado más estudios sobre la caracterización espacial de *S. reilianum* en cultivos agrícolas en México.

### 2.2.1 Reproducción y ciclo de vida

Los genes de apareamiento aseguran que los núcleos de individuos genéticamente compatible se fusionen dando lugar al núcleo diploide que experimentará la meiosis antes de la formación de las esporas sexuales. En basidiomicetos filamentosos, la reproducción comienza con la fusión hifal en esporidias sexualmente compatibles regulados por genes de apareamiento (Raudaskoski, 2015). La mayoría de los basidiomicetos cuentan con un sistema de apareamiento tetrapolar conservado, es decir que existen dos alelos con 4 combinaciones para poder aparearse siendo codificados por el gen *MAT* (David-Palma et al., 2016). Estos hongos son generalmente heterotálicos (que se autofertilizan) y poseen genes sexuales multialélicos. El apareamiento está determinado por dos *loci* conocidos como *a* y *b*. Para el apareamiento, ambas esporidias deberán tener alelos en genes de ambos *loci*, por ejemplo, en *S. reilianum* sería  $a1b1 \times a2b2$ . Se les conoce también como tetrapolares ya que a consecuencia de la meiosis surgen cuatro distintas basidiosporas (promicelio). En su forma asexual, que se encuentra como esporidias unicelulares haploides, son saprobias. Cuando se encuentran esporidias sexualmente compatibles ( $a1b1 \times a2b2$ ) comienza el apareamiento con los tubos de conjugación que son filamentos largos que se fusionan por los extremos, a partir de esta fusión surgen las hifas dicarióticas patógenas que infectan a la planta del maíz (**Fig. 2**) (David-Palma, 2017; Schirawski et al., 2005).



Figura 2. Apareamientos en *S. reilianum*. A) células no apareadas. B) Células con su hifa de conjugación. C) Células apareadas. Tomado de Schirawski et al. (2005).

El apareamiento en *S. reilianum* es un proceso sumamente importante en su capacidad de virulencia, ya que, si no es capaz de llevar a cabo este proceso, no se produce la hifa dicariótica, la cual es la única estructura celular que penetra a la planta vía el apresorio para así infectar a su hospedero produciendo los la sintomatología y en casos más extremos, la pérdida del cultivo (Storfie & Saville, 2021).

### 2.2.2 Infección en las plantas de maíz

*S. reilianum* es capaz de alterar la programación genética de la floración de la planta dando en su lugar al desarrollo de órganos vegetativos, en este caso da lugar a la condición conocida como filodia causando perdida de la dominancia apical, afectaciones a las inflorescencias, clorosis y producción de antocianinas como respuesta al estrés (**Fig. 3**) (Ghareeb et al., 2019).

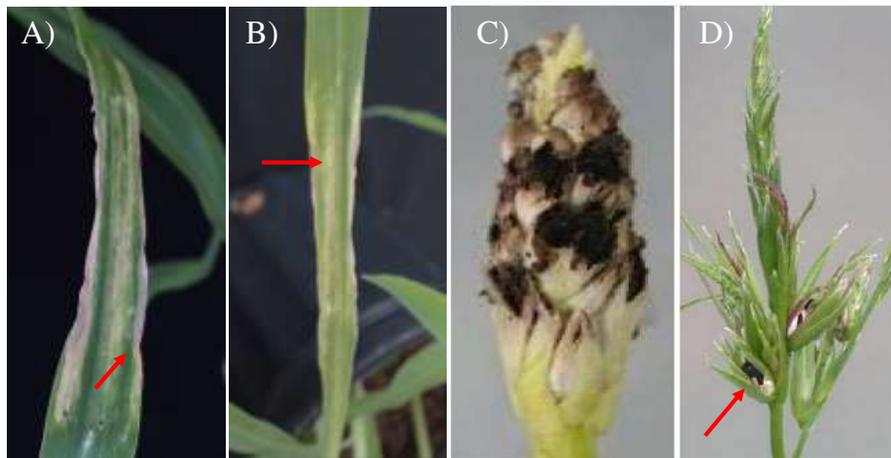


Figura 3. Síntomas por infección de *S. reilinaum* en *Z. mays*. A) Producción de antocianinas (flecha roja). B) Manchas cloróticas (flecha roja) Fotos propias. C) Mazorca con enanismo y telioesporas. D) Espiga con telioesporas (flecha roja). Tomado de Ghareeb et al. (2011).

A diferencia de *U. maydis*, *S. reilianum* solo es capaz de infectar a la planta del maíz a través de las raíces por medio de las hifas dicarióticas parasitarias mientras que *U. maydis* solo penetra la planta vía aérea. Se sabe que los ustilaginales son

dimórficos, Martínez et al. (2000) realizaron experimentos donde infectaron raíces de plantas de maíz con *S. reilianum* donde observaron cambios morfológicos, aumento y disminución del grueso de la pared celular dependiendo de en qué parte de la estructura vegetal se encontraba el hongo, y ambos estadíos dimórficos de *S. reilianum* alrededor de las raíces.

### **2.3 Morfogénesis y diferenciación celular en hongos**

La morfogénesis es el proceso mediante el cual los hongos desarrollan su forma y estructura produciendo esporas, hifas o micelio. Este proceso es altamente regulado e influenciado por diversos factores como la disponibilidad de nutrientes, temperatura, humedad, estrés e interacción con su entorno. Estos cambios morfológicos son fundamentales para la adaptación y supervivencia del hongo a su entorno, así como en su capacidad de patogenicidad y virulencia. Durante el ciclo de vida el hongo desarrolla diversos morfotipos los cuales pueden ir desde esporas, levadura, hifas, pseudohifas, micelios, apresorio, conidios y esclerocios (**Fig. 4**), así como también se puede realizar la distinción entre hongos dimórficos y no dimórficos (Gnat et al., 2021; Trevijano-Contador et al., 2016). Las partes de la morfogénesis y diferenciación celular se han dividido en tres estadios importantes facilitando su estudio y comprensión; el crecimiento polar (ruptura de la simetría celular); estabilización del eje polar; y despolarización (formación de la morfología celular) (Pérez-Martín & di Pietro, 2012).

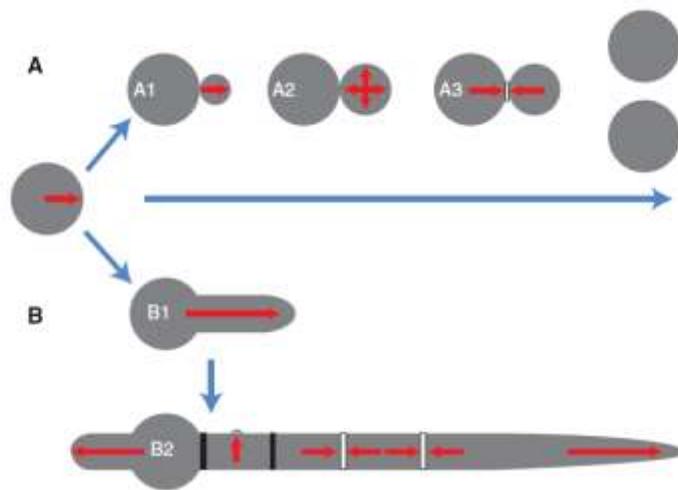


Figura 4. Representación de distintos cambios morfológicos presentados en hongos. A1) Crecimiento polar. A2) División nuclear. A3) Separación celular. B1) Crecimiento polar por extensión apical (hifa). B2) Estructura secundaria presentada en hongos filamentosos formada por varias hifas. Tomado de Lin et al. (2015).

Se han identificado algunos de los factores moleculares que intervienen en la morfogénesis y diferenciación celular en hongos. En la regulación de la formación de la hifa dicariótica en *U. maydis*, *S. reilianum* y algunos otros ustilaginales, están los reguladores transcripcionales bE y bW, estos son proteínas que conforman un heterodímero dando inicio al desarrollo patogénico en estos hongos (Heimel et al., 2010; Schirawski et al., 2005). Para la formación del filamento infectivo se da el fenómeno del crecimiento hiperpolarizado (**Fig 4B1**) en *U. maydis* se ha identificado que este fenómeno depende de la proteína Rac1 regulado por el factor GEF Cdc24 y BEM1; otro elemento que participa en la regulación y mantenimiento de la polaridad es el Spitzenkörper (Schmitz et al., 2019; Fisher & Roberson, 2016).

En hongos basidiomicetos, la morfogénesis es indispensable para la formación de las hifas que se convertirán en la hifa dicariótica infecciosa, así como de la estructura que le permitirá ingresar a la planta la cual es el apresorio. Por ejemplo, en *S. reilianum* se requiere de los siguientes cambios para que se dé la infección en el hospedero: basidioespora – hifa dicariótica – apresorio – telioespora; en *U. maydis*,

la infección se da únicamente cuando se llega a la fase de hifa después del apareamiento (Wang & Lin, 2012). Por lo tanto, la diferenciación celular y morfogénesis es clave para la capacidad de patogenicidad en hongos, así como una fuerte influencia sobre su virulencia (Wangsanut & Pongpom, 2022).

## 2.4 Las poliaminas

Las poliaminas (PA) son compuestos ubicuos con carga positiva a pH fisiológico distribuidas tanto en organismos eucariotas como en procariontes. Cumplen roles importantes en distintos procesos celulares tales como crecimiento, diferenciación celular, adaptación, entre otros, y constituyen los mayores policationes en la célula junto con el catión  $Mg^{2+}$  (Nandy et al., 2022; Igarashi & Kashiwagi, 2010). Las principales poliaminas que se encuentran en los organismos vivos son putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm), en hongos su vía de síntesis y metabolismo ha sido ampliamente estudiado (Yan et al., 2021). En algunos organismos se han observado presencia de otras poliaminas tales como 1,3-diaminopropano (Dap), cadaverina (Cad), thermoesperina (T-Spm), noespermina (Nor-Spm) y noespermidina (Nor-Spd), poliaminas ramificadas y de cadena larga, formas conjugadas y derivados acetilados de estas (Alkhzem et al., 2022; Eshtukova-Shcheglova et al., 2022; Zhou et al., 2020).

Se han reportado dos vías de síntesis en hongos: la vía de la arginina (ARG) que pasa a agmatina vía arginina descarboxilasa (ADC), que pasa a putrescina vía agmatinasa (AGMAT), y la otra vía que involucra a la ornitina que pasa a putrescina vía ornitina descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.17) para continuar con la biosíntesis de las poliaminas consecutivas, la putrescina pasa a espermidina vía espermidina sintasa (SPDS; EC 2.5.1.16) gracias a la adición de un grupo aminopropil que es proporcionado por la *S*-adenosilmetionina descarboxilada (dSAM), esta se crea a partir de la *S*-adenosilmetionina (SAM) gracias a la SAM descarboxilasa (SAMDC; EC 4.1.1.50), la espermidina es convertida a espermina vía espermina sintasa (SPMS; 2.5.1.22) la cual sigue el mismo proceso de agregación de un grupo aminopropil descrito anteriormente (**Fig. 5**) (Valdés-Santiago et al., 2012b). Todos

los seres vivos cuentan con una poza de poliaminas, es decir, una reserva que se va utilizando cuando exista un déficit de éstas en el medio. El catabolismo de PAs es esencial para mantener su homeóstasis, conocido también como retroconversión, esta se lleva a cabo mediante la Poliamina oxidasa (PAO) que requiere de FAD como cofactor, este se lleva a cabo mediante las enzimas espermina N<sup>1</sup>-acetil transferasa y espermina N<sup>1</sup>-acetil transferasa (SSAT) las cuales acetilan usando acetil-CoA como donador del grupo acetilo, dando lugar al intermediario N<sup>1</sup>-acetilespermina/espermidina la cual es convertida a la poliamina anterior en la vía gracias a la PAO, esta reacción produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocando un estrés oxidativo en la célula (Rocha & Wilson, 2019; Vilas et al., 2018).

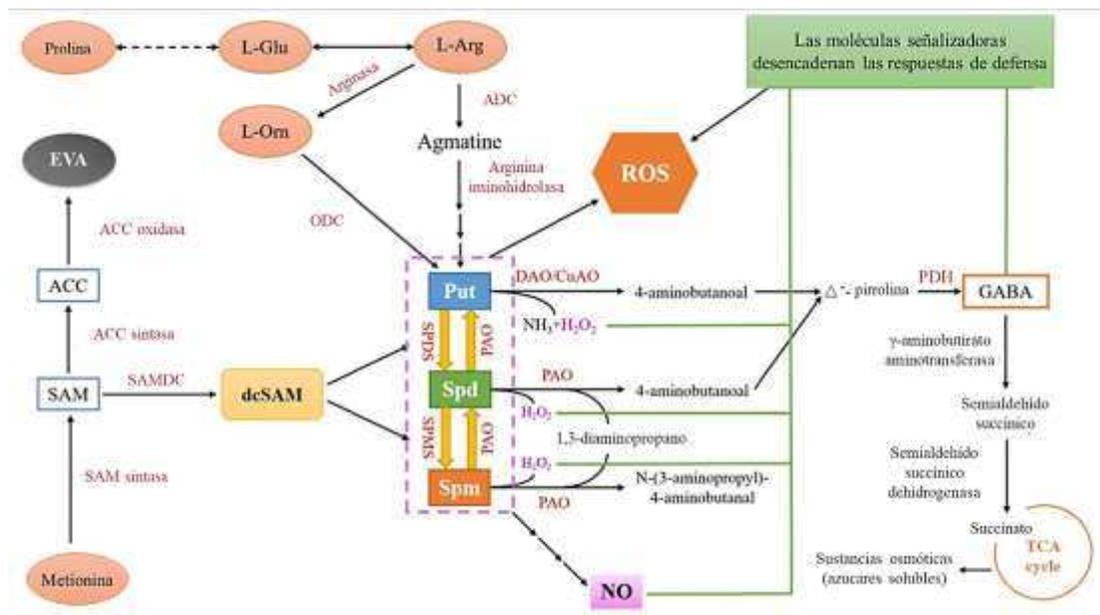


Fig. 5. Vía de la biosíntesis de las poliaminas. Modificado de Liang et al. (2022).

La vía de la ADC sólo ha sido descrita en un pequeño grupo de hongos siendo principalmente los pertenecientes a los ascomicetos, tales como *Gigaspora rosea*, *Verticillium dahliae*, *Ceratocystis minor*, y *Panis tigrinus*, así como también esta vía de biosíntesis principal en plantas y en la mayoría de los eucariotas. En el caso de *S. reilianum* hasta el momento no se ha reportado esta vía de síntesis de poliaminas (Schaefer et al., 2020; Khatri & Rajam, 2007; Sannazzaro et al., 2004).

### 2.4.1 Funciones de las poliaminas

Se ha demostrado que las PA son vitales para la fitopatogénesis de hongos, tal como en el crecimiento celular, dimorfismo y morfogénesis. En los siguientes sistemas se ha comprobado que juegan un papel esencial en la producción de micotoxinas en *Aspergillus nidulans* (Jin et al., 2002); en la formación del apresorio y su turgencia en *Maganaporthe oryzae* (Rocha et al., 2020); participan en la virulencia, crecimiento y dimorfismo en *U. maydis* (Valdés-Santiago et al., 2009); y en la germinación de telioesporas en *Sporisorium scitamineum* (Sánchez-Elordi et al., 2019). Otro ejemplo es en el trabajo de Dorighetto-Cogo et al. (2018) donde observaron que distintas concentraciones de Spm mayores a 1.5 mM en *Yarrowia lipolytica* reducen el crecimiento celular y provocan una morfología anormal en las células, mientras que concentraciones entre 0.75 y 1.5 mM potencian la transición dimórfica con la concentración más efectiva en 1 mM, demostrando que Spm es necesaria para llevar a cabo la este proceso, así como en *U. maydis*. Igualmente se ha encontrado que las PAs tienen una función en la respuesta al estrés oxidativo inhibiendo las enzimas generadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) o cumpliendo un papel en la transducción de señales para promover mecanismos antioxidantes (Fountain et al., 2019).

Otras funciones que cumplen las PAs en la célula son: la Put se oxida mediante la Putrescina oxidasa (PO) y se produce 4-aminobutanal, el cual forma  $\Delta^1$ -pirrolina que puede ser fácilmente convertido al metabolito ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), el cual tiene un papel importante debido a que es la fuente del succinato para el ciclo del Krebs, regulando así la producción de energía en la célula y también del metabolismo del nitrógeno (Nandy et al., 2022). Spd funge como sustrato para la modificación de la hipusina en el factor de iniciación de la traducción 5a (eIF5A). La deoxipusina sintetasa (DHS) cataliza el anclaje de la espermidina y la transferencia del 4-aminobutil al grupo  $\epsilon$ -amino en un residuo de lisina en el precursor del eIF5A, dando lugar al intermediario deoxipusina que se convierte a hipusina vía deoxipusina hidroxilasa (DOHH) activando así al factor de traducción eIF5A, siendo

el metabolismo de la Spd vía eIF5A un importante mediador en la interacción hongo-planta (Rocha & Wilson, 2019; Martinez-Rocha et al., 2016).

#### 2.4.2 Influencia de las poliaminas en los procesos diferenciativos

La diferenciación celular es un proceso mediante el cual las células de un organismo se especializan, por ejemplo, el dimorfismo, que es la capacidad de un hongo de crecer tanto como levadura como micelio, se considera un proceso diferenciativo; así como la formación del apresorio, estructura que le permite al hongo en su forma patogénica ingresar al hospedero cruzando la pared celular vegetal (Marroquin-Guzman et al., 2017; Ruiz-Herrera, 1994; Xiao et al., 1994). Guevara-Olvera et al. (1997) observaron alteraciones en el proceso diferenciativo de dimorfismo en mutantes nulas para el gen *odc* en *U. maydis*. Las mutantes *odc*-no pasan del estadio levaduriforme a la forma de micelio después de 12 horas de incubación a comparación de las cepas silvestres, este efecto se revirtió agregando PA exógenas. Rocha et al. (2020) obtuvieron mutantes nulas para el gen *sps* en *M. oryzae*, en estas mutantes observaron alteraciones en la formación del apresorio, la turgencia de esta estructura, y una disminución en la virulencia, posterior obtuvieron cepas complementarias a *sps* y observaron que se revirtieron las alteraciones en las mutantes *sps*-, concluyendo así, que las PAs cumplen con un papel importante en los procesos diferenciativos de los hongos, tal como en el caso del apresorio, estructura fundamental para la patogenicidad del hongo (**Fig. 6**).

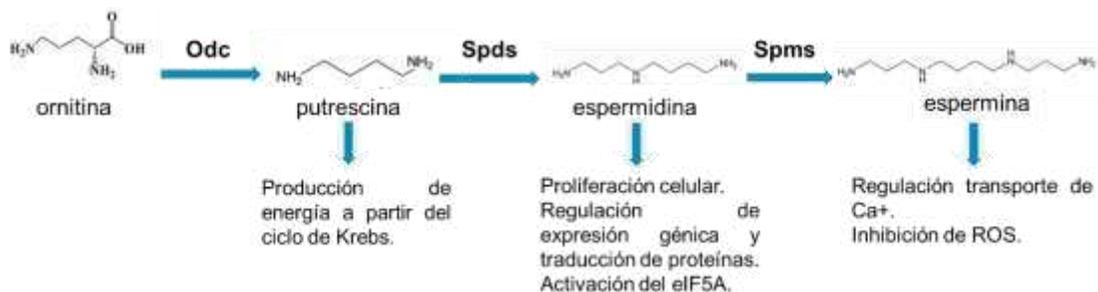


Fig. 6. Algunos de los roles principales de las PA en los procesos celulares. Modificado de Rocha & Wilson (2019).

## 2.5 Enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas en hongos

### 2.5.1 Ornitina descarboxilasa

La ornitina descarboxilasa (ODC) es una enzima que cataliza la descarboxilación de la L-ornitina para dar lugar a la primera poliamina que es la putrescina. Esta enzima forma un homodímero con dos dominios, cada dominio cuenta con un sitio catalítico donde se une el cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP) para llevar a cabo la reacción de descarboxilación y dar lugar a la síntesis *de novo* de las poliaminas (**Fig. 7**).

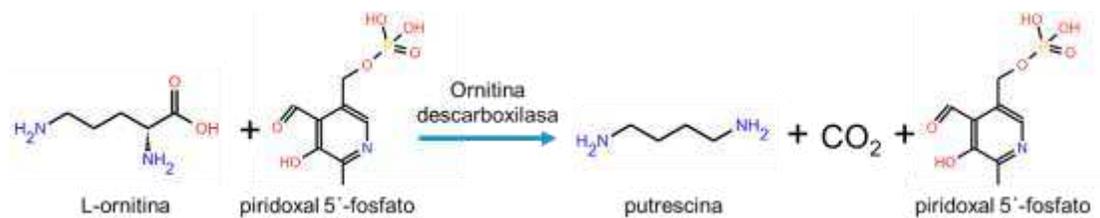


Figura 7. Mecanismo de descarboxilación de la L-ornitina por medio de la enzima ornitina descarboxilasa PLP dependiente para dar lugar a la poliamina putrescina. Modificado de Alcázar & Tiburcio (2018).

Esta es la enzima limitante para la síntesis de PAs y es regulada a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (Almrud et al., 2000). Esta enzima para que sea funcional debe de conformarse el homodímero correctamente. Se han encontrado reminiscencias entre la estructura cristalina de la ODC humana con la fúngica teniendo propiedades regulatorias y moleculares similares. Esta enzima es regulada por la antizima, su mecanismo se discutirá más adelante en la regulación de PAs en la célula (El-Sayed et al., 2019).

En el metabolismo de PAs de hongos esta enzima es de las más estudiadas, y es la primera involucrada en la biosíntesis de PAs, Fonzi (1989) estudió el efecto de las PAs en la actividad de la ODC mediante una mutante nula de *spe1* en *Saccharomyces cerevisiae* concluyendo que en este modelo de estudio las PAs modulan la expresión de esta enzima de manera postraduccional antes de que ODC

llegué a su forma activa. Guevara-Olvera et al. (1997) obtuvieron mutantes nulas para *odc* en *Ustilago maydis*, observando que las mutantes eran auxótrofas a Put, incapaces de llevar a cabo procesos básicos tales como el crecimiento dimórfico o el apareamiento. Hernández-Rojas & Cervantes-Chávez (2020) realizaron un alineamiento múltiple de varias secuencias de ODC observando que todas contienen sitios conservados y residuos de aminoácidos clave para la unión de la ornitina y el sitio catalítico necesario para el funcionamiento de ODC. Encontraron además una similitud del 88.27% entre la secuencia de ODC de *S. reilianum* y *U. maydis*.

Esta enzima presenta importancia medica también. Se han realizado múltiples estudios donde se interrumpe o se limita la actividad de la ODC observando una disminución de células tumorales proponiendo que la interrupción de esta enzima puede ser una futura terapia alternativa ante algunos tipos de cánceres (Geck et al., 2020; Dai et al., 2017; Kim et al., 2017; Xu et al., 2015).

### **2.5.2 Espermidina/espermina-*N*<sup>1</sup>-acetiltransferasa**

La espermidina/espermina- *N*<sup>1</sup>-acetiltransferasa (SSAT; EC 2.3.1.57) es una enzima reguladora del contenido intracelular de PAs. Esta enzima agrega un grupo acetilo en el último grupo aminopropil de la espermidina/espermina, reduciendo su carga y alterando su función. Este derivado es posteriormente oxidado por PAO generando un *N*-acetilpropanal, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una poliamina más pequeña, dando lugar así a la retroconversión de PAs (**Fig 8**). La actividad y regulación de esta enzima es dependiente de la cantidad de PAs en el medio, entre mayor presencia de PAs, esta es más activa, y está codificada por el gen *Sat* (Pegg, 2008). Hasta el momento, no se han reportado estudios en hongos, más que en modelos mamíferos y humanos.



Figura 8. Retro-conversión de espermina a espermidina vía SSAT y PAO. Modificado de Pegg (2008).

### 2.5.3 Poliamina oxidasa

La poliamina oxidasa (PAO; EC. 1.5.3.17) es una enzima clave en la biosíntesis de PAs ya que ésta participa en la vía de la retroversión, esta vía es necesaria cuando la célula necesita un PA en particular o hay demasiado de una PA intracelular, regulando así la homeóstasis. Esta enzima es dependiente de FAD y cataliza la oxidación de *N*<sup>1</sup>-acetilspermedina para producir *N*-acetil-3-aminopropanolaldehído y putrescina (**Fig. 9**) (Levitz et al., 1990).

Valdés-Santiago et al. (2010) obtuvieron mutantes dobles nulas para los genes *odc/pao* en *U. maydis*, observaron que estas era auxótrofas a Put y Spe, y posterior, lograron aislar mutante nulas para únicamente *pao*, concluyendo que en la naturaleza la reconversión de PAs juega un rol importante en una virulencia e infección exitosa del hongo en su hospedero.

Salvi & Tavladoraki (2020) realizaron análisis filogenéticos *in silico* de 428 secuencias de PAO en eucariontes, desde mamíferos hasta algas, incluyendo a los hongos. Sus resultados arrojaron 4 clados principales (I, II, III, IV). En el clado I se encontraron escasos hongos siendo principalmente ascomicetos, compartiendo lugar con las plantas; en este caso, se observó que PAO se puede encontrar de manera tanto extracelular como intracelular, mientras que en el clado III se ubicaron únicamente hongos, tanto ascomicetos como basidiomicetos, observando claras

diferencias entre estas clases, tales como el número y posiciones de intrones, y una ubicación de PAO únicamente de manera intracelular.

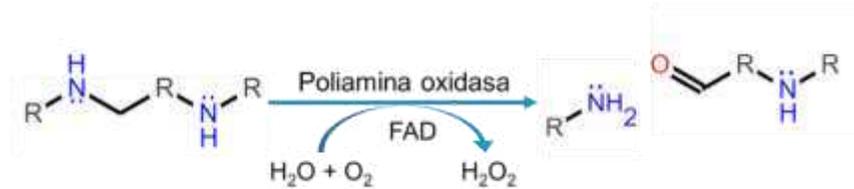


Figura 9. Oxidación de una diamina vía poliamina oxidasa. Modificado de Kaur et al. (2009).

#### 2.5.4 S-adenosil metionina descarboxilasa

La S-adenosil metionina descarboxilasa (SAMdc; EC 4.1.1.50) es una enzima que participa en la biosíntesis de PAs, descarboxilando a la S-adenosil metionina (SAM) para dar lugar a la 5'-desoxi-(5'-),3-aminopropil-(1), la cual dona su grupo n-propilamina para que junto con la Spd/Spm-sintetasa (Spds/Spms) de lugar a la espermina a partir de la putrescina, y a la espermina a partir de la espermidina (**Fig 10**). SAMdc requiere del cofactor piruvato para dar lugar a un enlace covalente del grupo prostético piruvato formando una reacción autocatalítica interna que une a la proenzima convirtiendo un residuo de serina a piruvato. Se identificó el sitio de unión YVLESS, siendo la serina en negritas, en la que se forma el piruvato. La actividad de la SAMdc está dada por la Put, incrementando sus niveles, y por la Spd, la cual reduce los niveles de esta, siendo ésta una enzima limitante en la biosíntesis de Spd y Spm (Li et al., 2023; Davidson, 2018; Tiburcio & Alcázar, 2018; Tassoni et al., 2007).

Valdés-Santiago et al. (2012) obtuvieron mutantes nulas para el gen de la *samdc* en *U. maydis* y observaron que estas mutantes eran incapaces de aparearse, por lo tanto eran completamente avirulentas, siendo más sensibles a estrés iónico a comparación de otras cepas mutantes afectadas en genes involucrados en la síntesis de PAs; observaron también que estas mutantes acumulaban grandes

cantidades de SAM, concluyendo que esta enzima tiene un rol importante en la biosíntesis de PAs y en la regulación celular.

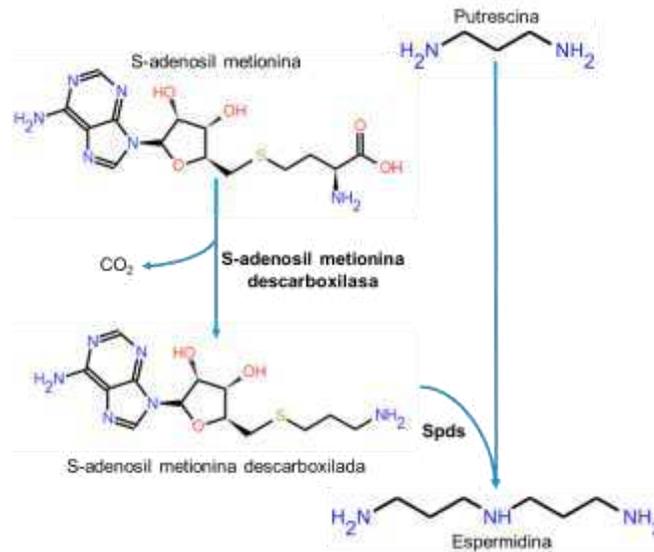


Figura 10. Mecanismo de biosíntesis de PAs donde entra en acción la S-adenosil metionina descarboxilasa. Spds, espermidina sintasa. (Pegg et al., 2011).

## 2.5 Regulación de la síntesis de poliaminas en hongos

La regulación de la síntesis de poliaminas se da gracias a la actividad de la antizima (AZ). La transcripción de esta antizima se da cuando existe un exceso de poliaminas en la célula provocando un cambio +1 en el marco abierto de lectura, la AZ se une a la ODC formando el heterodímero ODC-AZ evitando la formación del homodímero activo de la ODC, desencadenando su degradación por el proteosoma 26S. La presencia de AZ reduce la vida media de la ODC a solo minutos. En hongos solo se ha reportado hasta ahorita una sola antizima (**Fig 11**). Existe una proteína llamada inhibidor de la antizima (AZi), esta tiene una homología con la ODC pero carece de actividad enzimática, se une con mayor afinidad que a la ODC provocando que la actividad inhibitoria de la antizima sea nula (Mangold, 2005). Otro inhibidor de la ODC es la difluorometilornitina (DFMO) siendo este un inhibidor químico suicida irreversible (El-Sayed et al., 2019; Valdés-Santiago & Ruiz-Herrera, 2014; Mangold, 2005).

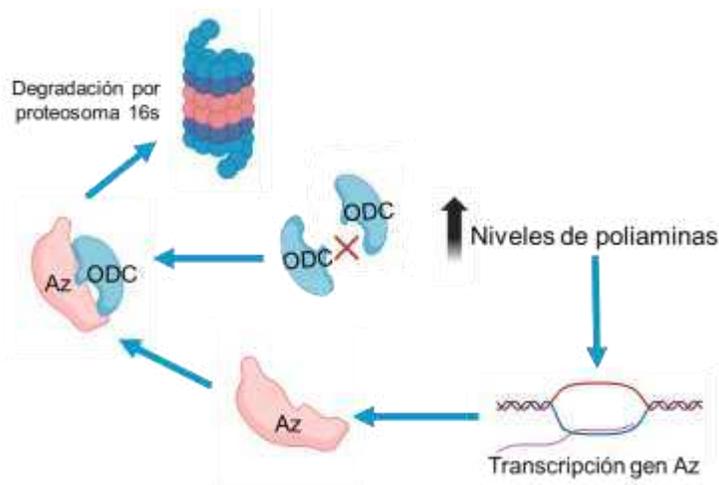


Figura 11. Esquema de la acción inhibitoria de la antizima sobre la ODC en presencia de altos niveles de poliaminas en la célula. Modificado de Valdés-Santiago & Ruiz-Herrera (2016).

## 2.6 Efecto de la interrupción química y genética en la biosíntesis de poliaminas en hongos

Se ha demostrado que mutantes en la ODC son auxótrofos a PAs y no son capaces de llevar a cabo sus funciones celulares de manera adecuada. Guevara-Olvera et al. (1997) obtuvieron mutantes nulas para el gen de la ODC en el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis* y observaron que estas mutantes no fueron capaces de llevar a cabo la transición dimórfica, el apareamiento (reacción de Fuzz negativa) y fueron auxótrofos a putrescina requiriéndose una concentración de por lo menos 5 mM para su crecimiento. Singh et al. (2020) utilizaron la técnica de RNAi y obtuvieron una línea transgénica de plantas de tomate que silencian el gen de la ODC en el hongo *F. oxysporum* observando que las plantas transgénicas infectadas no presentaban sintomatología característica de una infección por *F. oxysporum* ni se encontraba la hifa en el tejido vegetal, demostrando al silenciar el gen de la *odc* disminuía la capacidad virulenta y la presencia del hongo en la planta. Yan et al. (2021) trabajaron con el fitopatógeno *Colletotrichum higginsianum* obteniendo mutantes nulas en el gen de la *odc*, y observaron que estas eran defectuosas al

momento de la formación del apresorio, una disminución de la virulencia, y resultando auxótrofas a Put y Spd, además de afectar otras cascadas de señalización importantes para la función celular. Cuando agregaron Put y Spd en una concentración de 5mM al medio, las mutantes *ChODC*- crecieron de manera normal similar a los controles, demostrando que la eliminación del gen de la *odc* es esencial para la biosíntesis de las PAs y que, a su vez, estas son esenciales para llevar a cabo funciones celulares tales como el crecimiento. Yin et al. (2023) obtuvieron mutantes nulas en *Sporisorium scitamineum* para *odc*-, *samdc*- y la mutante nula doble *odc-samdc*-. Observaron que las mutantes *odc*- y *odc-samdc*- no fueron capaces de formar hifas dicarióticas ni fueron capaces de infectar plantas de caña de azúcar susceptibles, concluyendo que las PAs tienen un papel importante en la capacidad de apareamiento y en la virulencia de *S. scitamineum*.

### **III. HIPÓTESIS**

La adición de putrescina exógena provoca variaciones en la morfología, capacidad de apareamiento y expresión en los genes de *odc*, *pao*, *az* y *samdc* en *Sporisorium reilianum*.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Analizar a nivel bioinformático los genes involucrados en el metabolismo de poliaminas, y determinar el efecto de la adición de putrescina exógena en la morfología, capacidad de apareamiento y expresión de genes involucrados en la vía de síntesis de poliaminas en *Sporisorium reilianum*.

#### **V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar *in silico* y filogenéticamente los genes involucrados en la síntesis de poliaminas: *odc*, *samdc*, *pao* y *az* de la cepa de *S. reilianum* SRZ2.
2. Analizar el efecto de la putrescina exógena en la morfología de *S. reilianum* a pH 3 y a pH 7.
3. Evaluar cambios en la capacidad de apareamiento de *S. reilianum* mediante la adición de distintas concentraciones de putrescina exógena.
4. Determinar el efecto de la adición de distintas concentraciones putrescina exógena en la expresión de los genes *odc*, *az*, *pao*, *samdc*.
5. Caracterizar mutantes nulas afectadas en el gen que codifica la ornitina decarboxilasa (*odc*-) en *S. reilianum*.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Material biológico y condiciones de cultivo**

Se utilizaron las cepas 1206 (a1b1/SRZ1) y 1207 (a2b2/SRZ2) de *Sporisorium reilianum* proporcionadas por el Dr. Jan Schirawski (JSMC, Alemania). Para su reactivación proveniente de crioconservación se propagaron en Medio Completo (MC) sólido por 48 h/28° C.

Para la obtención y almacenamiento de plásmidos se usó *Escherichia coli* Top10 químicamente competentes (CaCl<sub>2</sub>) (Sambrook et al., 2001). Se incubaron en medio LB a 37°C con o sin agitación (120 rpm) durante 24 h.

### **6.2 Análisis *in silico* de los genes involucrados en la biosíntesis de poliaminas en *Sporisorium reilianum***

Se descargaron las secuencias de los genes relacionados con la síntesis de poliaminas de la base de datos EnsemblFungi (<https://fungi.ensembl.org/index.html>). Las secuencias se alinearon en el programa Mesquite (ver. 3.81). Para la construcción de los árboles filogenéticos se usó el programa Mr. Bayes (v.3.1.2) usando el método de inferencia bayesiana en filogenias. Se usaron *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* como grupo externo.

### **6.3 Ensayos de apareamiento con adición de putrescina exógena**

Se siguió el protocolo establecido por Cervantes-Chávez et al. (2011) y Schirawski et al. (2005) con algunas modificaciones, se utilizó carbenicilina (100 mg/mL, 1 µl/mL de medio). Para activar las cepas 1206 y 1207 conservadas a -80°, se sembraron en MC con carbenicilina (Cb) durante 48h/28°C, se tomó una colonia con un palillo de madera y se preparó el preinóculo en 7.5 ml de MM líquido pH 7 y pH 3 suplementado con Cb durante 48h, se realizaron 3 pases cada 24h en MM pH 7 y pH 3 suplementado con Cb. En el 3er pase se llevó a una DO<sub>600</sub> = 0.9-1.00 sin dejar pasar de DO<sub>600</sub>=1.00. Se realizó conteo de células en cámara de Neubauer, y se ajustó a 10<sup>6</sup> células/mL. Se prepararon los tratamientos de la siguiente manera: se preparó MM pH 7 y pH 3 suplementado con Cb glucosa al 1%, y se agregaron

las siguientes concentraciones de putrescina partiendo de un stock 250 mM: 0.1 mM, 1 mM, 5 mM y 10 mM. Se inocularon 40  $\mu$ L de células en 250 mL de MM con sus respectivos tratamientos. Se incubaron por 24, 48 y 72 h a 28 °C sin agitación. Se tomaron micrografías colocando 10  $\mu$ L sobre un portaobjetos con el microscopio LEICA ICC550 HD y la cámara LEICA. Se realizaron por triplicado los ensayos.

Para el ensayo en medio sólido, se tomó una colonia con palillo de madera estéril y se preparó el pre-inóculo en 7.5 ml de MM líquido pH 7 y pH 3 durante 48h a 28 °C. Se realizaron 3 pases cada 24 h en MM. En la tercera resiembra se llevó a una  $DO_{600} = 0.9-1.00$  sin pasar de  $DO_{600} = 1.00$ . Se realizó conteo de células en cámara de Neubauer, y se ajustó a  $10^4$  células/mL. Se prepararon los tratamientos de la siguiente manera: MM pH 7, suplementado con Cb, glucosa 1%, y agar 2%, y se agregaron las siguientes concentraciones de putrescina partiendo de un stock 250 mM: 0.1 mM, 1 mM, 5 mM y 10 mM. Se agregaron 2-3 mL del medio en un portaobjetos estéril en una cámara húmeda (caja Petri con una sanita humedecida con 3 mL de agua destilada estéril), y se colocó el portaobjetos sobre un soporte de vidrio estéril. Una vez solidificado el medio, en un portaobjeto se colocó 8  $\mu$ L de la cepa 1206, en otro portaobjetos se colocaron 8  $\mu$ L de la cepa 1207, y en otro portaobjetos se colocó 8  $\mu$ L del apareamiento 1206x1207 a una relación 1:1. Se incubaron durante 48 y 72 h a 28°C, y se tomaron las micrografías colocando un cubreobjetos sobre la colonia formada usando aceite de inmersión si el objetivo lo ameritaba. Se realizaron por triplicado los ensayos.

#### **6.4 Extracción de ARN total**

Todos los reactivos se prepararon con agua-DEPC 0.1%, Se partió de un cultivo de 30 mL en las condiciones indicadas en cada experimento, se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se recuperó la pastilla celular a 12 KRPM, en el caso de tejido de planta se utilizaron 100 mg. La molienda se realizó en un mortero estéril y congelado con nitrógeno líquido ( $N_2$ ), se recuperó el polvo en un mini tubo de 2 mL y se añadió 1 mL del reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Se agitó en vórtex durante 5 min y se

incubaron las muestras 5 min a  $T_a$ . Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se vortexeó 2 min, se incubó de 2-3 min a  $T_a$ . Se centrifugaron a 12 krpm/10min/4°C, se recuperó la fase acuosa y se precipitó con 500  $\mu\text{L}$  con una solución de citrato de sodio 0.8 M y NaCl 1.2 M, y 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se incubó 2 horas/-20° C. Se centrifugó a 12 krpm/10min/4°C y se descartó el sobrenadante con pipeta. La pastilla obtenida se lavó con 1 mL de etanol 75% DEPC, se centrifugó a 12 krpm/10min/4°C, se descartó sobrenadante con pipeta y se dejó secar 5 min a  $T_a$ . Se añadieron 50 $\mu\text{L}$  de agua MiliQ para cada una de las muestras. Se realizó la lectura de la absorbancia en el Nanodrop 2000 para verificar la calidad y concentración del ARN obtenido. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **6.5 Infección de plantas de maíz**

Se utilizó la variedad de maíz “cacahuazintle”. Se siguió el protocolo establecido por Storfie & Saville (2021) con algunas modificaciones. Se preparó un preinóculo con las cepas 1206 y 1207 en 10 mL de medio YEPS, se incubó a 28°C/24h/120 rpm. Se centrifugó a 3 krpm/5 min. Se inocularon 50  $\mu\text{L}$  del preinóculo en 50 mL de medio YEPS, se incubó 28°C/120 rpm hasta llegar a  $\text{DO}_{600} = 1$ . Si alguna de las cepas sobrepasó o fue menor a  $\text{DO}_{600} = 1$  se ajustaron para llevar a una  $\text{DO}_{600}$  igual con agua destilada estéril, para el ensayo de 1206x1207 se realizó una combinación de volúmenes 1:1. Se inoculó la plántula en el mesocotilo con 0.5 mL con ayuda de una jeringa ultra fina de 1 mL. No se regaron las plantas 48 h post-inoculación. Se observó sintomatología cada 3er día. Se recolectaron las plantas 7 dpi, y se conservaron a -80°C.

### **6.6 Síntesis de ADN complementario (ADNc)**

El ARN obtenido se trató con DNAsa I (ThermoFisher) de acuerdo al protocolo establecido por la casa comercial. Se realizó una dilución de 400 ng/  $\mu\text{L}$  del ARN, se tomaron 2.5  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}$  ARN), 1  $\mu\text{L}$  de 10X Buffer con  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  de DNAsa I, se llevó a 10  $\mu\text{L}$  con agua-DEPC. La reacción fue incubada a 37° C durante 30 minutos, posterior se añadió 1  $\mu\text{L}$  de 50 mM EDTA para detener la reacción y se incubó a 65° C/10 min. Se añadieron 2  $\mu\text{L}$  del oligo reverso del gen a analizar (10

ng) a 10  $\mu$ L del ARN tratado con DNAsa I, se incubó la reacción a 65° C/ 5 min, posterior se agregaron 4  $\mu$ L de amortiguador 5X, 0.5  $\mu$ L de inhibidor de RNAsa RiboLock, 2  $\mu$ L de dNTPs (1 mM) y 1  $\mu$ L de Transcriptasa Reversa (RT), llevando a un volumen final de 20  $\mu$ L. Como control negativo para cada muestra se prepararon reacciones sin la enzima RT. La reacción se incubó a 42° C y a 10 minutos/72° C. Como control interno se utilizó el gen de expresión constitutiva *Ef1 $\alpha$* , el cual codifica para el factor el factor de elongación 1 $\alpha$ . Los ensayos se realizaron por triplicado.

**Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos y especificaciones de los amplicones**

Secuencia	ID	Sentido	Secuencia primer	TM (°C)	Tamaño (pb)	Ciclos de saturación
<i>odc</i>	2193	F	5' – GTCACCGTCTACCCCAAGGT – 3'	68	250	34
	2194	R	5' – GTGTAGGCGCCCATATTCTC – 3'			
<i>samdc</i>	2197	F	5' – TTGTACCCCTTGAGCGTCAG – 3'	68	209	26
	2198	R	5' – CTTCCCAGTCGGAGCACACG – 3'			
<i>az</i>	2199	F	5' – AACGTAGCAGAGGCCGTGAA – 3'	68	213	25
	2200	R	5' – TACACTTCCACCAGCAGCAG – 3'			
<i>pao</i>	2205	F	5' - CTGGGCCAAGCAGCCGTTCA - 3'	68	250	25
	2204	R	5' - TCAGAGCTTGCCCTGCTCGC - 3'			
<i>Efl</i>	2216	F	5' – GGTATCATCAAGGGCGGCAT – 3'	69.5	385	28
	2038	R	5' – ACCGGACTTGATGAACTTGG – 3'			

## 6.7 Preparación de protoplastos por medio de enzimas líticas

### 6.7.1 Protocolo I para formación de protoplastos

Se siguió el protocolo establecido por Tsukuda et al. (1988) para *Ustilago maydis* con algunas modificaciones. Se prepararon pre-inóculos en tubos de 50 mL en 5 mL de MC suplementado con carbenicilina (1  $\mu$ L/mL a 100  $\mu$ g/mL), se incubaron 28°C/24h/120 rpm. Posterior se prepararon tres matraces de 250 mL con 80 mL de MC suplementado con Cb (1  $\mu$ L/mL a 100  $\mu$ g/mL) y se inocularon cada uno con 250, 500 y 750  $\mu$ L del pre inóculo, se incubaron 48h/28°C/120 rpm hasta llegar a una DO<sub>600</sub>= 0.8 sin dejar pasar de 0.9. El cultivo del matraz que llegó a la DO deseada

se dividió en 2 tubos cónicos de 50 mL, se centrifugaron a 6.5 krpm/5 min, se recuperó la pastilla de celular y se resuspendieron en 15 mL de amortiguador SCS, se juntaron en un solo tubo de 50 mL, se centrifugó a 6.5 krpm/5 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla de células fue resuspendida en 1 mL de SCS y se adicionaron 500  $\mu$ L de enzimas líticas (100 mg/mL) de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich). Se incubaron los tubos con agitación suave con la mano durante 15 minutos, se vigiló al microscopio la formación de protoplastos, y se mantuvo en agitación suave durante hora y media, vigilando cada media hora al microscopio las células hasta que se observó una formación de protoplastos de alrededor 70%. Se centrifugó a 3 krpm/10 min, se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de SCS para resuspender los protoplastos. Se transfirieron a mini tubos de 1.5 mL, se centrifugaron 4 krpm/4-5min, se decantó y se resuspendieron en 1 mL de SCS, se repitió este procedimiento dos veces. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL amortiguador STC frío, se adicionó DMSO al 7% como crioconservante. Se prepararon alícuotas de 50  $\mu$ L y se almacenaron a -80°C.

### **6.7.2 Protocolo II para formación de protoplastos**

Se prepararon preinóculos de 2 mL en YEPSL, se incubaron 28°C/120 rpm. Una vez crecido el cultivo se inocularon los pre inóculos en 100 mL de YEPS light 28°C/120 rpm hasta llevar a una  $DO_{600} = 0.6 - 0.8$ . Se centrifugó el cultivo 10 min/3.5 krpm y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las pastillas en 50 mL de SCS, se homogenizó, se centrifugó 10 min/3.5 krpm, y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de SCS y 500  $\mu$ L de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich). Se incubaron 5-10 min a  $T_a$ , se vigiló a microscopio cada 20 min hasta que el 50% de las células fueran protoplastos. Se agregaron 20 mL de SCS frío, se centrifugó 15 min/2300 rpm/4° C. Se resuspendieron las células cuidadosamente en 20 mL de STC frío, se centrifugó 10 min/2.3 krpm/4°C y se descartó el sobrenadante cuidadosamente. Un tubo se resuspendió en 0.5 mL de STC frío, se homogenizó y se con esa solución se resuspendió el 2do tubo. Se

agregó DMSO al 7% como crioconservante y se almacenaron las alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **6.8 Transformación de protoplastos**

### **6.8.1 Protocolo I para transformación de protoplastos**

Todo el procedimiento se realizó en hielo ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Se siguió el protocolo establecido por Tsukuda et al. (1988). El ADN obtenido por PCR, se re-suspendió en 4  $\mu\text{L}$  de STC, se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de heparina (15 mg/mL de STC), se transfirió a 50  $\mu\text{L}$  de protoplastos previamente descongelados en hielo y se mezcló con movimiento circular suave con la punta de la micropipeta, se incubó en hielo 10 min. Se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de polietilenglicol estéril frío (40 % PEG 3350 en STC) y se incubó 15 min en hielo. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de STC y se mezcló suavemente por 15 s. Se centrifugó a 5 min/2500 rpm. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de STC para resuspender las células. El contenido se sembró en DMS suplementado con Cb (1.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e Higromicina B (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), las células se distribuyeron suavemente de manera uniforme sobre la placa con una varilla de vidrio en forma de L estéril. Se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 6-7 días hasta observar crecimiento. Posterior, se recuperaron las transformantes en MC sólido suplementado con Higromicina B (75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Una vez crecidas las transformantes se seleccionaron algunas colonias y se incubaron en MC líquido suplementado con Higromicina B (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )  $28^{\circ}\text{C}/24\text{h}/120$  rpm.

### **6.8.2 Protocolo II para transformación de protoplastos**

Todo el procedimiento se realizó en hielo ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Se realizó el procedimiento sugerido por el equipo de trabajo de Jan Schirawski (Lim et al., 2021). El ADN obtenido por PCR (8  $\mu\text{L}$ ), se resuspendió en 4  $\mu\text{L}$  de STC y se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de heparina (15 mg/mL en STC), se transfirió a 50  $\mu\text{L}$  de protoplastos y se mezcló con movimiento circular suave con la punta de la micropipeta, se incubó en hielo 10 min. Se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de polietilenglicol estéril frío (40 % PEG 3350 en STC) y se incubó 15 min en hielo. El contenido se sembró en Agar regeneración (RegAg) suplementado con Cb (1.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e Higromicina B (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), las

células se distribuyeron suavemente de manera uniforme sobre la placa con una varilla de vidrio en forma de L estéril. Se incubaron a 28 °C durante 6-7 días hasta observar crecimiento. Posterior, se recuperaron las transformantes en MC sólido suplementado con Higromicina B (75 µg/mL). Una vez crecidas las transformantes se seleccionaron algunas colonias y se incubaron en MC líquido suplementado con Higromicina B (100 µg/mL) 28°C/24h/120 rpm.

### **6.9 Extracción de ADN genómico**

Se siguió el protocolo establecido por Hoffman & Winston (1987). Las colonias que crecieron en MCS se inocularon en MC líquido (5 mL), se incubaron a 28 °C/120 rpm hasta que alcanzaron una  $DO_{600} = 0.9-1$ . El cultivo se centrifugó 5 min/3.5 krpm, la pastilla celular se resuspendió en 200 µL de amortiguador Tris EDTA pH 8 (TE). La muestra se transfirió a mini tubos de 1.5 mL con mini perlas de vidrio (0.1 mm diámetro previamente lavadas con ácido nítrico y esterilizadas) y se adicionaron 400 µL de amortiguador de lisis (TSNTE). Se agregaron 400 µL de fenol-cloroformo (1:1) y se agitó 3 min en vórtex, se centrifugó 10 min/12 krpm. Se recuperó la fase acuosa en mini tubos de 1.5 mL nuevos, se adicionaron 2 µL de RNAsa (10 mg/mL) y se incubó por 20 min/37 °C. Se adicionaron 400 µL de cloroformo y se agitaron en vórtex 2 min, se centrifugó 7 min/14 krpm y se recuperó la fase acuosa en un mini tubo de 1.5 ml nuevo. Se agregaron 400 µL de cloroformo, se agitó en vórtex durante 5 min, se centrifugó durante 10 min/14 krpm y se recuperó la fase acuosa en un mini tubo de 1.5 ml nuevo. Se precipitó el ADN con acetato de sodio 3 M (10% del volumen de la muestra) y con 2 volúmenes de etanol frío al 95%. Se incubó a -20° C/60 min. Se centrifugó durante 10 min/12 krpm, la pastilla se lavó con 300 µL de etanol al 70% frío, se centrifugó 3 min/12 krpm, se decantó y se dejó secar la muestra. Una vez seca la pastilla, el ADN se disolvió con 50 µL agua grado biología molecular. La integridad del ADN se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (6 µl Bromuro de etidio/100 mL) en amortiguador TAE 1X. El gel se visualizó en el transiluminador de BIO RAD con el Software Image Lab.

### **6.10 Análisis de transformantes por PCR.**

Las colonias crecidas en MC suplementado con Higromicina B se analizaron por PCR utilizando los oligos 2193 – 2194. El programa de PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial 94 °C/3 min; 94 °C/3 min, 68 °C/30 s, 72 °C/30 s por 34 ciclos; elongación final 72 °C/7 min. Se corrió en gel de agarosa al 1% y se visualizó en el transiluminador de BIO RAD con el Software Image Lab.

### **6.11 Prueba de auxotrofia a putrescina en transformantes.**

Las transformantes crecidas en MC suplementado con Higromicina B se aislaron y cultivaron en 7.5 mL de MM pH 7 suplementado con Cb, se incubaron durante 48h/28 °C/120 rpm. Para agotar pozas de poliaminas, los cultivos se pasaron a MM pH 7 cada 48 h por 3 veces. Como control positivo se utilizó la cepa WT 1206. Los ensayos se realizaron por triplicado.

## **VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1 Identificación *in silico* de los genes involucrados en la síntesis de poliaminas en *Sporisorium reilianum***

Se realizó la identificación *in silico* de los genes involucrados en la síntesis de poliaminas usando como referencia a la cepa 521 de *U. maydis* obteniendo los siguientes resultados. Se realizó una búsqueda amplia mediante NBLAST (<http://fungi.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>).

**Tabla 2. Identificación *in silico* de los genes involucrados en la vía de biosíntesis de poliaminas en *S. reilianum*.**

Gen	Especie	% identidad	Valor E	ID	Nombre en base de datos	Especie contra la que se comparó	ID gen contra el que se comparó
ARG	<i>Sporisorium reilianum</i>	87	$2.6 \times 10^{-138}$	sr15821	Probable arginasa	<i>Ustilago maydis</i>	UMAG_04939
ADC	<i>Sporisorium reilianum</i>	Sin coincidencias	X	X	X	<i>Homo sapiens</i>	AY325129
ODC	<i>Sporisorium reilianum</i>	86.9	0.00	sr12348	ODC	<i>Ustilago maydis</i>	Umag_01048
Spds/Sch	<i>Sporisorium reilianum</i>	87.5	0.00	sr16440	Probable espermidina sintasa/sacropina reductasa	<i>Ustilago maydis</i>	Umag_05818
SAMDC	<i>Sporisorium reilianum</i>	93.2	$1.5 \times 10^{-99}$	sr12300	Relacionado a S-adenosilmetionina descarboxilasa (spe-2)	<i>Ustilago maydis</i>	Umag_10792
Spds	<i>Sporisorium reilianum</i>	Sin coincidencias	X	X	X	<i>Rhodotorula toruloides</i>	XM_016419965
SAMS	<i>Sporisorium reilianum</i>	86.1	$1.9 \times 10^{-83}$	sr15901	Probable S-adenosilmetionina sintetasa 2	<i>Rhodotorula toruloides</i>	XM_016420738
AZ	<i>Sporisorium reilianum</i>	84.8	$2.8 \times 10^{-51}$	sr11986	Proteina hipotética conservada	<i>Ustilago maydis</i>	UMAG_00698
PAO	<i>Sporisorium reilianum</i>	85.7	$3.3 \times 10^{-26}$	sr16473	Proteina hipotética conservada	<i>Ustilago maydis</i>	UMAG_05850
SSAT	<i>Sporisorium reilianum</i>	32.5	$2.7 \times 10^{-96}$	sr16120	Proteina hipotética conservada		
	<i>Sporisorium graniticola</i>	40.7	$9.6 \times 10^{-6}$	EX895_002798	Proteina hipotética conservada		
	<i>Ustilago maydis</i>	37	$3.7 \times 10^{-6}$	UMAG_05789	Proteina hipotética conservada	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	GCA_003611235
	<i>Sporisorium scitamineum</i>	39.8	$4.8 \times 10^{-4}$	SPSC_02098	Proteina sin caracterizar		

Arginasa (ARG); arginina descarboxilasa (ADC); ornitina descarboxilasa (ODC); gen quimera espermina sintasa/sacropina deshidrogenasa (Spds/Sch); S-adenosil metionina descarboxilasa (SAMDC); espermidina sintasa (Spds); S-adenosilmetionina sintasa (SAMs); antizima (AZ); poliamina oxidasa (PAO); espermidina/espermina s-acetil transferasa (SSAT). (<https://fungi.ensembl.org/index.html>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> )

En esta caracterización *in silico* no se encontró alguna coincidencia en los genes que codifican para la arginina descarboxilasa ni para la espermina sintasa, infiriendo que *S. reilianum* no cuenta con la presencia de estos genes, tal como se ha reportado ya que los hongos no presentan estos genes salvo excepciones específicas (Schaefer, et al., 2020; Valdés-Santiago et al., 2009; Khan & Minocha, 1989). El gen de la SSAT aún no está caracterizado en *U. maydis* ni ningún otro ustilaginal, por lo que usó la secuencia reportada por (Y. Wu et al., 2018) en *Golovinomyces cichoracearum*, siendo el ID del gen GCA\_003611235 obtenido a partir de la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>); este gen se comparó contra cuatro ustilaginales (**Tabla 2**) obteniendo una sola coincidencia para cada uno de los genes con un porcentaje de identidad menor a 50%. Para el gen de la ADC se usó como referencia el de *Homo sapiens* debido a que se ha observado este organismo y *U. maydis* comparten mayor homología proteómica que con algún otro hongo usado como modelo de estudio (Münsterkötter & Steinberg, 2007). Así como también se usó ese organismo como referencia debido a que en hongos que se ha descubierto actividad de la ADC sólo se ha identificado de manera bioquímica más no ha sido identificada a nivel de secuencia (Murakami et al., 2024).

Para cada uno de los genes analizados sólo se encontró con una sola coincidencia, este resultado sugiere que *S. reilianum* sólo cuenta con un gen que codifica para cada una de las enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas.

Con estos resultados obtenidos (**Tabla 2**) se propone la siguiente vía de biosíntesis de poliaminas en *S. reilianum* SRZ2 donde no se observó presencia de la enzima ADC ni de la enzima que codifica para la espermina (**Fig. 12**).

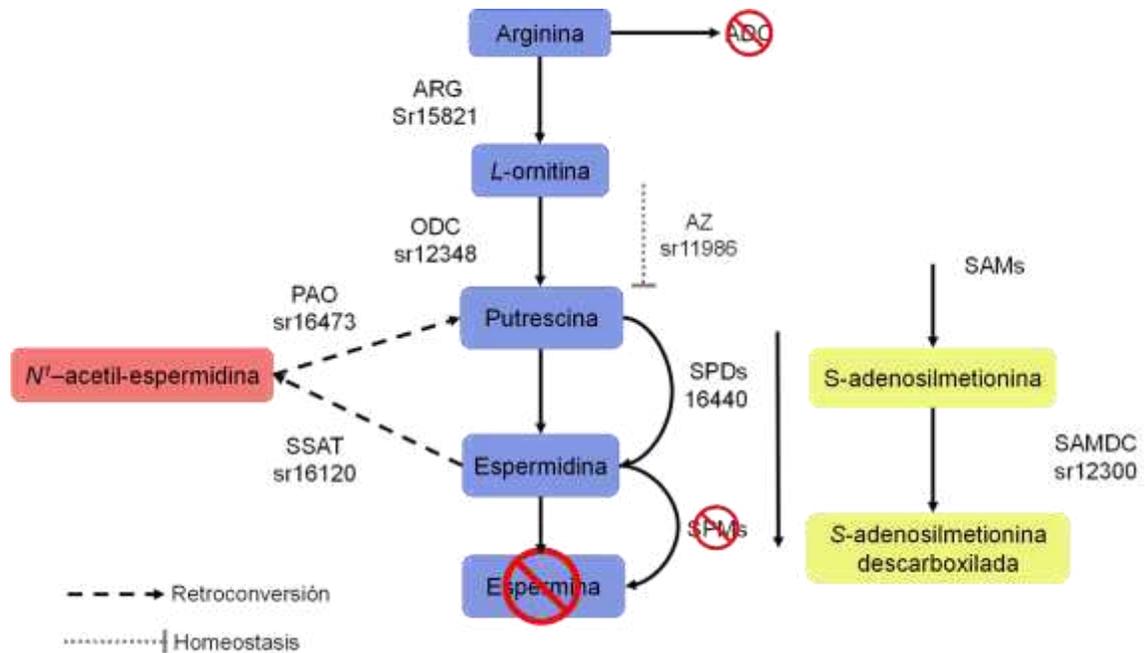


Figura 12. Propuesta de la vía metabólica de poliaminas en *S. reilianum* con base en los resultados obtenidos mediante la caracterización *in silico*.

El metabolismo de poliaminas está ampliamente involucrado en otras vías de señalización tales como la vía de señalización dependientes de proteincinasa de activación mitógena (MAPK) (Bavaria et al., 2014; J. Li et al., 2020; Sagor et al., 2015), la vía de la proteincinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico (cAMP/PKA) (Chang et al., 2019), especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo (Jiang et al., 2021; Wu et al., 2017), producción de energía por medio del ciclo de Krebs (Jorge et al., 2017; Legocka et al., 2017), inducción en la síntesis de óxido nítrico y activación de factores de transcripción, siendo el más sobresaliente y estudiado la hipusinación del factor eIF5A, la cual es una modificación post-transduccional que activa este factor de traducción siendo fundamental para todos los organismos eucariotas (Han et al., 2022; Hofer et al., 2021; Park & Wolff, 2018); por lo que alguna alteración en esta vía metabólica provocaría cambios importantes en la homeostasis y regulación celular tal como se ha demostrado con modelos de

estudio a los cuales se les ha interrumpido la vía de biosíntesis de poliaminas (Yan et al., 2022).

## **7.2 Análisis filogenético de enzimas clave en la biosíntesis de las PA en hongos basidiomicetos**

Un análisis filogenético permite establecer relaciones para distinguir homologías entre los taxones analizados, en este trabajo se realizaron análisis filogenéticos de los genes clave que participan en la biosíntesis de poliaminas mediante un análisis filogenético bayesiano utilizando secuencias ya reportadas para basidiomicetos. Estas secuencias se obtuvieron mediante la base de datos del <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, utilizando secuencias que se encuentran ya publicadas. La alineación se realizó con el programa Mesquite, y la creación del árbol filogenético se realizó mediante el programa Mr. Bayes basado en la metodología de inferencia bayesiana, esta es una metodología de inferencia estadística, donde se usa la distribución de probabilidades (Nascimento et al., 2017).

En el análisis filogenético del gen que codifica para la ornitina descarboxilasa (ODC) (**Fig. 13**) se observó la formación de dos clados, el primer clado (de arriba hacia abajo) podemos apreciar que se agrupan ustilaginales (carbones) y en el segundo clado apreciamos que se agrupan los agaricales y tremelales. Similar al análisis de PAO se tomaron los datos de la base de datos de la NCBI. Podemos decir que la ODC del filo de los basidiomicetos precede de un ancestro común. Jiménez-Bremont et al., (2006) realizaron un análisis filogenético en ascomicetos y otros organismos y diversas secuencias consenso conservadas entre los organismos analizados, concluyeron que derivan de un ancestro en común. El gen ODC ha sido ampliamente abordado en diversos modelos de estudio dado a que es el primer gen en la vía de la biosíntesis de poliaminas, en varios de estos estudios se ha observado que es una enzima “prima” a la ADC, infiriendo que la evolución de los organismos en usar una enzima o la otra se ha dado principalmente por la

abundancia ya sea de ornitina o arginina en el medio, así como pudo ser adquirida de manera horizontal (Li et al., 2021).

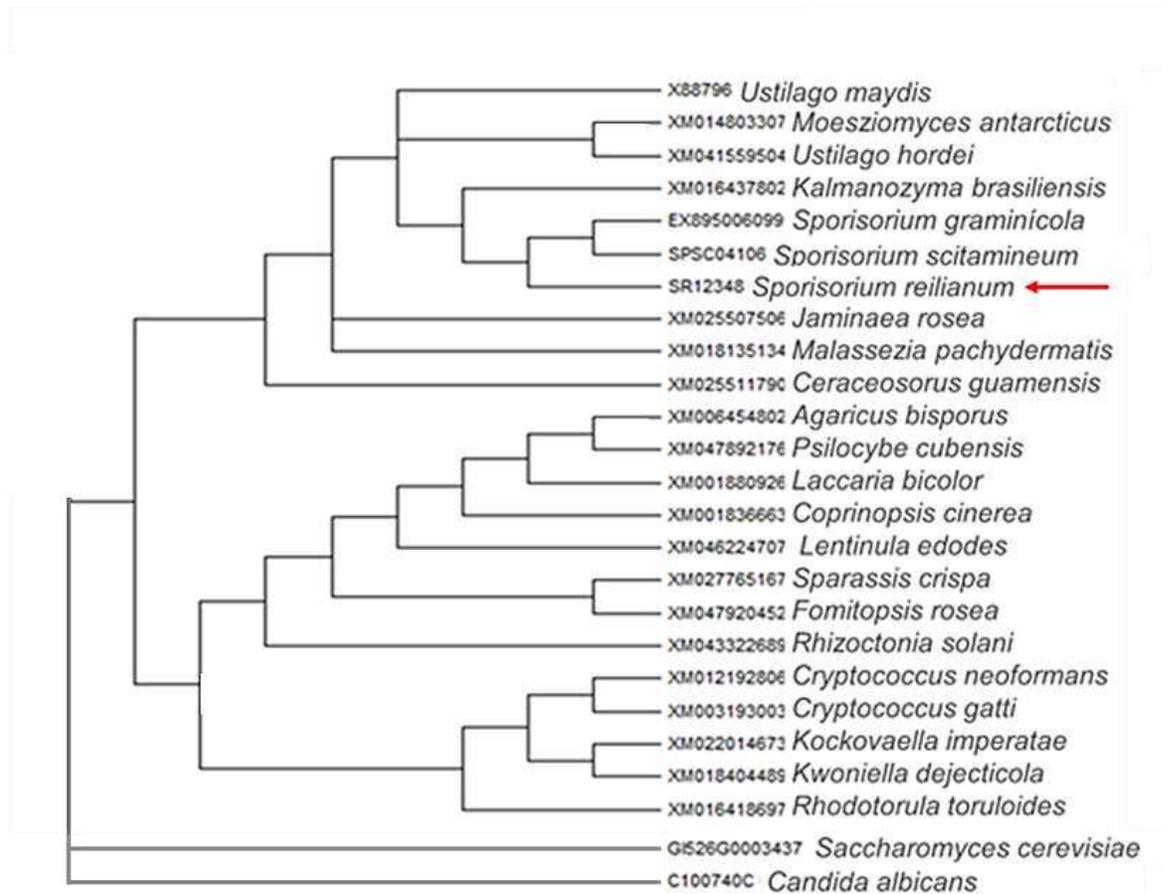


Figura 13. Análisis filogenético de la enzima ODC en basidiomicetos. Se realizó con la secuencia de nucleótidos reportada mediante inferencia bayesiana con el programa Mr. Bayes. Como grupo externo se utilizó a los ascomicetos *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*.

Para el gen de la poliamina oxidasa (PAO) se obtuvo el siguiente árbol filogenético (**Fig. 14**). Se usaron las secuencias ya reportadas y publicadas de PAO en basidiomicetos, como se puede observar, no son muchas las publicadas en este filo de hongos en comparación de los ascomicetos (Salvi & Tavladoraki, 2020). En el árbol filogenético observamos que se organizan los clados de acuerdo a las

familias a las que pertenecen los hongos de donde se obtuvieron las secuencias analizadas.

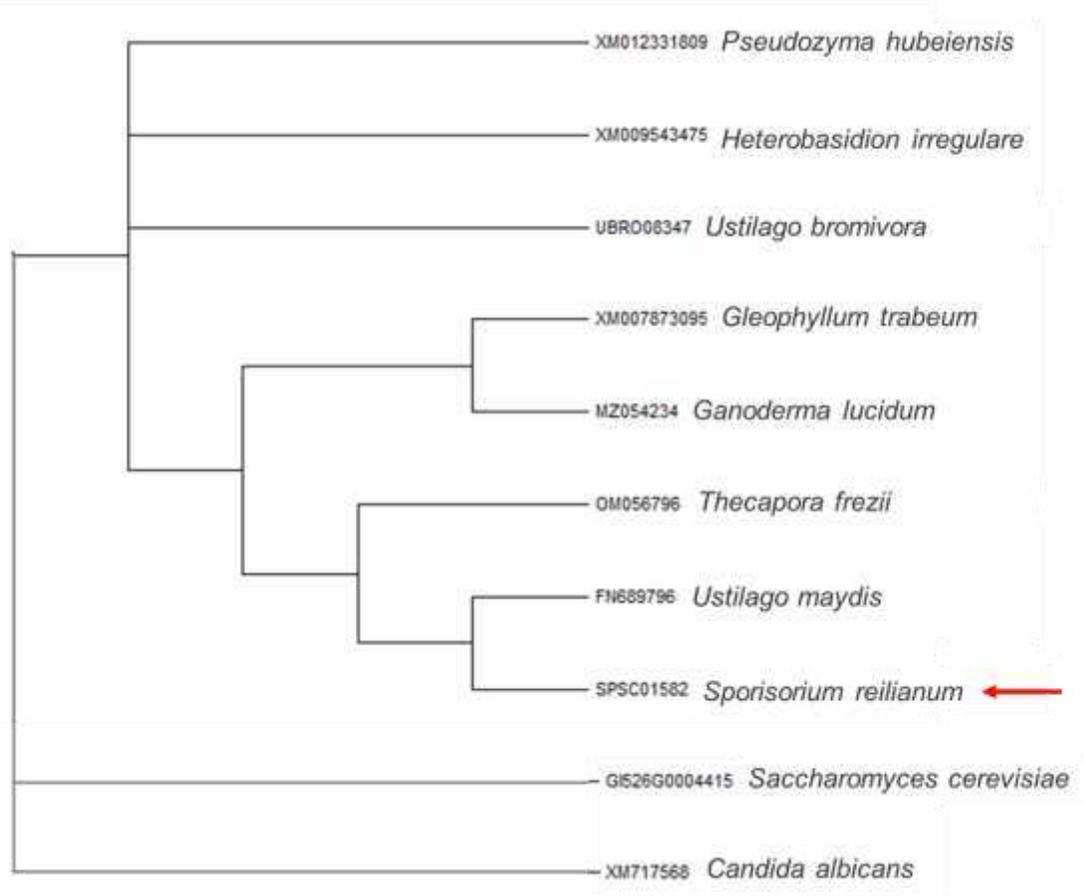


Figura 14. Análisis filogenético de la enzima PAO en basidiomicetos. Se realizó con la secuencia de nucleótidos reportada mediante inferencia bayesiana con el programa Mr. Bayes. Como grupo externo se utilizó a los ascomicetos *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*.

En el análisis filogenético del gen que codifica para la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) (**Fig. 15**) observamos como los taxones se van agrupando de acuerdo con las especies de los hongos, observando que comparten un nodo principal, es decir, que comparten un ancestro común que fue derivándose a diferentes clados. En el árbol filogenético obtenido observamos

valores <80, lo que significa que nuestra rama es sostenible, aunque algunos autores manejan que un número <50 se puede tomar en cuenta (Silva et al., 2015). Observamos varias ramificaciones, lo que nos indica que existen variaciones en la SAMDC de las secuencias reportadas de estos basidiomicetos. En ascomicetos se ha encontrado que algunos hongos presentan hasta dos isoformas de este gen (Domínguez-santos et al., 2022).

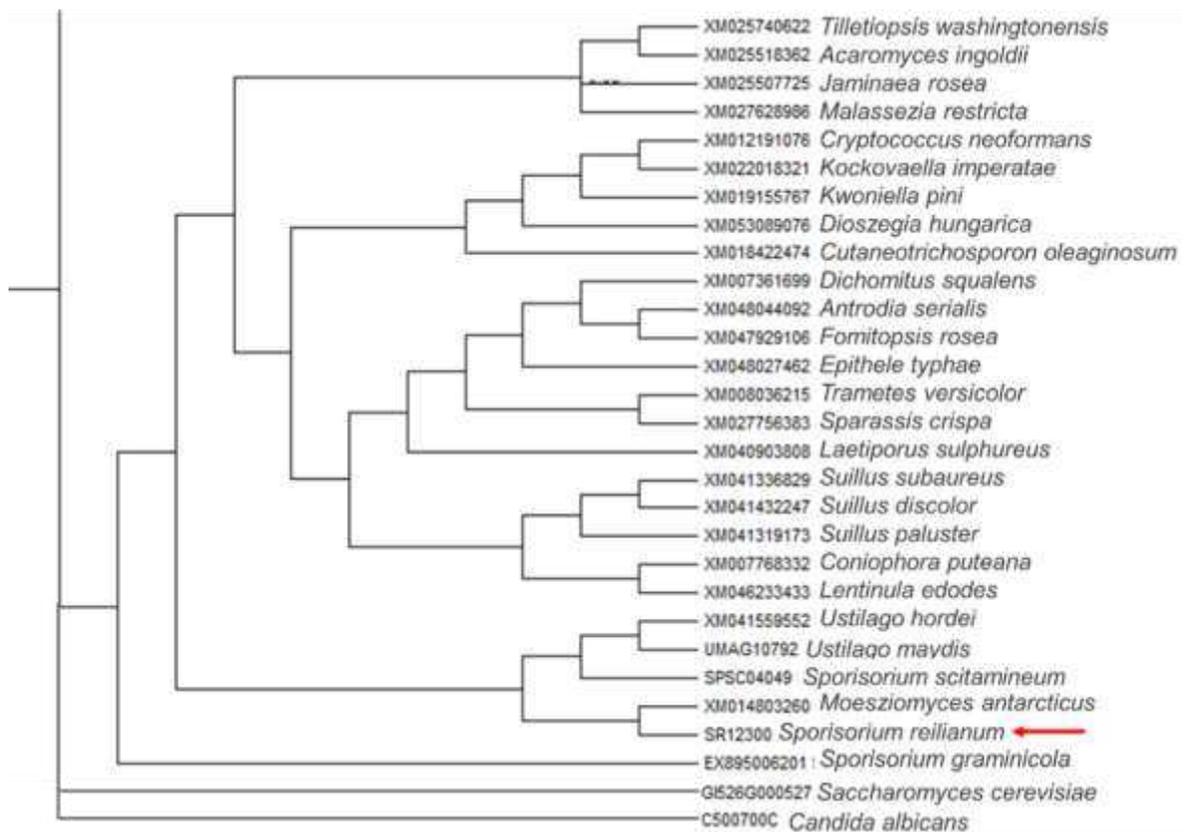


Figura 15. Análisis filogenético de la enzima SAMDC en basidiomicetos. Se realizó con la secuencia de nucleótidos reportada mediante inferencia bayesiana con el programa Mr. Bayes. Como grupo externo se utilizó a los ascomicetos *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*.

### 7.3 Efecto de la aplicación exógena de putrescina sobre la morfología y apareamiento en *S. reilianum* en pH 7 en medio líquido

El efecto de la adición de PAs exógenas ha sido un tema de estudio en el área de la micología y fitopatología, Rezvanypour et al. (2015) analizaron el efecto de la adición de Put, Spd y Spm en el desarrollo del hongo micorrízico *Rhizophagus intraradices* en cultivos de Freesia (*Freesia hybrida*), observaron que la adición de Put en concentraciones de 0.1 mM tiene resultados favorables en la colonización del hongo a la planta aumentando largo, diámetro del tallo y la floración. Zhang et al. (2023) realizaron un estudio de transcriptómica en *Fusarium graminecola* con putrescina exógena en la concentración de 5 mM a distintos tiempos de incubación observando que la adición de la putrescina exógena provoca cambios significativos en la expresión de ciertos genes involucrados en vías metabólicas clave para el desarrollo y diferenciación celular del hongo. Respecto al apareamiento existe gran cantidad de estudios que analizan la relación entre las poliaminas y la capacidad de llevar a cabo este proceso. Pérez-Rodríguez et al. (2023) observaron que en mutantes *odc-* de *U. maydis* este proceso se recupera únicamente al agregar putrescina exógena 5 mM al medio de cultivo, a esta concentración fue posible llevar a cabo la formación de los tubos de conjugación, infiriendo que la presencia de PAs en la célula es esencial para llevar a cabo procesos clave para el apareamiento.

En el caso del estudio de la morfología en condiciones de adición de poliaminas exógenas no se encuentra reportado hasta el momento. En este trabajo con *S. reilianum* se usaron las concentraciones de Put 0.1 mM, 1 mM, 5 mM y 10 mM en cultivos de MM líquido a distintos pH (3 y 7).

Se tomaron micrográficas a las 24 h de incubación en MM pH 7 (**Fig. 16**), en el control del apareamiento sin tratamiento de Put no se observó formación alguna de tubos de conjugación, por lo tanto, no se aprecia ninguna célula apareada (el porcentaje de apareamiento se contabilizó por cada 100 células observadas por triplicado (**Fig. 17**)). En los cultivos tratados con Put se observó una tendencia positiva y estadísticamente significativa en relación al desarrollo de estructuras de

apareamiento (tubos de conjugación), en el caso de la concentración 10 mM se observó una disminución en la contabilización celular (no mostrado), infiriendo que esta concentración de Put no es favorable, además se ha reportado que altas concentraciones de PAs provocan alteraciones en la homeóstasis celular, en el crecimiento e incluso pueden detener el ciclo celular (Sakamoto et al., 2020; Mandal et al., 2013).

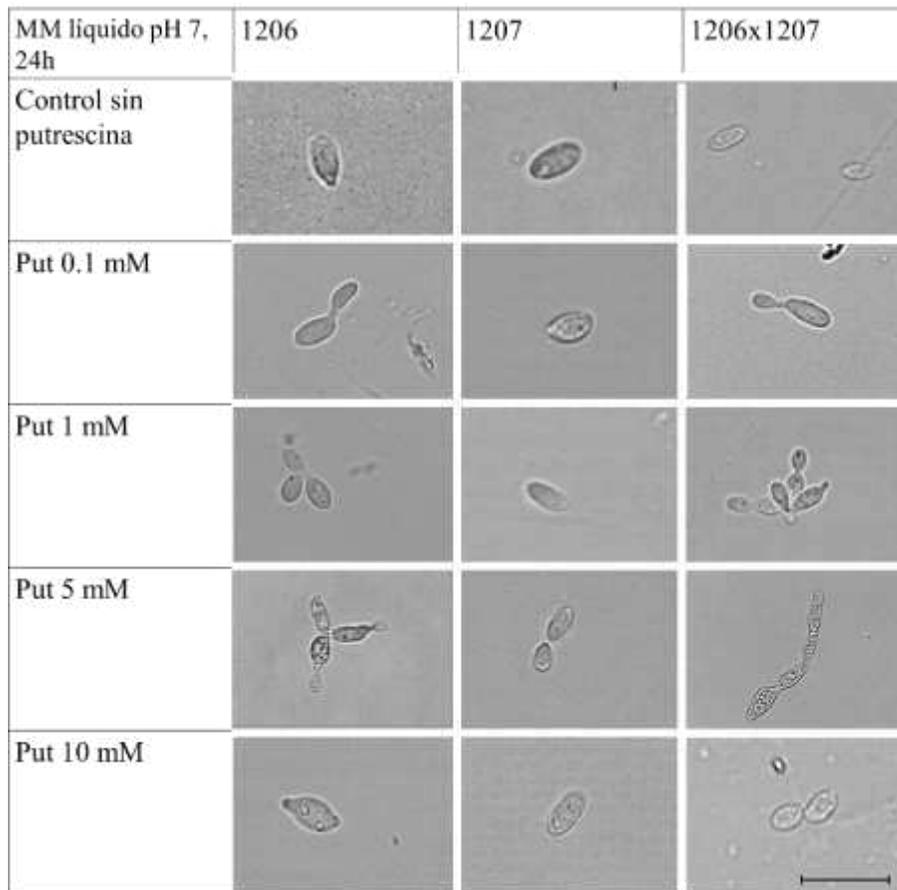


Figura 16. Efecto de la putrescina exógena en morfología y apareamiento en *S. reilianum* en MM líquido pH 7 a las 24 h de incubación. 100x. Barra de medida representa 100  $\mu$ m.

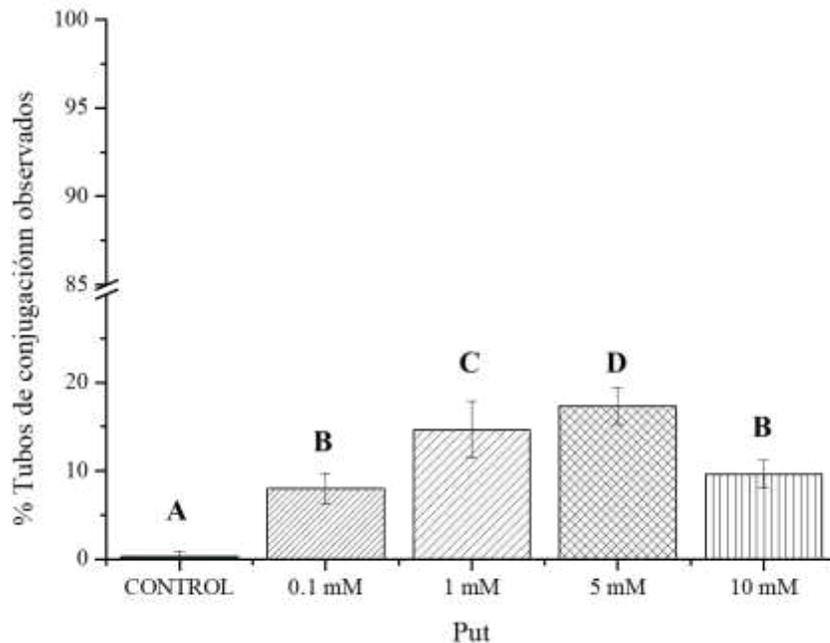


Figura 17. Porcentaje de células con presencia de formación de tubos de conjugación en medio mínimo líquido a pH 7 a las 24 horas de incubación. Se utilizó el programa estadístico Minitab para prueba de Tukey de medias, y análisis ANOVA y el programa ORIGIN 9 para creación de tablas. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. \*  $p < 0.001$ .

Posterior a las 72h de incubación en las células haploides no se observó ningún cambio morfológico significativo en los tratamientos, *S. reilianum* mantuvo su morfología en forma de limón, observándose en algunas células que estaban llevando a cabo el proceso de gemación (**Fig. 18**). En las condiciones de las células haploides podemos apreciar que no existe un cambio significativo en la morfología celular, en el caso los cultivos de la cruce 1206x1207 se observaron cúmulos de hifas de apareamiento. Cabe mencionar que en el tratamiento de Put 10 mM se apreció una disminución significativa en la formación de los tubos de conjugación, esto puede estar relacionado a que altas concentraciones de PAs son citotóxicas

afectando el correcto desarrollo de la célula o bien a que la presencia de poliaminas favorece el programa de desarrollo que conduce al proceso de apareamiento, pero que posterior a un umbral de concentración éste ya no es favorable (Yin et al., 2024).

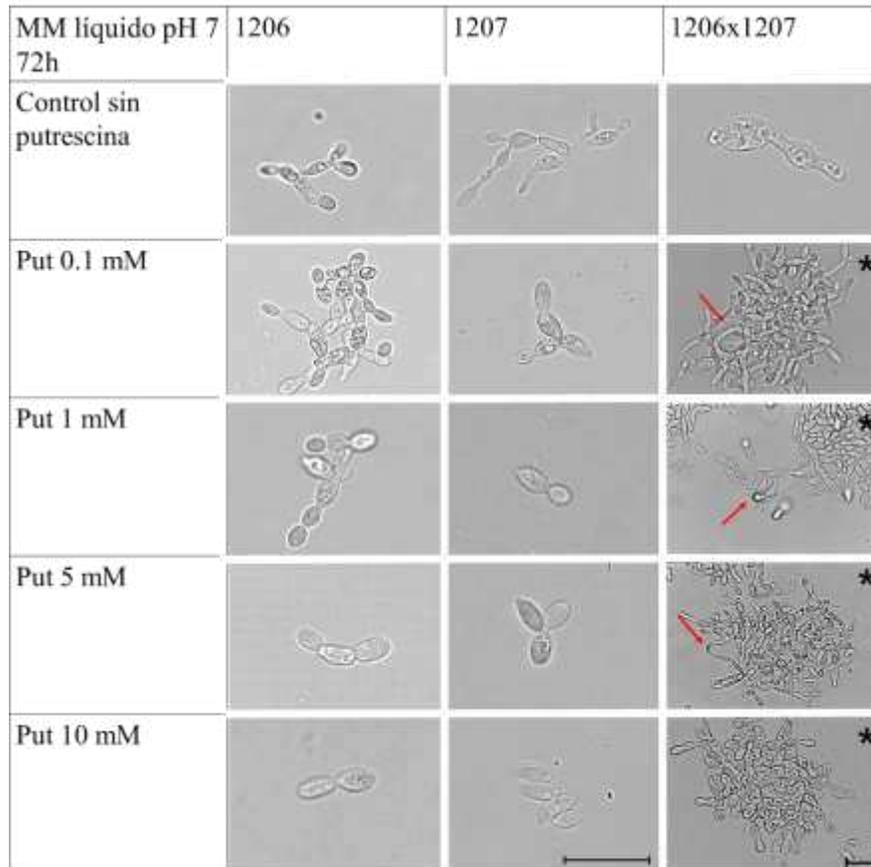


Figura 18. Efecto de la putrescina exógena en morfología y apareamiento en *S. reilianum* en MM líquido pH 7 a las 72 h. 100x, \*40x. Escala representa 100  $\mu$ m.

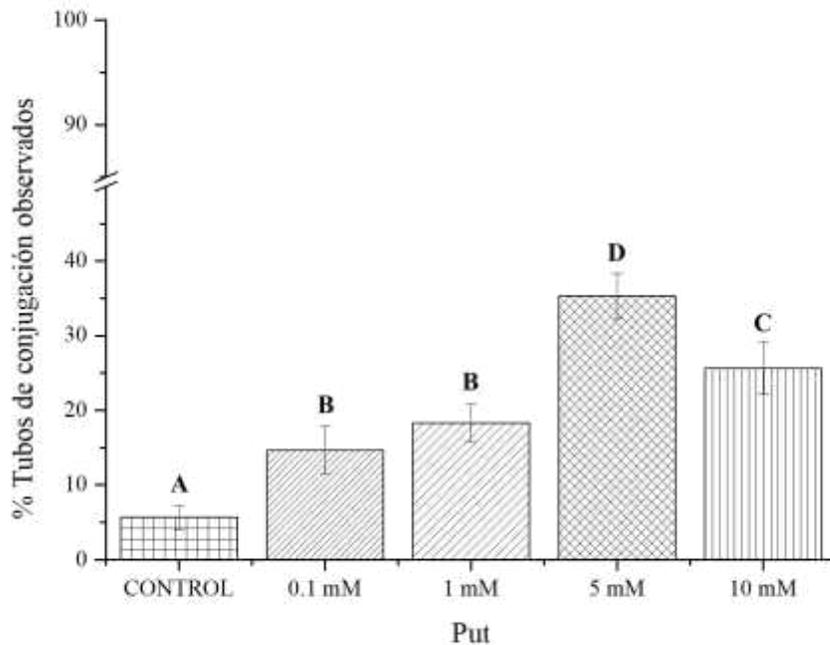


Figura 19. Porcentaje de células con presencia de formación de tubos de conjugación en medio mínimo líquido a pH 7 a las 72 horas de incubación. Se utilizó el programa estadístico Minitab para prueba de Tukey de medias, y análisis ANOVA y el programa ORIGIN 9 para creación de tablas. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. \* $p < 0.001$ .

Para los tratamientos *in vitro* en condiciones de MM líquido pH 7 se observó que a las 24 h la formación de tubos de conjugación, tanto en los controles como en los cultivos adicionados con putrescina, no hubo una diferencia significativa en la formación de éstos, mientras que a las 72 h podemos observar que en los cultivos adicionados con Put a cualquiera de las concentración, comparándolo con el control, hay un incremento en la formación de estas estructuras que le permiten a la célula aparearse y posterior formar un hifa dicariótica infectiva, esto puede ser debido a que la Put actúa como sustrato para la síntesis de Spd, poliamina la cual se le ha

visto involucrada positivamente en procesos como el apareamiento (Zhao et al., 2021; Bauer et al., 2013).

#### 7.4 Efecto de la aplicación exógena de putrescina en el apareamiento en *S. reilianum* a pH 7 en medio sólido

Se realizaron ensayos de apareamientos en MM sólido a pH 7 con concentraciones de Put 0.1, 1, 5 y 10 mM. En el tratamiento con 10 mM no hubo crecimiento bajo las condiciones experimentales; a las 24 h de incubación no se observó crecimiento, por lo que la siguiente observación se realizó a las 48 h de tratamiento, en este caso se logró observar la hifa dicariótica (flecha roja) en las cruzas 1026x1207, esta estructura fue más evidente sobre todo en las orillas de la colonia (Fig. 20). En el conteo realizado se determinó que a mayor cantidad de putrescina llegando hasta 5 mM, favorece la formación del crecimiento hifal.

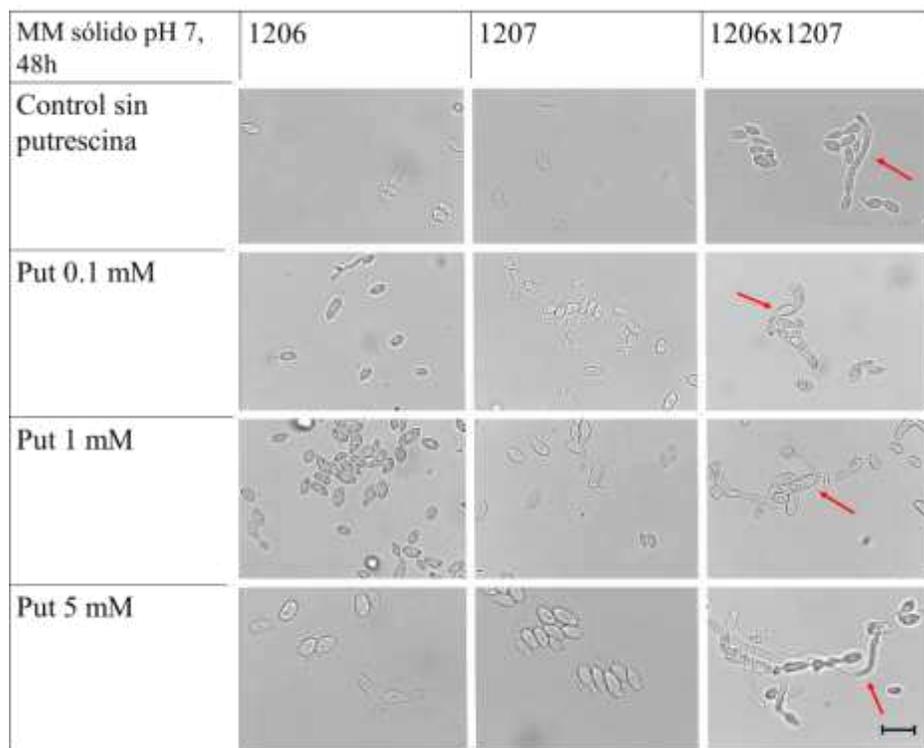


Figura 20. Efecto de la putrescina exógena en morfología y apareamiento en *S. reilianum* en MM sólido pH 7 a las 48 h. 100x. Barra de medida representa 100  $\mu$ m.

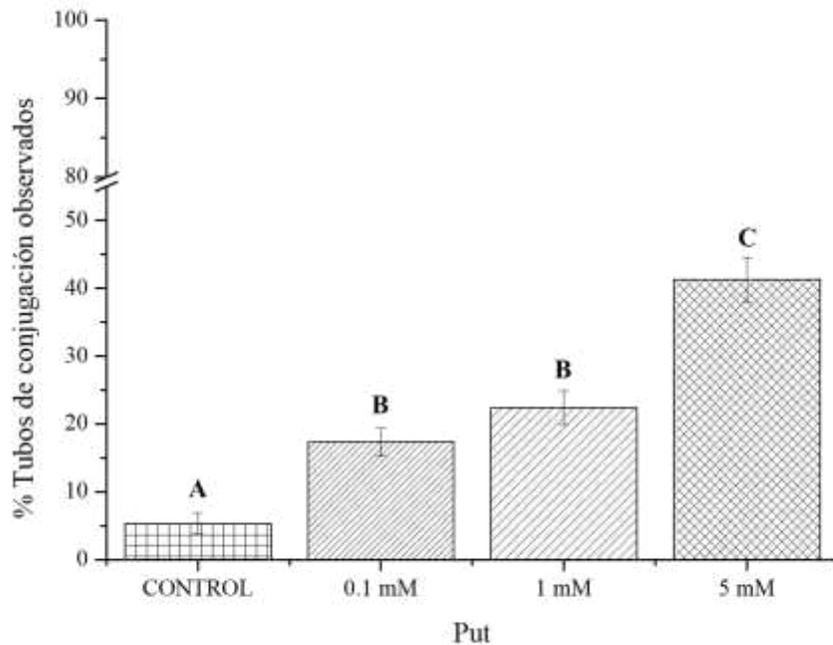


Figura 21. Porcentaje apareamiento en medio mínimo sólido a pH 7 a las 48 horas de incubación. Se utilizó el programa estadístico Minitab para prueba de Tukey de medias, y análisis ANOVA y el programa ORIGIN 9 para creación de tablas. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. \* $p < 0.001$ .

A las 72h se observó un aumento en la formación de las estructuras responsables del apareamiento por lo que se infiere que la adición de Put tiene un efecto positivo en este evento a excepción de la concentración de 10 mM la cual resultó citotóxica, situación previamente observada en medio líquido (**Fig. 22**).

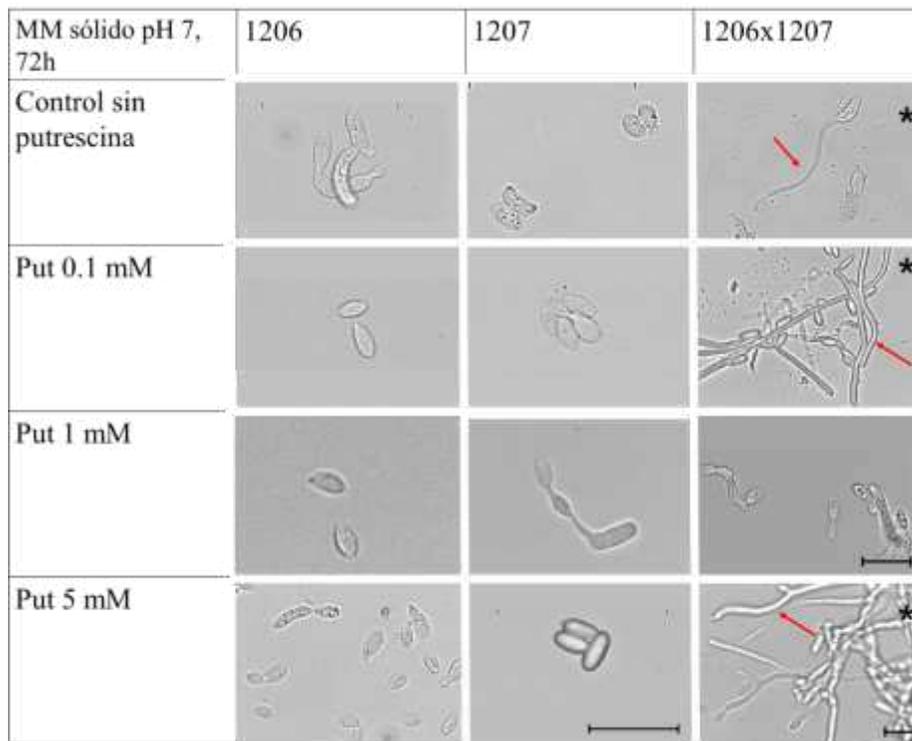


Figura 22. Efecto de la putrescina exógena en morfología y apareamiento en *S. reilianum* en MM sólido pH 7 a las 72 h. 100x, \*40x. Barra de medida representa 100  $\mu$ m.

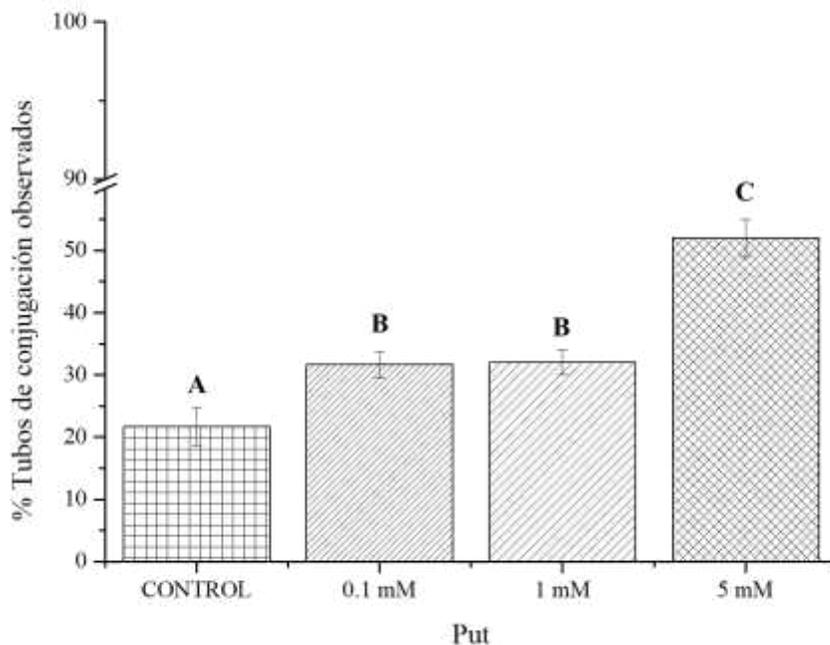


Figura 23. Porcentaje apareamiento en medio mínimo sólido a pH 7 a las 72 horas de incubación. Se utilizó el programa estadístico Minitab para prueba de Tukey de medias, y análisis ANOVA y el programa ORIGIN 9 para creación de tablas. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. \* $p < 0.001$ .

### 7.5 Efecto de la aplicación exógena de putrescina sobre el apareamiento en *S. reilianum* a pH 3 en MM líquido

Se realizaron ensayos de morfología y apareamiento en MM líquido a pH 3. En estas condiciones se observó una formación multicelular conocido como “clusters”, se propone que estas formaciones son dadas como resultado al estrés por pH (Martínez-Soto et al., 2020). Se ha reportado que el pH influye en la excreción y toma de PAs del medio, a un pH alcalino existe una mayor toma de PAs y a menor pH se eliminan PAs de la célula (Sampathkumar & Drouin, 2015; Fujihara & Yoneyama, 1993). En los ensayos de apareamiento se observa una disminución de la presencia de tubos de conjugación y por consiguiente de hifas dicarióticas aun

en los tratamientos con Put, lo que podría indicar que el pH sí tiene un efecto en la toma y disponibilidad de PAs, y por lo tanto, se observó el su efecto sobre la capacidad de *S. reilianum* de llevar a cabo el apareamiento (**Fig. 24**).

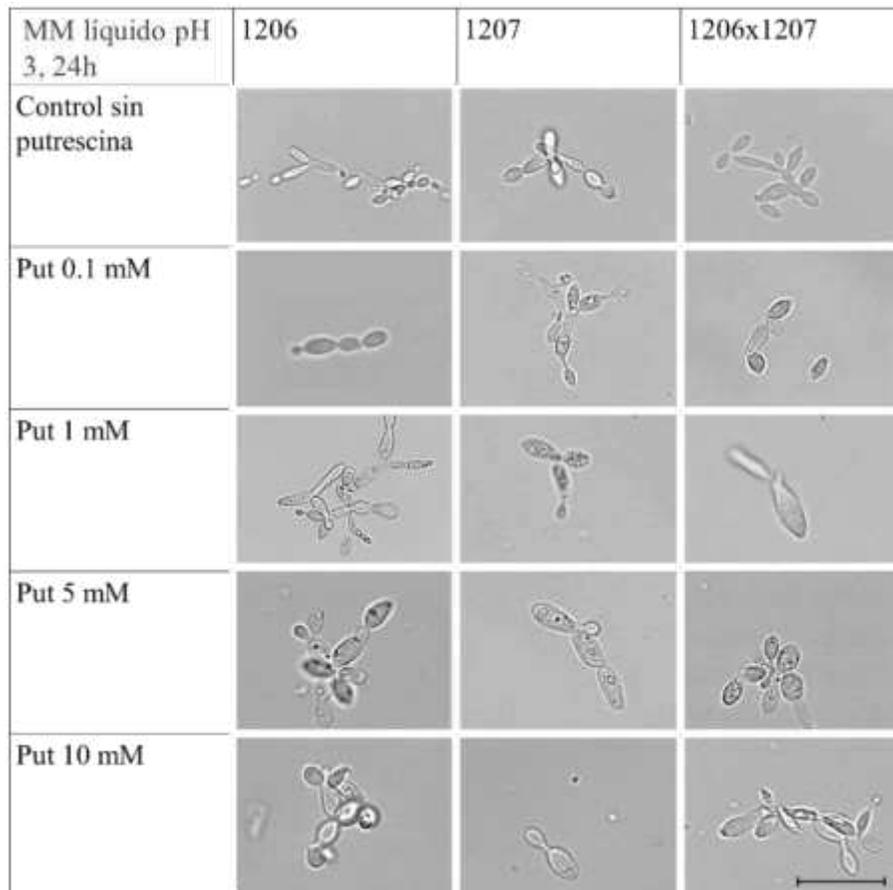


Figura 24. Efecto de la putrescina exógena en morfología y apareamiento en *S. reilianum* en MM líquido pH 3 a las 24 h. Barra de medida representa 100  $\mu$ m.

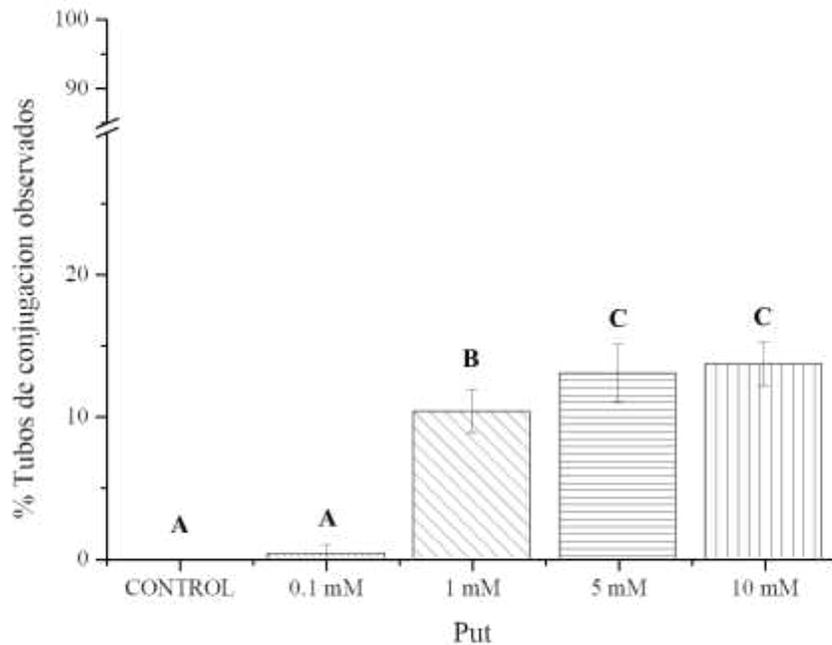


Figura 25. Porcentaje apareamiento en medio mínimo líquido a pH 3 a las 24 horas de incubación. Se utilizó el programa estadístico Minitab para prueba de Tukey de medias, y análisis ANOVA y el programa ORIGIN 9 para creación de tablas. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. \* $p < 0.001$ .

A las 72h (**Fig. 26**) en los cultivos haploides tratados con distintas concentraciones de Put observamos que la morfología en racimo de uva disminuye a comparación del control sin putrescina. En los ensayos de apareamiento observamos la presencia de un tubo de conjugación y probables hifas dicarióticas, en el tratamiento 10 mM hay una disminución de los tubos de conjugación, pero un aumento en la formación de clústeres. En esta condición surge un poco la confusión de si en los ensayos de apareamiento lo que se observa son las hifas dicarióticas o más bien los conjuntos multicelulares debido al pH ácido, por lo que se propone en un futuro realizar una tinción con DAPI para poder observar los núcleos celulares, o bien contar con cepas marcadas con distinta fluorescencia para poder seguir a cada

una en relación a su tipo de apareamiento (Munyenembe et al., 2021). En este ensayo se contabilizaron como hifas dicarióticas aquellas estructuras similares a un tubo de conjugación.

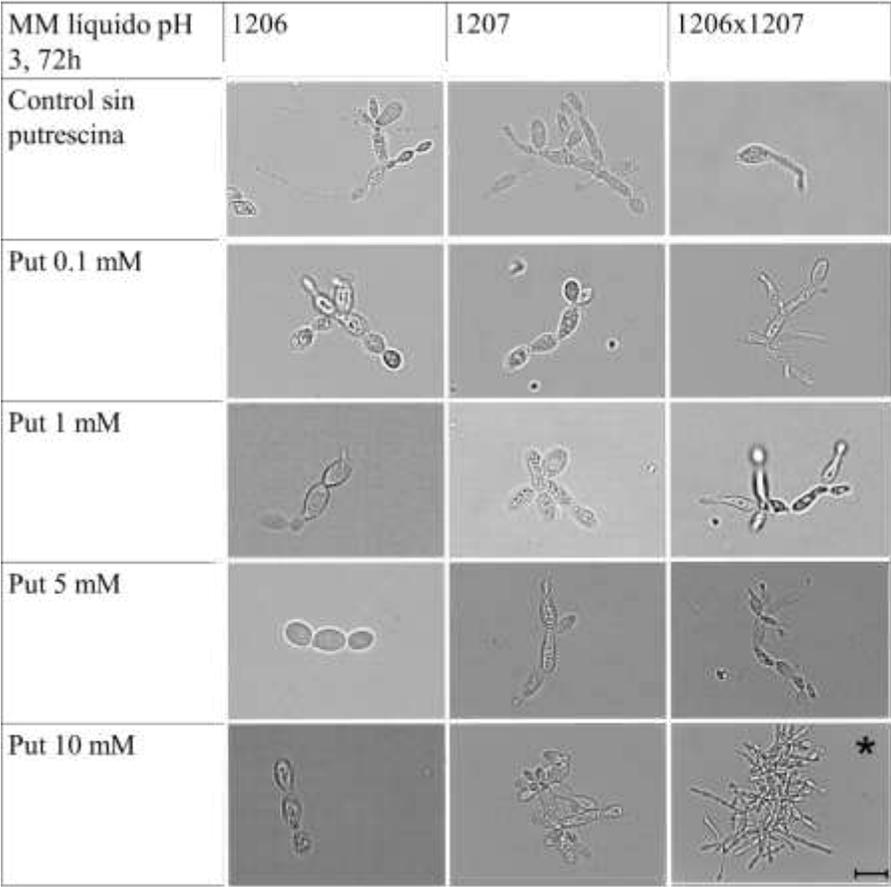


Figura 26. Efecto de la putrescina exógena en morfología y apareamiento en *S. reilianum* en MM líquido pH 3 a las 72 h. 100x, \*40x. Barra de medida representa 100  $\mu$ m.

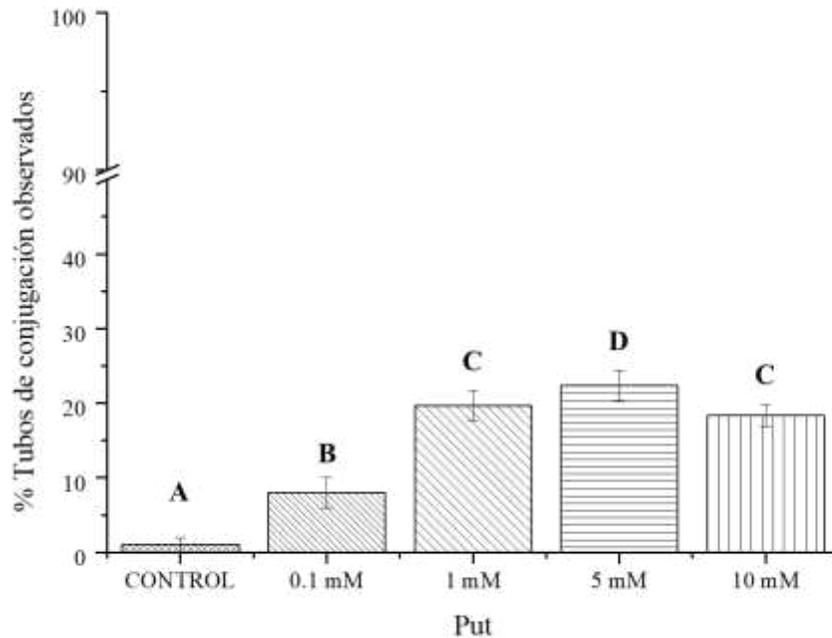


Figura 27. Porcentaje apareamiento en medio mínimo sólido a pH 3 a las 72 horas de incubación. Se utilizó el programa estadístico Minitab para prueba de Tukey de medias, y análisis ANOVA y el programa ORIGIN 9 para creación de gráficas. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. \* $p < 0.001$ .

De acuerdo a lo obtenido, se observa que la adición de Put exógena a pH 7 (**Fig. 16, 18, 20, 22**) en *S. reilianum* favorece a la formación de tubos de conjugación derivando esto en una mayor capacidad de apareamiento, a excepción del caso de la adición de 10 mM donde se observó una disminución del crecimiento celular, así como de la formación de tubos de conjugación, probablemente debido a que poliaminas en altas concentraciones derivan en una citotoxicidad ya que se ha observado que en estas condiciones se acumulan cantidades dañinas de especies reactivas de oxígeno en la célula (Wang et al., 2018). Cabe recalcar que, en este tipo de hongos, el apareamiento es el preludio para llevar a cabo el proceso de patogenicidad. Pérez-Rodríguez et al. (2023) realizaron ensayos de expresión

génica en *U. maydis* bajo ciertas condiciones de adición de Put exógena en mutantes con deleciones los genes que codifican para la ODC y Spd , y observaron un aumento en la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, procesamiento del DNA, síntesis de proteínas, energía, entre otros, mencionando los anteriores ya que estos procesos son necesarios para el correcto funcionamiento del organismo y su capacidad de enfrentarse a condiciones de estrés, concordando con los resultados obtenidos en este trabajo. La influencia e interacción de las PAs con vías de señalización vitales es indirecta, Yan et al. (2022) y Zhang et al. (2023b) realizaron análisis transcriptómicos en hongos evaluando la relación de las poliaminas con otras vías de señalización y obtuvieron que la putrescina puede afectar al transcriptoma general de este hongo, hallando cambios significativos en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de ácidos carboxílicos, glicolisis, gluconeogénesis, vías metabólicas de amino ácidos, la vía de la cAMP, así como la alteración de esta vía de síntesis de PAs provoca una acumulación de PAs en la célula provocando la inhibición o sobreexpresión de genes relacionados con vías de señalización vitales para la célula.

En el caso de la condición a pH 3 la adición de Put 10 mM (**Fig. 26, 24**) observamos igualmente la presencia de tubos de conjugación a pesar de estar en medio ácido, esto puede ser debido a que se ha reportado que las poliaminas confieren una protección contra el estrés a pH ácido a comparación de un pH alcalino, debido a que probablemente las poliaminas en un medio básico se desprotonan y se neutralicen, siendo capaces de cruzar la membrana celular alterando la homeostasis, mientras que, a un pH ácido, la diferencia del pH transmembranal limita la entrada de aminos exógenas a la célula, manteniendo el pH celular, confiriendo así una protección contra el estrés inducido por pH ácido (Finger et al., 2014; Lomozik et al., 2005; Yohannes et al., 2005). En el caso de *S. reilianum* en condiciones ácidas se observó la formación de células tipo racimo de uvas y en el control del apareamiento sin putrescina no hay una presencia de tubos de conjugación a comparación de los cultivos tratados con distintas concentraciones

de Put, infiriendo así que la adición de Put exógena a pH 3 confiere cierta protección ante el estrés ácido, así como proporciona cierta ventaja al momento de la formación de tubos de conjugación en condiciones de apareamiento.

### 7.6 Análisis de expresión de los genes involucrados en biosíntesis de poliaminas en respuesta la adición de putrescina exógena a 0.1, 5 y 10 mM

Para la realización ensayos RT-PCR semicuantitativo se obtuvieron los ciclos de saturación de cada uno de los genes a analizar mediante PCR de punto final. Los ciclos de saturación para cada uno de los genes se muestran en la Tabla 1.

Posterior se realizaron los RT-PCR para analizar la expresión los genes que participan en el metabolismo de poliaminas bajo la adición de distintas concentraciones de Put exógena en MM pH 7 bajo las condiciones anteriormente mencionadas. En la **Fig. 28** se observan las bandas obtenidas para cada una de las condiciones y genes analizados, y en la **Fig. 29** observamos la expresión relativa.

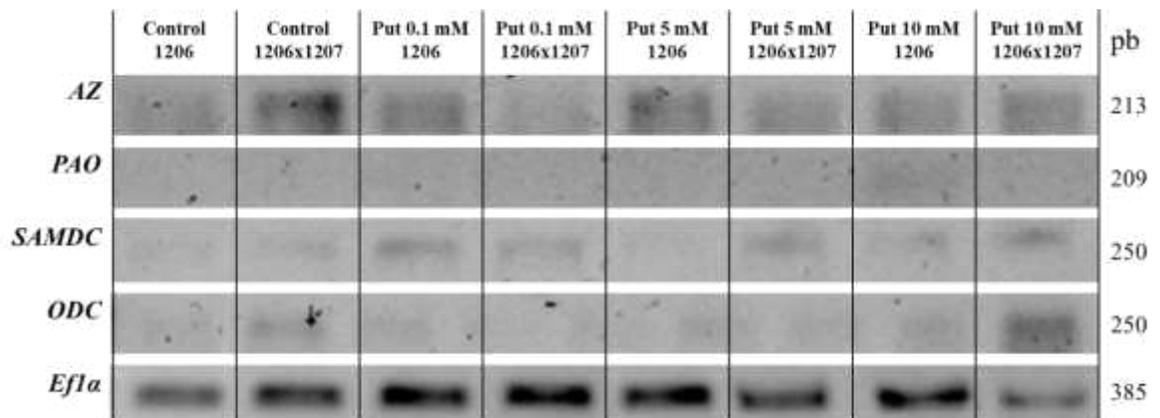


Figura 28. Análisis de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de PAs mediante RT-PCR semi-cuantitativo.

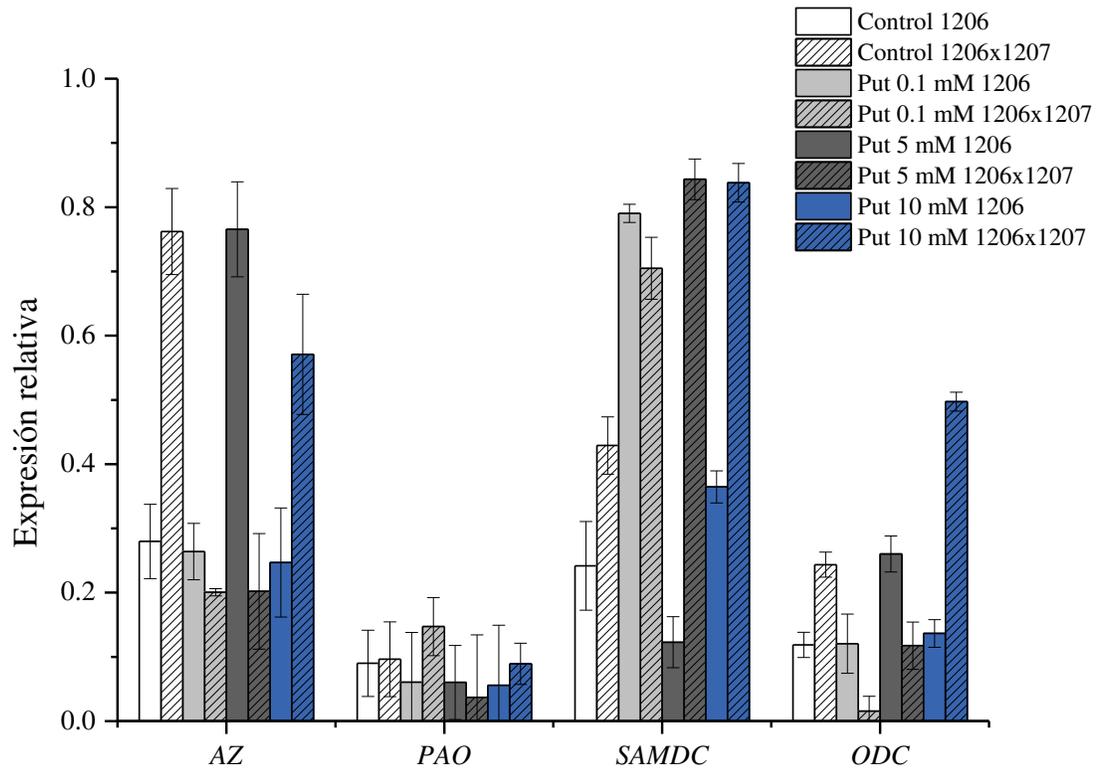


Figura 29. Expresión relativa de los genes involucrados en la biosíntesis de poliaminas durante el apareamiento de *S. reilianum* bajo la adición de Put exógena a diferentes concentraciones (0.1, 5, 10 mM) en MM pH 7 48 h. Los datos se graficaron con el software ORIGIN.

Para el gen de la antienzima observamos una expresión constitutiva y en las condiciones Ctrl 1206x1207, 5 mM 1206 y 10 mM 1206x1207 hay un aumento en la expresión relativa esto puede deberse a que la Az busca mantener la homeóstasis de PAs en la célula y comienza a expresarse cuando hay una alta presencia de estas moléculas evitando un desequilibrio, por lo que el aumento de la intensidad de esta banda puede ser debido que hay un sobrante de PAs para la célula y requiere degradarla infiriendo que este aumento se debe a que Put funciona como sustrato para la síntesis de Spd y así beneficiar el apareamiento sin que en estas condiciones experimentales se permita una acumulación en exceso; mientras que

en las demás condiciones observamos una baja expresión relativa, entendiéndose que Az se está expresando sin embargo su transcripción no es tan necesaria a comparación de las condiciones mencionadas ya que no existe un aumento en la concentración de PAs dentro de la célula (Yin et al., 2024) .

Para el gen de la poliamina oxidasa se observa una muy baja expresión relativa, probablemente se deba a que no es necesaria la vía de retroconversión de PAs en *S. reilianum* en las condiciones estudiadas (Salvi & Tavladoraki, 2020).

Para el gen de la S-adenosil metionina descarboxilasa la expresión en casi todas las condiciones se observa una alta expresión relativa, a excepción de la condición Put 5 mM 1206, lo que sugiere que Put está fungiendo como sustrato para Spd, por lo que para esta conversión se requiere de mayor sustrato que es el que proporciona SAMDC a la vía metabólica (Valdés-Santiago, et al., 2012).

En el caso del gen de la ornitina descarboxilasa observamos un aumento en la expresión relativa en la condición Put 10 mM 1206x1207 a comparación del apareamiento control, en este caso se podría esperar un disminución de la expresión debido a que es la condición con Put más alta, sin embargo, en los cultivos se observó una disminución en el crecimiento celular y formación de hifas de conjugación, por lo que se infiere que en esta condición se encuentra este aumento de la expresión relativa debido a que las PAs juegan papeles en la protección a condiciones de estrés para la célula (Singh et al., 2020).

Se ha observado que las PAs juegan un papel importante en la regulación del proceso del apareamiento afectando, ya sea de manera positiva o negativa, la homeostasis celular, incluyendo la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (ROS), apareamiento, proliferación celular, transcripción de ciertos genes, entre otros, por lo que mantener la homeóstasis de estas moléculas en la célula es un trabajo importante que las enzimas anteriormente analizadas llevan a cabo. ( Yin et al., 2024; Franco-Cano et al., 2021; Zhao et al., 2021; Lomozik et al., 2005).

### 7.7 Expresión del gen *SrEf1α* in planta

Posterior a la recolección de plantas de maíz a 7 dpi inoculadas por *S. reilianum*, se tomaron las hojas que presentaban síntomas de infección (necrosis, clorosis). Se realizó un PCR de punto final que amplifica el *Ef1α* para confirmar la presencia de *S. reilianum* en éstas, obteniendo lo siguiente (**Fig. 30**).

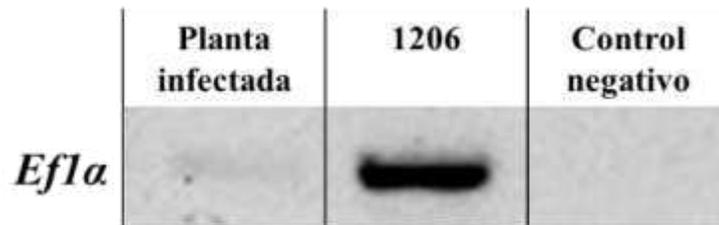


Figura 30. PCR usando DNA de planta de maíz infectada por *S. reilianum*.

Como control positivo se usó ADN de la cepa 1206 y como control negativo se usó agua grado biología molecular. Como se puede observar en el gel, la banda del amplicón es muy tenue indicando bajos niveles de expresión de este gen, infiriendo que la cantidad de material genético de *S. reilianum* es muy bajo. Posteriormente se realizó un RT-PCR a 28 ciclos para *Ef1α* sin amplificación alguna, lo que podría indicar que la cantidad del RNA mensajero de *S. reilianum* en las plantas de maíz no fue lo suficiente para que pueda ser detectado mediante este método, ya que el objetivo era analizar la expresión de los genes de vía de la síntesis de PAs *in planta*. Poloni & Schirawski (2016) y Storfie & Saville (2021) lograron identificar y analizar la expresión génica de *S. reilianum* bajo condiciones de apareamiento *in planta* utilizando la técnica de RT-qPCR y qPCR; usando también como punto de comparación a *U. maydis*, observando una diferencia entre los niveles de expresión, siendo los de *U. maydis* más alto aún a pocos días post infección, lo que indica que *S. reilinaum* necesita mayor tiempo para colonizar a *Z. mays* que *U. maydis*, por lo que se necesitaría de una mayor cantidad de tiempo para poder analizar la expresión de estos genes mediante RT-PCR punto final, sin embargo, sería plausible hacer estas identificaciones mediante RT-qPCR.

## 7.8 Obtención y aislamiento de transformantes *Srodc-*

Se realizaron 15 intentos de eventos de transformación para la obtención de mutantes nulas para el gen de la *odc* en protoplastos de *S. reilianum* con el protocolo I, y 8 eventos de transformación con el protocolo II, usando el cassette de interrupción *Srodc-* (4563 pb) con el gen de selección para resistencia al antibiótico Higromicina B (HPH) (**Fig. 31**) a partir del plásmido Sr\_ODC\_HPH\_pJET mediante una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos 2217 (5'-AAGTCAGCTTTTGCAGGCAG - 3') - 2220 (5'-GCCGCAGCGTGAACAATCCA - 3') ( **Fig. 32**) (Davidson et al., 2002).

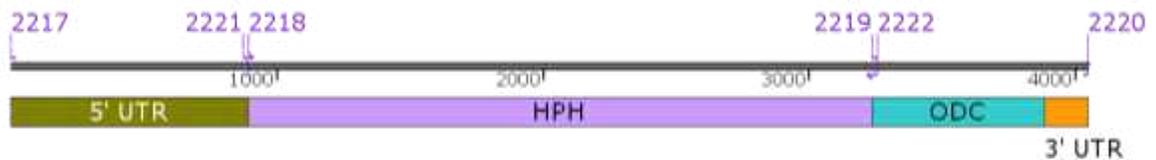


Figura 31. Cassete de interrupción *Srodc* con el gen de selección HPH.

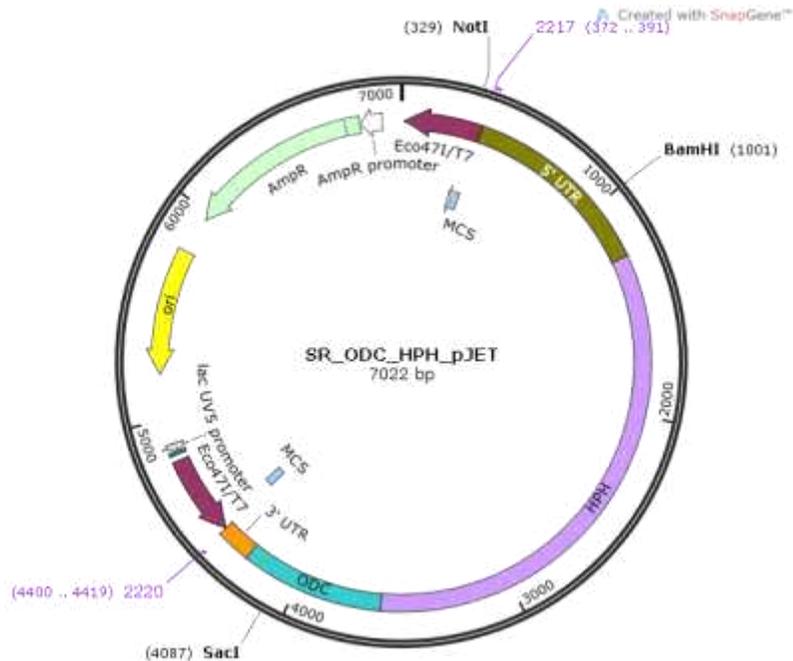


Figura 32. Plásmido pJET que contiene el cassette *Srodc*.

En los eventos de transformación con el protocolo I se observó la problemática de en las placas suplementadas con diversas concentraciones de HygB (75-250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) aún se observaba el crecimiento de células pasado el tiempo de recuperación e incubación de los protoplastos transformados. Se sembraron alrededor 50 colonias seleccionada en MC sólido suplementado con ~20% menos HygB que la placa de donde se tomaron, junto con 5 colonias de la placa control, y se observó crecimiento tanto en el control como en las colonias recuperadas (**Fig. 33**). Se hipotetizó si la Higromicina B estaba degradada, sin embargo, al momento de utilizarla siempre se tomaban las precauciones de manejo necesarias ya que es fotosensible, y se realizaron cultivos en Medio Completo suplementado con HygB a distintas concentraciones (50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se incubaron a 28°C 24-48 h, y no se observó crecimiento alguno en las placas suplementadas a diferencia de las placas sin HygB, por lo que nuestra HygB se encontraba en óptimas condiciones.

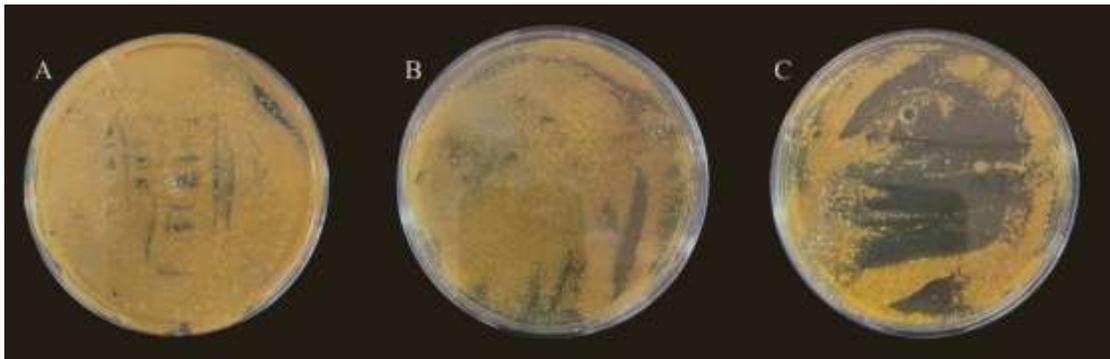


Figura 33. Evento de transformación con el protocolo I en DCMS. A. Control sin Hyg. B. Protoplastos de la cepa 1206 transformados suplementados Hyg 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . C. Protoplastos de la cepa 1207 transformados suplementado Hyg 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Posteriormente, se decidió cambiar al protocolo II para preparación y transformación de protoplastos obteniendo los siguientes resultados (**Fig. 34**), en la placa control se observó crecimiento en forma de tapete de los protoplastos, en las placas con el antibiótico de selección no se observó crecimiento alguno aun pasados los 5-7 días de incubación (**Fig. 34 B, C**). En un evento de transformación

se observó crecimiento de algunas colonias en presencia del factor de selección (HygB), estas se resembraron como se describe en la sección 6.7.2.

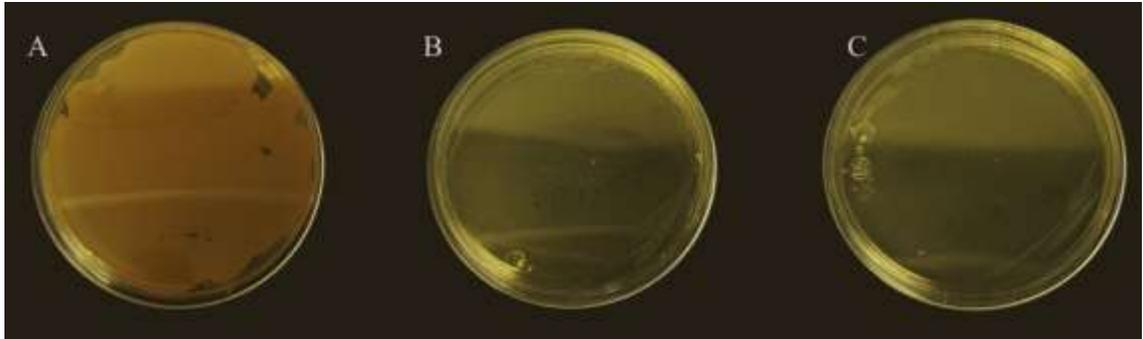


Figura 34. Evento de transformación con el protocolo II en medio RegAg. A. control sin Hyg. B. Protoplastos de la cepa 1206 transformados suplementados Hyg 100 µg/mL. C. Protoplastos de la cepa 1207 transformados suplementado Hyg 100 µg/mL.

Las diferencias principales entre los dos métodos utilizados son: en el protocolo I posterior a la adición e incubación de los protoplastos con PEG se agregó STC, se realizaron centrifugaciones tal como se describe en la sección 6.4.1, el cual es un buffer que permite estabilizar los protoplastos; y en el protocolo II, los protoplastos se incubaron directamente a un medio regeneración posterior a la adición e incubación con PEG (6.4.2).

Otras de las diferencias es la preparación y los componentes de los medios de cultivo, en el Agar Regeneración se hacen dos capas, una con la doble concentración final de HygB, una vez sólida se agrega la última capa de medio sin el antibiótico. Existen varias técnicas para transformar protoplastos de hongos, y de acuerdo a varios autores, una transformación exitosa depende del hongo a transformar, la preparación de lo protoplastos e incluso la conformación del ADN que se usará para transformar, en diversos hongos se tiene mayor éxito con un ADN linealizado, y en otros puede ser tanto linealizado como circular (Lim et al., 2021; van den Berg & Maruthachalam, 2015; Mathur & Koncz, 1998). En el caso de este trabajo de transformación, se observó que el protocolo II fue más efectivo,

probablemente debido a que no realizó el paso de adición del buffer STC, el cual conlleva una centrifugación de los protoplastos de *S. reilianum*, donde se observó que era muy complicada su recuperación, y la problemática expuesta anteriormente.

Se realizó la extracción de ADN genómico de colonias crecidas en MC suplementado con HygB (150 µg/mL), posterior se realizó el escrutinio molecular mediante PCR para comprobar la presencia del gen HPH en transformantes que crecieron en MC suplementado con Hyg B (**Fig. 34**). Se realizó una PCR usando los oligonucleótidos 2228 – 3' Hyg para amplificar la región no codificante 3' de ODC, un fragmento del ORF de ODC y una región del gen HPH. Se obtuvo un amplicón con el tamaño esperado (1799 pb), en el control negativo (WT) no se obtuvo amplificación alguna (**Fig. 36A**). Se realizó un PCR usando los oligonucleótidos 2227 – 2214 para amplificar la región no codificante 5' de ODC y una región del gen HPH. Se obtuvo un amplicón del tamaño esperado (1561 pb) y en el control negativo (WT) no se obtuvo amplificación alguna, como era lo esperado (**Fig. 36B**). Con estos resultados de amplificación indican la presencia del gen HPH en las posibles mutantes de la cepa 1207, considerando la ausencia de amplificación en el DNA control (cepa silvestre).

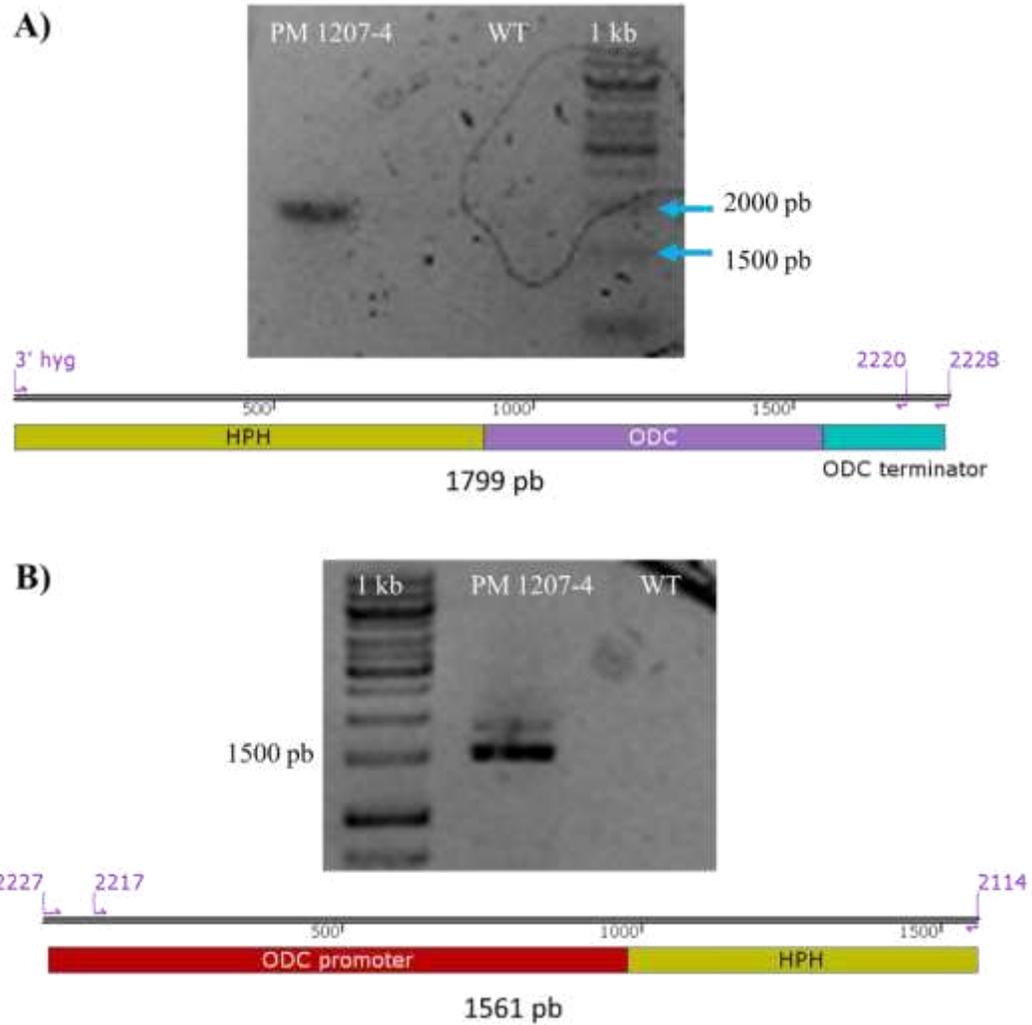


Figura 36. Escrutinio molecular de la posible mutante cepa 1207 con los oligonucleótidos que amplifican para el las regiones 5' y 3' no codificante de ODC más una región del gen HPH. A) Amplificación mediante PCR del terminador de ODC, un fragmento del ORF de ODC y una región de HPH. B) Amplificación mediante PCR del promotor de ODC más una región de HPH.

Para confirmar la delección del ORF de ODC se realizó un PCR usando los oligonucleótidos 2193 – 2194 (250 pb) y se obtuvieron los siguientes resultados (**Fig. 35A**), se observó la amplificación del fragmento del ORF de ODC debido a que en la construcción del cassette de interrupción Sr\_Odc\_HPH no se eliminó

completamente el ORF dejando un pequeño segmento donde los oligonucleótidos específicos para ODC amplificaron una banda de 250 pb (**Fig. 35B**), lo que hace imposible con estos oligonucleótidos comprobar la eliminación del ORF, por lo que en este caso se sugiere el diseño de oligonucleótidos que abarquen una zona que se haya eliminado en el cassette Sr\_Odc\_HPH. Sin embargo, para comprobar si el cassette de interrupción se integró correctamente, se procedió a realizar reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos diseñados fuera de la construcción.

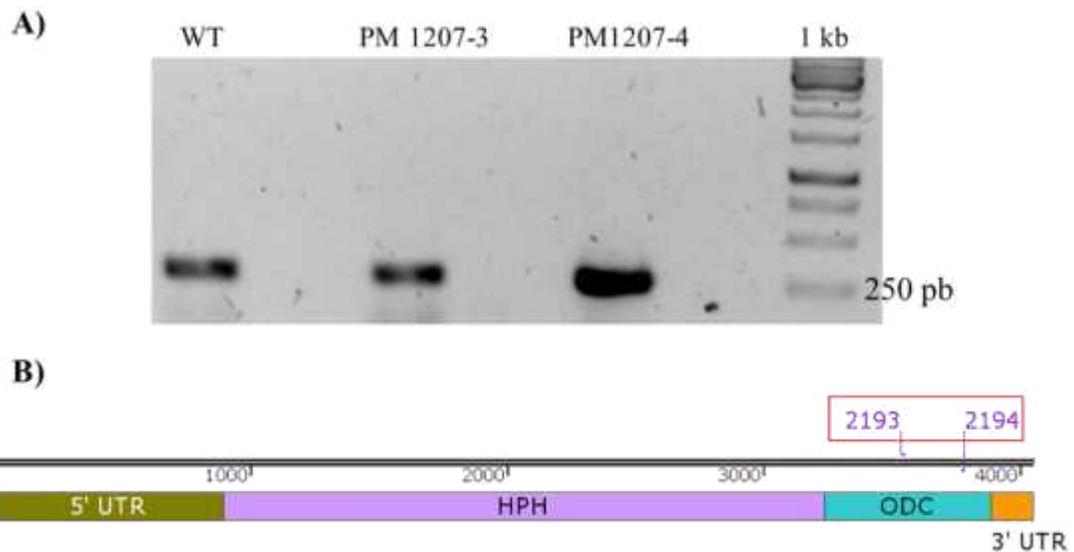


Figura 35. Escrutinio molecular de la posible mutante cepa 1207 con los oligonucleótidos que amplifican para el ORF de SrODC. A) Electroforesis en gel de agarosa al 1%. B) Cassette de interrupción Sr\_ODC\_HPH, en el recuadro rojo se señala la zona del ORF que no fue eliminado en la construcción del cassette y que amplifica en el PCR.

Posterior a los escrutinios moleculares, los cuales sugieren la integración del cassette de interrupción en el *locus* indicado, se realizaron pruebas de auxotrofia a putrescina (**Fig. 37**) en colonias de la cepa 1207 que crecieron en medio mínimo suplementado con HygB (100 µg/mL). Se realizaron hasta 5 pases de auxotrofia a putrescina en MM líquido. Sin embargo, en todos ellos se observó crecimiento de las posibles mutantes, ya que presentaron resistencia a higromicina B, se incluyó

como control a la cepa *odc-* de *U. maydis*, la cual dejó de crecer al segundo pase en medio mínimo. Con estos datos colectados se sugiere lo siguiente: un falso positivo en las pruebas de auxotrofía; o que *S. reilianum* sea capaz de sintetizar PAs por una vía alternativa a la ODC. Se realizó para ello un análisis *in silico* (pag. 43) para buscar enzimas putativas a la ADC en *S. reilianum*, esta enzima cataliza la reacción de descarboxilación de la arginina para dar paso a la putrescina, aun cuando, no se encontró ningún emparejamiento para esta enzima como se esperaba debido a que en hongos, salvo excepciones muy específicas tales como el ascomiceto *Aspergillus oryzae* y *Gigospora rosea* (Murakami et al., 2024; Sannazzaro et al., 2004), hasta el momento no se ha reportado la vía de la ADC en otros hongos o basidiomicetos más que en los anteriormente mencionados, sin embargo, para esta situación se sugiere un análisis bioquímico para observar si existe algún indicio de la actividad de esta enzima en *S. reilianum*, como es el caso de de *Verticillium dahliae*.

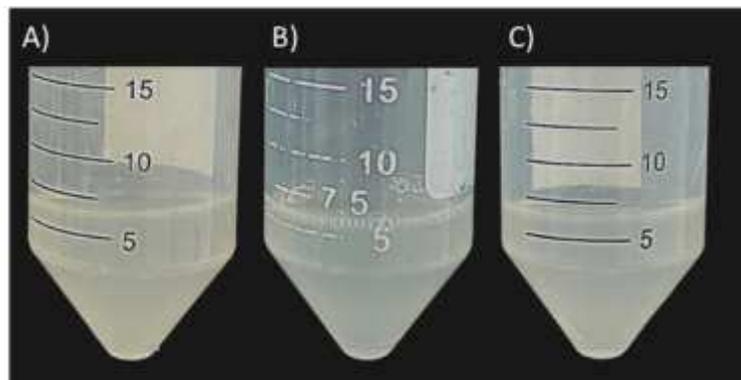


Figura 37. Pruebas de auxotrofía en transformantes de la cepa 1207 en MM pH 7 48 h de incubación a 26° C. Se muestran al 4to pase. A) Control WT. B) Posible mutante 1207-3. C) Posible Mutante 1207-4.

Como se mencionó anteriormente, el cassette de interrupción *SrOdc* mantiene un fragmento del ORF correspondiente al extremo 3' (652 pb), esto debido a que la distancia intergénica entre el gen de la ODC y el siguiente gen (*Sr12349*) es de solamente 250 pb (**Fig. 38B**), por lo que se decidió no eliminar por completo el ORF

considerando que la delección total del ORF de ODC podría afectar al gen vecino y obtener resultados sesgados, sin embargo, haciendo una comparación de la posición de los genes, encontramos la misma situación en *U. maydis* (**Fig. 38A**) donde se encuentra un gen río abajo con una cercanía al gen ODC, hongo donde Guevara-Olvera et al. (1997) obtuvieron mutantes nulas para este gen con resultados exitosos, por lo que alguna de las opciones que se propone para solucionar esta problemática es, rediseñar el cassette de transformación SrOdc, ya que el diseño de este es lo que podría ser el origen de la baja probabilidad de transformación de los protoplastos de *S. reilianum*. Recientemente, Yin et al. (2023) obtuvieron mutantes nulas en *S. scitamineum* para diversos genes que codifican para la síntesis de poliaminas, entre ellos ODC obteniendo mutantes nulas exitosas, y de acuerdo a las bases de datos, *S. scitamineum* tiene el mismo acomodo del gen para ODC que *U. maydis* y *S. reilianum* (**Fig. 38B**), por lo que un diseño del cassette de interrupción para *S. reilianum* con una eliminación total del ORF es viable e hipotetizamos que este diseño que se utilizó pudo haber afectado de manera negativa al realizar los eventos de transformación.

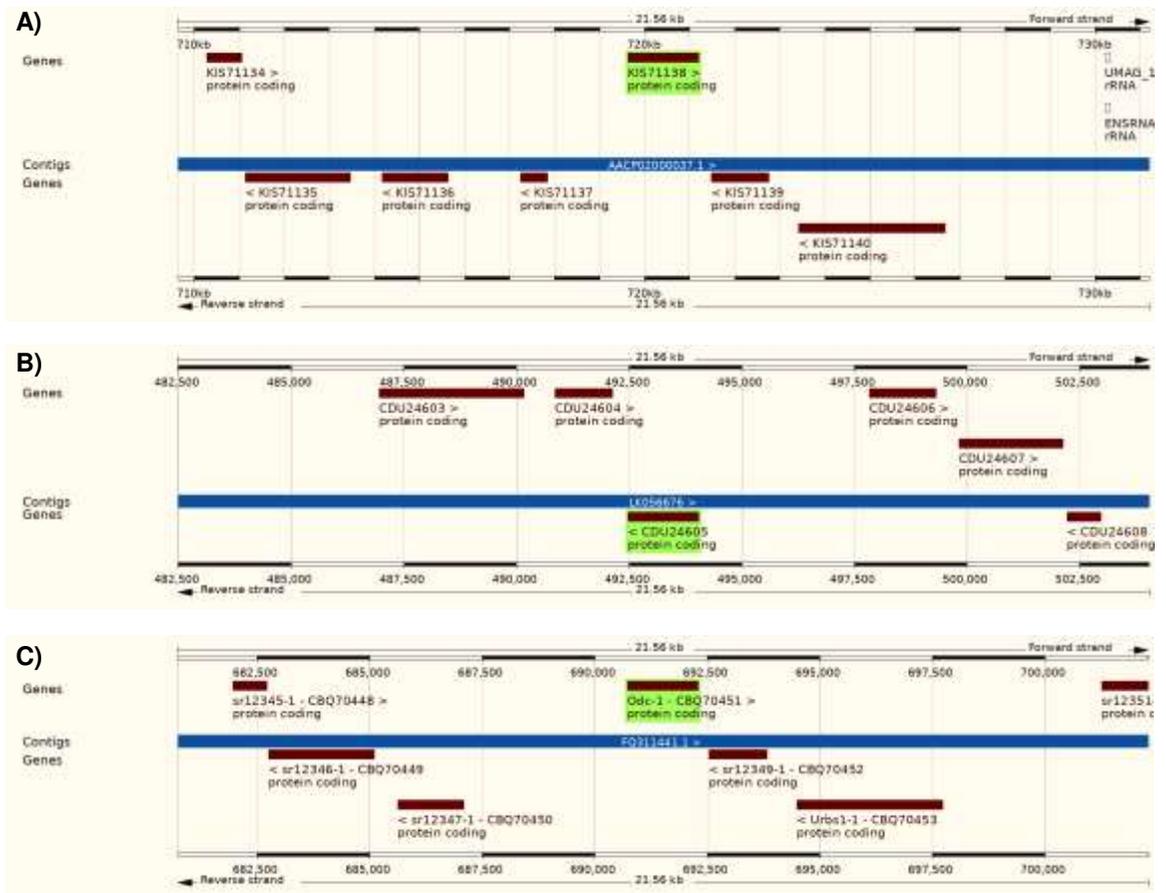


Figura 38. Loci del gen *ODC* en la región genómica de distintas especies de basidiomicetos. En verde se indica el gen *ODC* A) *Ustilago maydis* (UMAG\_01048). B) *Sporisorium scitamineum* (SPSC\_04106). C) *Sporisorium reilianum* (Sr12348). (<http://fungi.ensembl.org/index.html>).

*S. reilianum* es un modelo de estudio que poco a poco ha ido tomando relevancia en el área de biología molecular y sobre todo en la fitopatogénesis, con el cual sí existen estudios donde se ha logrado transformar y mutar genes específicos en este modelo, algunos ejemplos: Schweizer et al. (2018) obtuvieron mutantes nulas en genes de proteínas efectoras relacionadas a la capacidad de virulencia, la técnica que utilizaron para transformar fue la establecida por Schulz et al. (1990) que consiste en la técnica mediante el uso de PEG, utilizada ampliamente en *U. maydis*, obteniendo un resultado exitoso; Ghareeb et al. (2019) obtuvieron un clúster de varias mutantes nulas en genes que codifican proteínas efectoras en *S.*

*reilianum* por la técnica establecida por Schulz et al. (1990) referenciada anteriormente.

Además de las técnicas de transformación genética convencionales, tenemos la reciente tecnología de CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas 9 para realizar ediciones en genes; Werner et al. (2023) realizaron un protocolo de edición genética en *S. reilianum* mediante CRISPR-Cas 9 y una transformación de los protoplastos mediante la técnica de PEG; de acuerdo a sus resultados preliminares se obtuvieron resultados exitosos, por lo que una edición genética mediante esta técnica en *S. reilianum* para obtención de mutantes nulas en el gen de la ODC puede ser una técnica viable a utilizar.

En el caso de este trabajo y la problemática presentada, se propone modificar primeramente el cassette de interrupción para el gen *Odc* por uno que contenga la delección total del ORF de éste, posterior se propone la técnica de transformación mediante PEG debido a que cuando se realizó la transformación mediante la técnica establecida por Tsukuda et al. (1988) en el paso de la centrifugación la recuperación de las células era demasiado complicado y eso afectaba su viabilidad; en el caso del protocolo mediante PEG este paso no se lleva a cabo y era donde se presentaba la problemática de crecimiento en medio suplementado con HygB pero se hipotetiza que esto es debido a la conformación del cassette de interrupción *odc-*, por lo que para la obtención de mutantes *odc-* en *S. reilianum* se propone realizar una modificación en el cassette de interrupción eliminando totalmente el ORF y usar la técnica de transformación mediante PEG.

## VIII. CONCLUSIONES

El análisis *in silico* en *S. reilianum* de los genes relacionados a biosíntesis de poliaminas arrojó que se encuentran todas las enzimas reportadas hasta el momento a excepción de la arginina descarboxilasa y espermidina sintasa, por lo que el basidiomiceto *S. reilianum* es capaz de sintetizar las poliaminas putrescina y espermidina vía ODC únicamente, así como llevar a cabo el proceso de retroconversión vía PAO y SSAT.

El análisis filogenético de cada uno de los genes analizados en basidiomicetos arroja que derivan de un ancestro en común, posteriormente dividiéndose en dos a tres clados organizados por clases, así como que *S. reilianum* no es tan cercano a *U. maydis* como se ha pensado a pesar de ser patógenos de la misma especie.

La adición de putrescina exógena en 0.1 mM, 5 mM y 10 mM propician un aumento de hasta el 30% en la capacidad de generación de tubos de conjugación en *S. reilianum*, infiriendo que la adición de putrescina afecta de manera positiva la capacidad de apareamiento de *S. reilianum*.

La concentración de putrescina exógena 10 mM en cultivos de *S. reilianum* resulta ser citotóxica, aminora levemente la generación de tubos de conjugación, modificando la morfología del hongo y disminuye la cantidad de células en el cultivo.

La expresión de los genes implicados en la biosíntesis y metabolismo de las PAs se ve modificada cuando se le adiciona Put exógena al medio, pero no se observó un cambio sustancial al momento del apareamiento, infiriendo que los genes analizados no participan directamente en este proceso.

Se logró identificar la presencia de *S. reilianum* en plantas de maíz infectadas, sin embargo, el material genético del hongo no es suficiente para ser detectado por RT-PCR.

El diseño del cassette de delección *SrOdc*- probablemente no es tan viable debido a que mantiene un fragmento del ORF del gen de interés. En los casos

exitosos de obtención de mutantes *odc*- se realiza la delección total, siendo las técnicas de transformación las que varían unas de otras, por lo que se propone realizar un diseño del cassette que contenga una delección total del ORF de ODC tal cual se ha realizado exitosamente en otros ustilaginales (*S. scitamineum*, *U. maydis*) y utilizar la técnica de transformación mediante PEG.

## IX. PERSPECTIVAS

Realizar ensayos de apareamiento, virulencia *in planta* y expresión génica para la vía de síntesis de PAs en presencia del inhibidor químico DFMO (difluorometilornitina) de la ODC.

Realizar ensayos de apareamiento a distintas concentraciones bajo condiciones de pH 3-7 en Medio Mínimo con una curva de Put de 10 – 15 mM y cuantificar proteínas totales como indicadoras de crecimiento celular.

Realizar tinción con DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindol) en ensayos de apareamiento con concentraciones de putrescina exógena a diferentes pH para observar los núcleos de las hifas dicarióticas y corroborar si a pH ácido (>pH 5) se lleva a cabo el apareamiento.

Realizar qRT-PCR para llevar a cabo los análisis de expresión *in planta*.

Rediseñar el cassette de interrupción SrOdc\_HPH por uno que cuente con una delección total del gen ODC.

Aplicar otras técnicas de obtención de mutantes en hongos levaduriformes como la edición genética (como CRISPR-Cas9) para obtener la mutante *odc-* en *Sporisorium reilianum*.

## IX. REFERENCIAS

- Alcázar, R., & Tiburcio, A. F. (2018). Determination of arginine and ornithine decarboxylase activities in plants. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1694, pp. 117–122). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_11)
- Alkhzem, A. H., Laabei, M., Woodman, T. J., & Blagbrough, I. S. (2022). Practical Synthesis of Polyamine Succinamides and Branched Polyamines. *ChemistryOpen*, 11(10). <https://doi.org/10.1002/open.202200147>
- Almrud, J. J., Oliveira, M. A., Kern, A. D., Grishin, N. V., Phillips, M. A., & Hackert, M. L. (2000). Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: Structural insights to antizyme binding. *Journal of Molecular Biology*, 295(1), 7–16. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3331>
- Astiz-Gassó, M. M. (2017). *Histopatología de ustilaginales (carbones) en Poaceas de los géneros Sorghum, Bromus y Glyceria* [Tesis Doctoral]. FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.
- Bauer, M. A., Carmona-Gutiérrez, D., Ruckenstuhl, C., Reisenbichler, A., Megalou, E. V., Eisenberg, T., Magnes, C., Jungwirth, H., Sinner, F. M., Pieber, T. R., Fröhlich, K. U., Kroemer, G., Tavernarakis, N., & Madeo, F. (2013). Spermidine promotes mating and fertilization efficiency in model organisms. *Cell Cycle*, 12(2), 346–352. <https://doi.org/10.4161/cc.23199>
- Bavaria, M. N., Jin, S., Ray, R. M., & Johnson, L. R. (2014). The mechanism by which MEK/ERK regulates JNK and p38 activity in polyamine depleted IEC-6 cells during apoptosis. *Apoptosis*, 19(3), 467–479. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0944-1>
- Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). Killing softly: a roadmap of Botrytis cinerea pathogenicity. In *Trends in Plant Science* (Vol. 28, Issue 2, pp. 211–222). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>

- Boldt, A., Miersch, J., & Reinbothe, H. (1971). Metabolism of agmatine in fruit-bodies of the fungus *Panus tigrinus* (Bull. ex Fr.) Sing. *Phytochemistry*, *10*(4), 731–738. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97140-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97140-1)
- Briones-Reyes, D., Castillo-González, F., Chávez-Servia, J. L., Aguilar-Rincón, V. H., García-de Alba, C. D. L., & Ramírez Hernández, A. (2015). Respuesta del maíz nativo del Altiplano mexicano a pudrición de mazorca, bajo infección natural. *Agronomía Mesoamericana*, *26*(1), 73. <https://doi.org/10.15517/am.v26i1.16922>
- 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*. / *219 MPMI*, *24*(2), 219–232. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- CESAVEM. (2015). *Campaña Manejo Fitosanitario del Maíz CARBÓN DE LA ESPIGA DEL MAÍZ (Sporisorium reilianum = Sphacelotheca reiliana) COMITÉ ESTATAL DE SANIDAD VEGETAL.*
- Chandrasekaran, M., Thangavelu, B., Chun, S. C., & Sathiyabama, M. (2016). Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. In *Journal of General Plant Pathology* (Vol. 82, Issue 5, pp. 233–239). Springer Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0672-9>
- Chang, C., Cai, E., Deng, Y. Z., Mei, D., Qiu, S., Chen, B., Zhang, L. H., & Jiang, Z. (2019). cAMP/PKA signalling pathway regulates redox homeostasis essential for *Sporisorium scitamineum* mating/filamentation and virulence. *Environmental Microbiology*, *21*(3), 959–971. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14496>
- Cimmino, A., Andolfi, A., & Evidente, A. (2014). *Phytotoxic Terpenes Produced by Phytopathogenic Fungi and Allelopathic Plants.*
- Clinton, G. P. (1902). Mycological Society of America. *The Journal of Mycology*, *8*(3), 128–156. <http://www.jstor.org/stable/3752547> .

- Dai, F., Yu, W., Song, J., Li, Q., Wang, C., & Xie, S. (2017). Extracellular polyamines-induced proliferation and migration of cancer cells by ODC, SSAT, and Akt1-mediated pathway. *Anti-Cancer Drugs*, 28(4), 457–464. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000465>
- David-Palma, M. (2017). *Elucidating the mating system of Phaffia rhodozyma, an astaxanthin-producing yeast with biotechnological potential*. Universidade Nova de Lisboa.
- David-Palma, M., Sampaio, J. P., & Gonçalves, P. (2016). Genetic Dissection of Sexual Reproduction in a Primary Homothallic Basidiomycete. *PLoS Genetics*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006110>
- Davidson, R. C., Blankenship, J. R., Kraus, P. R., De, M., Berrios, J., Hull, C. M., Souza, C. D', Wang, P., & Heitman, J. (2002). A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. In *Microbiology* (Vol. 148).
- Davidson, V. L. (2018). Protein-Derived Cofactors Revisited: Empowering Amino Acid Residues with New Functions. *Biochemistry*, 57(22), 3115–3125. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00123>
- Devanna, B. N., Jain, P., Solanke, A. U., Das, A., Thakur, S., Singh, P. K., Kumari, M., Dubey, H., Jaswal, R., Pawar, D., Kapoor, R., Singh, J., Arora, K., Saklani, B. K., Anilkumar, C., Maganti, S. M., Sonah, H., Deshmukh, R., Rathour, R., & Sharma, T. R. (2022). Understanding the Dynamics of Blast Resistance in Rice-Magnaporthe oryzae Interactions. In *Journal of Fungi* (Vol. 8, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jof8060584>
- Dittiger, L. D., Chaudhary, S., Furch, A. C. U., Mithöfer, A., & Schirawski, J. (2023). Plant Responses of Maize to Two formae speciales of Sporisorium reilianum Support Recent Fungal Host Jump. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21). <https://doi.org/10.3390/ijms242115604>

- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017). Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology Spectrum*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0023-2016>
- Domínguez-santos, R., Kosalková, K., Sánchez-orejas, I. C., Barreiro, C., Pérez-pertejo, Y., Reguera, R. M., Balaña-fouce, R., & García-estrada, C. (2022). Characterization of the gene encoding s-adenosyl-l-methionine (Adomet) synthetase in penicillium chrysogenum; role in secondary metabolism and penicillin production. *Microorganisms*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010078>
- Dorighetto-Cogo, A., Ferreira, K. dos R. D., Okorokov, L. A., & Alessandro C. Ramos, Arnoldo R. Façanha, A. L. O.-F. (2018). Spermine modulates fungal morphogenesis and activates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase during yeast to hyphae transition. *BIOLOGY OPEN*.
- El-Sayed, A. S. A., George, N. M., Yassin, M. A., Alaidaroos, B. A., Bolbol, A. A., Mohamed, M. S., Rady, A. M., Aziz, S. W., Zayed, R. A., & Sitohy, M. Z. (2019a). Purification and Characterization of Ornithine Decarboxylase from *Aspergillus terreus*; Kinetics of Inhibition by Various Inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24152756>
- El-Sayed, A. S. A., George, N. M., Yassin, M. A., Alaidaroos, B. A., Bolbol, A. A., Mohamed, M. S., Rady, A. M., Aziz, S. W., Zayed, R. A., & Sitohy, M. Z. (2019b). Purification and Characterization of Ornithine Decarboxylase from *Aspergillus terreus*; Kinetics of Inhibition by Various Inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15). <https://doi.org/10.3390/molecules24152756>
- El-Sayed, A. S. A., George, N. M., Yassin, M. A., Alaidaroos, B. A., Bolbol, A. A., Mohamed, M. S., Rady, A. M., Aziz, S. W., Zayed, R. A., & Sitohy, M. Z. (2019c). Purification and Characterization of Ornithine Decarboxylase from *Aspergillus terreus*; Kinetics of Inhibition by Various Inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24152756>

- Eshtukova-Shcheglova, E. A., Perevoshchikova, K. A., Eshtukov-Shcheglov, A. V., Cheshkov, D. A., & Maslov, M. A. (2022). Amination of epoxides as a convenient approach for lipophilic polyamines synthesis. *Tonkie Khimicheskie Tekhnologii*, 17(4), 323–334. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-4-323-334>
- Ferris, A. C., & Walbot, V. (2021). Understanding ustilago maydis infection of multiple maize organs. In *Journal of Fungi* (Vol. 7, Issue 1, pp. 1–9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jof7010008>
- Finger, S., Schwieger, C., Arouri, A., Kerth, A., & Blume, A. (2014). Interaction of linear polyamines with negatively charged phospholipids: The effect of polyamine charge distance. *Biological Chemistry*, 395(7–8), 769–778. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0126>
- Fisher, K. E., & Roberson, R. W. (2016). Fungal Hyphal Growth – Spitzenkörper versus Apical Vesicle Crescent. *Fungal Genomics & Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.4172/2165-8056.1000136>
- Fonzi, W. A. (1989). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* ornithine decarboxylase expression in response to polyamine. *Journal of Biological Chemistry*, 264(30), 18110–18118. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)84684-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)84684-7)
- Fountain, J. C., Yang, L., Pandey, M. K., Bajaj, P., Alexander, D., Chen, S., Kemerait, R. C., Varshney, R. K., & Guo, B. (2019). Carbohydrate, glutathione, and polyamine metabolism are central to *Aspergillus flavus* oxidative stress responses over time. *BMC Microbiology*, 19(1), 209. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1580-x>
- Francisco-Ramírez, J., Sánchez, J. R., González, A., & de León, C. (2011). Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. *Ciencias Agrarias*, 43(2), 157–173. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=382837649013>

- Franco-Cano, A., Marcos, A. T., Strauss, J., & Cánovas, D. (2021). Evidence for an arginine-dependent route for the synthesis of NO in the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Environmental Microbiology*, *23*(11), 6924–6939. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15733>
- Fujihara, S., & Yoneyama, T. (1993). Effects of pH and Osmotic Stress on Cellular Polyamine Contents in the Soybean Rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 59, Issue 4). <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Geck, R. C., Foley, J. R., Stewart, T. M., Asara, J. M., Casero, R. A., & Toker, A. (2020). Inhibition of the polyamine synthesis enzyme ornithine decarboxylase sensitizes triple-negative breast cancer cells to cytotoxic chemotherapy. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 295, Issue 19, pp. 6263–6277). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012376>
- Ghareeb, H., Becker, A., Iven, T., Feussner, I., & Schirawski, J. (2011a). *Sporisorium reilianum* infection changes inflorescence and branching architectures of maize. *Plant Physiology*, *156*(4), 2037–2052. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179499>
- Ghareeb, H., Becker, A., Iven, T., Feussner, I., & Schirawski, J. (2011b). *Sporisorium reilianum* infection changes inflorescence and branching architectures of maize. *Plant Physiology*, *156*(4), 2037–2052. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179499>
- Ghareeb, H., Drechsler, F., Löffke, C., Teichmann, T., & Schirawski, J. (2015). SUPPRESSOR OF APICAL DOMINANCE1 of *Sporisorium reilianum* modulates inflorescence branching architecture in maize and arabidopsis. *Plant Physiology*, *169*(4), 2789–2804. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01347>
- Ghareeb, H., Drechsler, F., Löffke, C., Teichmann, T., Schirawski, J., Biology, M., Interactions, P., L, P. C. B. C., & Von, A. (2015). SUPPRESSOR OF APICAL DOMINANCE1 of *Sporisorium reilianum* Modulates In fl orescence Branching

*Architecture in Maize and Arabidopsis 1 [ OPEN ]*. 169(December), 2789–2804.  
<https://doi.org/10.1104/pp.15.01347>

- Ghareeb, H., Zhao, Y., & Schirawski, J. (2019a). Sporisorium reilianum possesses a pool of effector proteins that modulate virulence on maize. *Molecular Plant Pathology*, 20(1), 124–136. <https://doi.org/10.1111/mpp.12744>
- Ghareeb, H., Zhao, Y., & Schirawski, J. (2019b). Sporisorium reilianum possesses a pool of effector proteins that modulate virulence on maize. *Molecular Plant Pathology*, 20(1), 124–136. <https://doi.org/10.1111/mpp.12744>
- Gnat, S., Łagowski, D., Nowakiewicz, A., & Dyląg, M. (2021). A global view on fungal infections in humans and animals: infections caused by dimorphic fungi and dermatophytoses. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 131, Issue 6, pp. 2688–2704). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jam.15084>
- Guevara-Olvera, L., Xoconostle-Cázares, B., & Ruiz-Herrera, J. (1997a). Cloning and disruption of the ornithine decarboxylase gene of Ustilago maydis: evidence for a role of polyamines in its dimorphic transition. *Microbiology*, 143, 2237–2245.
- Guevara-Olvera, L., Xoconostle-Cázares, B., & Ruiz-Herrera, J. (1997b). Cloning and disruption of the ornithine decarboxylase gene of Ustilago maydis: Evidence for a role of polyamines in its dimorphic transition. *Microbiology*, 143(7), 2237–2245. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-7-2237>
- Han, X., Shangguan, J., Wang, Z., Li, Y., Fan, J., Ren, A., & Zhao, M. (2022a). *Spermidine Regulates Mitochondrial Function by Enhancing eIF5A Hypusination and Contributes to Reactive Oxygen Species Production and Ganoderic Acid Biosynthesis in Ganoderma lucidum*. <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Han, X., Shangguan, J., Wang, Z., Li, Y., Fan, J., Ren, A., & Zhao, M. (2022b). *Spermidine Regulates Mitochondrial Function by Enhancing eIF5A*

*Hypusination and Contributes to Reactive Oxygen Species Production and Ganoderic Acid Biosynthesis in Ganoderma lucidum.*  
<https://journals.asm.org/journal/aem>

- Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vincon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I., & Kämper, J. (2010). The transcription factor *rbf1* is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathogens*, 6(8), 17–18.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001035>
- Hernandez-Rojas, A. J., & Cervantes-Chávez, J. A. (2020). *ANÁLISIS in silico Y FUNCIONAL DE LA SÍNTESIS DE POLIAMINAS EN Sporisorium reilianum* [Tesis de Licenciatura]. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO.
- Hofer, S. J., Liang, Y. T., Zimmermann, A., Schroeder, S., Dengjel, J., Kroemer, G., Eisenberg, T., Sigrist, S. J., & Madeo, F. (2021). Spermidine-induced hypusination preserves mitochondrial and cognitive function during aging. *Autophagy*, 17(8), 2037–2039.  
<https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1933299>
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Scherichia coli*. In *Gene* (Vol. 51).
- Hu, F., Wang, C., Wang, P., Zhang, L., Jiang, Q., Al-Hatmi, A. M. S., Blechert, O., & Zhan, P. (2021). First Case of Subcutaneous Mycoses Caused by *Dirkmeia churashimaensis* and a Literature Review of Human Ustilaginales Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.711768>
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010). Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(7), 506–512. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.017>

- Jiang, D., Hou, J., Gao, W., Tong, X., Li, M., Chu, X., & Chen, G. (2021). Exogenous spermidine alleviates the adverse effects of aluminum toxicity on photosystem II through improved antioxidant system and endogenous polyamine contents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111265>
- Jiménez-Bremont, J. F., Rodríguez-Kessler, M., Rodríguez-Guerra, R., Cortes-Penagos, C., Torres-Guzman, J. C., & Williamson, J. S. (2006). Cloning and sequence analysis of ornithine decarboxylase gene fragments from the Ascomycota. *DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 17(3), 231–236. <https://doi.org/10.1080/10425170600807009>
- Jin, Y., Bok, J. W., Guzman-De-Peña, D., & Keller, N. P. (2002). Requirement of spermidine for developmental transitions in *Aspergillus nidulans*. In *Molecular Microbiology* (Vol. 46, Issue 3).
- Jorge, J. M. P., Nguyen, A. Q. D., Pérez-García, F., Kind, S., & Wendisch, V. F. (2017). Improved fermentative production of gamma-aminobutyric acid via the putrescine route: Systems metabolic engineering for production from glucose, amino sugars, and xylose. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(4), 862–873. <https://doi.org/10.1002/bit.26211>
- Kaur, N., Reumann, S., & Hu, J. (2009). Peroxisome Biogenesis and Function. *The Arabidopsis Book*, 7, e0123. <https://doi.org/10.1199/tab.0123>
- Khan, A. J., & Minocha, S. C. (1989). Polyamine Biosynthetic Enzymes and the Effect of their Inhibition on the Growth of Some Phytopathogenic Fungi I. In *Plant Cell Physiol* (Vol. 30, Issue 5).
- Khan, A. J., & Winoaha, S. C. (1989). BIOSYnETHIC ARGININE DECAEBOEELASE IN PHYTOPATHOGE#IC BUNGI'. *Life Sciences*, 44(1533), 1215–1222.

- Khatri, M., & Rajam, M. V. (2007). Targeting polyamines of *Aspergillus nidulans* by siRNA specific to fungal ornithine decarboxylase gene. *Medical Mycology*, *45*(3), 211–220. <https://doi.org/10.1080/13693780601158779>
- Kim, H. I., Schultz, C. R., Buras, A. L., Friedman, E., Fedorko, A., Seamon, L., Chandramouli, G. V. R., Maxwell, G. L., Bachmann, A. S., & Risinger, J. I. (2017). Ornithine decarboxylase as a therapeutic target for endometrial cancer. *PLoS ONE*, *12*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189044>
- Kumar, P., Akhtar, J., Kandan, A., Kumar, S., Batra, R., & Dubey, S. C. (2016). *Advance Detection Techniques of Phytopathogenic Fungi: Current Trends and Future Perspectives* (pp. 265–298). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9_12)
- Legocka, J., Sobieszczuk-Nowicka, E., Ludwicki, D., & Lehmann, T. (2017). Putrescine catabolism via DAO contributes to proline and GABA accumulation in roots of lupine seedlings growing under salt stress. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, *86*(3). <https://doi.org/10.5586/asbp.3549>
- León-Ramírez, C. G., Sánchez-Arreguín, J. A., & Ruiz-Herrera, J. (2014). Ustilago maydis, a Delicacy of the Aztec Cuisine and a Model for Research. *Natural Resources*, *05*(06), 256–267. <https://doi.org/10.4236/nr.2014.56024>
- Levitz, S. M., Dibenedetto, D. J., & Diamond, R. D. (1990). Inhibition and killing of fungi by the polyamine oxidase-polyamine system Antifungal activity of the PA O-polyamine system. In *Antonie van Leeuwenhoek* (Vol. 58). Kluwer Academic Publishers.
- Li, B., Liang, J., Hanfrey, C. C., Phillips, M. A., & Michael, A. J. (2021). Discovery of ancestral L-ornithine and L-lysine decarboxylases reveals parallel, pseudoconvergent evolution of polyamine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(4). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101219>

- Li, B., Liang, J., Phillips, M. A., & Michael, A. J. (2023). Neofunctionalization of S-adenosylmethionine decarboxylase into pyruvoyl-dependent L-ornithine and L-arginine decarboxylases is widespread in bacteria and archaea. *Journal of Biological Chemistry*, 299(8). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105005>
- Li, J., Meng, Y., Wu, X., & Sun, Y. (2020). Polyamines and related signaling pathways in cancer. In *Cancer Cell International* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01545-9>
- Li, Y. M., Shivas, R. G., & Cai, L. (2017). Cryptic diversity in *Tranzscheliella* spp. (Ustilaginales) is driven by host switches. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep43549>
- Liang, S. M., Zheng, F. L., & Wu, Q. S. (2022). Elucidating the dialogue between arbuscular mycorrhizal fungi and polyamines in plants. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 38, Issue 9). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03336-y>
- Lim, F. H., Rasid, O. A., Idris, A. S., As'wad, A. W. M., Vadamalai, G., Parveez, G. K. A., & Wong, M. Y. (2021a). Enhanced polyethylene glycol (PEG)-mediated protoplast transformation system for the phytopathogenic fungus, *Ganoderma boninense*. *Folia Microbiologica*, 66(4), 677–688. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00852-6>
- Lim, F. H., Rasid, O. A., Idris, A. S., As'wad, A. W. M., Vadamalai, G., Parveez, G. K. A., & Wong, M. Y. (2021b). Enhanced polyethylene glycol (PEG)-mediated protoplast transformation system for the phytopathogenic fungus, *Ganoderma boninense*. *Folia Microbiologica*, 66(4), 677–688. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00852-6>
- Lin, X., Andrew Alspaugh, J., Liu, H., & Harris, S. (2015). Fungal morphogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019679>

- Lomozik, L., Gasowska, A., Bregier-Jarzebowska, R., & Jastrzab, R. (2005). Coordination chemistry of polyamines and their interactions in ternary systems including metal ions, nucleosides and nucleotides. In *Coordination Chemistry Reviews* (Vol. 249, Issues 21–22, pp. 2335–2350). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.05.002>
- Mandal, S., Mandal, A., Johansson, H. E., Orjalo, A. V., & Park, M. H. (2013). Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), 2169–2174. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219002110>
- Mangold, U. (2005). The antizyme family: Polyamines and beyond. *IUBMB Life*, 57(10), 671–676. <https://doi.org/10.1080/15216540500307031>
- Márquez-Licon, G., Castillo-González, F., Carlos de León-García de, A., Leyva-Mir, S. G., & Téliz-Ortiz, D. (2021). Resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in native maize germplasm. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 1–20.
- Márquez-Licon, G., Castillo-González, F., Vargas-Hernández, M., De León-García de Alba, C., Solano-Báez, A. R., Leyva-Mir, S. G., & Téliz-Ortiz, D. (2020). Resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in native maize germplasm. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 39(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-5>
- Marroquin-Guzman, M., Sun, G., & Wilson, R. A. (2017). Glucose-ABL1-TOR Signaling Modulates Cell Cycle Tuning to Control Terminal Appressorial Cell Differentiation. *PLoS Genetics*, 13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006557>
- Martinez, C., Jauneau, A., Roux, C., Savy, C., & Dargent, R. (2000). *Early infection of maize roots by Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*.

- Martinez, C., Roux, C., & Dargent, R. (1999). *Biochemistry and Cell Biology Biotrophic Development of Sporisorium reilianum f. sp. zeae in Vegetative Shoot Apex of Maize* (Vol. 89, Issue 3).
- Martinez-Rocha, A. L., Woriedh, M., Chemnitz, J., Willingmann, P., Kröger, C., Haderler, B., Hauber, J., & Schäfer, W. (2016). Posttranslational hypusination of the eukaryotic translation initiation factor-5A regulates *Fusarium graminearum* virulence. *Scientific Reports*, 6(April), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep24698>
- Martínez-Soto, D., Velez-Haro, J. M., León-Ramírez, C. G., Galán-Vásquez, E., Chávez-Munguía, B., & Ruiz-Herrera, J. (2020). Multicellular growth of the Basidiomycota phytopathogen fungus *Sporisorium reilianum* induced by acid conditions. *Folia Microbiologica*, 65(3), 511–521. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00755-7>
- Mathur, J., & Koncz, C. (1998). *PEG-Mediated Protoplast Transformation with Naked DNA*.
- Merényi, Z., Krizsán, K., Sahu, N., Liu, X. Bin, Bálint, B., Stajich, J. E., Spatafora, J. W., & Nagy, L. G. (2023). Genomes of fungi and relatives reveal delayed loss of ancestral gene families and evolution of key fungal traits. *Nature Ecology and Evolution*, 7(8), 1221–1231. <https://doi.org/10.1038/s41559-023-02095-9>
- Münsterkötter, M., & Steinberg, G. (2007). The fungus *Ustilago maydis* and humans share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-473>
- Munyenembe, K., Timmons, C., Weiner, A. K. M., Katz, L. A., & Yan, Y. (2021). DAPI staining and DNA content estimation of nuclei in uncultivable microbial eukaryotes (Arcellinida and Ciliates). *European Journal of Protistology*, 81. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2021.125840>
- Murakami, Y., Ikuta, S., Fukuda, W., Akasaka, N., Maruyama, J., Shinma, S., Fukusaki, E., & Fujiwara, S. (2024). Identification and enzymatic properties of

arginine decarboxylase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.00294-24>

Nandy, S., Mandal, S., Gupta, S. K., Anand, U., Ghorai, M., Mundhra, A., Rahman, M. H., Ray, P., Mitra, S., Ray, D., Lal, M. K., Tiwari, R. K., Nongdam, P., Pandey, D. K., Shekhawat, M. S., Jha, N. K., Jha, S. K., Kumar, M., Radha, ... Dey, A. (2022a). Role of Polyamines in Molecular Regulation and Cross-Talks Against Drought Tolerance in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, September. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10802-2>

Nandy, S., Mandal, S., Gupta, S. K., Anand, U., Ghorai, M., Mundhra, A., Rahman, M. H., Ray, P., Mitra, S., Ray, D., Lal, M. K., Tiwari, R. K., Nongdam, P., Pandey, D. K., Shekhawat, M. S., Jha, N. K., Jha, S. K., Kumar, M., Radha, ... Dey, A. (2022b). Role of Polyamines in Molecular Regulation and Cross-Talks Against Drought Tolerance in Plants. In *Journal of Plant Growth Regulation*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10802-2>

Nascimento, F. F., Reis, M. Dos, & Yang, Z. (2017). A biologist's guide to Bayesian phylogenetic analysis. In *Nature Ecology and Evolution* (Vol. 1, Issue 10, pp. 1446–1454). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0280-x>

Park, M. H., & Wolff, E. C. (2018). Hypusine, a polyamine-derived amino acid critical for eukaryotic translation. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 293, Issue 48, pp. 18710–18718). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003341>

Pegg, A. E. (2008). Spermidine/spermine-N 1-acetyltransferase: a key metabolic regulator Pegg AE. Spermidine/spermine-N 1-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294, 995–1010. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90217.2008.-Spermidine/spermine-N>

- Pegg, A. E., Wang, X., Schwartz, C. E., & McCloskey, D. E. (2011). Spermine synthase activity affects the content of decarboxylated S-adenosylmethionine. *Biochemical Journal*, 433(1), 139–144. <https://doi.org/10.1042/BJ20101228>
- Peng, Y., Li, S. J., Yan, J., Tang, Y., Cheng, J. P., Gao, A. J., Yao, X., Ruan, J. J., & Xu, B. L. (2021). Research Progress on Phytopathogenic Fungi and Their Role as Biocontrol Agents. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.670135>
- Pérez-Martín, J., & di Pietro, A. (2012). *Morphogenesis and Pathogenicity in Fungi*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22916-9>
- Pérez-Rodríguez, F., Valdés-Santiago, L., García-Chávez, J. N., Castro-Guillén, J. L., & Ruiz-Herrera, J. (2023). Analysis of gene expression related to polyamine concentration and dimorphism induced in ornithine decarboxylase (odc) and spermidine synthase (spd) *Ustilago maydis* mutants. *Fungal Genetics and Biology*, 166. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2023.103792>
- Poloni, A., & Schirawski, J. (2016). Host specificity in *Sporisorium reilianum* is determined by distinct mechanisms in maize and sorghum. *Molecular Plant Pathology*, 17(5), 741–754. <https://doi.org/10.1111/mpp.12326>
- Radwan, G. L., Prom, L. K., Odvody, G., & Magill, C. W. (2019). Mating type a locus alleles and genomic polymorphism in *Sporisorium reilianum*: comparison of sorghum isolates to those from maize. *Australasian Plant Pathology*, 48(2), 119–129. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0607-3>
- Rafiei, V., Véléz, H., & Tzelepis, G. (2021). The role of glycoside hydrolases in phytopathogenic fungi and oomycetes virulence. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22179359>

- Raudaskoski, M. (2015). Mating-type genes and hyphal fusions in filamentous basidiomycetes. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 29, Issues 3–4, pp. 179–193). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2015.04.001>
- Rezvanypour, S., Hatamzadeh, A., Elahinia, S. A., & Asghari, H. R. (2015). Exogenous Polyamines Improve Mycorrhizal Development and Growth and Flowering of *Freesia hybrida*. *Journal of Horticultural Research*, 23(2), 17–25. <https://doi.org/10.2478/johr-2015-0013>
- Richards, T. A., Leonard, G., & Wideman, J. G. (2017). What Defines the “Kingdom” Fungi? *Microbiology Spectrum*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0044-2017>
- Rocha, R. O., Elowsky, C., Pham, N. T. T., & Wilson, R. A. (2020). Spermine-mediated tight sealing of the *Magnaporthe oryzae* appressorial pore–rice leaf surface interface. *Nature Microbiology*, 5(12), 1472–1480. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0786-x>
- Rocha, R. O., & Wilson, R. A. (2019a). Essential, deadly, enigmatic: Polyamine metabolism and roles in fungal cells. *Fungal Biology Reviews*, 33(1), 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.07.003>
- Rocha, R. O., & Wilson, R. A. (2019b). Essential, deadly, enigmatic: Polyamine metabolism and roles in fungal cells. *Fungal Biology Reviews*, 33(1), 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.07.003>
- Rocha, R. O., & Wilson, R. A. (2019c). Essential, deadly, enigmatic: Polyamine metabolism and roles in fungal cells. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 33, Issue 1, pp. 47–57). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.07.003>
- Ruiz-Herrera, J. (1994). Polyamines, DNA Methylation, and Fungal Differentiation. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 20, Issue 2).

- Ryder, L. S., Cruz-Mireles, N., Molinari, C., Eisermann, I., Eseola, A. B., & Talbot, N. J. (2022). The appressorium at a glance. *Journal of Cell Science*, *135*(14). <https://doi.org/10.1242/jcs.259857>
- Ryder, L. S., & Talbot, N. J. (2015). Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 26, pp. 8–13). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.013>
- Sagor, G. H. M., Chawia, P., Kim, D. W., Berberich, T., Kojima, S., Niitsu, M., & Kusano, T. (2015). The polyamine spermine induces the unfolded protein response via the MAPK cascade in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, *6*(September). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00687>
- Sakamoto, A., Sahara, J., Kawai, G., Yamamoto, K., Ishihama, A., Uemura, T., Igarashi, K., Kashiwagi, K., & Terui, Y. (2020). Cytotoxic mechanism of excess polyamines functions through translational repression of specific proteins encoded by polyamine modulon. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072406>
- Salvatore, M. M., & Andolfi, A. (2021). *Phytopathogenic Fungi and Toxicity*. <https://doi.org/10.3390/toxins>
- Salvi, D., & Tavladoraki, P. (2020). The tree of life of polyamine oxidases. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74708-3>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (2001). *Cold Spring Harbor Laboratory Press - Molecular Cloning - Table of Contents*.
- Sampathkumar, G., & Drouin, G. (2015). Purifying selection against gene conversions between the polyamine transport (TPO) genes of *Saccharomyces* species. *Current Genetics*, *61*(1), 67–72. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0445-y>
- Sánchez-Elordi, E., de los Ríos, L. M., Vicente, C., & Legaz, M. E. (2019). Polyamines levels increase in smut teliospores after contact with sugarcane

- glycoproteins as a plant defensive mechanism. *Journal of Plant Research*, 132(3), 405–417. <https://doi.org/10.1007/s10265-019-01098-7>
- Sánchez-Pale, J. R., Ramírez-Dávila, J. F., González-Huerta, A., & De León, C. (2017). Patrón espacial del carbón de la espiga del maíz en diferentes localidades del Estado de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(7), 1467. <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i7.536>
- Sannazzaro, A. I., Álvarez, C. L., Menéndez, A. B., Pieckenstain, F. L., Albertó, E. O., & Ruiz, O. A. (2004a). Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), 115–121. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00880-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00880-2)
- Sannazzaro, A. I., Álvarez, C. L., Menéndez, A. B., Pieckenstain, F. L., Albertó, E. O., & Ruiz, O. A. (2004b). Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), 115–121. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00880-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00880-2)
- Schaefer, K., Wagener, J., Ames, R. M., Christou, S., MacCallum, D. M., Bates, S., & Gow, N. A. R. (2020). Three Related Enzymes in *Candida albicans* Achieve Arginine-Agmatine-Dependent Metabolism That Is Essential for Growth and Fungal Virulence. *AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY*, 11(4), 1–15.
- Schaefer, K., Wagener, J., Ames, R. M., Christou, S., Maccallum, D. M., Bates, S., & Gow, N. A. R. (2020). Three related enzymes in *Candida albicans* achieve arginine-and agmatine-dependent metabolism that is essential for growth and fungal virulence. *MBio*, 11(4), 1–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01845-20>
- Schirawski, J., Heinze, B., Wagenknecht, M., & Kahmann, R. (2005a). Mating type loci of *Sporisorium reilianum*: Novel pattern with three a and multiple b specificities. *Eukaryotic Cell*, 4(8), 1317–1327. <https://doi.org/10.1128/EC.4.8.1317-1327.2005>

- Schirawski, J., Heinze, B., Wagenknecht, M., & Kahmann, R. (2005b). Mating type loci of *Sporisorium reilianum*: Novel pattern with three a and multiple b specificities. *Eukaryotic Cell*, 4(8), 1317–1327. <https://doi.org/10.1128/EC.4.8.1317-1327.2005>
- Schirawski, J., Perlin, M. H., & Saville, B. J. (2021). Smuts to the power of three: Biotechnology, biotrophy, and basic biology. In *Journal of Fungi* (Vol. 7, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jof7080660>
- Schmitz, L., Schwier, M. A., & Heimel, K. (2019). The unfolded protein response regulates pathogenic development of *Ustilago maydis* by rok1-dependent inhibition of mating-type signaling. *MBio*, 10(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.02756-19>
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I., & Kahmann, R. (1990). The b Alleles of *U. maydis*, Whose Combinations Program Pathogenic Development, Code for Polypeptides Containing a Homeodomain-Related Motif. In *Cell* (Vol. 60).
- Schweizer, G., Münch, K., Mannhaupt, G., Schirawski, J., Kahmann, R., & Dutheil, J. Y. (2018). Positively Selected Effector Genes and Their Contribution to Virulence in the Smut Fungus *Sporisorium reilianum*. *Genome Biology and Evolution*, 10(2), 629–645. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy023>
- Seepe, H. A., Nxumalo, W., & Amoo, S. O. (2021). Natural products from medicinal plants against phytopathogenic fusarium species: Current research endeavours, challenges and prospects. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 21). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules26216539>
- Seong, K., & Krasileva, K. V. (2023). Prediction of effector protein structures from fungal phytopathogens enables evolutionary analyses. *Nature Microbiology*, 8(1), 174–187. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01287-6>

- Silva, D. N., Duplessis, S., Talhinhos, P., Azinheira, H., Paulo, O. S., & Batista, D. (2015). Genomic patterns of positive selection at the origin of rust fungi. *PLoS ONE*, *10*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143959>
- Singh, N., Mukherjee, S. K., & Rajam, M. V. (2020a). Silencing of the Ornithine Decarboxylase Gene of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by Host-Induced RNAi Confers Resistance to Fusarium Wilt in Tomato. *Plant Molecular Biology Reporter*, *38*(3), 419–429. <https://doi.org/10.1007/s11105-020-01205-2>
- Singh, N., Mukherjee, S. K., & Rajam, M. V. (2020b). Silencing of the Ornithine Decarboxylase Gene of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by Host-Induced RNAi Confers Resistance to Fusarium Wilt in Tomato. *Plant Molecular Biology Reporter*, *38*(3), 419–429. <https://doi.org/10.1007/s11105-020-01205-2>
- Sodikov, B., Sodikova, D., & Omonlikov, A. (2022). Effects of Phytopathogenic Fungi on Plants (Review). *Bulletin of Science and Practice*, *8*(4), 192–200. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/77/22>
- Storfie, E. R. M., & Saville, B. J. (2021). Fungal pathogen emergence: investigations with an *ustilago maydis* × *sporisorium reilianum* hybrid. *Journal of Fungi*, *7*(8). <https://doi.org/10.3390/jof7080672>
- Sugita, T., Takashima, M., Poonwan, N., Mekha, N., Malaithao, K., Thungmuthasawat, B., Prasarn, S., Luangsook, P., & Kudo, T. (2003). The first isolation of ustilaginomycetous anamorphic yeasts, *Pseudozyma* species, from patients' blood and a description of two new species: *P. parantarctica* and *P. thailandica*. *Microbiology and Immunology*, *47*(3), 183–190. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03385.x>
- Tassoni, A., Franceschetti, M., Tasco, G., Casadio, R., & Bagni, N. (2007). Cloning, functional identification and structural modelling of *Vitis vinifera* S-adenosylmethionine decarboxylase. *Journal of Plant Physiology*, *164*(9), 1208–1219. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.07.009>

- Tiburcio, A. F., & Alcázar, R. (2018). Determination of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in plants. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1694, pp. 123–128). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_12)
- Trevijano-Contador, N., Rueda, C., & Zaragoza, O. (2016). Fungal morphogenetic changes inside the mammalian host. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 57, pp. 100–109). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.04.008>
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., & Hollomanl, W. K. (1988). Isolation and Characterization of an Autonomously Replicating Sequence from *Ustilago maydis*. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 8, Issue 9).
- Valdés-Santiago, L., Cervantes-Chávez, J. A., León-Ramírez, C. G., & Ruiz-Herrera, J. (2012a). Polyamine Metabolism in Fungi with Emphasis on Phytopathogenic Species. *Journal of Amino Acids*, 2012, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/837932>
- Valdés-Santiago, L., Cervantes-Chávez, J. A., León-Ramírez, C. G., & Ruiz-Herrera, J. (2012b). Polyamine Metabolism in Fungi with Emphasis on Phytopathogenic Species. *Journal of Amino Acids*, 2012, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/837932>
- Valdés-Santiago, L., Cervantes-Chávez, J. A., & Ruiz-Herrera, J. (2009). *Ustilago maydis* spermidine synthase is encoded by a chimeric gene, required for morphogenesis, and indispensable for survival in the host. *FEMS Yeast Research*, 9(6), 923–935. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00539.x>
- Valdés-Santiago, L., Cervantes-Chávez, J. A., Winkler, R., León-Ramírez, C. G., & Ruiz-Herrera, J. (2012). Phenotypic comparison of *samdc* and *spe* mutants reveals complex relationships of polyamine metabolism in *Ustilago maydis*. *Microbiology*, 158(3), 674–684. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055954-0>

- Valdés-Santiago, L., Guzmán-De-Peña, D., & Ruiz-Herrera, J. (2010). Life without putrescine: Disruption of the gene-encoding polyamine oxidase in *Ustilago maydis* odc mutants. *FEMS Yeast Research*, *10*(7), 928–940. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00675.x>
- Valdés-Santiago, L., & Ruiz-Herrera, J. (2014). Stress and polyamine metabolism in fungi. *Frontiers in Chemistry*, *1*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fchem.2013.00042>
- Valdés-Santiago, Laura., & Ruiz-Herrera, J. (2016). *Polyamines in fungi: their distribution, metabolism, and role in cell differentiation and morphogenesis*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- van den Berg, M. A., & Maruthachalam, K. (2015). *Fungal Biology Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 1*. Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-10142-2>
- Vilas, J. M., Romero, F. M., Rossi, F. R., Marina, M., Maiale, S. J., Calzadilla, P. I., Pieckenstain, F. L., Ruiz, O. A., & Gárriz, A. (2018). Modulation of plant and bacterial polyamine metabolism during the compatible interaction between tomato and *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Physiology*, *231*, 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.09.014>
- Wang, J., Holden, D. W., & Leongtt, S. A. (1988). Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* (DNA transformation/hygromycin B/corn smut). In *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* (Vol. 85).
- Wang, L., & Lin, X. (2012). Morphogenesis in Fungal Pathogenicity: Shape, Size, and Surface. *PLoS Pathogens*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003027>
- Wang, L., Liu, Y., Qi, C., Shen, L., Wang, J., Liu, X., Zhang, N., Bing, T., & Shangguan, D. (2018). Oxidative degradation of polyamines by serum

- supplement causes cytotoxicity on cultured cells. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28648-8>
- Wangsanut, T., & Pongpom, M. (2022). The Role of the Glutathione System in Stress Adaptation, Morphogenesis and Virulence of Pathogenic Fungi. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms231810645>
- Werner, J., Zuo, W., & Doehlemann, G. (2023). CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein-mediated mutagenesis in *Sporisorium reilianum*. *BioRxiv Preprint*. <https://doi.org/10.1101/2023.10.17.562663>
- Wu, C.-G., Tian, J.-L., Liu, R., Cao, P.-F., Zhang, T.-J., Ren, A., Shi, L., & Zhao, M.-W. (2017). Ornithine Decarboxylase-Mediated Production of Putrescine Influences Ganoderic Acid Biosynthesis by Regulating Reactive Oxygen Species in *Ganoderma lucidum*. In *aem.asm.org 1 Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 83). <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Wu, Y., Ma, X., Pan, Z., Kale, S. D., Song, Y., King, H., Zhang, Q., Presley, C., Deng, X., Wei, C. I., & Xiao, S. (2018). Comparative genome analyses reveal sequence features reflecting distinct modes of host-adaptation between dicot and monocot powdery mildew 06 Biological Sciences 0604 Genetics. *BMC Genomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5069-z>
- Xiao, J.-Z., Watanabe, T., Kamakura, T., Ohshima, A., & Yamaguchi, I. (1994). *Studies on cellular differentiation of Magnaporthe grisea. Physicochemical aspects of substratum surfaces in relation to appressorium formation* (Vol. 44).
- Xu, L., Long, J., Wang, P., Liu, K., Mai, L., & Guo, Y. (2015). Association between the ornithine decarboxylase G316A polymorphism and breast cancer survival. *Oncology Letters*, 10(1), 485–491. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3201>
- Yan, Y., Tang, J., Yuan, Q., Liu, H., Huang, J., Hsiang, T., Bao, C., & Zheng, L. (2021). Ornithine decarboxylase of the fungal pathogen *Colletotrichum*

higginsianum plays an important role in regulating global metabolic pathways and virulence. *Environmental Microbiology*, 00. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15755>

Yan, Y., Tang, J., Yuan, Q., Liu, H., Huang, J., Hsiang, T., Bao, C., & Zheng, L. (2022). Ornithine decarboxylase of the fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum* plays an important role in regulating global metabolic pathways and virulence. *Environmental Microbiology*, 24(3), 1093–1116. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15755>

Yin, K., Cui, G., Bi, X., Liang, M., Hu, Z., & Deng, Y. Z. (2023). Intracellular polyamines regulate redox homeostasis with cAMP–PKA signalling during sexual mating/filamentation and pathogenicity of *Sporisorium scitamineum*. *Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/mpp.13393>

Yin, K., Cui, G., Bi, X., Liang, M., Hu, Z., & Deng, Y. Z. (2024a). Intracellular polyamines regulate redox homeostasis with cAMP–PKA signalling during sexual mating/filamentation and pathogenicity of *Sporisorium scitamineum*. *Molecular Plant Pathology*, 25(1). <https://doi.org/10.1111/mpp.13393>

Yin, K., Cui, G., Bi, X., Liang, M., Hu, Z., & Deng, Y. Z. (2024b). Intracellular polyamines regulate redox homeostasis with cAMP–PKA signalling during sexual mating/filamentation and pathogenicity of *Sporisorium scitamineum*. *Molecular Plant Pathology*, 25(1). <https://doi.org/10.1111/mpp.13393>

Yohannes, E., Thurber, A. E., Wilks, J. C., Tate, D. P., & Slonczewski, J. L. (2005). Polyamine stress at high pH in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-59>

Zhang, L., Zhou, X., Li, P., Wang, Y., Hu, Q., Shang, Y., Chen, Y., Zhu, X., Feng, H., & Zhang, C. (2023). Transcriptome Profile of *Fusarium graminearum* Treated by Putrescine. *Journal of Fungi*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/jof9010060>

- Zhao, J., Wang, X., Pan, X., Jiang, Q., & Xi, Z. (2021). Exogenous Putrescine Alleviates Drought Stress by Altering Reactive Oxygen Species Scavenging and Biosynthesis of Polyamines in the Seedlings of Cabernet Sauvignon. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.767992>
- Zhao, Y. (2015). *The molecular basis of symptom formation in Sporisorium reilianum*. Aachen University.
- Zhou, N., Zhang, A., Wei, G., Yang, S., Xu, S., Chen, K., & Ouyang, P. (2020). Cadaverine Production From L-Lysine With Chitin-Binding Protein-Mediated Lysine Decarboxylase Immobilization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00103>
- Zuther, K., Kahnt, J., Utermark, J., Imkampe, J., Uhse, S., & Schirawski, J. (2012). Host Specificity of *Sporisorium reilianum* Is Tightly Linked to Generation of the Phytoalexin Luteolinidin by *Sorghum bicolor* e-Xtra \*. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 25(9), 1230–1237. <https://doi.org/10.1094/MPMI>

## **X. APÉNDICE**

### **10.1 Preparación de medios de cultivo**

#### **Medio Completo (MC) para 1000 mL**

- 5 g Peptona
- 1.5 g Nitrato de Amonio
- 10 g Extracto de Levadura
- 62.5 mL Solución de Sales
- 10 g Glucosa
- Ajustar a pH 7 con NaOH
- 20 g Agar Bacteriológico (En caso de ser sólido)

#### **Medio completo doble con sorbitol (DCMS) 250 mL**

- 1 M Sorbitol
- 5 g Extracto de levadura
- 2.5 g Peptona
- 0.75 Nitrato de amonio
- 31.25 mL Solín de sales
- 2% Agar bacteriológico
- 1% Glucosa (agregar en solín aparte)
- Ajustar pH 7 con NaOH
- Esterilizar 20 psi/2 min

#### **Agar regeneración (RegAg) para 1000 mL**

- 10 g Extracto de levadura
- 20 g Bactopeptona
- 20 g Sacarosa
- 1 M Sorbitol
- 15 g Agar

#### **YEPS light (YEPSL) para 1000 mL**

- 10 g Extracto de levadura
- 4 g Bactopeptona
- 4 g Sacarosa

#### **Solución de Sales para 1000 mL**

- 16 g Fosfato de Potasio monobásico
- 4 g Sulfato de Sodio
- 8 g Cloruro de Potasio
- 2 g Sulfato de Magnesio heptahidratado
- 1 g Cloruro de Calcio dihidratado
- 8 mL Elementos Traza

#### **Elementos Traza para 500 mL**

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

#### **Medio mínimo pH 3 para 1000 mL**

- 1 % (m/v) Glucosa
- 3 g Nitrato de Potasio
- 62.5 mL Solución de Sales
- Ajustar pH con HCl

#### **Medio mínimo pH 7 para 1000 mL**

- 1 % (m/v) Glucosa
- 3 g Nitrato de Amonio
- 62.5 mL Solución de Sales
- 30 mM Tris-Hcl pH 7

- Ajustar pH con NaOH

### **Medio Completo (MC) adicionado con carbón activado para 1000 mL**

- 5 g Peptona
- 1.5 g Nitrato de Amonio
- 10 g Extracto de Levadura
- 62.5 mL Solución de Sales
- 10 g Glucosa
- Ajustar pH a 7 con NaOH
- 20 g Agar Bacteriológico
- 10 g Carbón Activado

## **10.2 Preparación de Soluciones**

### **Preparación y transformación de protoplastos**

#### **STC**

- 10 mM Tris-HCl pH 7.5
- 100m mM CaCl<sub>2</sub>
- 1 M sorbitol
- Esterilizar 20 psi/20 min

#### **SCS**

- 20 mM citrato de sodio pH 5.8
- 1 M sorbitol
- Esterilizar 20 psi/20 min

#### **Amortiguador II**

- 25 mM Tris-HCl pH 7.5
- 25 mM CaCl<sub>2</sub>

- 1 M sorbitol
- Esterilizar 20 psi/20 min

### **Enzimas líticas**

- Almacenar a -20°C
- 100 mg enzimas líticas
- 1 mL amortiguador II

### **Heparina**

- Almacenar a -20°C
- 15 mg heparina sódica
- 1 mL STC frío

### **PEG al 40%**

- Almacenar a 4°C
- 4 g Polietilenglicol
- 10 mL STC
- Esterilizar 20 psi/20 min

### **Extracción de ADN:**

#### **Tris EDTA (TE)**

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

#### **TSNTE**

- 2 % (m/v) Tritón X 100
- 1 % (m/v) SDS
- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl pH 8
- 1 mM EDTA

### **10.3 Extracción de ADNp a mini escala (Miniprep):**

#### **Solución I**

- 50 mM glucosa monohidratda
- 25 mM Tris-HCl pH 8.0
- 10 mM EDTA pH 8
- Esterilizar 20 psi/20 min

#### **Solución II**

- Se prepara al momento
- 1 N NaOH
- SDS 1% p/v

#### **Solución III**

- 5 M acetato de potasio previamente esterilizado 20 psi/20 min
- 2 M ácido acético glacial

#### **Extracción de ARN:**

Todo se preparó con agua MiliQ ® (donada por la DC. Edith Espino de los Ángeles)

#### **Agua DEPC 0.1%**

- 99 mL agua MiliQ
- 0.1 mL DEPC
- Esterilizar 20 min/20 psi

#### **Solución NaCl 1.2 M y citrato de sodio 0.8 M por 100 mL**

- 7.0128 g NaCl
- 20.64 g citrato de sodio
- Aforar a 100 mL con agua MiliQ
- Esterilizar 20 min/20 psi

## **11.4 Electroforésis**

### **Tris Ácido Acético EDTA (TAE)**

- 40 mM Ácido Acético
- 40 mM Tris-HCl pH 8
- 1 mM EDTA
- Para uso para ARN esterilizar 20 min/20 psi

### **Agarosa 2% para 100 ml**

- 2 g agarosa
- 98 ml TAE
- Para uso para ARN esterilizar 20 min/20 psi