

Evelia Judith  
Figueroa Reséndiz

Análisis de la interacción de la síntesis de la trehalosa y la metacaspasa de  
*Ustilago maydis* por estrés celular y la patogenicidad en el maíz

2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Análisis de la interacción de la síntesis de la  
trehalosa y la metacaspasa de *Ustilago maydis*  
en respuesta a estrés celular *in vitro* y la  
patogenicidad en el maíz

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

EVELIA JUDITH FIGUEROA RESÉNDIZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

DICIEMBRE, 2018



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Ciencias Biológicas

**Análisis de la interacción de la síntesis de la trehalosa y la metacaspasa de *Ustilago maydis* en respuesta a estrés celular *in vitro* y la patogenicidad en el maíz**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Biológicas

**Presenta:**

Evelia Judith Figueroa Reséndiz

**Dirigido por:**

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

**SINODALES**

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

**Presidente**

Firma

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

**Secretario**

Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal

**Vocal**

Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime

**Suplente**

Firma

M. en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández

**Suplente**

Firma

Dra. Juana Elizabeth Elton Punte  
**Directora de la Facultad**

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
**Directora de Investigación y Posgrado**

Centro Universitario  
Querétaro, Qro  
México  
Noviembre, 2018

*Después de la batalla, nada es como antes. La cerveza es menos dulce,  
el cielo es menos luminoso y la sangre nunca es tan caliente  
como la primera vez en que uno lucha hasta la muerte.*

**Jeff Janoda “Los clanes de la tierra helada”**

## RESUMEN

Para la síntesis de la trehalosa se necesitan dos enzimas que realizan la unión y el cambio conformacional de 2 moléculas: la glucosa-6-fosfato y glucosa uridindifosfato; donde la trehalosa 6 fosfato sintasa (Tps1) realiza dicha unión y la trehalosa 6 fosfato fosfatasa (Tps2) retira el grupo fosfato de la trehalosa 6 fosfato. Por lo que, la falta de alguna de estas enzimas hace incapaz al organismo de realizar dicha biosíntesis, teniendo como resultado la reducción de la supervivencia ante situaciones de estrés, o bien la disminución de la magnitud de la virulencia, como se ha visto en *Ustilago maydis* con la ausencia del gen *TPS2*, en nuestro equipo de trabajo. Asimismo, la ausencia del gen *MCA1*, incapacita la producción de la metacaspasa (Mca1), lo que en muchos organismos modelo reduce la sensibilidad a metales pesados, peróxido de hidrógeno y sales, al tiempo que aumenta la supervivencia celular evitando apoptosis. Sin embargo, se ha descrito que Mca1 elimina proteínas oxidadas o mal plegadas, reduciendo el daño celular por el estrés en levadura. En *U. maydis* se eliminaron los genes *MCA1* y *TPS2* de forma independiente, así como la obtención de cepas dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$ . Con base en el fenotipo observado en las cepas creadas, se concluye que la trehalosa es una molécula protectora en presencia de agentes oxidantes, puesto que la cepa mutante  $\Delta mca1$  mostró mayor cantidad de trehalosa durante el estrés oxidativo, la cual es más resistente a este tipo de estrés. En cuanto a la expresión del gen *MCA1* durante el estrés oxidativo en el fondo genético  $\Delta tps2$ , observamos que esta es transitoria, teniendo como consecuencia menor cantidad de células muertas que la cepa silvestre, sugiriendo que la función de la metacaspasa no solo es pro-apoptótica sino que también es una proteasa utilizada para la proteostasis celular, en condiciones de estrés oxidativo y para el mantenimiento de la pared celular. La avirulencia de las cepas  $\Delta tps2$ , se debió a la alteración morfológica en las hifas, puesto que estas son ovaladas. Además, la cepa  $\Delta tps2::\Delta mca1$  recuperó la capacidad de formar hifas generando agallas, y mostró un fenotipo intermedio ante diferentes condiciones de estrés.

**Palabras clave:** trehalosa, trehalosa 6 fosfato fosfatasa, metacaspasa, *U. maydis*, supervivencia, apoptosis.

## SUMMARY

For the synthesis of trehalose, two enzymes are required to binding and conformational change of two molecules: glucose-6-phosphate and glucose-uridindiphosphate. Trehalose 6 phosphate synthase (Tps1) which binds and trehalose 6 phosphate phosphatase (Tps2) which removes the phosphate group from trehalose 6 phosphate. Therefore, the lack of any of these enzymes makes incapable to perform biosynthesis, incapacitating its survival or infective capacities, as seen in *Ustilago maydis* with absence of *TPS2* gene, in our research group. Also, the absence of *MCA1* gene, there is no translation of metacaspase enzyme (Mca1), which in many model organisms reduces the sensitivity to heavy metals, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and salts, and increases cell survival avoiding apoptosis. However, it has been reported that Mca1 removes oxidized or misfolded proteins, reducing cellular damage generated by cellular stress in yeast. In *U. maydis*, *MCA1* and *TPS2* gene were delete, independently, and obtain double mutant  $\Delta tps2::\Delta mca1$ . The observed phenotype of strains  $\Delta mca1$  had a higher amount of trehalose during oxidative stress, so trehalose is a protective molecule, which makes them more resistant to this type of stress. And the expression of the *MCA1* in  $\Delta tps2$  during oxidative stress is temporary, resulting in less dead cells than the wild type, suggesting that the metacaspase function is not only pro-apoptotic, also is a protease used for cellular proteostasis in oxidative stress and for the maintenance of the cell wall. The avirulence of  $\Delta tps2$  was due to the dysmorphism of hyphae, since these are oval. Furthermore,  $\Delta tps2::\Delta mca1$  recovered the ability to form hyphae, therefore is able generate galls, and showed an intermediate phenotype under different stress conditions.

**Key words:** trehalose, trehalose 6 phosphate phosphatase, metacaspa, *U. maydis*, survival, apoptosis.

## DEDICATORIAS

A Dios, a mis padres Judith y Manuel,  
que siempre me han apoyado en todo momento.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, por el apoyo al proyecto de investigación **CB-2011-01/165844**, desarrollado en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales.

Agradezco al Dr. José Antonio Cervantes Chávez por aceptarme y permitirme, una vez más, formar parte de su grupo de investigación. Asimismo, agradezco todo su apoyo y paciencia para la realización de este trabajo.

También agradezco a mis asesores, Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo, M. en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández y al Dr. Fidel Landeros Jaime por sus consejos, apoyo y observaciones.

A mi asesor, al Dr. Fausto Arellano Carbajal por su apoyo y sus consejos durante el curso y por permitirme utilizar el microscopio de fluorescencia en el Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva de la Facultad de Ciencias Naturales.

A la Dra. Georgina Berenice Cueva Torres por su apoyo en el Laboratorio de Cromatografía PlanTECC en CINVESTAV Unidad Irapuato.

A mi familia y Omar.

A mis amigos del LAMIMO (Edda, Ceci, Gaby, Almis, Tony, Erik R., Dany pay y Dany no pay, y los que me falten) y las hienas.

Y a mi amiga Azucena, que aún no se olvida de mí y que siempre está escuchando mis quejas.

## ÍNDICE

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2. 1 Generalidades de los hongos fitopatógenos.....	3
2. 2 Género <i>Ustilago</i> .....	4
2. 3 <i>Ustilago maydis</i> .....	4
2. 4 La muerte celular y apoptosis por caspasas.....	7
2. 5 Las paracaspasas y las metacaspasas .....	9
2. 6 Función general de las metacaspasas en organismos unicelulares .....	10
2. 7 Efectos de la manipulación funcional de la metacaspasa .....	11
2. 8 La trehalosa .....	14
2. 9 Propiedades de la trehalosa y sus aplicaciones .....	14
2. 10 Metabolismo de la trehalosa.....	15
2. 11 Función de la trehalosa en insectos y plantas .....	17
2. 12 Importancia de la trehalosa en organismos unicelulares .....	18
2. 13 El rol de la molécula T6P y de la fosfatasa Tps2.....	19
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>21</b>
<b>IV. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>21</b>
<b>V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
6. 1 Cepas y condiciones de cultivo .....	22
6. 2 Amplificación de ADN Y ADNc.....	23
6. 3 Extracción del ADN plasmídico (AC97) .....	25
6. 4 Linearización del plásmido para transformar protoplastos de <i>U. maydis</i> .....	26
6. 5 Formación de protoplastos de <i>U. maydis</i> .....	26

6. 6 Transformación de protoplastos de <i>U. maydis</i> en hielo.....	27
6. 7 Extracción de ADN genómico.....	28
6. 8 Extracción de ARN (ácido ribonucleico).....	29
6. 9 Síntesis de ADN <sub>c</sub> .....	30
6. 10 Obtención de cepas dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta mca1$ por recombinación en planta .....	30
6. 11 Reacción de apareamiento “fuz” .....	31
6. 12 Ensayos de respuesta a estrés en placa .....	32
6. 13 Análisis de la expresión del gen <i>UmMCA1</i> .....	32
6. 14 Extracción de trehalosa .....	33
6. 15 Tinción con yoduro de propidio .....	34
6. 16 Crecimiento en forma de hifa .....	35
6. 17 Crecimiento con acetato de sodio.....	35
6. 18 Pruebas de patogenicidad.....	36
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
7. 1 Análisis <i>in silico</i> de <i>Mca1</i> .....	37
7. 2 Obtención del cassette para deletar el gen <i>UmMCA1</i> .....	40
7. 3 Transformación de <i>U. maydis</i> .....	41
7. 4 Obtención de las dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta mca1$ .....	43
7. 5 Confirmación de la eliminación de los genes <i>UmTPS2</i> y <i>UmMCA1</i> .....	45
7. 6 La delección de los genes <i>MCA1</i> y <i>TPS2</i> no afecta el apareamiento de <i>U. maydis</i> . 46	
7. 7 El fenotipo observado en la mutante $\Delta mca1$ y doble mutante $\Delta tps2::\Delta mca1$ depende del tipo de estrés.....	48
7. 7. 1 La eliminación de <i>TPS2</i> afecta el crecimiento en estrés oxidativo y por ácido mientras que en $\Delta mca1$ se favorece .....	48
7. 7. 2 El estrés osmótico no altera el crecimiento de las mutantes $\Delta mca1$ .....	49
7. 7. 3 El estrés de pared celular afecta de manera diferencial a las mutantes $\Delta mca1$ y $\Delta tps2$ .....	50

7. 7. 4 Los metales pesados disminuyen el crecimiento de $\Delta tps2$ y $\Delta tps2::\Delta mca1$ .....	51
7. 7. 5 Respuesta a otros tipos de estrés .....	52
7. 8 En ausencia de trehalosa se indujo la expresión del gen <i>UmMCA1</i> en respuesta a estrés oxidativo .....	53
7. 9 La trehalosa es un disacárido protector en <i>U. maydis</i> .....	54
7. 10 La metacaspasa no incrementa la muerte celular en $\Delta tps2$ .....	55
7. 11 La transición dimórfica de <i>U. maydis</i> se ve afectada por la delección de <i>TPS2</i> y <i>MCA1</i> .....	56
7. 12 La función de la trehalosa y la metacaspasa durante el daño a la mitocondrial es diferencial.....	58
7. 13 En <i>U. maydis</i> la incapacidad para sintetizar trehalosa afecta más la virulencia que la ausencia de <i>Mca1</i> .....	59
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
8. 1 Modelado de la metacaspasa de <i>U. maydis</i> .....	61
8. 2 Función dual de la metacaspasa en estrés oxidativo y la trehalosa como una molécula precursora de antioxidantes .....	62
8. 3 La trehalosa ayuda a soportar el estrés ácido pero el daño a mitocondria está comprometido en $\Delta mca1$ .....	67
8. 4 El estrés osmótico no es regulado por la trehalosa y no provoca la muerte celular	69
8. 5 La sensibilidad de la pared celular se debe a la ausencia de la metacaspasa en <i>U. maydis</i> .....	70
8. 6 La viabilidad celular está comprometida en $\Delta tps2$ por metales pesados, exposición a la luz UV, choque térmico y estrés salino .....	72
8. 7 La ausencia de trehalosa afecta el dimorfismo en <i>U. maydis</i> .....	74
8. 8 El grado de virulencia difiere en la ausencia de <i>MCA1</i> y <i>TPS2</i> .....	75
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>X. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>78</b>
<b>XI. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>79</b>

<b>XII. APÉNDICE</b> .....	<b>96</b>
12. 1 Preparación de medios de cultivo .....	96
12. 2 Preparación de soluciones .....	98
12. 2. 1 Extracción de plásmido.....	98
12. 2. 2 Formación de protoplastos y transformación de <i>U. maydis</i> .....	98
12. 2. 3 Electroforesis .....	99
12. 2. 4 Extracción de ADN.....	99
12. 3 Curva de calibración para la cuantificación de la trehalosa .....	100

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Especificaciones del cepario .....	22
<b>Tabla 2.</b> Secuencia de los oligonucleótidos. ....	24
<b>Tabla 3.</b> Especificaciones de los amplicones .....	25
<b>Tabla 4.</b> Cepas mutantes $\Delta mca1$ obtenidas por el método Delsgate .....	41
<b>Tabla 5.</b> Cepas dobles mutante $\Delta tps2::\Delta mca1$ obtenidas por recombinación en planta .....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Estructura de Yca1 en <i>S. cerevisiae</i> .....	11
<b>Figura 3.</b> Estructura de la trehalosa.....	14
<b>Figura 4.</b> Rutas de la biosíntesis de la trehalosa en microorganismos eucariotas y procariotas.....	16
<b>Figura 5.</b> Esquema de las regiones de UmMca1.....	37
<b>Figura 6.</b> Estructura de UmMca1.....	39
<b>Figura 7.</b> Identidad del plásmido AC97.....	40

<b>Figura 8.</b> Linearización del plásmido AC97.....	41
<b>Figura 9.</b> Identificación de mutantes $\Delta mca1$ por PCR.....	42
<b>Figura 10.</b> Reacción fuz.....	43
<b>Figura 11.</b> Identificación de las dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta mca1$ por PCR.....	44
<b>Figura 12.</b> Confirmación de mutantes $\Delta mca1$ por RT-PCR.....	45
<b>Figura 13.</b> Confirmación de dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta mca1$ por RT-PCR.....	46
<b>Figura 14.</b> Reacción de apareamiento.....	47
<b>Figura 15.</b> Magnificación de la morfología del apareamiento. ....	47
<b>Figura 16.</b> Efecto del estrés oxidativo y ácido.....	49
<b>Figura 17.</b> Respuesta al estrés osmótico.....	50
<b>Figura 18.</b> Respuesta a agentes que perturban la pared celular.....	51
<b>Figura 19.</b> Respuesta a metales pesados.....	51
<b>Figura 20.</b> Otras condiciones que alteran el crecimiento en <i>U. maydis</i> .....	52
<b>Figura 21.</b> Análisis densitométrico de la expresión del gen <i>UmMCA1</i> .....	54
<b>Figura 22.</b> Cuantificación intracelular de trehalosa por HPLC.....	55
<b>Figura 23.</b> Muerte celular.....	56
<b>Figura 24.</b> Dimorfismo en <i>U. maydis</i> .....	57
<b>Figura 25.</b> Crecimiento de <i>U. maydis</i> en acetato de sodio.....	58
<b>Figura 26.</b> Cuantificación de los signos producidos por las cepas mutantes y dobles mutantes de <i>U. maydis</i> .....	59
<b>Figura 27.</b> Modelo hipotético de la actividad chaperona de la metacaspasa (Mca1) y trehalosa.....	65
<b>Figura 28.</b> Posibles escenarios de la afectación de la pared celular en la ausencia de Mca1 y Tps2.....	71
<b>Figura 29.</b> Curva de calibración de la trehalosa.....	98
<b>Figura 30.</b> Cromatograma de la curva de calibración de la trehalosa.....	98

## ABREVIATURAS

%	Porcentaje
$\Delta$	Mutación por delección
°C	Grados centígrados
AA	Ácido acético
AcNa	Acetato de sodio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Arg (R)	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
Asp (N)	Asparagina
ATH	Trehalasa ácida
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
cbx	Carboxina
C-terminal	Carboxilo terminal
CW	Calcoflúor White
Cys (C)	Cisteína
cyt-c	Citocromo C
D. O.	Densidad óptica
DC.	Iniciales del botánico suizo Augustin Pyrame de Candolle
DCM-S	Medio doble completo con sorbitol
DED	Dominio efector de muerte
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ER	Retículo endoplasmático
g, mg, $\mu$ g	Gramo, miligramo, microgramo
G6P	Glucosa-6-fosfato
Gln (Q)	Glutamina
Gly (G)	Glicina
h, min, seg	Hora, minuto, segundo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno

HCl	Ácido clorhídrico
His (H)	Histidina
Hsp	Proteína de choque térmico
HygB	Higromicina B
Ile (I)	Isoleucina
kcal	Kilocaloría
km	Kanamicina
LB	Medio Luria Bertani
Lys (K)	Lisina
M, mM	Molar, milimolar
MC	Medio completo
Mca1	Metacaspasa
mL, $\mu$ L	Mililitro, microlitro
MM	Medio mínimo
mm, $\mu$ m	Milimetro, micra
NaCl	Cloruro de sodio
N-terminal	Amino terminal
NTH	Trehalasa neutra
ORF	Open reading frame "Marco de lectura abierto"
pb	Pares de bases
PCD	Muerte celular programada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pDONR cbx	Vector Gateway® pDNOR carboxina
pDONR hph	Vector Gateway® pDONR higromicina B
PEG	Polietilenglicol
Pi	Fosfato inorgánico
poli-Q/N	Dominio rico en Glutamina y Asparagina
PQC	Control de calidad de proteína
Pro (P)	Prolina
RB	Rosa de bengala
RC	Rojo congo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revolución por minuto
sp.	Especie (del latín <i>Specie</i> )

T6P	Trehalosa-6-fosfato
T <sub>a</sub>	Temperatura ambiente
tBOOH	t-butilhidroperóxido
T <sub>H</sub>	Temperatura de hibridación
Tps1	Enzima Trehalosa-6-fosfato sintasa
Tps2	Enzima Trehalosa-6-fosfato fosfatasa
Tre (T)	Treonina
UDP-Glucosa	Glucosa-uridindifosfato
UTR	Región no traducida
WT	Cepa silvestre
α	Alfa
β	Beta

## I. INTRODUCCIÓN

*Ustilago maydis* es un hongo fitopatógeno Basidiomycota del orden Ustilaginales, denominados “carbones”. Estos carbones tienen como huésped plantas de la familia Poaceae (gramíneas) que son de gran importancia agroeconómica, como el maíz, el trigo, el arroz, entre otros. Estos hongos forman sacos de teliosporas que invaden el grano del hospedador, generando el aspecto de carbón (Brefort *et al.*, 2009). El hongo *U. maydis* es un modelo de estudio por su relación patógeno-huésped, debido a su capacidad dimórfica, que consiste en una fase haploide, levaduriforme no infectivo, y una diploide, micelial e infectivo del maíz, generando la enfermedad comúnmente conocida en México como “huitlacoche”. Además, cuenta con un sistema eficiente de recombinación homóloga y tiene un ciclo de vida sencillo que facilita su manipulación en el laboratorio (Ruiz-Herrera, 2008). *Ustilago maydis* es capaz de responder a diferentes estímulos a través de diversos genes que están involucrados en diferentes procesos celulares y entre ellos se encuentra un gen que codifica para una metacaspasa (Mca1), que es una proteasa que comparte propiedades estructurales con las caspasas, cuya función es la regulación molecular de la proliferación celular y la muerte celular programada conocida como apoptosis (Tsiatsiani *et al.*, 2011). Asimismo, *U. maydis* tiene el gen que codifica la enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasa (Tps2), cuya actividad radica en la síntesis de la trehalosa que es un disacárido no reductor muy conservado tanto en eucariotas como en procariotas (Feofilova *et al.*, 2014), ya que es usado como reserva de energía, optimiza la actividad enzimática y provee estabilidad a las membranas en condiciones de estrés abiótico (Benaroudj *et al.*, 2001). La eliminación del gen *TPS2* en *U. maydis* ( $\Delta tps2$ ), anula la síntesis de trehalosa, reduce la virulencia en maíz, genera vulnerabilidad a estrés oxidativo, térmico, entre otros (Cervantes-Chávez *et al.*, 2016). Asimismo, se ha estudiado la función de la metacaspasa en este modelo, con la eliminación del gen *MCA1* ( $\Delta mca1$ ), mostrando resistencia a estrés oxidativo, térmico y osmótico; este fenotipo puede estar relacionado con la acumulación de trehalosa y la señalización de otros genes involucrados en las rutas de respuesta ante estos agentes estresantes. Mientras que la vulnerabilidad de las mutantes  $\Delta tps2$ , puede estar relacionada con la sobreexpresión de la *MCA1* observada en las

cepas  $\Delta tps2$ ; aunque la sobreexpresión fue parcial, no fue el motivo de muerte celular en  $\Delta tps2$  por lo que sugiere que una función de la metacapa en *U. maydis* es la estabilidad de la proteostasis celular. La eliminación de ambos genes, es decir, las cepas dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , son más sensibles al estrés que su parental mutante  $\Delta mca1$ , pero son más resistentes que las mutantes  $\Delta tps2$ , es decir, se observó un fenotipo intermedio. En cuanto a la transición dimórfica en las mutantes  $\Delta tps2$ , presentaron hifas aglomeradas y ovaladas, mientras que las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  recuperaron su capacidad para la formación de hifas, similar a la morfología de la cepa  $\Delta mca1$ . Respecto a la virulencia, la cepa  $\Delta tps2::\Delta mca1$  restauró la capacidad de formar agallas, respecto a su parental  $\Delta tps2$  (Cervantes-Chávez *et al.*, 2016), proponiendo que la eliminación de la metacaspasa provee la resistencia adecuada para proteger a *U. maydis* de los factores respuesta del huésped. En cambio, la mutante  $\Delta mca1$  no presentó cambios en la virulencia respecto a la silvestre.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2. 1 Generalidades de los hongos fitopatógenos

La fitopatología es la ciencia que estudia la interacción patógeno-planta, que resulta de la asociación parasítica entre el organismo (hongos, bacterias o virus) y la planta (Agrios, 2008). Los hongos son organismos eucariotas quimioheterótrofos que presentan metabolismo absorptivo, pueden reproducirse por medio de procesos asexuales (división binaria, gemación o formación de esporas) o a través de esporas de tipo sexual. Los hongos pueden ser tanto unicelulares como pluricelulares. Los unicelulares consisten en células aisladas redondas u ovaladas, denominadas levaduras. Los pluricelulares están constituidos por células alargadas que crecen por extensión apical, se tabican uniformemente, formando largos filamentos denominados hifas, que se ramifican y forman el micelio, tal es el caso de los Ascomicetos y los Basidiomicetos (Prats, 2005). En varias especies de hongos fitopatógenos, la hifa incrementa su tamaño y forma una estructura aplanada en forma de bulbo para adherirse a la cutícula del hospedante denominada apresorio, algunos forman una estructura llamada haustorio, la cual penetra al interior de las células y sirve para extraer los nutrientes (Agrios, 2008). Desde el punto de vista antropocéntrico, los hongos tienen efectos tanto destructivos como benéficos. Entre los efectos nocivos cabe destacar que son agentes causales de enfermedades en cultivos y demás organismos superiores. Entre los efectos benéficos está su uso como: alimento, productores de metabolitos secundarios por ejemplo los antibióticos, y su importancia en la investigación. De las más de 100,000 especies de hongos la mayoría son hongos conocidos son saprófitos, de éstos, 50 son patógenos para humanos. En relación con las plantas, el número de especies patógenas supera las 8,000 (Dean *et al.*, 2012; Brefort *et al.*, 2009; Rivera-Coto, 2007).

## **2. 2 Género *Ustilago***

La denominación etimológica del género *Ustilago* proviene del latín *ustus*, *ustulatos*, quemado o chamuscado, de *ustulo*, quemar, por el color negro de la masa de esporas en el fruto de las gramíneas causando la enfermedad conocida como carbones. El término como *Uftilago* fue acuñado por los franceses Henri François-Anne de Roussel en 1806 en su libro "*Flore du Calvados et terrains adjacents, composée suivant la méthode de Jussieu*" y Christiaan Hendrik Persoon (Ulloa & Herrera, 1994). Se clasifica en la división Basidiomicetos, de la orden Ustilaginales (Holliday, 1960). Los Ustilaginales constituyen un importante grupo de hongos fitopatógenos con más de 50 géneros y 1,200 especies, que infectan a más de 4,000 plantas monocotiledóneas divididas en 75 familias en todo el mundo (Ruiz-Herrera, 2008). La división Basidiomicetos incluye un gran número de hongos saprófitos, productores de cuerpos fructíferos llamados basidiocarpos, presentan micelio septado y sus esporas sexuales son las basidiosporas, producidas en los basidios o probasidios (Rivera-Coto, 2007). La mayoría de los hongos ustilaginales atacan los ovarios de las gramíneas, y se desarrollan en sus frutos destruyéndolos por completo. Algunos carbones infectan las semillas o las plántulas y se desarrollan en el interior de la planta hasta que alcanzan la inflorescencia. Las células de los tejidos infectados son estimuladas para que se dividan y crezcan a tal grado que producen agallas, alterando dramáticamente el ciclo celular de tal manera que el grano es reemplazado por esporas del carbón, denominadas soros (Agrios, 2008).

## **2. 3 *Ustilago maydis***

El "huitlacoche" (carbón del maíz) del náhuatl *huitla*, excremento y *cochi*, dormir, es la enfermedad específica del maíz (*Zea maydis*) y de su antecesor el teosintle (*Zea mays ssp parviglumis*, del náhuatl *teocintli*, grano de dioses), que se caracteriza por el desarrollo de tumores negros en las mazorcas, las cuales son consumidas mundialmente como un platillo gourmet. Introducido en Europa como consecuencia de la conquista española, cuyas alteraciones fisiológicas eran consideradas como una enfermedad propia de la planta, hasta que en 1836, Unger identificó al

huitlacoche como una infección por el hongo, que denominó, *Ustilago zaeae*; entre los años de 1883 y 1895 Brefeld logró la infección del maíz usando una suspensión de esporidias del hongo; en 1944 Stevenson y Johnson determinaron el nombre binomial de *Ustilago maydis*, que había sido previamente usado por (DC.) Corda en 1842, para referirse al hongo patógeno del maíz y en 1927 se conoció por completo el ciclo de vida de *U. maydis* (McTaggart *et al.*, 2016; Ruiz-Herrera, 2008). El patosistema del maíz-*U. maydis* es considerado como un modelo para el estudio de los Basidiomicetos fitopatógenos y también un modelo para la interacción biotrófica que se lleva a cabo en todo el desarrollo del hongo dentro del hospedero (Brefort *et al.*, 2009). Este sistema posee muchas herramientas que lo hacen atractivo para realizar diversos tipos de estudios, ya que tiene la capacidad de crecer en medios de cultivo definidos, es haploide y por su capacidad dimórfica crece como levadura siendo saprófito y en forma patogénica como micelio (Holliday, 1960). El proceso infectivo de *U. maydis* involucra el desarrollo sexual, por lo que el apareamiento y la formación de un filamento dicariótico son necesarios previo al desarrollo de la sintomatología en el maíz (Brefort *et al.*, 2009).

Su ciclo de vida inicia en la fase saprófita, donde el hongo crece en forma de levaduras haploides o esporidias las cuales se reproducen por gemación. La gema, se desarrolla en el extremo formando un ángulo de 30° a 45° con respecto a la célula madre. La fase micelial, que además es la forma infectiva, inicia con el desarrollo sexual por la fusión de dos células haploides participando dos *loci* denominados *a* y *b*. El *locus a* contiene dos genes, el *mfa1* codifica una feromona lipopeptídica y *pra1* codifica un receptor transmembranal, cuya función es para el reconocimiento de la célula haploide de sexo opuesto, iniciando así el desarrollo sexual, arrestando el ciclo celular en la fase G2 y formar el tubo conjugativo. Una vez formado este tubo, ocurre la plasmogamia, lo cual permite establecer un filamento dicariótico. Para mantener un dicarion estable se necesita la función del *locus b* (Nadal *et al.*, 2008; Banuett, 1995). El *locus b* codifica dos proteínas de homeodominio, bE y bW, forman un heterodímero que tiene función de factor de transcripción. Este factor de transcripción únicamente se activa cuando se ensamblan bE y bW, derivados de diferentes alelos *b*, p. ej. los alelos provenientes de la cepa FB1 (*a1b1*) al cruzarse

con una cepa FB2 (*a2b2*) (Matei & Doehlemann, 2016). Esta fusión inhibe la gemación e induce la formación de tubos de conjugación que se dirigen uno hacia el otro por acción quimiotrópica para formar el filamento o hifa dicariótica, el cual es capaz de invadir al huésped (Ruiz-Herrera & León-Ramírez, 2012; Kämper *et al.*, 2006). En la planta, el crecimiento de hifas en los tejidos meristemáticos genera una serie de alteraciones morfológicas (agallas), sitio en donde se lleva a cabo la esporulación del hongo, incluyendo la ramificación, la formación de un material mucilaginoso y el desarrollo de sensibilidad celular osmótica, antes de dar lugar a las teliosporas, las cuales constituyen la fase diploide del ciclo celular de *U. maydis*, su formación implica cambios morfológicos de las hifas dicarióticas, que se encuentran embebidas en una matriz mucilaginosa. Las hifas se fragmentan por citocinesis y producen células individuales de forma esférica, ornamentada y de pigmentación oscura (Banuett & Herskowitz, 1996). Las teliosporas, una vez maduras, son liberadas de las agallas y cuando las condiciones ambientales son las adecuadas, se inicia su germinación con la formación de un tubo germinativo denominado promicelio. El núcleo de la espora migra hacia el promicelio y en este punto ocurre la meiosis. A partir del promicelio se forman cuatro basidiosporas las cuales geman para formar esporidias producto de la recombinación meiótica (Banuett, 1995) (Figura 1).

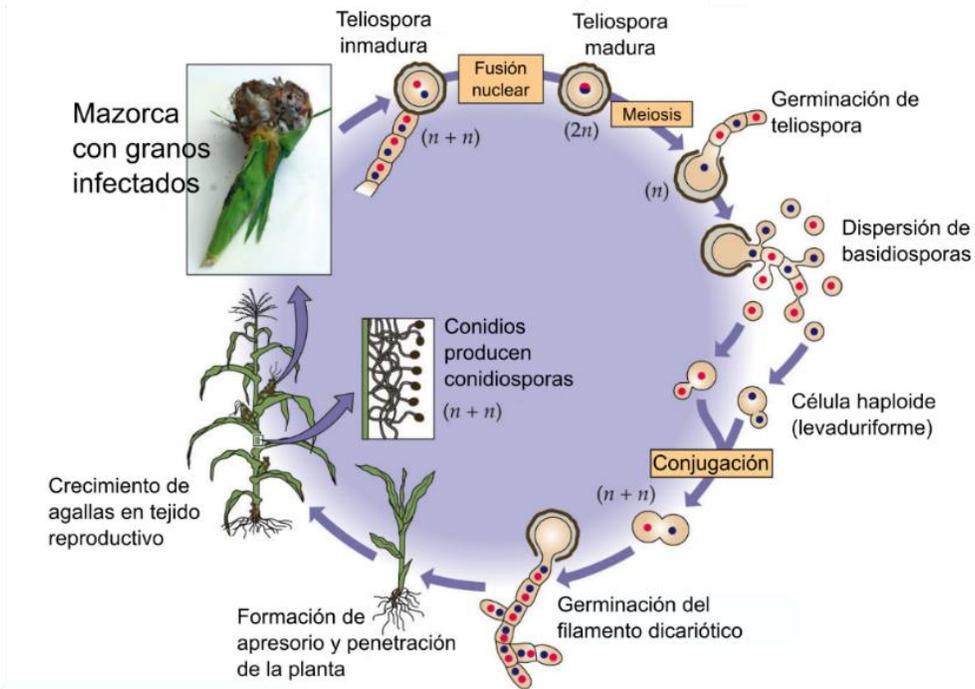


Figura 1. Ciclo de vida de *U. maydis* (Modificado de Stanley *et al.*, 2007).

## 2. 4 La muerte celular y apoptosis por caspasas

La muerte celular es el programa de suicidio que lleva a cabo la célula y que es esencial para propiciar el desarrollo del organismo, involucra la degeneración de procesos celulares, lo cual conduce al envejecimiento celular y a varias enfermedades, se caracteriza por activación masiva de caspasas, pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria, completa permeabilización de la membrana mitocondrial y la exposición de residuos de fosfatidilserina. Por lo que, la célula se considera muerta cuando se toman en cuenta los siguientes criterios moleculares y morfológicos: (1) la célula pierda la integridad de la membrana plasmática, (2) el núcleo de la célula está fragmentado y (3) los restos celulares son engullidos por otras células (Kroeme *et al.*, 2005). La muerte celular programada (por sus siglas en inglés, PCD) es caracterizada por la reducción del volumen celular, ulceración de la membrana plasmática, se presenta la condensación de la cromatina (picnosis), la fragmentación nuclear (cariorraxis) y la degradación del ADN seguida de la destrucción celular (Váchová & Palková, 2007). Debido a

morfología generalizada en la muerte celular se clasifica en tres tipos la PCD: Tipo I, apoptótica, dependiente o independiente de caspasas; tipo II, autofágica, se caracteriza por la vacuolación del citoplasma; y tipo III, necrótica, se dilatan los organelos y se inflama el citoplasma (Kramer *et al.*, 2016). La apoptosis es un proceso fundamental y estrictamente conservado en eucariontes, tanto en organismos unicelulares como pluricelulares, que garantiza el bienestar de la célula ante el envejecimiento de ésta, las infecciones por virus, el control de la proliferación celular, respuesta al ataque por patógenos y las condiciones de estrés oxidativo (Lam, 2004; Madeo *et al.*, 2002).

La adquisición de la morfología apoptótica se asocia con la activación de un conjunto de proteasas, pertenecientes a la familia cisteína-proteasas que se activan específicamente en las células apoptóticas. Estas proteínas son homólogas entre sí y forman parte de un grupo de enzimas denominadas caspasas (Kaushal *et al.*, 1997). Las caspasas son sintetizadas como zimógenos. Estos zimógenos se componen de tres dominios organizados de la siguiente forma: un prodominio N-terminal, los dominios p20 y p10, con el conservado elemento divalente His-Cys en el dominio p20. El prodominio de la proteína de la caspasa tiene una extensión N-terminal y un prodominio, que se necesita para formar complejos de proteínas, denominado apoptosoma (Vercammen *et al.*, 2007). Esta activación requiere rompimiento proteolítico para separar los dominios y eliminar el prodominio; una vez activado esto, la caspasa iniciadora propicia una cascada por activación proteolítica de caspasas efectoras zimógenas. Las caspasas efectoras rompen numerosos sustratos, su especificidad está determinada por los cuatro residuos amino-terminal hasta el punto de corte, antes de un ácido aspártico, causando la morfología de la apoptosis (Kumar, 2007).

Las caspasas, en función a su sustrato, el grado de identidad de la secuencia y las similitudes estructurales, se dividen en subfamilias, como las paracaspasas, encontradas en los metazoarios, y las metacaspasas, localizadas en plantas, hongos y protozoarios (Uren *et al.*, 2000).

## 2. 5 Las paracaspasas y las metacaspasas

Las paracaspasas poseen un prodominio que contiene un dominio de muerte (DD) cuya secuencia y estructura está relacionada con el efector de muerte (DED) y el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD), denominado dominio Ig (Uren *et al.*, 2000). Las metacaspasas son producidas como zimógenos, con un prodominio N-terminal y las dos subunidades, p20 y p10 (Lee *et al.*, 2010). El prodominio de las metacaspasas no contiene los motivos DED y CARD de las caspasas, por lo que su activación proteolítica es desconocida; sin embargo, se induce por agentes estresantes e incluye la separación de la subunidad p10 pero no elimina el prodominio, el cual contiene un fragmento rico en prolina y un dominio rico en poli-Q/N que es un dominio rico en Glutamina (Gln, Q) y Asparagina (Asn, N) que tiene una función de proteína formadora de priones por lo que facilita su interacción con las proteínas (Michelitsch & Weissman, 2000). Tanto las metacaspasas como las caspasas tienen residuos de His-Cys (Histidina-Cisteína) de carácter catalítico acoplado a su sitio activo dentro de la subunidad p20, por medio del residuo de Cys actúan como nucleófilo usando el grupo tiol (-SH) para la hidrólisis de la cadena peptídica como sustrato en el residuo aspartil (Tsiatsiani *et al.*, 2011). Sin embargo, existen algunas diferencias entre las secuencias, comparando la metacaspasa de levadura con el efector e iniciador de las caspasas (caspasa-3 y caspasa-9) se reveló una homología del 10-11%, por lo que cada una tiene estructura y funciones diferentes (Wong *et al.*, 2012). La característica bioquímica más notable de todas las metacaspasas es su estricta especificidad a los sustratos de Arginina (Arg) y Lisina (Lys), y su activación depende de la concentración del calcio para la eliminación del prodominio (Watanabe & Lam, 2005).

En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, la estructura de la metacaspasa Mca1 comprende en el centro ocho láminas- $\beta$ , tres hélices- $\alpha$  ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 4 y  $\alpha$ 5) y 2 hélices- $\alpha$  ( $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3) de ambos lados (Figura 2), también contiene una  $\beta$  horquilla que comprende  $\beta$ 3a y  $\beta$ 3b, y una pequeña hélice- $\alpha$  ( $\alpha$ 2a), localizada entre la lámina  $\beta$ 3 y la hélice  $\alpha$ 3, cerca del sitio activo de Mca1. Por definición el sitio activo de caspasas contiene 3 bucles bien ordenados L1, L2 y L4. Los bucles, L1 y L4, constituyen dos lados opuestos del surco putativo de unión para el sustrato. El

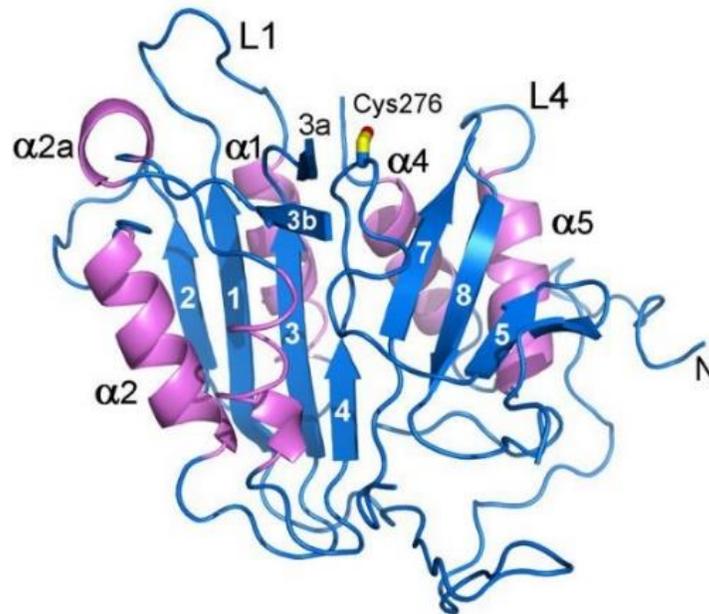
residuo putativo catalítico Cys<sup>276</sup> está en el bucle L2, entre los bucles L1 y L4 (Wong *et al.*, 2012).

Las metacaspasas (MCs) están divididas en tres tipos, caracterizados por su secuencia primaria y su dominio estructural: las MCs del tipo I, presente en protozoos y hongos, tienen una extensión N-terminal denominada prodominio, un motivo repetido rico en prolina; también un motivo de dedos de zinc presente en metacaspasas de origen vegetal (Uren *et al.*, 2000). El tipo II de las metacaspasas, localizada en plantas, no contiene tales motivos, pero alberga una región conservada de aproximadamente 180 aminoácidos, que une la subunidad p20 y la p10 (Vercammen *et al.*, 2004). El tipo III se encuentra en el fitoplancton, la cual posee un reordenamiento en la estructura del dominio entre el N- y C-terminal (Choi & Berges, 2013).

## **2. 6 Función general de las metacaspasas en organismos unicelulares**

La delección y la sobreexpresión del gen de la metacaspasa *MCA1* en diversos organismos mostraron alteraciones fisiológicas significativas; la sobre-expresión de *MCA1* incrementa los defectos en el control del ciclo celular, ya que incrementa los defectos en la segregación de cinetoplastos, mitosis y citocinesis en *Leishmania major* (Ambit *et al.*, 2008). Así como mayor resistencia al estrés (oxidativo, osmótico, salino) en la ausencia del gen *MCA1*, por lo que la metascapasa actúa en favor de la PCD para la supervivencia y el mantenimiento celular. En las mutantes del gen *MCA1* de *S. cerevisiae*, se ha observado la acumulación de proteínas mal plegadas y agregados de proteína por la deficiencia de la actividad proteolítica de Mca1, identificando así su participación como co-chaperona al emplear el prodominio Q/N R como secuestrador de los agregados facilitando la consecuente actividad de la maquinaria chaperona (Hsp104), manteniendo el control de la calidad de proteínas (PQC) (Lee *et al.*, 2010). En el caso de las proteínas mal plegadas, Mca1 fragmenta los sustratos para facilitar su accesibilidad en la degradación por el proteosoma (Hill *et al.*, 2014); esta acumulación de agregados de proteína induce la posterior activación de la ruta de autofagia por la presencia de cuerpos autofágicos (Bozhkov

*et al.*, 2010). Esto sugiere que la función de la metacaspasa es el efecto indirecto de la regulación de la ruta apoptótica y un mecanismo alternativo de supervivencia y adaptación de los organismos en estrés oxidativo (Hill & Nyström, 2015; Kampinga, 2014; Tsiatsiani *et al.*, 2011; Herker *et al.*, 2004; Madeo *et al.*, 2002).



**Figura 2. Estructura de Yca1 en *S. cerevisiae*.** Representación gráfica de la proteasa Mca1. En el núcleo contiene 5 hélices- $\alpha$  (magenta) y 8 láminas- $\beta$  (azul). Los elementos de la estructura secundaria, los bucles del sitio activo L1 y L4, y el residuo catalítico Cys<sup>276</sup> están señalados (Wong *et al.*, 2012).

## 2. 7 Efectos de la manipulación funcional de la metacaspasa

En *S. cerevisiae* la metacaspasa (Yca1) fue reportada como un regulador de la respuesta a estrés oxidativo, salino y osmótico que induce a la PCD; cuando se sobre-expresa Mca1 se produce una alta sensibilidad a especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) lo que conlleva a una muerte acelerada en respuesta a dicho estrés (Madeo *et al.*, 2002). Por el contrario, la delección de este gen produjo células que son tres veces más resistentes al efecto tóxico del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Madeo *et al.*, 2009). También se ha reportado que la delección de *YCA1* afecta la biosíntesis de fosforribosil pirofosfato, que es un importante intermediario en la producción de purinas y pirimidinas, así como de algunos aminoácidos como histidina y triptófano, por lo que se reduce la cantidad de

nucleótidos prolongando la transición de G1 a S y baja regulación del punto de control G2/M (Ždravlević *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2008); así como la acumulación de agregados de proteínas y de los cuerpos autofágicos durante la fase exponencial en *S. cerevisiae* (Lee *et al.*, 2010).

Existen metacaspasas que son requeridas durante la senescencia asociada a la apoptosis, como en el caso de *Podospora anserina*, este hongo posee dos genes con función de metacaspasa, *PaMCA1* y *PaMCA2*, que se activan cuando el micelio es senescente. Es interesante el hecho de que la delección de estos dos genes de manera independiente aumenta la longevidad del hongo, en el caso del gen, *PaMCA2* en un 78% y para *PaMCA1* en un 148%, pero la delección de ambos no maximiza sus cualidades observadas de forma independiente (Hamann *et al.*, 2007). Esto sugiere que cada proteasa tiene funciones específicas, como en el caso de *PaMCA1* que es únicamente activada en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

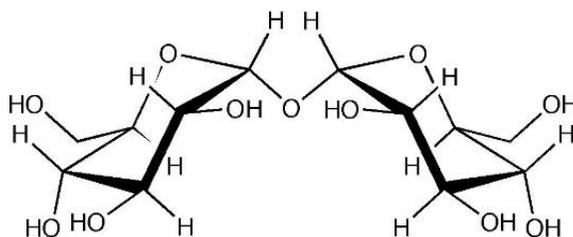
En el caso de la levadura *Candida albicans*, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el antifúngico anfotericina B producen daño oxidativo. En respuesta a estos tratamientos, se observaron marcadores apoptóticos clásicos como son la fragmentación del ADN y la generación de ROS (González-Párraga *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2011). En este hongo patógeno de humanos existen evidencias que relacionan al estrés oxidativo con la apoptosis como son: la presencia del ARN mensajero y la actividad de *CaMCA1* (gen de la metacaspasa) los cuales son inducidos en células sometidas a estrés oxidativo. Asimismo, se observó que la interrupción del gen *CaMCA1* conduce a niveles bajos de ROS y aumenta la viabilidad celular, indicando la participación de esta proteína en la muerte celular (Cao *et al.*, 2009). En el hongo patógeno de humanos *Aspergillus fumigatus*, se deletaron los dos genes de metacaspasas *CasA* y *CasB*, las mutantes simples y dobles, mostraron hipersensibilidad para agentes que inducen el estrés del retículo endoplasmático (ER). Lo que sugiere que las metacaspasas son mediadores importantes para la supervivencia bajo el estrés de ER, por 2-deoxy-D-glucosa y tunicamicina, y posiblemente, participan en la eliminación de los agregados de proteína que se forman en el ER (Richie *et al.*, 2007).

Por otra parte, el genoma de *Trypanosoma brucei* (parásito responsable de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño), codifica cinco metacaspasas (Szallies *et al.*, 2002), cuya reducción simultánea de la expresión (por medio de RNA de interferencia) de los genes *TbMCA2*, *TbMCA3* y *TbMCA5*, produjo defectos en la citocinesis, causando posteriormente la muerte de parásito, así como la localización nuclear de *TbMCA4* en *S. cerevisiae*, sugiriendo que la metacaspasa podría tener una función nuclear que controla la proliferación nuclear acoplada a la biogénesis mitocondrial (González, 2009; Helms *et al.*, 2006; Szallies *et al.*, 2002), involucrando así a las metacaspasas en procesos del desarrollo celular. Mientras que la sobre-expresión del gen de la metacaspasa en *L. major*, estimula la muerte celular inducida por estrés oxidativo y un retardo en el crecimiento (Zalila *et al.*, 2011), y la delección, produce células inviables por alteraciones en la regulación del ciclo celular, lo que sugiere que esta proteína puede tener una función esencial durante la división celular (Ambit *et al.*, 2008).

En el caso de la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, las metacaspasas del tipo I, AtMC1 y AtMC2 son funcionales en *S. cerevisiae*, debido a que complementan a la mutante  $\Delta mca1$  de esta levadura, este dato indica la conservación funcional de la proteína, aún en especies con gran divergencia evolutiva (Watanabe & Lam, 2005). La sobreexpresión de la metacaspasa AtMC1 en *A. thaliana*, mostró ser un regulador positivo de la respuesta hipersensible de la muerte celular (Coll *et al.*, 2010), caso contrario, la delección de la metacaspasa AtMC2 resultó en plantas resistentes al estrés oxidativo, sin embargo, la expresión constitutiva de este gen induce apoptosis en respuesta al mismo estímulo (Watanabe & Lam, 2011). De manera natural muchas de sus metacaspasas son inducidas durante la senescencia de las flores, así como en presencia de patógenos y durante el estrés abiótico (Sanmartín *et al.*, 2005). Esto provoca que la muerte celular sea consecuencia de la respuesta a estrés tanto biótico como abiótico, ante la carencia facultativa de la adaptación por parte de la planta (Vercammen *et al.*, 2007).

## 2. 8 La trehalosa

La trehalosa es el nombre general usado para  $\alpha$ -D-glucopiranosil-1,1- $\alpha$ -D-glucopiranosido, es un disacárido no reductor, formada por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace  $\alpha,\alpha$ -1,1 glucosídico (Figura 3) (Elbein *et al.*, 2003). Este disacárido fue identificado por primera vez por Wiggers en el cornezuelo del centeno en 1832. Posteriormente fue identificada y aislada en diferentes organismos, como en el capullo del escarabajo *Larinus maculatus* del Medio Oriente, cuya secreción es comestible y dulce, conocida como “trehala-manna”, y en 1858 Berthelot aisló la trehalosa de *Echinops persica* y la denominó como se conoce hasta ahora (Paul *et al.*, 2008). La síntesis de la trehalosa está ampliamente distribuida en una variedad de organismos, como en bacterias, hongos, plantas, insectos y otros invertebrados, excepto en vertebrados que sólo tienen la capacidad de degradar la trehalosa (Avonce *et al.*, 2006).



**Figura 3. Estructura de la trehalosa.** Disacárido  $\alpha$ -D-glucopiranosil-1,1- $\alpha$ -D-glucopiranosido, la unión de dos moléculas de glucosa unidas por una configuración  $\alpha,\alpha$ -1 (Elbein *et al.*, 2003).

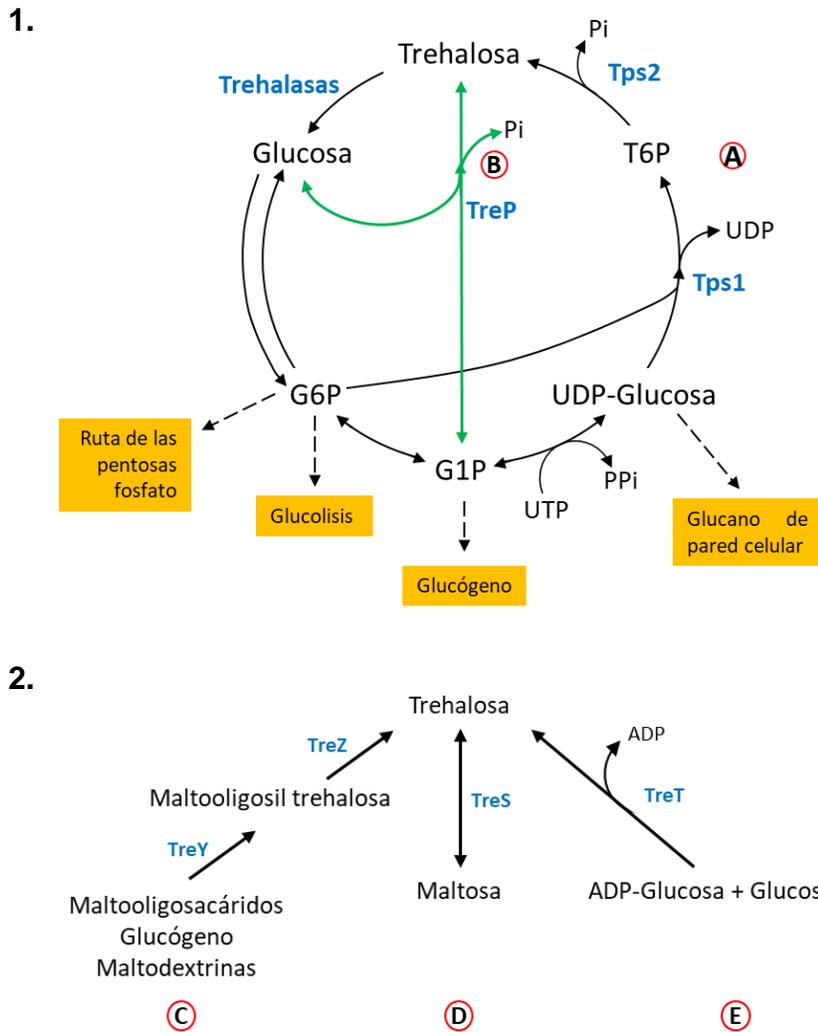
## 2. 9 Propiedades de la trehalosa y sus aplicaciones

La trehalosa está clasificada químicamente entre los azúcares reductores y su fuerte estabilidad es el resultado de la baja energía ( $1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) del enlace glucosídico de oxígeno que une los dos anillos de hexosa, en comparación con otros disacáridos no reductores, como la sacarosa, que tienen una energía de enlace de  $27 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Paiva & Panek, 1996). De acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas la molécula de la trehalosa puede resistir una temperatura de  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , y un rango de pH de 3.5 – 10 por 24 horas, siendo resistente a la hidrólisis ácida, por esta razón demuestra la capacidad molecular para proteger, estabilizar las estructuras de las proteínas y

mantener la integridad de las membranas ante diferentes tipos de estrés (Patist & Zoerb, 2005). Durante la desnaturalización de proteínas y membranas, reemplaza el agua de los puentes de hidrógeno por residuos polares, en la desecación la trehalosa forma estructuras amorfas de cristal que limitan el movimiento molecular, lo que previene los agregados de proteína y la difusión de radicales libres. Por lo que su configuración  $\alpha,\alpha$ -1,1 es crucial para la preservación de la estructura de la bicapa lipídica en la ausencia de agua. Al ser un azúcar no reductor no muestra reacción de Maillard con los compuestos amino. Asimismo, la trehalosa se utiliza para enmascarar olores y sabores en la comida, también es un importante ingrediente en la industria alimentaria como estabilizador y preservativo de comida fresca. Se usa como crioprotector de células y enzimas, en la medicina y en la microbiología. También la trehalosa inhibe la agregación de proteína inducida por poliglutamina encontrado en la enfermedad de Huntington (Paul *et al.*, 2008). Debido a las diversas aplicaciones de la trehalosa se ha producido a escala industrial desde los comienzos de 1990, siendo el método más factible el uso de diferentes organismos a partir de su sistema enzimático, como el de la bacteria *Arthrobacter* sp. Q36 que sintetiza trehalosa a partir del almidón por la ruta TreY-TreZ (Schiraldi *et al.*, 2002).

## **2. 10 Metabolismo de la trehalosa**

Existen cinco rutas para la síntesis de la trehalosa en bacterias (Figura 4), sin embargo en hongos, plantas, insectos y algunos invertebrados solo hay una vía, denominada vía TPS/TPP descrita en *S. cerevisiae* por primera vez en 1958 por Cabib and Leloir (Eleutherio *et al.*, 2014), ésta involucra dos pasos enzimáticos catalizados por la trehalosa-6-fosfato sintasa (Tps1), que genera la molécula de trehalosa-6-fosfato (T6P) a partir de la unión de una molécula de glucosa-6-fosfato (G6P) y una glucosa donada por el glucosa-uridindifosfato (UDP-Glucosa), y la enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasa (Tps2), que desfosforila la molécula de T6P para obtener finalmente la trehalosa (Avonce *et al.*, 2006).



**Figura 4. Rutas de la biosíntesis de la trehalosa en eucariotas (1) y procariotas (2).** **A)** Ruta Tps1/Tps2 (TPS/TPP) consiste en dos enzimas: trehalosa-6-fosfato sintasa (Tps1) y trehalosa-6-fosfato fosfatasa (Tps2). **B)** Ruta alternativa de la trehalosa fosforilasa (TreP) consiste de una enzima trehalosa fosforilasa que reversiblemente convierte la glucosa y glucosa-1-fosfato (G1P) a trehalosa y fosfato inorgánico (Pi). **C)** La ruta TreY/TreZ se compone por la enzima maltooligosil trehalosa sintasa (TreY) que convierte maltooligosacáridos, glucógeno y almidón (maltodextrinas) a maltooligosil trehalosa, después la maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (TreZ) hidroliza la maltooligosil trehalosa para obtener la trehalosa. **D)** La trehalosa sintasa (TreS) cambia directamente la maltosa a trehalosa. **E)** ADP-Glucosa y la glucosa son reversiblemente convertidas en trehalosa por la enzima trehalosa glicosil-transferasa sintasa (TreT) (Modificado de Thammahong *et al.*, 2017).

Por lo tanto, la ruta de la biosíntesis de la trehalosa utiliza sustratos importantes (G6P y UDP-Glucosa) que son requeridos para la glucólisis, en la ruta de las

pentosas fosfato y en la biosíntesis de la pared celular, de modo que la interrupción de esta ruta conduce a la desregulación de otras rutas metabólicas (Thammahong *et al.*, 2017). Mientras que el sistema de regulación de la síntesis de trehalosa está determinada por las necesidades del organismo, distribuidas en tres escenarios: (1) la célula en condiciones fisiológicas estables, por lo que no hay síntesis de trehalosa, (2) la célula en estrés induce la síntesis de trehalosa, la activación del transportador simporte de la trehalosa Agt1 para la protección de la célula, y la expresión de la trehalasa neutra (*NTH1*, *NTH2*) no fosforilada y sin actividad, y (3) la recuperación de la célula por el estrés, los bajos niveles de glucosa activan la expresión de la trehalasa ácida (*ATH1*) para degradar la trehalosa extracelular y generar glucosa para internalizarla de nuevo en la célula para su recuperación, asimismo sucede la fosforilación de las trehalasas neutras (*NTH1*, *NTH2*) activándose para hidrolizar la trehalosa del citoplasma (Eleutherio *et al.*, 2014; Macakova *et al.*, 2013).

## **2. 11 Función de la trehalosa en insectos y plantas**

La trehalosa es el principal componente de la hemolinfa (80 – 90%) de los artrópodos. En los insectos la trehalosa es utilizada como fuente de energía, por la ruta TPS/TPP que es estimulada por neuropéptidos que se activan antes y durante el vuelo, para que sea degradada por las trehalasas de los músculos del tórax. Estos organismos, también usan la trehalosa como punto de partida para la síntesis de quitina (Avonce *et al.*, 2006).

Las plantas sintetizan dos sacáridos no reductores, la sacarosa y trehalosa, cuya función de la primera es la reserva de carbohidratos que se distribuyen por el floema, y la trehalosa, que se encuentra en plantas que experimentan desecación, encontrándose en bajas concentraciones, por lo que se concluyó que no era indispensable para las plantas, hasta que a principios del año 2000 se encontró que en *A. thaliana* existen 11 genes de TPS y 10 genes de TPP, para la síntesis de trehalosa por la ruta TPS/TPP (Paul *et al.*, 2008), comprobando la importancia de los genes (*AtTPS1*) y la función de T6P como una molécula señal para el metabolismo y desarrollo (Eastmond *et al.*, 2002). Por esta razón, la alteración de

la ruta de síntesis de la trehalosa puede perturbar la maduración de embriones y hojas, la arquitectura de la inflorescencia, la cantidad de biomasa de las plántulas y plantas adultas, la fotosíntesis, la utilización y degradación de la sacarosa y el almidón, la señalización del ácido abscísico, y la tolerancia al estrés abiótico, particularmente durante la sequía (Avonce *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2008).

## **2. 12 Importancia de la trehalosa en organismos unicelulares**

Es conocido que la trehalosa protege a los hongos en respuesta de estrés térmico y deshidratación, porque forma puentes de hidrógeno con las proteínas, también interactúa con la cabeza polar de los fosfolípidos para mantener la estructura de la membrana bajo condiciones de deshidratación, e inhibe la fusión y la transición de la fase lipídica en condiciones anhidrobióticas, asimismo previenen la agregación de proteínas desnaturalizadas por bajas temperaturas manteniendo la membrana celular intacta, y en el caso de estrés oxidativo protege a la célula contra los radicales libres (Elbein *et al.*, 2003; Rudolph *et al.*, 1990; Crowe & Crowe, 1988).

En *S. cerevisiae* en condiciones de estrés térmico (1 h a 40 °C) aumenta la cantidad de trehalosa, por lo que incrementa la actividad enzimática de TPS y de NTH, para la recuperación de la célula (Hottiger *et al.*, 1987), en cuanto a la mutante  $\Delta tps1$ , su crecimiento se inhibe en medio con glucosa a altas temperaturas (Bell *et al.*, 1992). También se acumula trehalosa en respuesta a frío (12 h a 10 °C) pero la doble mutante *tps1/tps2* todavía sobrevive bajo esas condiciones, sugiriendo que existe otra ruta de adaptación al frío para *S. cerevisiae* (Schade *et al.*, 2004). Durante el estrés oxidativo las mutantes *tps1/tps2*, al no sintetizar trehalosa, son más sensibles al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por lo que presentaron gran cantidad de proteínas dañadas por el ambiente oxidante, sugiriendo que la acumulación de trehalosa protege a las células ante el daño oxidativo (Benaroudj *et al.*, 2001).

En el caso de *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus nidulans*, la trehalosa es importante para el estrés térmico y la supervivencia en estrés oxidativo (Petzold *et al.*, 2006; Alvarez-Peral *et al.*, 2002; Fillinger *et al.*, 2001). Respecto al crecimiento en glucosa, la mutante  $\Delta tps1$  de *C. albicans* crece a 30 °C, pero su desarrollo se ve afectado a 42 °C (Zaragoza *et al.*, 1998). De manera similar, en *C.*

*neoformans* y *C. gattii* la pérdida de la función de Tps1p afecta su crecimiento en glucosa a 37 °C (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2009; Petzold *et al.*, 2006). En *A. fumigatus* la mutante nula  $\Delta tpsA/B$  se ve afectada por el choque térmico a 50 °C, pero mantiene su viabilidad a 38 °C, en cuanto al estrés oxidativo se redujo la viabilidad de los conidios al exponerlos a 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 min y su crecimiento en glucosa no se vio afectado (Al-Bader *et al.*, 2010). Por otra parte, en *Magnaporthe oryzae* y *M. grisea* la ausencia del gen *TPS1* inhibe el crecimiento en glucosa y disminuye la capacidad invasiva en el arroz (Badaruddin *et al.*, 2013; Foster *et al.*, 2003). En el caso de muchos hongos patógenos, la acumulación de la molécula de señalización T6P inhibe la actividad de las hexocinasas y regula el flujo de glucosa (Puttikamonkul *et al.*, 2010).

En relación a las bacterias, en el caso de *Escherichia coli* los genes de la síntesis de trehalosa son importantes para responder al choque por frío (Kandror *et al.*, 2002). En algunas especies de *Mycobacterium* los glucolípidos contienen trehalosa, como es la trehalosa dimicolato que está involucrada en la virulencia y la homeostasis de la pared celular (Argüelles, 2000). Además, durante el estado de dormancia de *Mycobacterium smegmatis*, se demostró que acumula trehalosa para el mantenimiento celular y supervivencia, manteniendo su viabilidad, y cuando sale de este estadio existe una mayor actividad de las trehalasas, por lo cual decrece la concentración de trehalosa y aumenta la cantidad de glucosa (Shleevea *et al.*, 2017).

## **2. 13 El rol de la molécula T6P y de la fosfatasa Tps2**

En la mayoría de los organismos, mencionados con anterioridad, denotan que la eliminación del gen *TPS2* afecta la ruta de biosíntesis de trehalosa, como consecuencia se genera la acumulación de T6P, la cual es una molécula señal que inhibe la actividad de las hexocinasas1-2 (Hxk1p y Hxk2p) y de Tps1, también detiene la síntesis de trehalosa durante un choque térmico y disminuye la actividad de Tps2, en *S. cerevisiae* (Trevisol *et al.*, 2014), en plantas, la acumulación de T6P regula el crecimiento en sacarosa (Schluepmann *et al.*, 2003), y en *C. albicans* se sabe que niveles altos de T6P son tóxicos porque la acumulación causa agotamiento de fosfato, y reducen la infectividad (avirulento) (van Dijck *et al.*, 2002).

En *S. cerevisiae* se observó que mutante  $\Delta tps2$  no pudo crecer en temperaturas superiores a 34 °C (Piper & Lockheart, 1988), y acumula T6P (De Virgilio *et al.*, 1993). En cuanto a *C. albicans*, la mutante nula en  $\Delta tps2/\Delta tps2$  acumula T6P a 44 °C, no tiene defectos en la formación de hifas en medio con glucosa a 30 °C pero disminuye sus crecimiento a 42 °C, también, a pH superior a 7 la integridad de la pared celular está comprometida, y tiene una disminución significativa en la virulencia (Zaragoza *et al.*, 2002; van Dijck *et al.*, 2002). En el caso de *C. neoformans* el gen *TPS2* cuenta con cuatro copias de elementos de respuesta a estrés (STRE) en su región promotora y *TPS2* de *C. gattii* cuentan con una similitud de secuencia del 89% con *C. neoformans*, de modo que en ambos casos las mutantes  $\Delta tps2$  acumulan T6P y tienen defectos de crecimiento a 37 °C en medio con glucosa e incluso la muerte, y se restaura el crecimiento en medio adicionado con sorbitol o galactosa a 37 °C, la mutante  $\Delta tps2$  de *C. gattii* tiene un ligera disminución de la virulencia en *Caenorhabditis elegans*, pero en el modelo murino la virulencia disminuye drásticamente (Ngamskulrungraj *et al.*, 2009; Petzold *et al.*, 2006). Las mutantes en el gen *TPS2* en *Fusarium graminearum*, no producen trehalosa y están afectadas en la esporulación y en la reproducción sexual, asimismo afectó el crecimiento polarizado de la célula, alterando la estructura y la remodelación de la pared celular (Song *et al.*, 2014). Las mutantes *TPS2* de *U. maydis*, tampoco producen trehalosa, presentaron mayor sensibilidad a estrés oxidativo, osmótico, al igual que a agentes que dañan la pared celular. Así como, una drástica disminución en la virulencia en el maíz (Cervantes-Chávez *et al.*, 2016). Además, la eliminación de *TPS2* (*orlA*) en *A. nidulans* y *A. fumigatus* afectó la homeostasis de la pared celular, por defectos en la producción de la quitina contenida en la célula, alterando así la biosíntesis de la quitina y el ensamble de la pared celular, atenuando la virulencia en murinos (Puttikamonkul *et al.*, 2010; Borgia *et al.*, 1996). Todos estos descubrimientos, en cuanto a la disminución drástica de la virulencia y otros defectos notorios en el desarrollo de varios organismos modelo, por la ausencia de *TPS2*, se ha propuesto como un blanco farmacéutico la inhibición de esta fosfatasa.

### III. HIPÓTESIS

La ausencia de trehalosa y las condiciones de estrés oxidativo, osmótico y daño en la pared celular conducen a la muerte celular de *Ustilago maydis* vía la metacaspasa (Mca1), afectando de manera general la virulencia.

### IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación de la muerte celular mediada por la ausencia de trehalosa y la eliminación del gen de la metacaspasa *MCA1* en *Ustilago maydis* en respuesta a estrés oxidativo, osmótico y en daño de pared celular, así como en la patogenicidad.

### V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la tasa de muerte celular en respuesta a estrés oxidativo y osmótico en la cepa mutante  $\Delta tps2$ .
- Estudiar la regulación de la expresión del gen *MCA1* en respuesta a estrés oxidativo en la cepa mutante  $\Delta tps2$ .
- Analizar la capacidad de síntesis de la trehalosa en la mutante  $\Delta mca1$  en estrés oxidativo y osmótico.
- Caracterizar *in vitro* la respuesta de la mutante simple  $\Delta mca1$  y la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  en estrés oxidativo, daño de pared celular y estrés osmótico.
- Comparar la capacidad infectiva en plantas de maíz de la mutante simple  $\Delta mca1$  y la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$ .

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6. 1 Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizaron las cepas silvestres (WT) de *Ustilago maydis*, FB1 (*a1b1*) y FB2 (*a2b2*), proporcionada por la Dra. Flora Banuett de la Universidad de California, y los fondos genéticos mutantes FB1  $\Delta tps2$  (234) y FB2  $\Delta tps2$  (277) (Cervantes-Chávez *et al.*, 2016) (Tabla 1). Las cepas se propagaron en medio completo MC (0.5% de peptona, 1% de extracto de levadura, 1% de glucosa, 0.15% de nitrato de amonio, 62.5 mL de solución de sales de *U. maydis* y 2% de agar bacteriológico para medio sólido) (Holliday, 1974). Las mutantes  $\Delta mca1$  y las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  se recuperaron en MC suplementado con el antibiótico de selección, 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de higromicina B para las cepas  $\Delta mca1$ , y 3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de carboxina para las mutantes  $\Delta tps2$ , asimismo las cepas dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  se recuperaron en presencia de ambos antibióticos (Tabla 1). Para la producción de ADN de plásmido se utilizaron células de *Escherichia coli* Top10, crecidas en medio Luria Bertani (LB) (Sambrook & Rusell, 1999). Todas las cepas y medios de cultivo fueron manipulados en condiciones asépticas en campana de flujo laminar.

Para el estudio de patogenicidad se utilizaron semillas de maíz de la variedad “cacahuazintle” cultivadas en el invernadero de la Facultad de Ciencias Naturales, Campus Juriquilla de la UAQ.

**Tabla 1. Especificaciones del cepario**

CEPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
FB1	Silvestre <i>a1b1</i>	(Banuett & Herskowitz, 1989)
FB2	Silvestre <i>a2b2</i>	
234	$\Delta tps2$ , <i>cbx</i> <sup>R</sup> , <i>a1b1</i>	(Cervantes-Chávez <i>et al.</i> , 2016)
277	$\Delta tps2$ , <i>cbx</i> <sup>R</sup> , <i>a2b2</i>	
165	$\Delta mca1$ , <i>hygB</i> <sup>R</sup> , SG200 (solopatogénica)	(Figueroa-Resendiz, 2016)

639 al 644	$\Delta mca1$ , hyg <sup>B</sup> <sup>R</sup> , <i>a1b1</i>	Este trabajo
653 al 662	$\Delta mca1$ , hyg <sup>R</sup> , <i>a2b2</i>	
669 al 676	$\Delta tps2::\Delta mca1$ , cbx <sup>R</sup> hyg <sup>R</sup> , <i>a1b1</i> in planta	
647	$\Delta tps2::\Delta mca1$ , cbx <sup>R</sup> hyg <sup>R</sup> , <i>a2b2</i> in vitro	
651	$\Delta tps2::\Delta mca1$ , cbx <sup>R</sup> hyg <sup>R</sup> , <i>a2b2</i> in vitro	
665 al 668	$\Delta tps2::\Delta mca1$ , cbx <sup>R</sup> hyg <sup>R</sup> , <i>a2b2</i> en planta	

Cepas haploides *a1b1* y *a2b2*. cbx<sup>R</sup> resistencia a carboxina. hyg<sup>B</sup><sup>R</sup> resistencia a higromicina B.  $\Delta$  delección del gen.

## 6. 2 Amplificación de ADN Y ADNc

Con base en la secuencia de los genes de interés de *U. maydis*, el ORF (Open Reading Frame) obtenido de la base de datos MIPS ([http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=start\\_method&Db=p3\\_t237631\\_Ust\\_maydi\\_v2GB](http://pedant.helmholtz-muenchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=start_method&Db=p3_t237631_Ust_maydi_v2GB)) y con el programa Vector NTI, se diseñaron oligonucleótidos para el gen *MCA1* (UMAG\_01408) y para el gen de *TPS2* (UMAG\_10650), además de sus respectivas regiones UTR (por sus siglas en inglés untranslated region) 5' y 3', de cada uno de los respectivos genes, para la comprobación de la integración homóloga doble del cassette de interrupción; junto con oligonucleótidos anidados en el vector pDONR higromicina B y pDNOR carboxina respectivamente (Tabla 2). También se diseñaron oligonucleótidos para el gen de actina (UMAG\_11232). Estos oligonucleótidos se utilizaron para amplificar por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los fragmentos de interés de ADN y ADNc (Ácido desoxirribonucleico complementario), cuyas combinaciones se especifican en la Tabla 3. El PCR se realizó en el termociclador BioRad®T100. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados en la empresa Sigma-Aldrich.

**Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos.**

<b>Secuencia blanco</b>	<b>Número de oligonucleótido</b>	<b>Secuencia de nucleótidos</b>
<b>ORF MCA1</b>	2084-D	5'-AGTATGCCACGAACCATGTCA-3'
	2090-R	5'-TACTGTTTGCCTGTCTCG-3'
	2190-D	5'-CAGAACGGCGAGCTTCGAGG-3'
<b>pDNOR hph</b>	3-hyg-D	5'-CTCGAGGGTTCCTACTCCACG-3'
	2114-R	5'-ATTGCAGGCGAGAAGAAATG-3'
<b>Río arriba MCA1</b>	2023-D	5'-ATCGAAGGGCCTTGTAACCT-3'
<b>Río abajo MCA1</b>	2028-R	5'-AGATCGGCGGTAAGAACATG-3'
<b>ORF Actina</b>	2035-D	5'-CTTCCTGACGGACAGGTGAT-3'
	2036-R	5'-CTCGGGAGGAGCAACAATC-3'
<b>ORF TPS2</b>	2040-D	5'-CAAGGTCCGGAACATGTCTT-3'
	2057-R	5'-AGGACAGGACGAGTACCGAA-3'
<b>pDNOR cbx</b>	1072-D	5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3'
	1071-R	5'-TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC-3'
<b>Río arriba TPS2</b>	1720-D	5'-GCGGTACTCCATTACACCT-3'
<b>Río abajo TPS2</b>	1721-R	5'-TGGCTAAACAACCAGAAAACG-3'

**D** oligonucleótido directo, **R** oligonucleótido reverso.

**Tabla 3. Especificación de los amplicones**

Amplicón	Oligonucleótidos	T <sub>H</sub> (°C)	Tamaño (pb)
<b>ORF MCA1</b>	2084 – 2090	64	290
	2190 – 2090	70	726
<b>5'-hph (<math>\Delta mca1</math>)</b>	2023 – 3'hyg	60	2628
<b>3'-hph (<math>\Delta mca1</math>)</b>	2028 – 2114	63.7	3446
<b>ORF TPS2</b>	2040 – 2057	69	390
<b>UP-pDNOR (<math>\Delta tps2</math>)</b>	1720 – 1071	57	1261
<b>DOWN-pDNOR (<math>\Delta tps2</math>)</b>	1072 – 1721	57	1065
<b>ORF Actina</b>	2035 – 2036	64	276

T<sub>H</sub> Temperatura de hibridación

### 6. 3 Extracción del ADN plasmídico (AC97)

Se trabajó con el plásmido AC97, que es el cassette de eliminación del gen de la metacaspasa (*MCA1*), en 5 mL de medio de cultivo LB adicionado con kanamicina (50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) se incubó por 24 horas a 37 °C y 150 rpm. Posteriormente la muestra se centrifugó 2 minutos a 12,000 rpm para concentrar las células, se decantó el sobrenadante y se repitió el proceso de concentración de células. La pastilla celular así obtenida se re-suspendió con 200  $\mu\text{L}$  de la Solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8 y 10 mM EDTA pH 8), posteriormente se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de la Solución II (0.2 M NaOH, 1% SDS), se homogenizó y se incubó por 10 minutos en hielo. Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de la Solución III (3 M acetato de potasio, 2 M ácido acético glacial), se incubó 10 minutos en hielo. Posteriormente el tubo se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 rpm, se recuperó el sobrenadante en tubos Eppendorf nuevos. El ADN plasmídico se precipitó con 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío, y se incubó la muestra a -20°C por 20 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 300  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% frío, nuevamente se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm, se decantó el etanol y se invirtieron los tubos para secar la pastilla. Para limpiar el ADN plasmídico, la pastilla

se re-suspendió en 700  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular y se añadieron 3  $\mu\text{L}$  de RNAsa A ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), se mezcló e incubó durante 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de solución de fenol: cloroformo (1:1), 2 minutos en vórtex, se centrifugó 10 minutos a 12,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se agitó durante 2 minutos en vórtex, y se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm, se recuperó el sobrenadante, este paso se realizó dos veces. El ADN se precipitó con 1/10 del volumen de 3 M acetato de sodio y con dos volúmenes de etanol 95% frío. Las muestras se mantuvieron 20 minutos a  $-20^\circ\text{C}$ , posteriormente se centrifugaron 10 minutos a 12,000 rpm y se decantó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 300  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%, se centrifugó, se decantó y se invirtió el tubo para secar. Finalmente, la muestra se re-suspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular. Se determinó la identidad del plásmido por medio de enzimas de restricción *HindIII* y *PstI*.

#### **6. 4 Linearización del plásmido para transformar protoplastos de *U. maydis***

El plásmido AC97 se linearizó con la enzima de restricción I-SceI (New England, Biolabs). Se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  ( $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) de ADN plasmídico, 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador 10X de la enzima I-SceI, 0.5  $\mu\text{L}$  de albúmina de suero bovino (BSA) y agua grado biología molecular para 50  $\mu\text{L}$  de reacción. La mezcla se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante dos horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación, la digestión se precipitó con 5  $\mu\text{L}$  de 3 M acetato de sodio (pH 5.2) y 100  $\mu\text{L}$  de etanol al 95%. Se agitó en el vórtex y se incubó a  $-20^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Después se centrifugó por 15 minutos a 12,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70%. Se dejó secar la pastilla y se re-suspendió en 12  $\mu\text{L}$  de amortiguador STC (véase apéndice) se usaron 3  $\mu\text{L}$  de esta solución por cada reacción de transformación.

#### **6. 5 Formación de protoplastos de *U. maydis***

Se inoculó una colonia de la cepa de *U. maydis* de interés en 5 mL de MC líquido y se incubó a  $28^\circ\text{C}$  durante toda la noche a 150 rpm. De este cultivo se tomaron 100

$\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{L}$  y 500  $\mu\text{L}$  para inocular de manera independiente 100 mL de MC líquido y se incubó durante 20 horas a 28 °C en agitación, o hasta que un cultivo alcanzó una densidad óptica (D. O.  $_{600\text{nm}}$ ) cercana a 0.8 medida en el espectrofotómetro Genesys 10s UV-Vis (Thermo SCIENTIFIC). A continuación, se transfirió el cultivo del matraz seleccionado a dos tubos cónicos de 50 mL, se centrifugaron a 2,500 rpm durante 7 minutos, el sobrenadante fue desechado. Se adicionaron 15 mL de amortiguador SCS (véase apéndice) a cada tubo, se re-suspendieron las células y se juntaron en un solo tubo, nuevamente se centrifugó y fue desechado el sobrenadante. El concentrado de células fue re-suspendido en 1 mL de SCS, se adicionaron 800  $\mu\text{L}$  de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (100  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) diluidas en amortiguador II (véase apéndice), se incubaron en agitación suave durante 10 minutos, o hasta que se observó la formación de los protoplastos en el microscopio (Leica DM750). Se centrifugaron a 2,300 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de SCS. Las células se transfirieron a tubos Eppendorf, se centrifugaron a 2,000 rpm durante 2 minutos, se decantó y las células se re-suspendieron en 1 mL de SCS. Se repitió el paso anterior, finalmente se decantó el sobrenadante y se re-suspendieron en 1 mL de amortiguador STC frío. Para su almacenamiento a -80 °C se adicionó dimetilsulfóxido (DMSO) al 7% (70  $\mu\text{L}$  de DMSO y 930  $\mu\text{L}$  de protoplastos) y se prepararon alícuotas de 50  $\mu\text{L}$ .

## **6. 6 Transformación de protoplastos de *U. maydis* en hielo**

El ADN plasmídico linearizado (5  $\mu\text{g}$ ), se re-suspendió en 4  $\mu\text{L}$  de STC y se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de heparina (15  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en STC), se mantuvo en hielo, después se transfirió a 50  $\mu\text{L}$  de protoplastos y se mezcló con movimiento circular suavemente con la punta de la micropipeta, se mantuvieron en hielo por 10 minutos. Se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de polietilenglicol (40 % PEG 3350 en STC) frío y se incubó por 15 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de STC y se mezcló suavemente por 15 segundos. La reacción se centrifugó a 2,500 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de STC para re-suspender las células. El contenido se sembró en medio completo doble con 1 M

de sorbitol, DCM-S, y antibióticos ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  carbenicilina, y  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de higromicina B), las células se distribuyeron suavemente de manera homogénea con una varilla de vidrio estéril. Finalmente se incubaron a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 4 a 5 días aproximadamente (García-Pedrajas *et al.*, 2008). Pasado el tiempo de incubación se recuperaron las transformantes en MC sólido adicionando del agente selectivo (higromicina B). Una vez crecidas las transformantes se inocularon algunas colonias en MC líquido con el agente selectivo, se incubaron a 250 rpm durante 24 horas para su posterior extracción de ADN genómico.

### **6. 7 Extracción de ADN genómico**

Las células de *U. maydis* crecidas en MC sólido (placa) se utilizaron para inocular MC líquido (10 mL), se incubaron a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  a 150 revoluciones por minuto (rpm) hasta que alcanzaron la fase logarítmica. El cultivo se centrifugó a 3,500 rpm durante 5 minutos para obtener una pastilla celular, ésta se re-suspendió en 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador Tris EDTA pH 8 (TE, véase apéndice). La muestra se transfirió a tubos Eppendorf y se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  del amortiguador de lisis (TSNTE, véase apéndice). Se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de la mezcla de fenol-cloroformo (1:1) y 0.3 gramos de perlas de vidrio (0.1 mm de diámetro, lavadas con ácido nítrico y esterilizadas). Para romper las paredes de las células, se colocó el tubo en agitador vórtex de 3 a 5 minutos. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 12, 000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó la fase acuosa en tubos nuevos (estériles). Se adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de RNAsa ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y se incubó por 5 minutos a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se agitaron en el vórtex por un minuto, se centrifugó durante 7 minutos a 14,000 rpm y se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf. Posteriormente se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se agitó en el vórtex por 5 minutos, nuevamente se centrifugó durante 10 minutos a 14,000 rpm y se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf. El ADN se precipitó con acetato de sodio 3 M (1/10 del volumen de la muestra) y con dos volúmenes de etanol 95% frío. Se incubó a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 rpm, la pastilla se lavó con 300  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% frío, nuevamente se

centrifugó durante 3 minutos a 12,000 rpm, se decantó y se dejó secar la muestra, finalmente el ADN se disolvió con 50  $\mu$ L agua grado biología molecular. La integridad del ADN se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X (véase apéndice). A 100 mL de agarosa se le adicionaron 60  $\mu$ g de bromuro de etidio los geles teñidos se visualizaron en el el transiluminador de BIO RAD® Gel Doc. XR, con el Software Image Lab™.

### **6. 8 Extracción de ARN (ácido ribonucleico)**

El cultivo de la cepa de interés se preparó según lo descrito en cada experimento. La pastilla de células se colecto por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min. Se congeló en nitrógeno líquido y se molió en mortero con nitrógeno líquido con la ayuda de un pistilo, el polvo fino así obtenido (aproximadamente 100 mg) se depositó en tubos Eppendorf (libres de RNAsas). Para purificar el ARN se homogenizó la muestra con 1 mL de TRIzol, se colocó el tubo en agitador vórtex 2 minutos y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente ( $T_a$ , 20 – 25 °C), se añadieron 400  $\mu$ L de cloroformo y se agitó suavemente. Se incubó a  $T_a$  durante 3 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C por 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Se realizó una purificación empleando 400  $\mu$ L de cloroformo y se agitó un minuto en el vórtex, después se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se recuperó la fase acuosa. El ARN se precipitó con 600  $\mu$ L de la mezcla 0.8 M citrato de sodio/1.2 M NaCl, y 700  $\mu$ L de isopropanol frío, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 1 mL de etanol al 75% frío, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a 4 °C, se decantó y dejó secar el tubo con la pastilla durante 5 a 10 minutos. Finalmente, la pastilla se disolvió con 50  $\mu$ L de agua DEPC (tratada con Dietilpirocarbonato al 0.1%), y se cuantificó el ARN en el Nanodrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC). Todos los reactivos se prepararon con agua DEPC (0.1%).

## 6. 9 Síntesis de ADN<sub>c</sub>

Para obtener el ADN<sub>c</sub> (ADN complementario) se utilizaron los reactivos de la marca (Thermo SCIENTIFIC, #EP0441). El ARN total se trató con la enzima DNAsa I, libre de RNAsa en relación 1 U de DNAsa I por 1 µg de ARN, se añadieron 2 µL amortiguador 10X de la enzima DNAsa I/MgCl<sub>2</sub> y agua DEPC, para una reacción de 20 µL. La reacción se incubó a 37 °C por 35 minutos, pasado el tiempo de incubación se detuvo la reacción con 2 µL de 50 mM EDTA, y se incubó a 65 °C por 10 minutos. Se agregaron 0.5 µL de oligo (dT) a 10 µL ARN tratado con DNAsa I, se incubó la reacción 65 °C por 5 minutos. A continuación, se agregaron los siguientes componentes: 4 µL de amortiguador de reacción 5X, 0.5 µL de Inhibidor de RNAsa RiboLock, 2 µL de la mezcla de dNTPs (10 mM) y 1 µL de la enzima Transcriptasa Reversa (RT), en un volumen final de 20 µL. Para los controles, la reacción se llevó a cabo con y sin la enzima RT (+RT y -RT, respectivamente), por cada muestra. La reacción se incubó a 42 °C por una hora, la reacción se finalizó a 72 °C por 10 minutos.

## 6. 10 Obtención de cepas dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta mca1$

Se infectaron plantas de maíz de 10 días de edad con una cepa sexualmente compatible de la mutante  $\Delta tps2$  (carboxina resistente *a2b2*, 277) y la cepa mutante  $\Delta mca1$  (higromicina B resistente *a1b1*, 643). Se preparó el pre-inóculo de estas cepas mutantes en 10 mL de MC, de forma independiente, se incubaron 20 horas a 28 °C a 150 rpm suplementados con el antifúngico correspondiente. Después se inocularon 60 mL de MC con 600 µL de células del pre-inóculo, se incubaron por 24 horas a 28 °C y 150 rpm, pasado el tiempo de incubación se procedió al lavado de células con agua destilada estéril y se re-suspendió la pastilla celular en 30 mL de agua destilada estéril, posteriormente se mezclaron ambas cepas en un solo matraz y se inoculó cada planta por inyección en la base del tallo con 150 µL de células. Los signos de las plantas se observaron durante un mes. Las agallas maduras se colectaron y se conservaron a -80 °C. En condiciones asépticas se maceró el tumor en mortero y pistilo estéril en 5 mL de agua destilada estéril. El macerado se filtró

con tela magitel sobre un embudo, y se centrifugó a 3,500 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en 2 mL de agua destilada estéril, se verificó la presencia de teliosporas al microscopio (Leica DM750). A continuación, se agregaron 2 mL de sulfato de cobre al 3%, 60  $\mu\text{L}$  de carbenicilina ( $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y 120  $\mu\text{L}$  de kanamicina ( $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), se incubó a  $28^\circ\text{C}$  a 150 rpm por 2 horas. Posteriormente se centrifugó a 3,500 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se disolvió la pastilla en 1 mL de agua destilada estéril, de este concentrado celular se realizaron diluciones 1:10 y 1:100, para esparcir 200  $\mu\text{L}$  de cada dilución en MC sólido suplementado con 0.5 % tritón X-100, y antibióticos ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  carbenicilina y  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  kanamicina), se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  hasta observar crecimiento de *U. maydis*. Subsecuentemente, se recuperaron 300 colonias, estas se depositaron en 10 mL de agua destilada estéril, para separar las esporidias se agitaron 2 minutos en vórtex. Se realizaron diluciones 1:10 y 1:100, a continuación, se esparcieron 200  $\mu\text{L}$  de cada dilución en MC sólido ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  carbenicilina, se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Las colonias así aisladas se recuperaron en MC sólido y líquido adicionado con higromicina B ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y carboxina ( $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), el medio líquido se incubó a  $28^\circ\text{C}$  durante 24 horas en agitación de 150 rpm, y el medio sólido se incubó 48 horas a  $28^\circ\text{C}$ . De las cepas resistentes a ambos antifúngicos (dobles mutantes,  $\Delta tps2::\Delta mca1$ ), se procedió a determinar el sexo de cada cepa por reacción “fuz”. La doble mutación se comprobó por PCR y RT-PCR.

### **6. 11 Reacción de apareamiento “fuz”**

La capacidad de apareamiento de las cepas mutantes simples  $\Delta mca1$ ,  $\Delta tps2$  y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  se determinó por reacción fuz (Banuett & Herskowitz, 1988). Se realizó un inóculo de 5 mL de cada una de las cepas a aparear, se incubó por 24 horas, en agitación 150 rpm a  $28^\circ\text{C}$ . Posteriormente se lavaron las células con agua destilada estéril, y se procedió a su conteo en la cámara de Neubauer. Se ajustó la concentración a  $1 \times 10^8$  células·mL<sup>-1</sup> de cada cepa. En un tubo Eppendorf® de 1.5 mL se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  del par de cepas a aparear (doble mutante vs silvestre *a1b1* y *a2b2* de manera independiente).

Después, se inocularon gotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada mezcla sobre MC con 1% de carbón activado. Las cajas se incubaron a 28  $^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Se considera una reacción fuz positiva, por el crecimiento con aspecto algodonoso. Posteriormente éstas fueron fotografiadas con una cámara CANON EOS Rebel T3i. La observación de la reacción de apareamiento se magnificó con el estereoscopio Leica EZ4D acoplado a la cámara Leica ICC50 HD usando la aplicación Leica Application Suite v. 2. 0. 0.

## **6. 12 Ensayos de respuesta a estrés en placa**

Las cepas de interés se inocularon en 7.5 mL de MC durante 24 horas a 28  $^{\circ}\text{C}$  y 150 rpm, terminado el tiempo de incubación se lavaron las células con agua destilada estéril y se disolvió la pastilla celular en 5 mL de agua destilada estéril. Se realizó el conteo de células (cámara de Neubauer) y se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^8$  células $\cdot\text{mL}^{-1}$ , a partir de ésta se realizaron diluciones decimales ( $10^{-7}$  hasta  $10^{-3}$  células $\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Para el ensayo de estrés en placa se utilizó MM pH 7 (30 mM Tris $\cdot\text{HCl}$ ) con 1% de glucosa (condición control). Para la condición estresante, se suplementó con el agente indicado en cada experimento. Los tipos de estrés a los que las células se sometieron fueron: oxidativo, ácido, de pared celular, osmótico, radiación con luz ultravioleta, salino y estrés por metales pesados. El medio indicado se inoculó con gotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada dilución de células ( $10^{-7}$  hasta  $10^{-3}$ ) método “spot assay” (Cervantes-Chávez *et al.*, 2010). Las cajas se incubaron a 28  $^{\circ}\text{C}$  por 96 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las cajas fueron fotografiadas con una cámara CANON EOS Rebel T3i. Los ensayos se realizaron por triplicado, con dos replicas por experimento.

## **6. 13 Análisis de la expresión del gen *UmMCA1***

Para analizar la expresión del gen *UmMCA1* en la cepa FB1 y 234 ( $\Delta\text{tps2}$ ) en condiciones de estrés oxidativo y osmótico se inocularon 300 mL de MC líquido con 600  $\mu\text{L}$  de cultivo de cada una de las cepas (previo cultivo de 18 a 24 horas), y se

incubó durante 20 horas a 28 °C y 150 rpm. Pasado el tiempo de incubación, el cultivo se dividió en 6 tubos cónicos de 50 mL, se centrifugaron a 3,000 rpm por 4 minutos, se lavaron las células se descartó el sobrenadante y se re suspendió la pastilla celular en 10 mL de agua destilada estéril, éstos se utilizaron para inocular 35 mL de medio mínimo pH 7 (MM pH 7) con 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se incubaron a 28 °C a 150 rpm durante 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos, como control se utilizó MM pH 7 sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Una vez pasado el tiempo de incubación las células se recuperaron por centrifugación a 4,000 rpm por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se almacenó la pastilla a -80 °C, para extraer posteriormente el ARN. El análisis densitométrico de la expresión de Mca1, se realizó a partir de PCR de punto final observado en gel de agarosa, en el cual se utilizó como templado el ADNc. Se usó el programa *Image J* para el análisis de la imagen, donde la relación de intensidad de banda para Mca1 y la banda del gen constitutivo (actina, *Um11232*) de la cepa sin estrés se le asignó un valor arbitrario de 100% y los otros valores se calcularon tomando esto como el valor base. Los valores arrojados se analizaron con una prueba de ANOVA con post-test Tukey ( $p \leq 0.05$ ) en el programa PRISM de GraphPad. Los experimentos se realizaron por triplicado.

## **6. 14 Extracción de trehalosa**

Se realizó de acuerdo (Ferreira *et al.*, 1997). Las cepas de interés se crecieron en un pre-inóculo de 5 mL MC líquido durante 20 horas a 28 °C y 150 rpm. Posteriormente, se inocularon 50 mL de MC con 100 µL de células del pre-inóculo y se incubaron 20 horas a 28 °C y 150 rpm, pasado el tiempo de incubación se centrifugaron a 3,000 rpm 5 minutos se decantó el medio y se lavó la pastilla celular dos veces con agua destilada estéril. Después se inocularon 200 mL de MM pH 7 (30 mM Tris-HCl pH 7) a una D. O. <sub>600nm</sub> de 0.02. El medio inoculado se incubó por 15 horas a 28 °C y 150 rpm, inmediatamente se agregó el agente estresante (2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 500 mM NaCl, de manera independiente) por 3 horas manteniendo las mismas condiciones de incubación, como control se mantuvo el cultivo en incubación sin la adición del agente estresante. Transcurrido este tiempo se

concentraron las células por centrifugación, a pastilla obtenida se congeló en nitrógeno líquido y se molió hasta obtener polvo fino evitando descongelar la muestra, una vez molida se pesó directamente en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se adicionaron 30 mL de etanol grado HPLC. La muestra se sometió a un proceso de ebullición (baño maría) hasta la evaporación completa del solvente. Posteriormente, a las muestras secas se le adicionó 1 mL de la mezcla de acetonitrilo:agua (50%), ambos grado HPLC, para disolver la trehalosa presente en cada muestra. La suspensión obtenida se pasó a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó dos veces a 13,000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se recuperó en tubos nuevos. Previo a la cuantificación por HPLC la muestra se filtró en un filtro para jeringa de 4 mm de diámetro Phenex™-NY de membrana de nylon cuyo tamaño de poro es de 0.2 µm. Para cuantificar la trehalosa se utilizó una columna Agilent Zorbax Carbohydrate 4.6 X 150 mm 5 µm (No. CAT 843300-908), la fase móvil fue 75 % acetonitrilo, 25 % agua a 30 °C y su flujo de 1.5 mL·min<sup>-1</sup>, isocrático 10 min. Se utilizó el equipo de HPLC Agilent 1200 de bomba isocrática con detector de índice de refracción (IR), en el laboratorio de cromatografía PlanTECC del CINVESTAV-Irapuato. La curva de calibración se preparó con D-(+)-Trehalosa de Sigma-Aldrich® (véase apéndice). El análisis estadístico fue una ANOVA con post-test Tukey ( $p \leq 0.05$ ) en el programa PRISM de GraphPad. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### **6. 15 Tinción con yoduro de propidio**

La cuantificación de la muerte celular se determinó con la tinción con Yoduro de Propidio. Las cepas de interés se inocularon en MC durante 24 horas en 150 rpm a 28 °C, terminado el tiempo de incubación se lavaron las células con agua destilada estéril y se disolvió la pastilla celular en 5 mL de agua destilada estéril, se realizó el conteo de células con la cámara de Neubauer y se preparó una suspensión a una concentración de  $1 \times 10^8$  células·mL<sup>-1</sup>. De ésta, se tomaron 500 µL para cada condición: control, 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 500 mM NaCl, y se incubaron por 3 horas. Al término de este tiempo se lavaron las células y se re-suspendieron en 50 µL de una solución de yoduro de propidio 1:100 (1mg·1mL<sup>-1</sup>) se mezclaron y se incubó a T<sub>a</sub> en

oscuridad por 20 minutos. Posterior a la tinción se realizó una dilución 1:10 con agua destilada de las células teñidas para su adecuada visualización en el microscopio compuesto triocular EPI-fluorescente Mod. M834FLR AMSCOPE® con el objetivo 40x, y conteo a partir de la imagen capturada por ScopelImage 9.0. Para el análisis estadístico se realizó una prueba ANOVA de dos vías con un ajuste de residuales con el post-test Bonferroni ( $p \leq 0.05$ ), en el programa PRISM de GraphPad. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **6. 16 Crecimiento en forma de hifa**

Las cepas de interés se crecieron en MC durante 20 horas a 150 rpm, pasado el tiempo de incubación se centrifugó el cultivo a 4,500 rpm por 5 minutos, y se re-suspendió la pastilla con agua destilada estéril e incubó 24 horas a 4 °C. Después se dejó en ayuno 3 horas a 28 °C a 150 rpm, posteriormente se incubó en hielo durante 30 minutos. Se tomaron 250  $\mu$ L de las células ayunadas, se inocularon 5 mL de MM pH 7 (morfología de levadura) y 5 mL de MM pH 2.8 (morfología de hifa) con 1% de glucosa, se incubó a 28 °C a 150 rpm durante 24 horas (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995). Posteriormente, las células se tiñeron con calcoflúor White (CFW, 18909 Sigma-Aldrich®), se tomaron 50  $\mu$ L del cultivo y se agregaron 50  $\mu$ L de CFW, y se mezcló; se procedió a tomar fotos en el microscopio compuesto triocular EPI-fluorescente Mod. G506T UNICO®, objetivo 40X. La imagen fue capturada por el programa ScopelImage 9.0. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **6. 17 Crecimiento con acetato de sodio**

Las células de las cepas de interés se prepararon como en el punto 6.12. Para el ensayo del acetato de sodio (AcNa) en placa se utilizó MM pH 7 (30 mM Tris-HCl) con 1% de glucosa (condición control) y 1.5%, 2%, 3% y 4% de AcNa sin glucosa. Las placas se inocularon con gotas de 10  $\mu$ L de cada dilución de células ( $10^{-7}$  hasta  $10^{-3}$ ) método “spot assay” (Cervantes-Chávez *et al.*, 2010). Las cajas se incubaron a 28 °C por 96 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las cajas fueron fotografiadas con una cámara CANON EOS Rebel T3i. Los experimentos se realizaron por triplicado, con dos replicas por experimentos.

## **6. 18 Pruebas de patogenicidad**

Se inyectaron plantas de maíz de la variedad “cacahuazintle” de 8 a 12 días de edad, en condiciones de invernadero. Se preparó el pre-inóculo de las cepas sexualmente compatibles: doble mutantes, mutantes simples y silvestre en 10 mL de MC y se incubaron 20 horas a 28 °C y 150 rpm, suplementados con el antifúngico correspondiente. Después se inocularon 60 mL de MC con 600 µL de células del pre-inóculo, se incubaron por 24 horas a 28 °C en 150 rpm, pasado el tiempo de incubación se procedió al lavado de células con agua destilada estéril y se re-suspendió la pastilla celular en 10 mL de agua destilada estéril, se determinó la concentración celular en la cámara de Neubauer. Se preparó una suspensión a una concentración de  $1 \times 10^8$  células·mL<sup>-1</sup>. Se mezcló en una relación 1:1 cada par de cepas sexualmente compatibles y las plantas de maíz fueron inyectadas con 300 µL de esta suspensión en la base del tallo. La sintomatología de las plantas de maíz se evaluó a los 14 días posteriores a la inoculación, clasificando los síntomas en: asintomática, hojas con clorosis y producción de antocianinas, agallas pequeñas, agalla grande y muerte de la planta (Chavan & Smith, 2014). Las plantas fueron fotografiadas EOS Rebel T3i. Para el análisis estadístico se realizó la prueba Kruskal-Wallis con el post-test Dunn ( $p \leq 0.05$ ) en el programa PRISM de GraphPad.

## VII. RESULTADOS

### 7. 1 Análisis *in silico* de Mca1

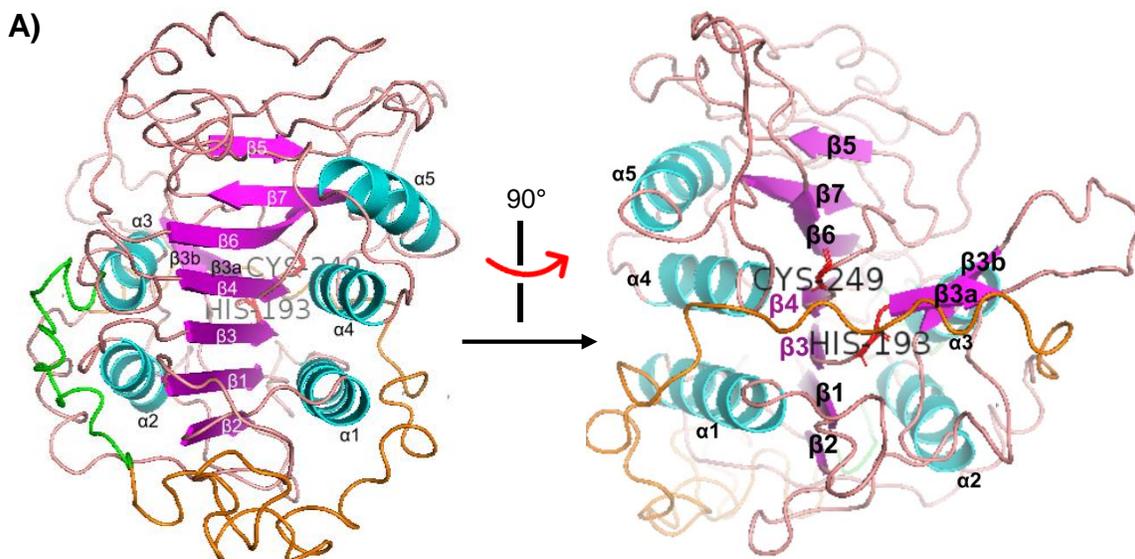
Se analizó la secuencia de aminoácidos obtenida del gen UMAG\_01408, clasificada como la única metacaspasa en *Ustilago maydis* (UmMca1), en el banco de datos de proteínas (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/protein/Q4PEQ5>). La proteína está conformada por un prodominio y el dominio caspasa que incluye las dos subunidades (p20 y p10). El dominio está conformado por dos regiones ricas en glicina y prolina, seguida de la subunidad p20, en éste se encuentran el sitio activo, donde están conservadas las histidina y cisteína (His-Cys), seguida de la subunidad p10 (Figura 5).



**Figura 5. Esquema de las regiones de UmMca1.** Rectángulo verde, región rica en glicina (Gly<sup>5</sup> al Gly<sup>78</sup>). Rectángulo naranja, región rica en prolina (Pro<sup>23</sup> al Pro<sup>80</sup>). Rectángulo amarillo, dominio conservado de caspasa denominado peptidasa C14, del Arg<sup>110</sup> al Ile<sup>394</sup>. Círculo rojo, residuos catalíticos conservados de histidina (H<sup>193</sup>) y cisteína (C<sup>249</sup>).

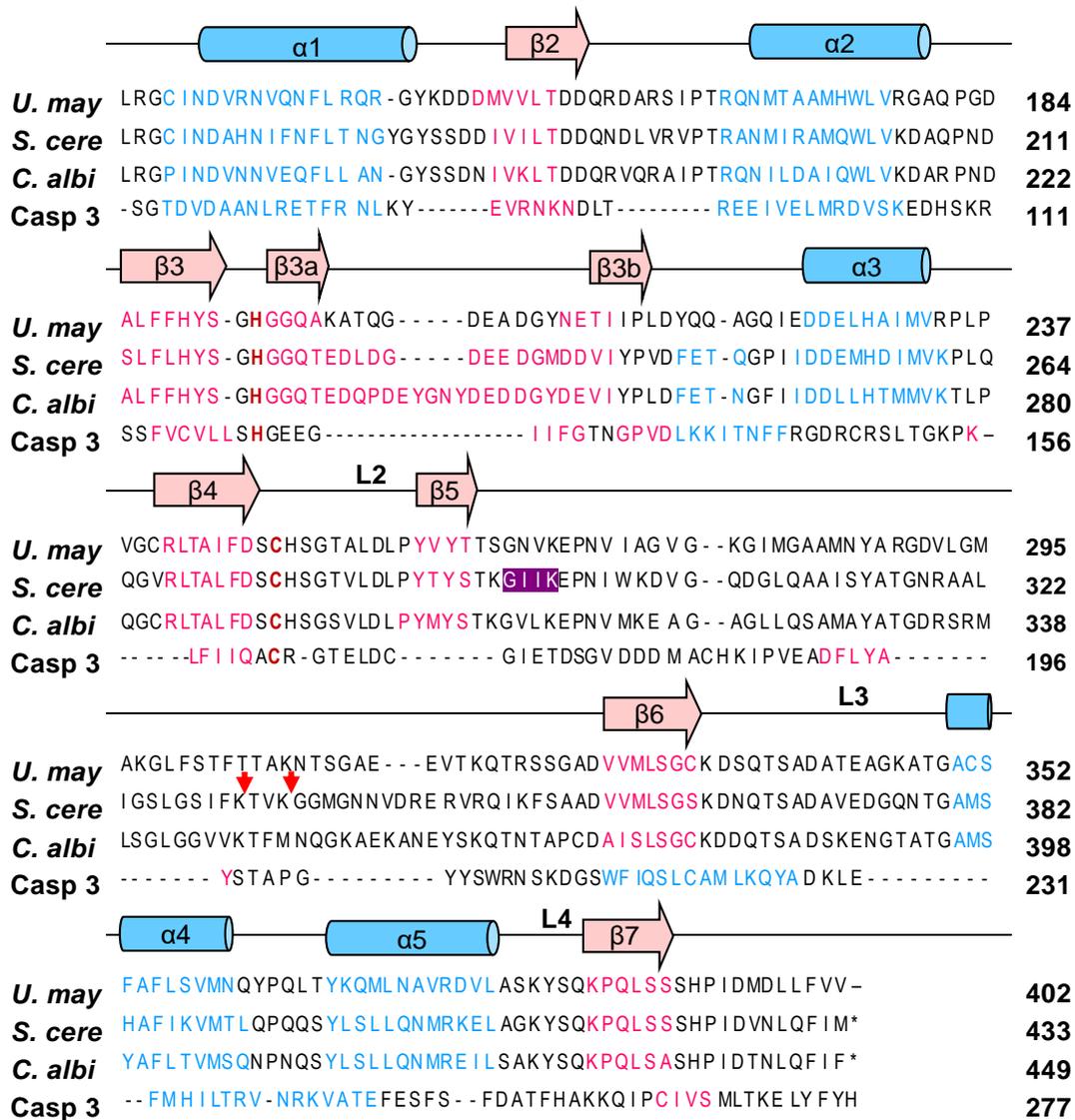
El modelaje de la proteasa UmMca1 se realizó en el servidor I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Para ello se introdujo la secuencia de aminoácidos en formato FASTA. Para el modelado de Mca1 de *U. maydis* se comparó con la estructura de otras de secuencias de metacaspasa en la base de datos de PDB, cuyo análisis indicó la homología de UmMca1 con 3 proteínas de diferentes organismos, una hidrolasa, identificada como una metacaspasa de *Trypanosoma brucei* (código PDB, 4AF8); la hidrolasa, identificada como una metacaspasa (Yca1) de *Saccharomyces cerevisiae* (código PDB, 4F6O) y una proteína no caracterizada de *Geobacter sulfurreducens* (código PDB, 3BIJ) (<https://www.rcsb.org/>). La estructura de UmMca1 comprende en el centro siete láminas- $\beta$  con tres  $\alpha$ -hélices a un lado ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 4 y  $\alpha$ 5), y en otro lado dos  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3) (Figura 6). Entre del sitio activo de UmMca1 se encuentra una horquilla  $\beta$  que tiene las láminas- $\beta$ ,  $\beta$ 3a y  $\beta$ 3b (Figura 6A), para la manipulación de la estructura se

realizó en el programa PyMol v.2.1.1 de Schrodinger. En general, la estructura de UmMca1 muestra una conformación de caspasa, especialmente por las seis láminas- $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 4,  $\beta$ 6 y  $\beta$ 7) y las cinco  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 5), representando el núcleo del plegamiento de una caspasa. Sin embargo; existen diferencias entre UmMca1, Yca1 y la caspasa de humanos (Casp 3). La diferencia primordial es que Yca1 tiene una lámina- $\beta$  extra, entre las láminas  $\beta$ 5 y la  $\beta$ 6, teniendo en total 8 láminas- $\beta$ , mientras que la Casp-3 no tiene ninguna de las anteriores láminas- $\beta$  (Figura 6B). El alineamiento de secuencias se realizó en el programa CLC Main Workbench v.8.0.1. de QIAGEN.



B)

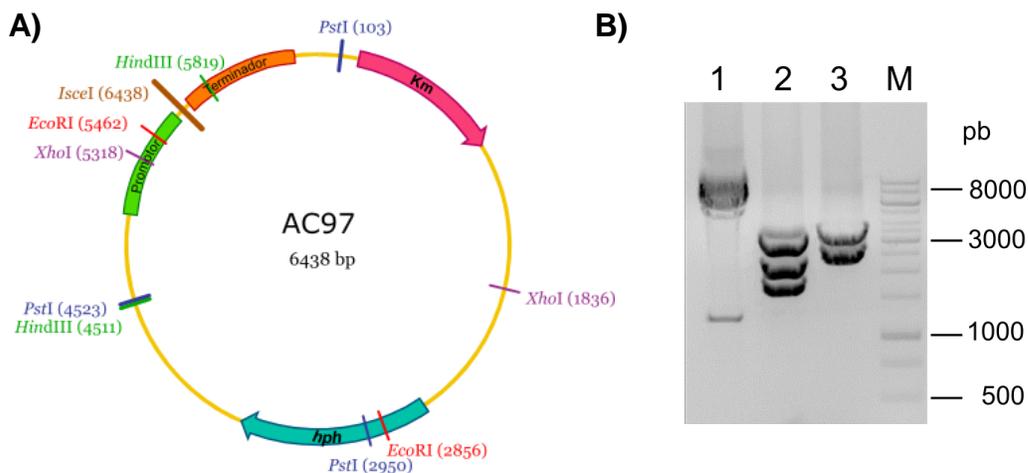
	↓	↓		
<b>U. may</b>	MAY PGQ GGHHYQ S THGGG GG -----G F PA PHG-- Y AQ -----			<b>30</b>
<b>S. cere</b>	M- YPGSGRYTYNNAGGN - NGYQRPMAPPPNQQ YGQQY GQQ YEQQ YGQQ YGQQNDQ - QFSQ			<b>57</b>
<b>C. albi</b>	M- FPGQGRHTYGGQQSNYSNQQQGYDQGYNQGYQAYGQYEQY YDRPSGPPPGQQYNR			<b>59</b>
<b>Casp 3</b>	M-----			<b>1</b>
<hr/>				
<b>U. may</b>	-----PG----- YG-----YA PPSGPPQGYQSGG-----GYAPPMQPPGGVQQMGYGFA			<b>71</b>
<b>S. cere</b>	QYAPPPGPPMA-- YNRPVYPPP-- QFQQEQAKAQLSNGYNNP - NV NAS----- NMYG			<b>105</b>
<b>C. albi</b>	PSGPPGPPPGQQYNRPSGPPPSQQGYNRPSGPPPGQYGN - QTRGSGNEQN YGNMHG			<b>118</b>
<b>Casp 3</b>	-----			<b>9</b>
<hr/>				
	↓	↓	β1	L1
<b>U. may</b>	PPSGP I GPP	EYATNHVNY NPQGGMI GNQRYEYSSMQGKRKALL I G I NY----- FGQNGE		<b>125</b>
<b>S. cere</b>	PPQNMSLPPP-----	QTQT I QGTDQPYQYSQCTGRRKAL I I G I NY----- I GSKNQ		<b>151</b>
<b>C. albi</b>	SG- HYSRPPT-----	DSQSFVENYNYQYSNCSGRKALL I G I NY----- IGTKNE		<b>163</b>
<b>Casp 3</b>	SKS I KNLEPK I IHGSEMSDSG I SLDNSYKMDYPEM-GLC I I INN	KNFHKSTGMTSR-----		<b>64</b>



**Figura 6. Estructura de UmMca1.** A) Modelado de UmMca1 en dos vistas perpendiculares. El núcleo de la estructura contiene cinco  $\alpha$ -hélice (azul) y siete laminas- $\beta$  (rosa), la cual forma un centro de láminas- $\beta$  intercalado por  $\alpha$ -hélices. Así como los bucles L1 y L4, los residuos catalíticos de His<sup>193</sup> y Cys<sup>249</sup> (rojo), y las regiones ricas en glicina (verde, Gly<sup>5</sup> y Gly<sup>78</sup>) y prolina (naranja, Pro<sup>23</sup> y Pro<sup>80</sup>). B) Alineamiento de secuencias de proteína entre metacaspasa de diferentes organismos. Se utilizaron las secuencias de: *U. maydis* (*U. may*), *S. cerevisiae* (*S. cere*), *Candida albicans* (*C. albi*) y la caspasa-3 de *Homo sapiens* (Casp 3). Las flechas rojas indican el sitio de autoproteólisis reportado en Yca1. La secuencia de fondo morado es la lámina- $\beta$  extra en *S. cerevisiae*.

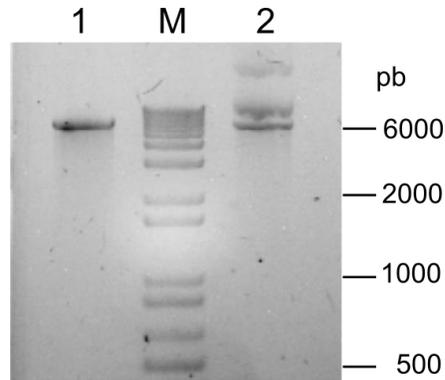
## 7. 2 Obtención del cassette para deletar el gen *UmmCA1*

El plásmido que se utilizó para la transformación de *U. maydis* fue el AC97 (Figura 7A), cuya identidad se determinó por medio de enzimas de restricción (*EcoRI*, *HindIII* y *PstI*) de forma independiente. Se comprobó que el sitio de corte correspondiera con los tamaños esperados (Figura 7B).



**Figura 7. Identidad del plásmido AC97. A)** Esquema del plásmido AC97. Se indica el gen *hph* que confiere resistencia a higromicina B, el gen de resistencia a kanamicina (Km), y la ubicación de los sitios de restricción de las enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *XhoI* y *IscI*. Y las regiones UTR, 5' (promotor) y 3' (terminador). **B)** Digestión del plásmido AC97. 1. *HindIII* presentó las bandas de 5,130 pb y 1,308 pb, 2. *PstI*, bandas de 1,573 pb, 2,185 pb y 2,847 pb, 3. *EcoRI* mostró las bandas de 3,832 pb y 2,606 pb; (M) Marcador de tamaño Molecular de 1 kpb.

Para proceder al evento de transformación genética en *U. maydis*, es necesario utilizar el plásmido AC97 en su versión lineal. El plásmido se digirió con la enzima de restricción *I-SceI*, se corrió una alícuota del producto de digestión en un gel de agarosa al 0.8% para verificar la correcta linearización, y se observó la banda esperada de 6,438 pb (Figura 8).



**Figura 8. Linearización del plásmido AC97.** 1. Digestión del plásmido con la enzima I-SceI, 2. Control sin la enzima I-SceI, M. Marcador de tamaño molecular de 1 kpb

### 7. 3 Transformación de *U. maydis*

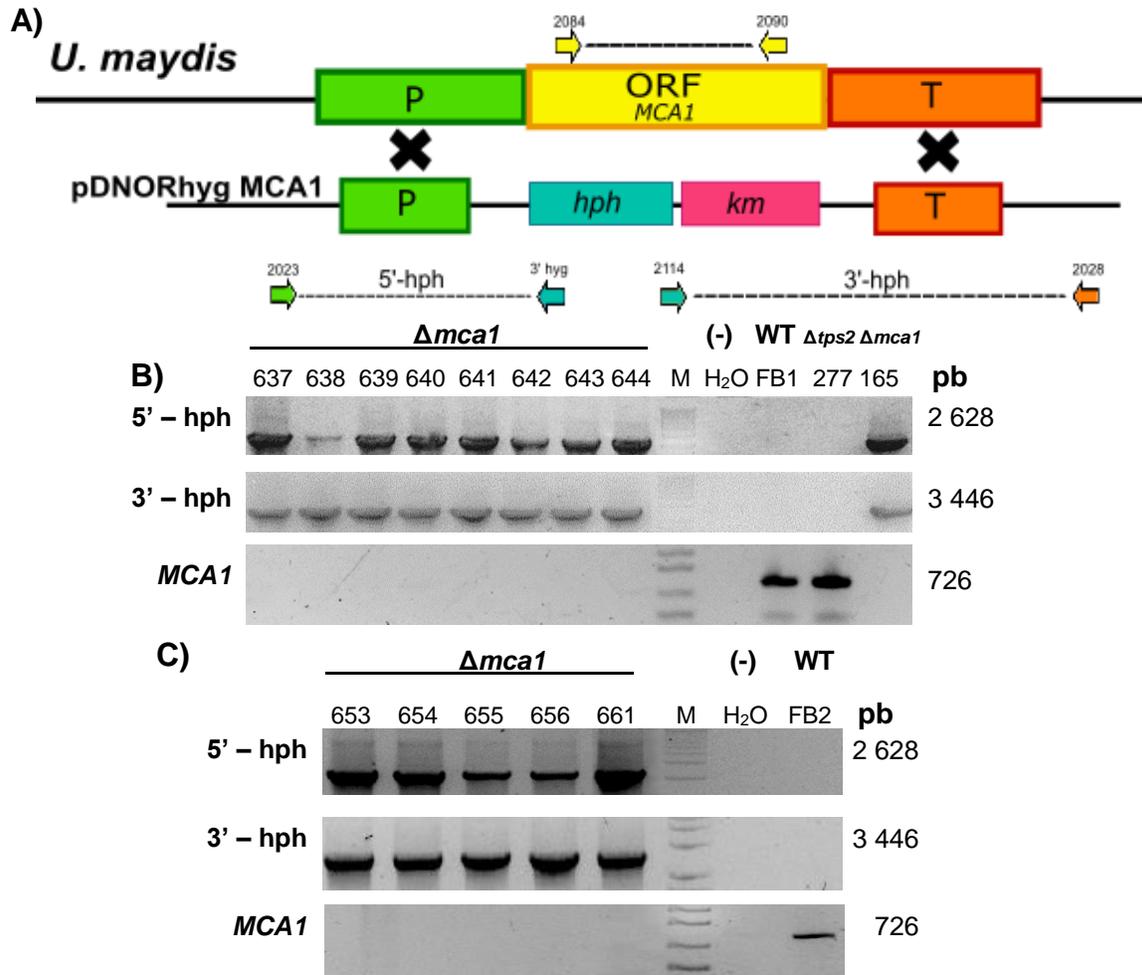
La transformación de *U. maydis* se realizó por medio de protoplastos, de las cepas silvestres FB1 y FB2, con el plásmido AC97 linearizado previamente. Este plásmido contiene la región 5' UTR (terminador) y 3' UTR (terminador), lo cual permitirá eliminar el 80% de la región codificante (Open Reading Frame, ORF, marco de lectura abierto). Las transformantes se seleccionaron de acuerdo con su resistencia a higromicina B, de las cuales se obtuvieron 10 cepas *a1b1* y 5 cepas *a2b2* (Tabla 4).

**Tabla 4. Cepas mutantes  $\Delta mca1$  obtenidas por el método Delsgate**

Fondo genético	Cepas $\Delta mca1$		Fondo genético	Cepas $\Delta mca1$
FB1	637	638	FB2	653
	639	640		654
	641	642		655
	643	644		656
	645	646		661

Las cepas mutantes, carentes del gen *MCA1*, se identificaron por PCR y RT-PCR. Para ello se usaron los oligonucleótidos ubicados en la secuencia del plásmido

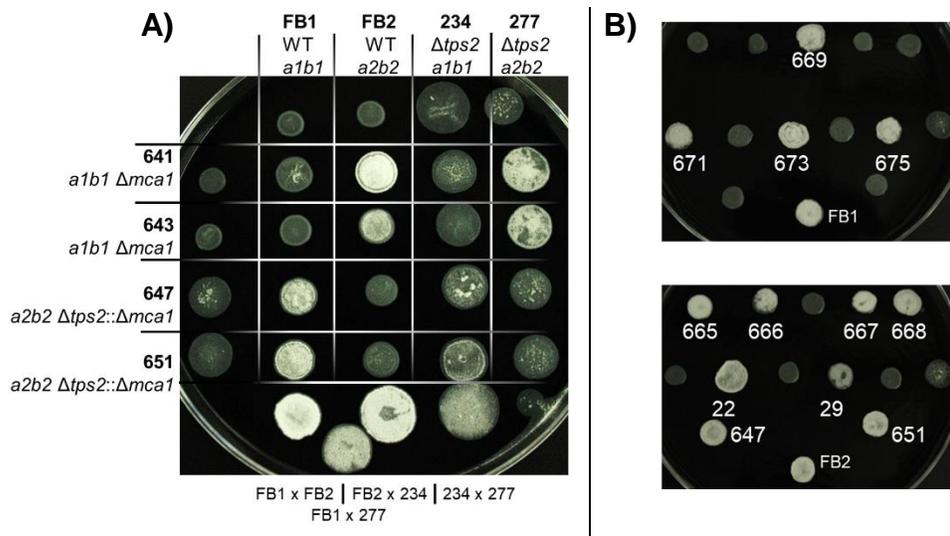
(cassette de interrupción), y los extremos de río arriba o río abajo de la región 5' UTR y 3' UTR respectivamente, así como los que amplifican un fragmento de gen de resistencia a hyg B (Figura 9). Por lo que se extrajo el ADN genómico de las transformantes para amplificar dichos fragmentos.



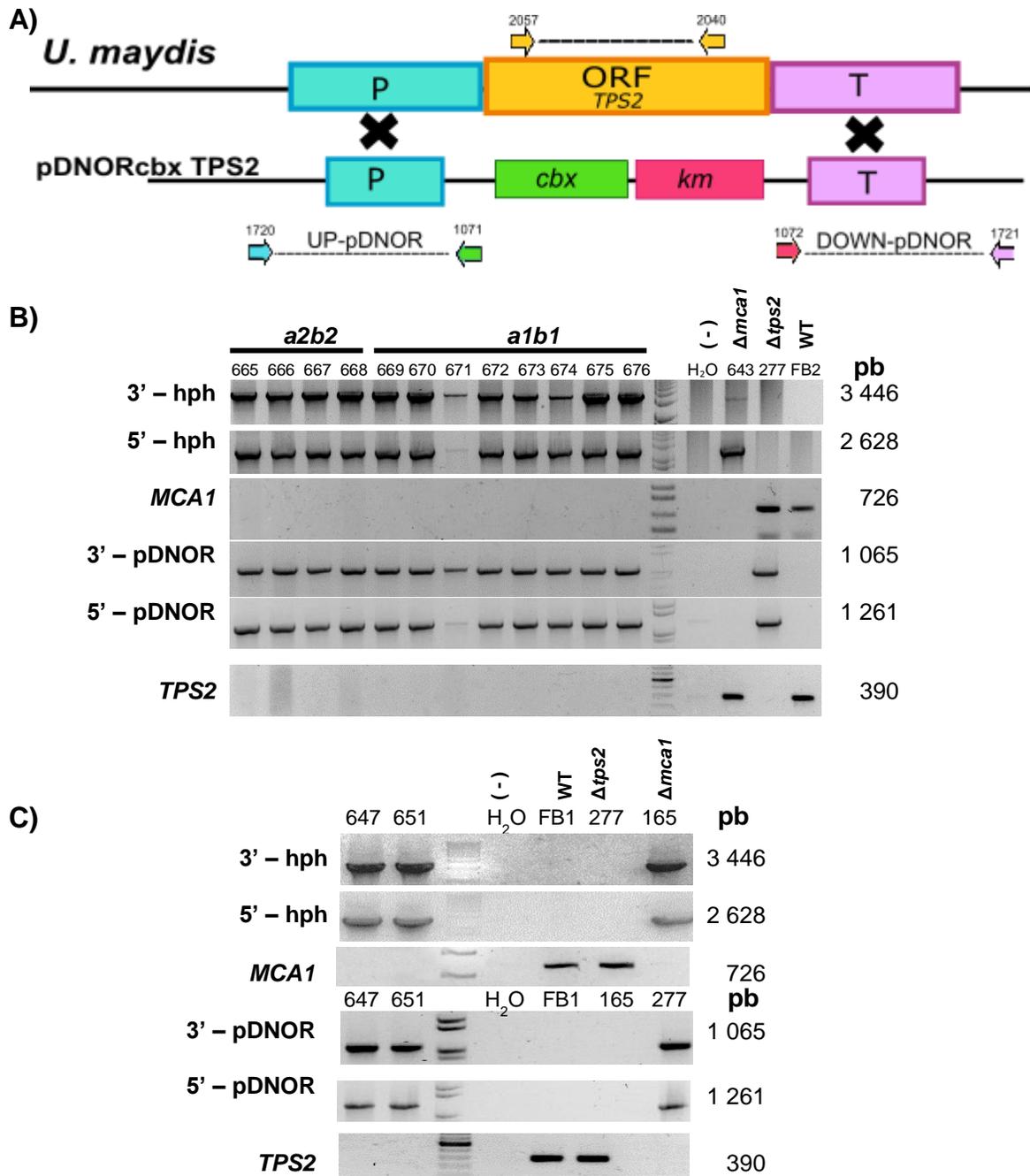
**Figura 9. Identificación de mutantes  $\Delta mca1$  por PCR. A)** Diagrama de la recombinación homóloga para la eliminación del gen *MCA1*. Se muestran los sitios de unión de los oligonucleótidos río arriba y río abajo del gen *MCA1*, así como los oligonucleótidos correspondientes al cassette. **B)** PCR de mutantes *a1b1*. **C)** PCR de mutantes *a2b2*. El gel 3' - hph es el PCR del brazo derecho del cassette de interrupción. El gel 5' - hph es el PCR del brazo izquierdo del cassette de interrupción, como muestra el inciso A. Los controles utilizados en el PCR fueron los siguientes: H<sub>2</sub>O (reacción sin ADN), FB1/FB2 (WT), 277 ( $\Delta tps2$ ) y 165 ( $\Delta mca1$ , SG200).

#### 7. 4 Obtención de las dobles mutantes $\Delta tps2::\Delta mca1$

Se obtuvieron dos cepas dobles mutantes utilizando la técnica del Delsgate con el plásmido AC97 una vez transformado el fondo genético  $\Delta tps2 a2b2$  (cepa 277), denominadas 647 y 651. Para obtener las cepas dobles mutantes del sexo  $a1b1$ , se procedió a obtener dobles mutantes por recombinación en planta. Para ello se determinó la capacidad de apareamiento entre las cepas mutantes de cada uno de los genes ( $\Delta tps2$  y  $\Delta mca1$ ), esto por reacción fuz (Figura 10A). Una vez comprobado que las cepas mutantes de cada gen se aparean correctamente, se realizó la infección de plantas de maíz con las dos cepas mutantes sexualmente compatibles, 277 ( $\Delta tps2, a2b2$ ) por 643 ( $\Delta mca1, a1b1$ ), de las cuales se recuperaron los tumores maduros un mes después de la inoculación. Del análisis de la progenie se obtuvieron ocho dobles mutantes ( $\Delta tps2::\Delta mca1$ ) en el fondo genético  $a1b1$ , y cuatro cepas  $\Delta tps2::\Delta mca1$  en el fondo genético  $a2b2$  (Tabla 5), cuyo sexo se determinó a partir del resultado del apareamiento con la cepa FB1 o FB2, de forma independiente (Figura 10B). La doble mutación  $\Delta tps2$  y  $\Delta mca1$ , se corroboró por PCR (Figura 11).



**Figura 10. Reacción fuz. A)** Apareamiento de cepas mutantes. Se usaron las cepas  $\Delta tps2$  (234 y 277),  $\Delta mca1$  (641, 643), las cepas dobles mutantes *in vitro*  $\Delta tps2::\Delta mca1$  (647, 651), y las cepas WT (FB1, FB2). **B)** Apareamiento de cepas dobles mutantes. Estas cepas se obtuvieron a partir de la germinación de teliosporas, *Arriba*. Apareamiento de cada cepa  $\Delta tps2::\Delta mca1$  con FB2. *Abajo*. Apareamiento de cada cepa  $\Delta tps2::\Delta mca1$  con FB1.



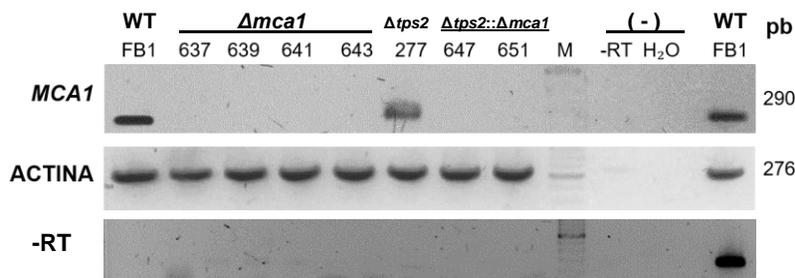
**Figura 11. Identificación de dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  por PCR. A)** Diagrama de la recombinación homóloga para la eliminación del gen *TPS2*. Se muestran los sitios de unión de los oligonucleótidos río arriba y río abajo del gen *TPS2*, así como los oligonucleótidos localizados en el plásmido. **B)** PCR de dobles mutantes obtenidas por recombinación en la planta. **C)** PCR de dobles mutantes obtenidas *in vitro* *a1b1*, 647 y 651. H<sub>2</sub>O (reacción sin ADN), FB1/FB2 (WT), 277 ( $\Delta tps2$ ), 643 ( $\Delta mca1$ ) y 165 ( $\Delta mca1$  SG200).

**Tabla 5. Cepas dobles mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  obtenidas por recombinación en planta.**

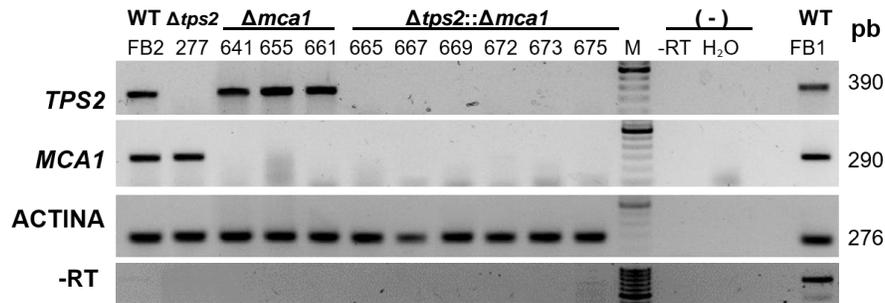
<i>a1b1</i>		<i>a2b2</i>
669	670	665
671	672	666
673	674	667
675	676	668

### 7. 5 Confirmación de la eliminación de los genes *UmTPS2* y *UmMCA1*

Para corroborar que no existe transcrito de cada uno de los genes *TPS2* y *MCA1* que se eliminaron en el genoma de *U. maydis*, se extrajo el ARN de las cepas, mutantes simples ( $\Delta mca1$ ) y de las dobles mutantes ( $\Delta tps2::\Delta mca1$ ). Se sintetizó el ADN<sub>c</sub>. Con estos experimentos se corroboró que las mutantes  $\Delta mca1$  no tienen el gen de la metacaspasa (Figura 12), de igual manera las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  no amplificaron para los genes *MCA1* y *TPS2*, respectivamente (Figura 13). En ambos experimentos se utilizó el ADN<sub>c</sub> de las cepas FB1 o FB2 (WT), 277 ( $\Delta tps2$ ) como control, y en el caso de la comprobación de las dobles mutantes se utilizó la cepa 641 ( $\Delta mca1$ ) como control. Se amplificó un fragmento del ORF del gen constitutivo de actina.



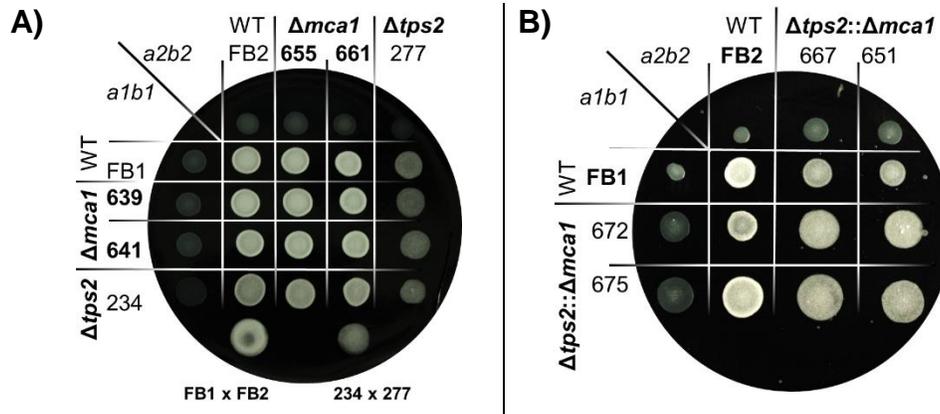
**Figura 12. Confirmación de mutantes  $\Delta mca1$  por RT-PCR.** Se amplificó el fragmento que corresponde al gen *MCA1* con los oligonucleótidos 2190 - 2090. FB1, cepa silvestre. 637, 639, 641 y 643, mutantes  $\Delta mca1$ . 277,  $\Delta tps2$ . 647 y 651, dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  *in vitro*. (M) Marcador de peso molecular, (-RT) reacción sin transcriptasa reversa, (H<sub>2</sub>O) reacción sin ADN. Actina se amplificó con los oligonucleótidos 2035 – 2036.



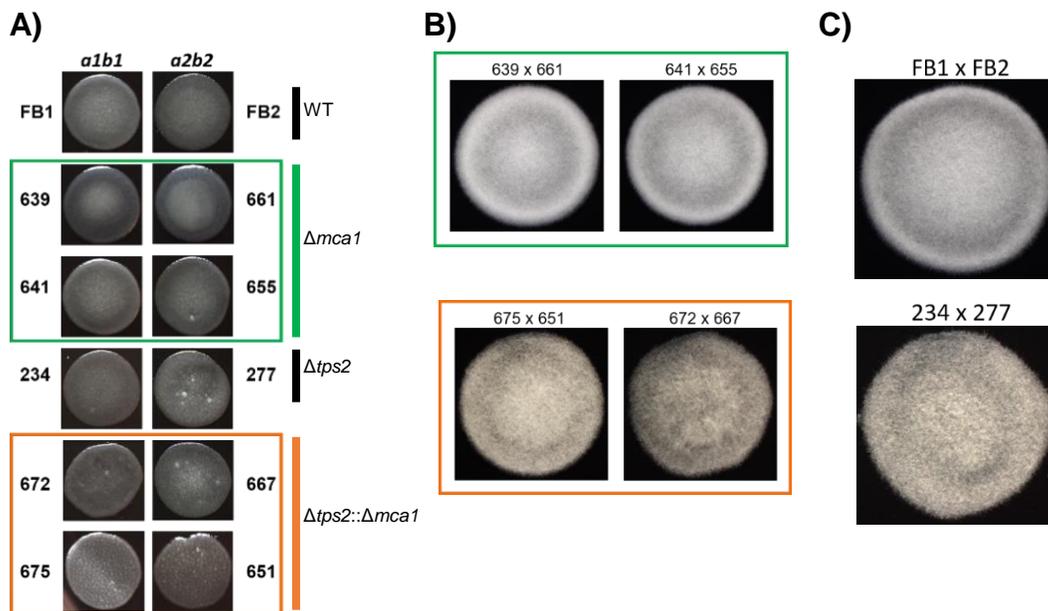
**Figura 13. Confirmación de dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  por RT-PCR.** Se utilizó el ADN<sub>c</sub> de WT (FB2), la mutante  $\Delta tps2$  (277), la mutante  $\Delta mca1$  (641, 655 y 661), y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  obtenidas *in planta* (665, 667, 669, 672, 673 y 675). (M) Marcador de peso molecular, (-RT) Muestra sin transcriptasa reversa, (H<sub>2</sub>O) reacción sin ADN y (FB1, ADN) WT.

## 7. 6 La delección de los genes *MCA1* y *TPS2* no afecta el apareamiento de *U. maydis*

Para determinar si la delección de estos genes está relacionada con el apareamiento, procedimos a corroborar la capacidad para aparearse de las mutantes  $\Delta mca1$  y de las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , previo a realizar los ensayos de infección de plantas de maíz (Figura 14). Posterior a incubar 24 h procedimos a observar cada una de las reacciones de apareamiento con el estereoscopio, para así confirmar la estructura del micelio y verificar que las cepas haploides no generen reacción fuz por sí solas, mostrando que las esporidias fueron separadas correctamente (Figura 15A). Observamos que la reacción fuz obtenida en las cruzas  $\Delta mca1$  por  $\Delta mca1$ ,  $\Delta tps2$  por  $\Delta tps2$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$  por  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , fue similar entre todas las cepas probadas, es decir, al compararlo con el apareamiento producido por la cruce de las de las cepas WT (control). Este dato nos indica que este importante evento celular en *U. maydis* no fue afectado por la delección del gen *MCA1* o la eliminación de ambos genes, *MCA1* y *TPS2* (Figura 15B), y que por lo tanto, serán capaces de iniciar el proceso infeccioso en planta.



**Figura 14. Reacción de apareamiento.** Se inocularon gotas de cada de cepa en MC con 1% de carbón activado. **A)** Reacción luz de cepas mutantes simples. WT, FB1 (*a1b1*) y FB2 (*a2b2*);  $\Delta mca1$ , 639, 641 (*a1b1*) y 655, 661 (*a2b2*);  $\Delta tps2$ , 234 (*a1b1*) y 277 (*a2b2*). **B)** Reacción luz de cepas dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$ . Cepas 651 y 667 (*a2b2*); cepas 672 y 675 (*a1b1*). FB1xFB2, control positivo. Las cajas se incubaron 24 h a 28 °C, por triplicado.



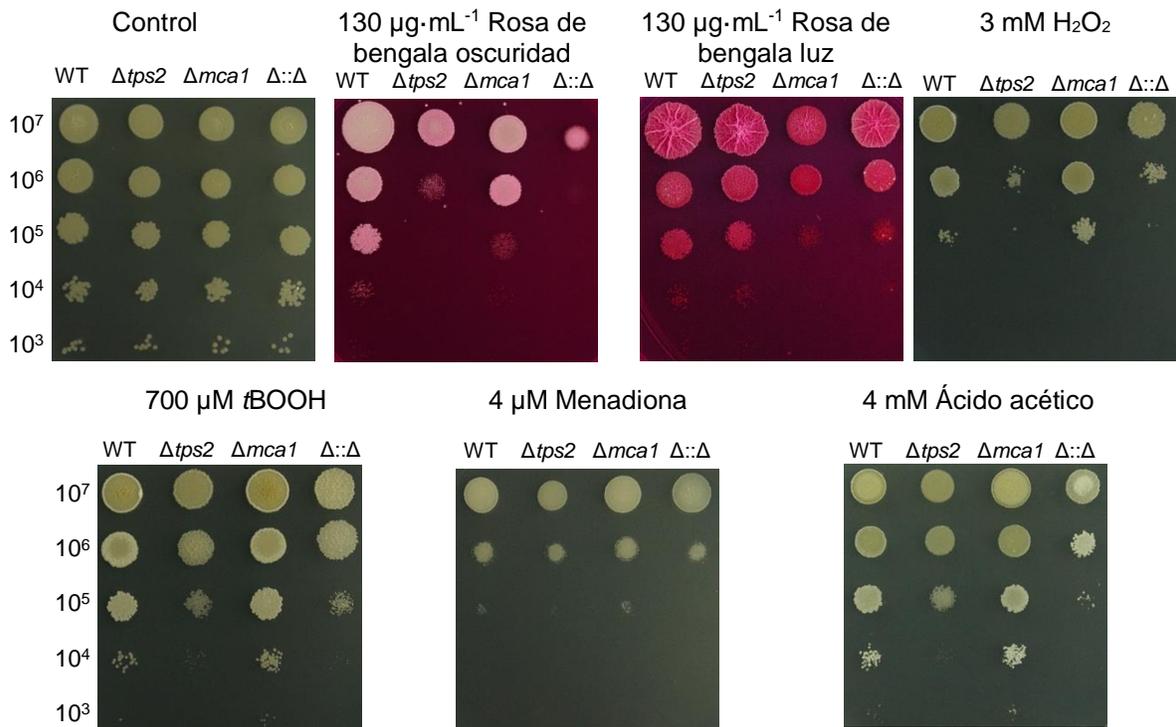
**Figura 15. Magnificación de la morfología del apareamiento.** Reacción luz en MC con 1% carbón activado. **A)** Cepas haploides. Izquierda cepas *a1b1*, derecha cepas *a2b2*. Recuadro verde, cepas mutantes  $\Delta mca1$ , recuadro naranja dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$ . **B)** Cepas mutantes  $\Delta mca1$  y dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$ . **C)** Cepas WT y  $\Delta tps2$ . WT, FB1 y FB2; 234 y 277,  $\Delta tps2$ . Imágenes tomadas con el estereoscopio Leica EZ4D, el experimento se realizó por triplicado.

## **7. 7 El fenotipo observado en la mutante $\Delta mca1$ y doble mutante $\Delta tps2::\Delta mca1$ depende del tipo de estrés**

Para determinar las funciones de la proteína Mca1, la trehalosa y la regulación de ambos genes de *U. maydis* en respuesta a condiciones de estrés, se procedió a inocular las cepas silvestre (WT),  $\Delta tps2$ ,  $\Delta mca1$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , del alelo *a1b1*, en MM pH 7 (Tris-HCl) en condiciones que producen estrés oxidativo, reductor, térmico, osmótico, luz UV, metales pesados, salino y de pared celular, a 28 °C durante 4 días.

### **7. 7. 1 La eliminación de *TPS2* afecta el crecimiento en estrés oxidativo y por ácido mientras que en $\Delta mca1$ se favorece**

Se ha reportado que las mutantes de *TPS2* y *MCA1* presentan respuestas opuestas respecto al estrés oxidativo en *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *F. graminearum*, *A. fumigatus*, entre otros (Thammahong *et al.*, 2017; Hill *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014; Tsiatsiani *et al.*, 2011). Si consideramos que *U. maydis* al entrar a la planta se encuentra con un ambiente hostil, determinamos la respuesta de las mutantes simples y dobles mutantes de este patógeno ante diferentes agentes que producen estrés oxidativo; como 130  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de rosa de bengala, 3 mM de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 700  $\mu\text{M}$  de *t*-butilhidroperóxido (*t*BOOH), 4  $\mu\text{M}$  de menadiona, y para el estrés por ácido se utilizó 4 mM de ácido acético. Ante estas condiciones observamos que la cepa mutante  $\Delta mca1$  fue resistente en presencia de rosa de bengala en oscuridad,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *t*BOOH, menadiona y ácido acético, caso contrario, no mostraron resistencia en presencia de rosa de bengala en condición de luz, puesto que ante dicha situación se apreció la disminución de crecimiento (Figura 16). Mientras que la mutante  $\Delta tps2$  y la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  mostraron un fenotipo de sensibilidad ante estos agentes, puesto que su crecimiento se vio disminuido en todas los ensayos de estrés oxidativo mencionados, ya que éstas crecieron menos que la cepa WT, demostrando así su incapacidad de resistir a este tipo de estrés. Mientras que en la condición del ácido acético la doble mutante fue más sensible al ácido que la mutante  $\Delta tps2$ , por otro lado, la mutante simple  $\Delta mca1$ , su crecimiento fue muy similar al de la cepa silvestre (Figura 16).

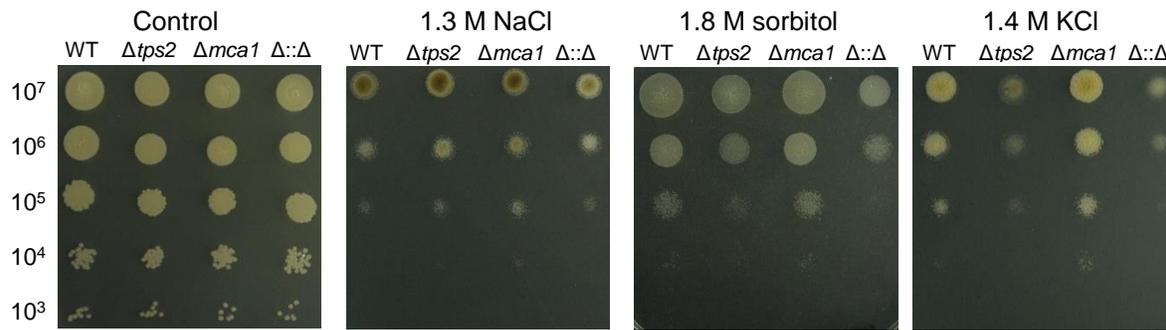


**Figura 16. Efectos del estrés oxidativo y ácido.** Las filas corresponden a diluciones seriadas y cada columna, se refiere, a las cepas inoculadas: silvestre (FB1), mutante  $\Delta tps2$  (234), mutante  $\Delta mca1$  (641) y doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  ( $\Delta::\Delta$ , 672), respectivamente. Las placas se fotografiaron después de 96 h de incubación a 28 °C. El experimento se realizó por triplicado, con dos replicas por experimento.

### 7. 7. 2 El estrés osmótico no altera el crecimiento de las mutantes $\Delta mca1$

Respecto a las condiciones de estrés osmótico, la mutante  $\Delta tps2$  y la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  fueron más sensibles a los agentes osmóticos analizados: 1.3 M de NaCl (cloruro de sodio), 1.8 M de sorbitol, y 1.4 M de KCl (cloruro de potasio), al ser comparado con la cepa WT. En el caso contrario, la mutante  $\Delta mca1$  mostró mayor resistencia a este tipo de estrés en comparación con el crecimiento observado en la cepa WT (Figura 17), mostrando así que es más resistente al estrés osmótico, el cual fue más evidente en presencia de KCl y sorbitol. Cabe mencionar que la cepa doble mutante, fue más sensible a los tres tipos de agentes estresantes, incluso que

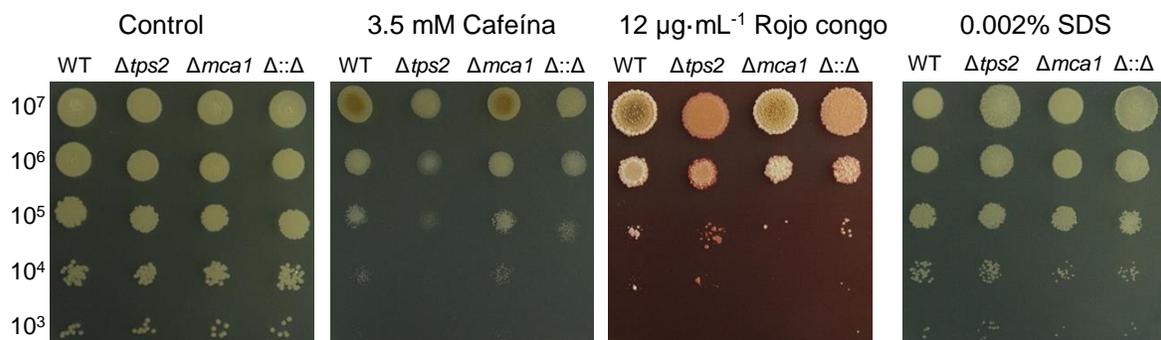
la cepa  $\Delta tps2$ , esto en sorbitol y en KCl, puesto que en NaCl, las cuatro cepas mostraron un fenotipo similar. En este caso, además se observó la presencia de un pigmento color café, el cual fue más evidente en NaCl, asimismo este pigmento casi no se observó en la cepa doble mutante, ni en la  $\Delta tps2$  en sorbitol y KCl.



**Figura 17. Respuesta al estrés osmótico.** Las filas corresponden a diluciones seriales y cada columna a las cepas inoculadas: silvestre (FB1), mutante  $\Delta tps2$  (234), mutante  $\Delta mca1$  (641) y doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  ( $\Delta::\Delta$ , 672). Las placas se fotografiaron después de 96 h de incubación a 28 °C. El experimento se realizó por triplicado, con dos replicas por experimento.

### 7. 7. 3 El estrés de pared celular afecta de manera diferencial a las mutantes $\Delta mca1$ y $\Delta tps2$

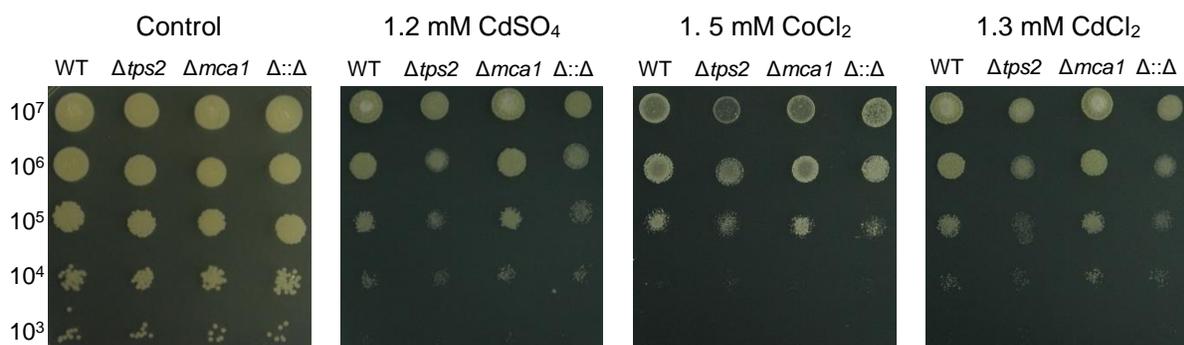
Para estudiar el efecto de la mutación con relación a agentes que perturban la pared celular de las mutantes simples y dobles, se usaron diferentes agentes estresantes de pared celular como: rojo congo, cafeína, y dodecilsulfato sódico (SDS). De manera interesante, en este caso, encontramos que la mutante  $\Delta mca1$  presentó mayor sensibilidad a  $12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  rojo congo y a 0.002% de SDS, en comparación con la mutante  $\Delta tps2$ , y la cepa control. Respecto a la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , observamos que su fenotipo fue similar al de la mutante simple  $\Delta mca1$  en presencia de SDS. Un dato interesante fue el hecho de que, observamos una respuesta diferencial de la mutante  $\Delta mca1$  a la cafeína, pero no con respecto a la cepa WT, puesto que en este caso en particular fue más resistente que las cepa  $\Delta tps2$  y la doble mutante en la presencia de 3.5 M de este compuesto (Figura 18).



**Figura 18. Respuesta a agentes que perturban la pared celular.** Silvestre (FB1), mutante  $\Delta tps2$  (234), mutante  $\Delta mca1$  (641) y doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  ( $\Delta::\Delta$ , 672), respectivamente. Las placas se fotografiaron después de 96 h de incubación a 28 °C. El experimento se realizó por triplicado, con dos replicas por experimento.

#### 7. 7. 4 Los metales pesados disminuyen el crecimiento de $\Delta tps2$ y $\Delta tps2::\Delta mca1$

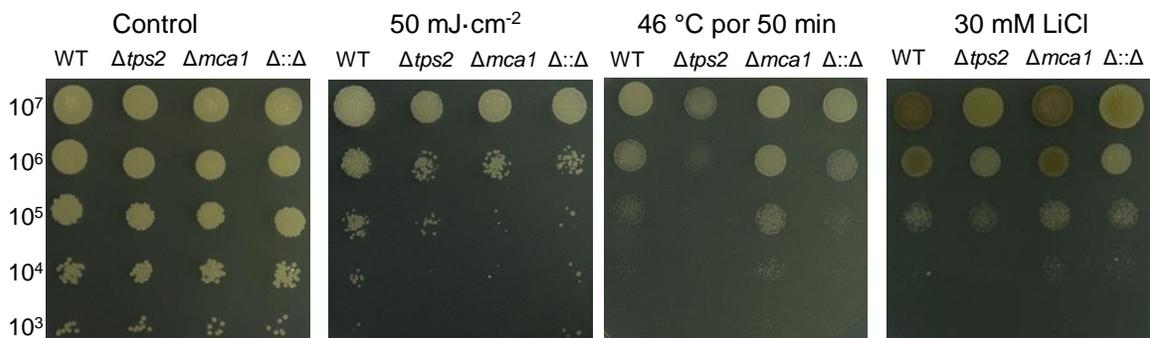
Expusimos a las cepas de *U. maydis* a la presencia de metales pesados, cuyo mecanismo de acción es producir estrés oxidativo. En este caso solo la mutante  $\Delta tps2$  y la doble mutante mostraron vulnerabilidad ante la presencia de éstos, tales como 1.2 mM  $\text{CdSO}_4$ , 1.5 mM  $\text{CoCl}_2$ , y 1.3 mM  $\text{CdCl}_2$ , siendo el efecto más notorio en respuesta  $\text{CoCl}_2$  (Figura 19). Mientras que la mutante  $\Delta mca1$  mostró el mismo fenotipo de la cepa WT, las cuales crecieron menos que la condición control (sin metales pesados) pero notablemente mejor que las cepas carentes del gen *TPS2* (Figura 19).



**Figura 19. Respuesta a metales pesados.** Las cepas inoculadas en todas las cajas son: silvestre (FB1), mutante  $\Delta tps2$  (234), mutante  $\Delta mca1$  (641) y doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  ( $\Delta::\Delta$ , 672), respectivamente. Las placas se fotografiaron después de 96 h de incubación a 28 °C. El experimento se realizó por triplicado, con dos replicas por experimento.

### 7. 7. 5 Respuesta a otros tipos de estrés

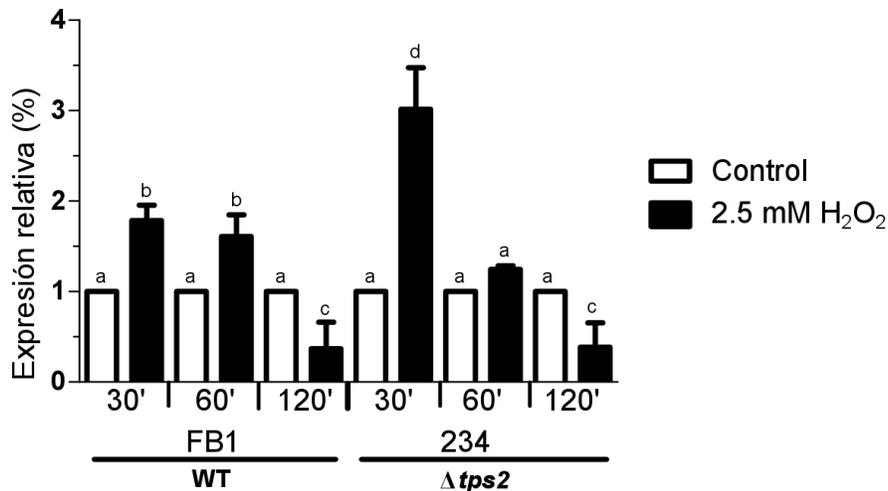
Analizamos la respuesta de las cepas mutantes ante otras condiciones de estrés, como fueron: el choque térmico, ya que se ha reportado que en *S. cerevisiae* existe una mayor síntesis de trehalosa y también existe una mayor actividad de Yca1 ante esta condición de estrés (Thammahong *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2010). Ante esta condición nuestros datos indican que la mutante  $\Delta mca1$  no fue afectada después de experimentar una incubación de 50 minutos a 46 °C, mientras que el resto de las cepas fueron más sensibles, destacando de manera particular la respuesta muy sensible mostrada por la mutante  $\Delta tps2$ , mientras que la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  creció de manera muy similar a la cepa WT, sugiriendo un fenotipo intermedio entre la mutante  $\Delta tps2$  y la  $\Delta mca1$ . En cuanto al daño de radiación por luz UV (50 mJ·cm<sup>-2</sup>), en todas las cepas carentes por lo menos de alguno de los genes *TPS2* o *MCA1* tuvieron un crecimiento menor que la cepa WT, cabe señalar que ante esta condición, la mutante  $\Delta mca1$  fue la más sensible puesto que tuvo menor crecimiento respecto a las demás cepas. Por otro lado, también estudiamos la respuesta al estrés salino impuesto con 30 mM de cloruro de litio (LiCl), observamos que la mutante  $\Delta mca1$  mostró un mejor crecimiento en comparación con las demás cepas, las cuales se comportaron de manera similar, asimismo ante esta condición se observó la producción de un pigmento color verde-café; el cual está presente en menor cantidad en la mutante  $\Delta tps2$  y en la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  (Figura 20).



**Figura 20. Otras condiciones que alteran el crecimiento en *U. maydis*.** Las cepas inoculadas en todas las cajas son: silvestre (FB1), mutante  $\Delta tps2$  (234), mutante  $\Delta mca1$  (641) y doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  ( $\Delta::\Delta$ , 672), respectivamente. Las placas se fotografiaron después de 96 h de incubación a 28 °C. El experimento se realizó por triplicado, con dos replicas por experimento

## **7. 8 En ausencia de trehalosa se indujo la expresión del gen *UmMCA1* en respuesta a estrés oxidativo**

Durante el análisis fenotípico en la mutante  $\Delta tps2$ , observamos que ésta mostró sensibilidad a todos los tipos de estrés estudiados, es decir es muy sensible. Este fenotipo puede estar relacionado con la importancia de la trehalosa no sólo como un disacárido protector, sino además como un regulador de la expresión génica (Song *et al.*, 2014). Por lo tanto, es posible que el crecimiento de la mutante  $\Delta tps2$  está comprometido debido a una desregulación en la expresión de otros genes involucrados de manera normal en crecimiento o respuesta a estrés. Asimismo, considerando que las mutantes  $\Delta mca1$ , que son resistentes a la mayoría de los estreses analizados, hipotetizamos, que uno de estos genes que podría estar relacionado con este fenotipo. Por esta razón se analizó la expresión del gen *MCA1* en el fondo genético mutante  $\Delta tps2$  sometida a condiciones de estrés oxidativo con 2.5 mM de  $H_2O_2$ . Observamos que el nivel de transcripción del gen *MCA1* en el fondo genético  $\Delta tps2$  fue mayor en comparación con lo observado en la cepa silvestre, esto a los 30 minutos de exposición con  $H_2O_2$ , mientras que los niveles del transcrito de *MCA1*, durante estrés oxidativo, en la cepa WT fueron similares a los 30 minutos y 60 minutos, decayendo posteriormente la expresión de *MCA1* a los 120 minutos. Sin embargo, como podemos observar en la figura 21, en ambos casos, las cepas WT y  $\Delta tps2$ , tienen una mayor cantidad de transcrito de *UmMCA1* durante el estrés oxidativo (2.5 mM de  $H_2O_2$ ) que en la condición control. Por lo tanto, la cantidad del transcrito de *UmMCA1* es inversamente proporcional al tiempo de exposición al  $H_2O_2$ . En consecuencia, a los 120 minutos de exposición con  $H_2O_2$ , la cepa  $\Delta tps2$  llega a tener la misma cantidad de transcrito de *UmMCA1* que la cepa WT en las mismas condiciones (Figura 21). En este caso, sería necesario medir la actividad de metacaspasa, para determinar su comportamiento en el tiempo.

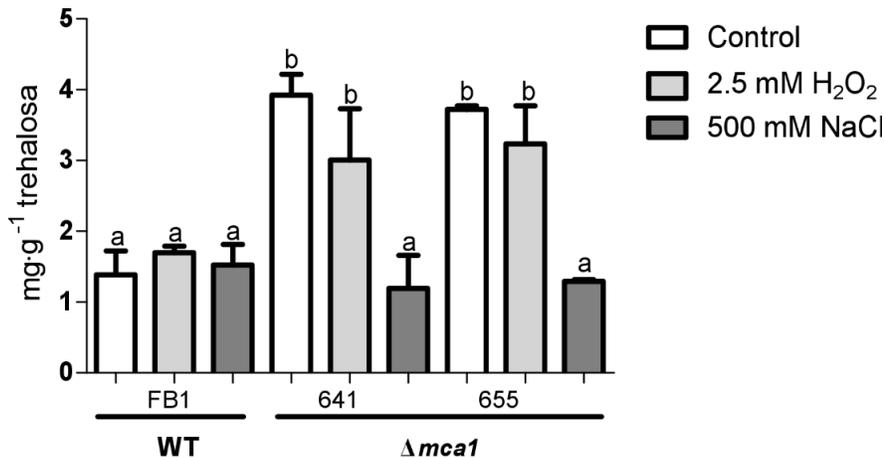


**Figura 21. Análisis densitométrico de la expresión del gen *UmmCA1*.** Cuantificación de la expresión de *UmmCA1* en la mutante  $\Delta tps2$  y la WT, con y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mM) durante 30, 60 y 120 minutos. Imagen analizada por densitometría en el programa *Image J* y los datos se normalizaron con el gen de actina. El experimento se realizó por triplicado, F=38.58; DF=35; p<0.0001.

### 7. 9 La trehalosa es un disacárido protector en *U. maydis*

Se ha reportado que la síntesis de trehalosa en varios organismos se incrementa en respuesta a las condiciones estresantes del entorno (Avonce *et al.*, 2006). Observamos que las mutantes  $\Delta tps2$  que no la producen, son sensibles a las diferentes condiciones de estrés, en contraparte; las mutantes  $\Delta mca1$  son más resistentes, por lo cual planteamos la posibilidad de que estas cepas sintetizen mayor cantidad de trehalosa, por esta razón se cuantificó la concentración intracelular de esta molécula en células sometidas a estrés oxidativo (2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y osmótico (NaCl 500 mM) durante 3 horas de manera independiente. Nuestros datos indican que las mutantes  $\Delta mca1$  sintetizaron mayor cantidad del disacárido en la condición control en comparación a la cepa WT. Cuando las células fueron expuestas con el agente oxidante, se detectó que las mutantes  $\Delta mca1$  acumulan el doble de la concentración de trehalosa respecto a la cepa WT sometida a este

estrés (Figura 22). En contraste, las células  $\Delta mca1$  sujetas a estrés osmótico no mostraron diferencias significativas en la concentración del disacárido en relación con la cepa WT. Este resultado podría sugerir una respuesta diferencial respecto al tipo de estrés o mecanismo de respuesta utilizado por la célula para sobrevivir (Figura 22).

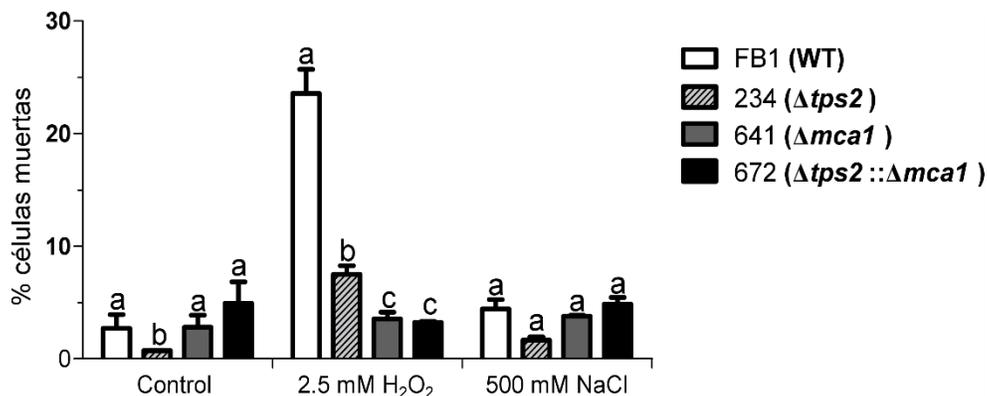


**Figura 22. Cuantificación intracelular de trehalosa por HPLC.** La trehalosa se extrajo de las cepas sometidas a condiciones de estrés oxidativo (2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), osmótico (500 mM NaCl) y sin estrés (condición control). La concentración de trehalosa se determinó utilizando como estándar trehalosa pura, y se expresó en mg de trehalosa por gramo de peso fresco de células. FB1 (WT), 641 y 655 cepas mutantes  $\Delta mca1$ . El experimento se realizó por triplicado, F=25.51; DF=26; p<0.0001.

## 7. 10 La metacaspasa no incrementa la muerte celular en $\Delta tps2$

La apoptosis es un estado celular que se caracteriza por la activación masiva de la proteína llamada caspasa, cuyo homólogo en hongos es la metacaspasa, que provocan la permeabilización de las membranas por lo que el núcleo queda expuesto para la fragmentación del ADN y la dispersión de este último por el citosol. Para determinar la muerte celular, se tiñeron las células con el colorante fluorogénico yoduro de propidio, este reactivo penetra las membranas celulares por las ulceraciones y se intercala estequiométricamente entre las bases nitrogenadas de la cadena doble del ADN, tiñendo así a la célula. Para ello, tratamos las células de *U. maydis* correspondientes a las cepas mutantes  $\Delta mca1$ , la  $\Delta tps2$  y la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  en condiciones control (sin estrés), en estrés oxidativo (2.5

mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y estrés osmótico (500 mM NaCl), durante tres horas, para posteriormente realizar la tinción con este colorante. Al observar las células al microscopio encontramos que la cepa WT es sensible al estrés oxidativo en comparación con las cepas  $\Delta mca1$  y la  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , al tener un mayor porcentaje (23%) de células muertas (Figura 23). Sin embargo, de manera interesante encontramos que la cepa mutante  $\Delta tps2$  presenta el doble de células muertas en comparación con su condición control y que la mutante  $\Delta mca1$  y la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$ . Respecto a la condición de estrés osmótico, observamos que no hubo diferencia significativa entre los tres fondos genéticos, lo que sugiere un tipo de muerte distinta, ya sea por regulada por otras rutas, aun así, se observó que la mutante  $\Delta tps2$  presentó menor cantidad de células muertas que las otras cepas, por lo que la trehalosa no es una molécula protectora cuando las células se exponen a estrés osmótico (Figura 23).

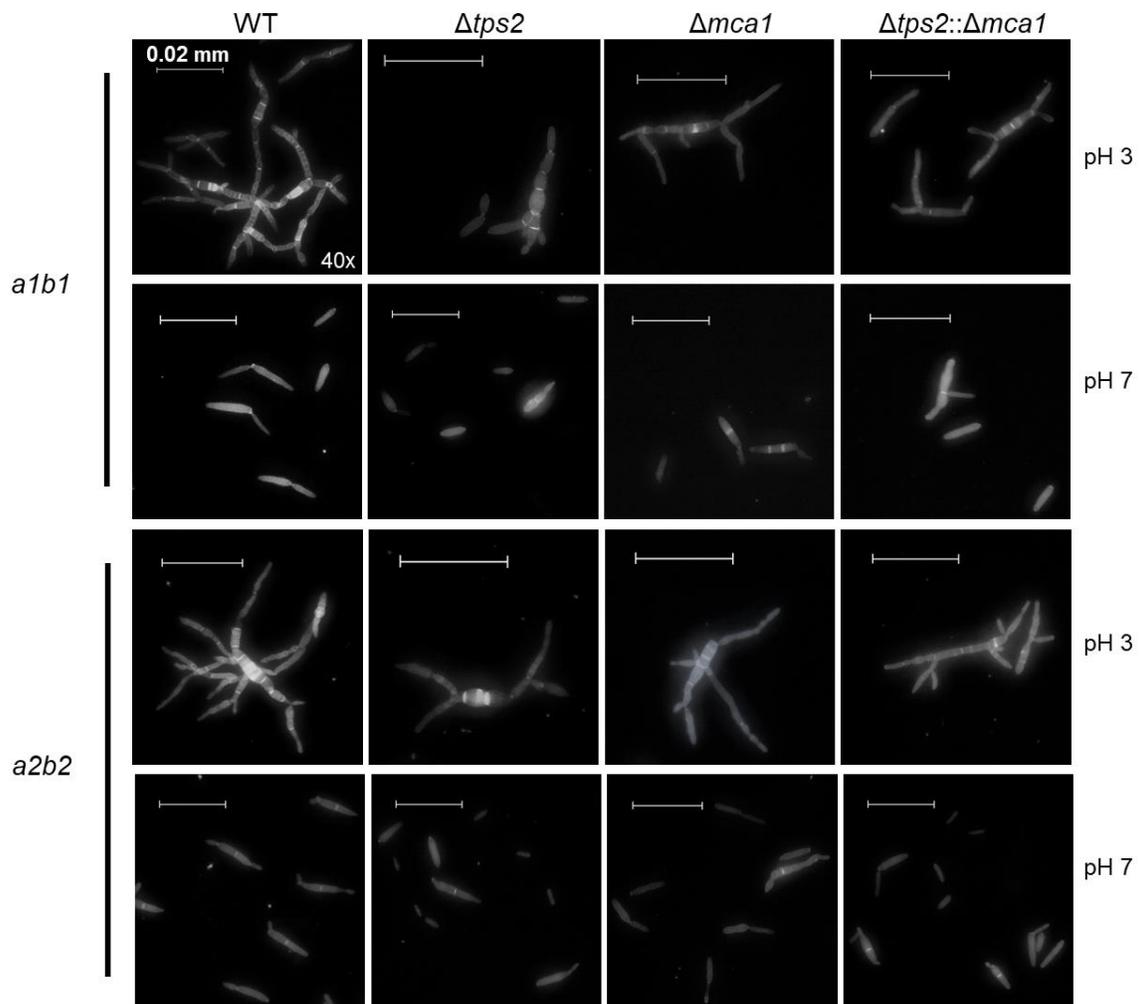


**Figura 23. Muerte celular.** Se muestra la cuantificación de las células muertas obtenidas posterior a 3 horas de exposición al agente oxidante (2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), estrés osmótico (500 mM NaCl) y sin estrés (condición control). Las células tenidas se observaron el microscopio compuesto triocular EPI-fluorescente Mod. M834FLR AMSCOPE® por triplicado, F=29.71; DF=24; p<0.0001.

## 7. 11 La transición dimórfica de *U. maydis* se ve afectada por la delección de *TPS2* y *MCA1*

Como se mencionó anteriormente, *U. maydis* es un hongo dimórfico, proceso indispensable para poder infectar al maíz, que pasa de una forma de levadura (estado haploide, no infectivo) a una forma de micelio (infectiva-dicariótica). En condiciones de laboratorio este cambio se puede estudiar creciendo a *U. maydis* en

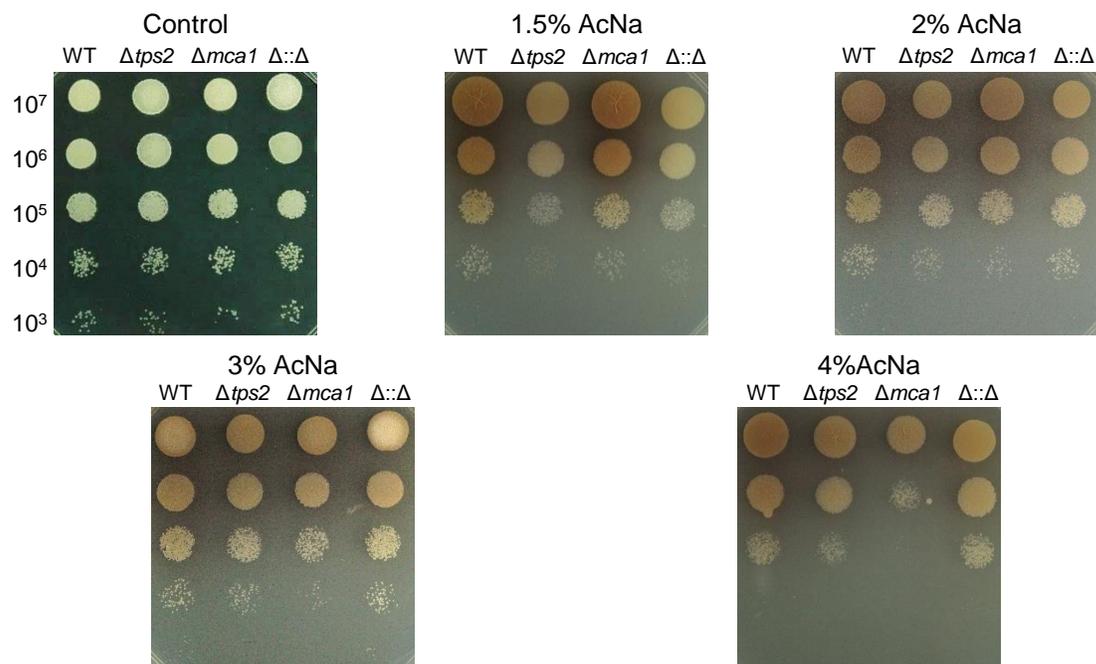
medio mínimo (MM) pH 7, condición en la que se obtiene la forma de levadura y en MM pH 3 para formar las hifas. Las cepas  $\Delta mca1$ ,  $\Delta tps2$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$  crecieron adecuadamente en la forma de levadura en MM pH 7, en comparación con la cepa silvestre. Por otro lado, cuando se observaron las células crecidas en MM pH 3, las mutantes  $\Delta tps2$  de ambos sexos (*a1b1* y *a2b2*) desarrollaron hifas gruesas y no elongadas (ovaladas), respecto a las mutantes  $\Delta mca1$  estas crecieron con una morfología similar a la silvestre. De manera interesante, las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  formaron hifas con una estructura normal, aunque se apreció menor número de ramificaciones que la cepa WT. Un aspecto importante es la formación de septos a lo largo de la hifa. A este respecto, las cepas  $\Delta mca1$ ,  $\Delta tps2$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$  mostraron una menor cantidad de septos respecto a la cepa WT de ambos sexos (Figura 24).



**Figura 24. Dimorfismo en *U. maydis*.** Las cepas incubadas 24 h en MM7 y MM3 respectivamente. Las células teñidas con calcoflúor white fotografiadas con el microscopio compuesto triocular EPI-fluorescente Mod. M834FLR AMSCOPE®. (WT) FB1 y FB2, ( $\Delta tps2$ ) 234 y 277, ( $\Delta mca1$ ) 641 y 655, ( $\Delta tps2::\Delta mca1$ ) 672 y 667. Escala igual a 20  $\mu$ M, en el objetivo 40x. El experimento se realizó por triplicado.

## 7. 12 La función de la trehalosa y la metacaspasa durante el daño a la mitocondrial es diferencial

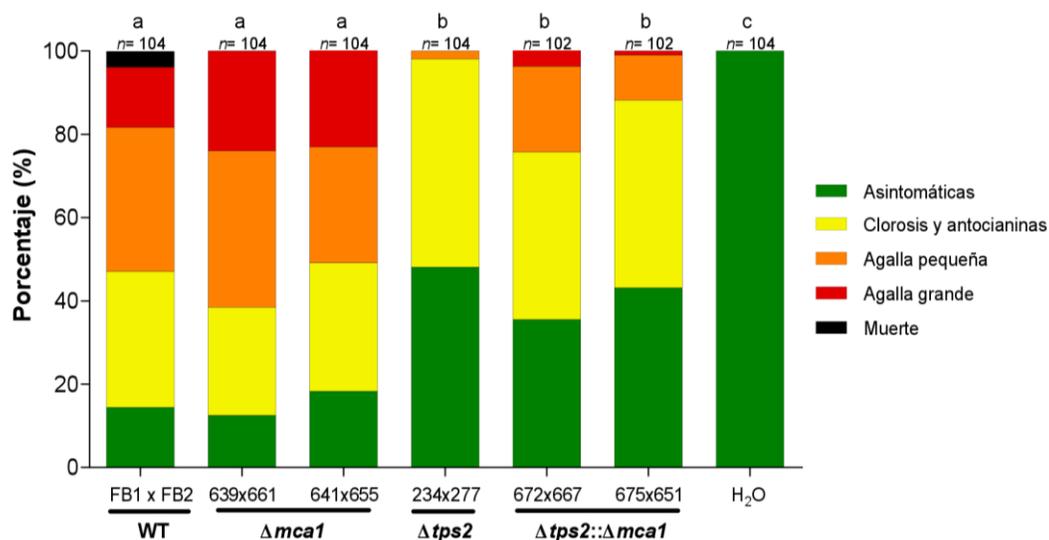
Está documentado que el acetato es un reactivo que daña las funciones de la mitocondria e incrementa el estrés oxidativo generando la PCD. Por esta razón las mutantes simples y dobles mutantes se crecieron en placa con diferentes cantidades de acetato de sodio (AcNa) de 1.5%, 2%, 3% y 4% ( $m \cdot v^{-1}$ ) y se comparó el comportamiento con la cepa silvestre. Observamos que la  $\Delta mca1$  se comporta diferente a cada condición probada, ya que a 1.5% crece similar a la cepa WT, mejor que  $\Delta tps2$  y que  $\Delta tps2::\Delta mca1$ . Mientras que en la condición del 2%, las mutantes  $\Delta mca1$  y  $\Delta tps2$  crecen igual, aunque menos que la WT y la cepa  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , estas dos últimas cepas mostraron el mismo comportamiento en las condiciones posteriores (3% y 4%), mientras que  $\Delta mca1$  al 3% y 4% tiene menor crecimiento que la cepa  $\Delta tps2$ , este dato sugiere un umbral en el crecimiento de  $\Delta mca1$  en acetato de sodio (Figura 25). En particular, en esta condición, se observó mayor cantidad de pigmento, color café, el cual varió entre las diferentes cepas.



**Figura 25. Crecimiento de *U. maydis* en acetato de sodio.** Las cepas inoculadas en todas las cajas son: silvestre (FB1), mutante  $\Delta tps2$  (234), mutante  $\Delta mca1$  (641) y doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  ( $\Delta::\Delta$ , 672). Las placas se fotografiaron después de 96 h de incubación a 28 °C. El experimento se realizó por duplicado, con dos replicas por experimento.

## 7. 1. *U. maydis* en maíz de la variedad cacahuazintle para determinar si afecta la virulencia que la ausencia de *Mca1*

Las plantas del maíz de la variedad cacahuazintle se infectaron con las cruces de las mutantes  $\Delta mca1$  (639x661; 641x655), las mutantes  $\Delta tps2$  (234x277), las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  (672x667; 675x651) y como control positivo las cepas WT (FB1xFB2). Se utilizaron 100 plantas por cada una de las combinaciones mencionadas, como control negativo se inyectó agua destilada estéril. Los signos presentados por las plantas se analizaron a los 14 días posteriores a la infección (Chavan & Smith, 2014). Como se muestra en la Figura 26, las cepas mutantes  $\Delta mca1$  tiene la misma relación de signos respecto a las cepas WT, estos datos indican que la eliminación del gen *MCA1* no afecta la patogenicidad de *U. maydis*. Sin embargo, la eliminación de gen *TPS2* ( $\Delta tps2$ ) disminuyó la virulencia en las plantas, de acuerdo con lo reportado por (Cervantes-Chávez *et al.*, 2016), aunque las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  son estadísticamente similares al fenotipo de virulencia de la cepa  $\Delta tps2$ , estas tuvieron la capacidad de generar más agallas pequeñas y pocas agallas grandes, pero no es comparable con lo observado en las cepas  $\Delta mca1$  o la cruce WT.



**Figura 26. Cuantificación de los signos producidos por las cepas mutantes y dobles mutantes de *U. maydis*.** Las cepas utilizadas fueron: (WT) FB1xFB2, ( $\Delta tps2$ ) 234x277, ( $\Delta mca1$ ) 639x661 y 641x655, ( $\Delta tps2::\Delta mca1$ ) 672x667 y 675x651 y H<sub>2</sub>O, (n) número de plantas infectadas. Las plantas se infectaron a los 7 días de haberlas sembrado. Los signos se analizaron a los 14 días después de la inoculación. Los datos se analizaron por



## VIII. DISCUSIÓN

### 8. 1 Modelado de la metacaspasa de *U. maydis*

La metacaspasa de *Ustilago maydis* (UmMca1; UMAG\_01408) es la única metacaspasa presente en este hongo para el análisis *in silico*. En contraste con lo reportado en *Podospora anserina* y *Aspergillus fumigatus*, en los que se caracterizaron dos genes con identidad de caspasa, *PaMCA1* y *PaMCA2*, CasA y CasB, respectivamente (Richie *et al.*, 2007; Hamann *et al.*, 2007). La UmMca1 está clasificada como tipo I, por su prodominio en el extremo N-terminal, que comparte con *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, ambos prodominios son distintos, ya que el de *U. maydis* tiene una región rica en glicina y prolina (poli G/P, Gly y Pro) como lo muestra la Figura 5; mientras que en *S. cerevisiae*, este está conformado por una región rica en prolina y un prodominio poli Q/N (Gln y Asn), el cual es importante para la eliminación de agregados insolubles de proteína (AIP) y tiene una función priónica (Erhardt *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010). Se sabe que las proteínas interaccionan con otras proteínas y para ello necesitan secuencias que favorezcan dicha unión o establezcan ciertos espacios rígidos para la interacción de los dominios de las proteínas, es por ello que la región rica en Gly/Pro sirve como un enlazador de proteínas, ya que la región rica en Pro forma una estructura relativamente rígida para favorecer la unión entre dominios, que sirve como un “brazo adhesivo”, mientras que la región rica en glicina es flexible para la unión con los dominios de otras proteínas sin alterar las funciones de cada dominio (Reddy *et al.*, 2013). Lo que sugiere que la región poli G/P en *U. maydis* facilita la interacción proteína-proteína y funciona como una estructura regulatoria de la metacaspasa con su sustrato.

La estructura 3D de UmMca1 mostró mayor similitud con tres estructuras de metacaspasas reportadas en la base de datos PDB, entre las cuales se encuentra la metacaspasa (Yca1) de *S. cerevisiae*, con una similitud del 75%. Entre las proteínas utilizadas para realizar el alineamiento de la figura 6 se usaron las secuencias de *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, y la caspasa 3 de *Homo sapiens*, se pudo observar que la cantidad de láminas- $\beta$  es diferente entre Yca1 (8), Mca1 (7) y Casp-3 (6), y en el caso de *C. albicans* puede tener 8 láminas- $\beta$  como en el caso de

Yca1, por la homología de la secuencia que existe en la lámina- $\beta$  extra que contienen respecto a Mca1 de *U. maydis*; todas tienen su sitio activo conservado puesto que están presentes la His y Cys. Conforme se ha visto la proteína Yca1, tiene una subunidad pequeña (p10) y una subunidad grande (p20), la cuales comprenden los residuos 1-331 y 335-432, respectivamente; cuyo procesamiento autocatalítico remueve p10, que se encuentra entre Lys<sup>331</sup> y Lys<sup>334</sup>, formando la secuencia K<sup>331</sup>TVK<sup>334</sup>G (Wong *et al.*, 2012). De manera que, esta pequeña secuencia está conservada en *U. maydis*, excepto por la primer lisina que es una treonina, T<sup>304</sup>TAK<sup>307</sup>N, sugiriendo que el posible sitio de corte podría ser en la Lys<sup>307</sup> (Figura 6). Aunque ambas secuencias, solo difieren por dos aminoácidos en los extremos de la secuencia de interés, en el programa CLC Main Workbench ambas secuencias están reconocidas como sitios de fosforilación, lo que propone que conservan alguna actividad en común. Esta actividad de autoprocésamiento en la mayoría de las metacaspasas es altamente dependiente de Ca<sup>2+</sup> y también puede ser regulado por cambios en la concentración de iones de Ca<sup>2+</sup>, como se ha visto en *C. albicans* y *S. cerevisiae* (Minina *et al.*, 2017). A pesar de que ya se sabe que las metacaspasas son activas como monómeros, no todas rompen entre las subunidades p20 y p10 o eliminan el prodominio N-terminal, en el caso de *U. maydis*, es necesario realizar otros estudios que permitan determinar sí en este hongo se lleva a cabo este autoprocésamiento.

## **8. 2 Función dual de la metacaspasa en estrés oxidativo y la trehalosa como una molécula precursora de antioxidantes**

En *U. maydis* se ha descrito que la mutación del gen *TPS2*, genera susceptibilidad en ambientes oxidantes (Cervantes-Chávez *et al.*, 2016). Por lo que, la trehalosa podría realizar la función de una molécula protectora de proteínas y membranas durante el estrés oxidativo (da Costa Morato Nery *et al.*, 2008). Por otra parte, la metacaspasa es una proteasa que promueve la muerte celular programada (PCD) en presencia de agentes estresantes (Hill & Nyström, 2015). En *C. albicans* durante el estrés oxidativo y térmico, se determinó un incremento en la acumulación de trehalosa, mientras que la deficiencia en las mutantes que presentaron déficit en la

síntesis de trehalosa, mostraron un incremento de apoptosis en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, junto con una mayor cantidad intracelular de Ca<sup>2+</sup> y actividad de metacaspasa (Lu *et al.*, 2011).

En *U. maydis*, como se observó en la Figura 16, las mutantes  $\Delta mca1$ ,  $\Delta tps2$ , así como la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  en rosa de bengala (RB) mostraron diferentes fenotipos en presencia de luz y en oscuridad. El RB es un colorante fotoreactivo que produce oxígeno en singulete cuando se ilumina. Además, el RB retarda el crecimiento radial de hongos filamentosos por la producción de ROS provocando fototoxicidad en las células (Chilvers *et al.*, 1999). En la condición de RB (130  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) con luz, la mutante  $\Delta tps2$  mostró una ligera disminución de crecimiento respecto a la cepa silvestre (WT), mientras que  $\Delta mca1$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , tuvieron un menor crecimiento. Esto sugiere, que la molécula de la trehalosa está involucrada en la protección celular ante la presencia de fotosensibilizadores como el RB. Por otro lado, la metacaspasa es importante en la respuesta ante este tipo de estrés, ya que la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  mostró el mismo fenotipo que la cepa  $\Delta mca1$ , donde ambas cepas fueron sensibles al RB en presencia de luz.

En plantas se ha descrito que la delección de la metacaspasa I en *Arabidopsis thaliana* (*atmc1*), afecta la viabilidad de las células en presencia del RB mostrando mayor cantidad de células muertas respecto a la cepa WT (Coll *et al.*, 2014), indicando que la metacaspasa participa en la respuesta de las células contra el incremento de las ROS producidos por la presencia de fotosensibilizadores, como el RB, o durante el envejecimiento. En cuanto a la condición de RB en oscuridad sucedió lo contrario, respecto a la presencia de la luz, al comparar el crecimiento de las cepas. La mejor cepa en crecer fue la WT, mientras que  $\Delta tps2$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$  fueron las más afectadas por la presencia de RB, aunque la  $\Delta mca1$  tuvo mejor crecimiento que  $\Delta tps2$ , pero no superó el crecimiento de WT. Aunque se ha descrito que el RB en oscuridad no es fototóxico (Chilvers *et al.*, 1999), el mecanismo de acción de los organismos ante este reactivo en esta condición no ha sido descrito a detalle, es interesante la vulnerabilidad de *U. maydis*, en ausencia de la síntesis de la trehalosa, a este fotoreactivo en oscuridad.

En presencia de algunos químicos oxidantes como menadiona, tBOOH y

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el fenotipo de  $\Delta mca1$  mostró resistencia a estos agentes causantes de apoptosis por este tipo de estrés. En el caso de 4  $\mu$ M menadiona (2-metil-1, 4-naftoquinona), se sabe que de manera natural *A. nidulans*, *Fusarium graminearum*, *C. albicans*, *Kluyveromyces lactis* y *S. cerevisiae*, son más resistentes, esto en función de su capacidad detoxificante de superóxidos generados por la menadiona, mientras que el hongo patógeno de arroz *Magnaporthe grisea*, es más sensible al estrés oxidativo por menadiona, al igual que *U. maydis* (Nikolaou *et al.*, 2009). Las cepas  $\Delta tps2$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$  mostraron una mayor sensibilidad que la WT y  $\Delta mca1$ , como se ve en la figura 16, por lo que se reitera la posible participación de la trehalosa en la desintoxicación por superóxidos siendo una molécula involucrada en la señalización de respuesta a estrés oxidativo para la activación de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasas, catalasas, y de proteínas de choque térmico (HSP) (Jamieson, 1998), para mantener la proteostasis mediante el plegamiento y re-plegamiento de proteínas, debido a la acumulación de ROS, en *S. cerevisiae* (Cervantes-Chávez *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2011).

En *S. cerevisiae* y *C. albicans* el agente oxidativo *t*-butilhidroperóxido (*t*BOOH), acelera la peroxidación lipídica de la membrana y activa el sistema antioxidante (Fekete *et al.*, 2007), en presencia de 700  $\mu$ M de este agente, se observó en *U. maydis* que en  $\Delta tps2$  y la  $\Delta tps2::\Delta mca1$  tuvieron un menor crecimiento que la cepa WT, por lo que su sistema antioxidante puede estar comprometido por la ausencia de la síntesis de trehalosa, como también se ha descrito en *Cryptococcus neoformans*, debido a la mutación de *TPS1* y *TPS2* (Petzold *et al.*, 2006). Caso contrario, la mutante  $\Delta mca1$  tuvo un buen desarrollo en comparación con las dos mutantes anteriores y la cepa WT. Con base a estos datos, en *U. maydis* la metacaspasa actúa como un promotor de la PCD ante agentes estresantes oxidativos como el *t*BOOH (Figura 16), por lo que sería conveniente medir la lipoperoxidación en *U. maydis* en respuesta a *t*BOOH.

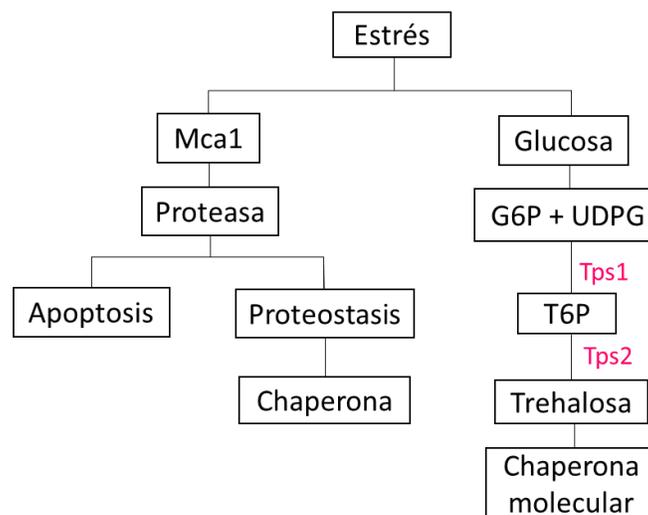
Al usar 3 mM de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) la  $\Delta tps2$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$  fueron más sensibles que la WT, sugiriendo la importancia de la trehalosa como una molécula protectora en respuesta al estrés oxidativo (Cervantes-Chávez *et al.*, 2016), así mismo en el caso de *F. graminearum*, la eliminación de ambos genes

*TPS1* y *TPS2* inhiben el crecimiento micelial en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Song *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta que la apoptosis es una vía alterna de muerte celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se analizó la expresión del gen *UmMCA1* en la cepa  $\Delta tps2$  (Figura 21) donde se observó que la susceptibilidad de esta cepa puede estar potencializada por la mayor expresión de *MCA1*. Esta sensibilidad a estrés oxidativo también se observó en mutantes en el gen *TPS1* de *C. albicans* donde se afectó la viabilidad de las células en presencia de 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y se observó un aumento en los niveles intracelulares de ROS, así como en la actividad de la metacaspasa (Lu *et al.*, 2011). Lo que sugiere que en *U. maydis* puede suceder un escenario similar, en cuanto a un aumento de la actividad de la metacaspasa, al existir una mayor expresión del gen *MCA1* en la mutante  $\Delta tps2$  (Figura 21). Sin embargo, pese a que el gen *MCA1* se expresa más en  $\Delta tps2$  no generó mayor muerte celular en estrés oxidativo como se observó en la figura 23, donde la cepa WT fue la que tuvo una mayor cantidad de células muertas en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 27); sugiriendo que la actividad de la metacaspasa no es exclusiva en pro apoptosis, sino que podría estar relacionada con el mantenimiento de proteínas mal plegadas para preservar la calidad de las proteínas durante el estrés oxidativo, como se ha sugerido la participación de la metacaspasa como co-chaperona en *S. cerevisiae* (Hill & Nyström, 2015; Lee *et al.*, 2010). Mientras que en la mutante  $\Delta mca1$  pasa el efecto contrario, crece mejor que la cepa WT en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como se ve en la figura 16; como sucede en *P. anserina* y *S. cerevisiae*, ascomicetos en los que la eliminación de *MCA1* decreció el porcentaje de PCD inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en comparación al mismo tratamiento aplicado a la cepa silvestre, tolerando así el estrés oxidativo (Hamann *et al.*, 2007; Madeo *et al.*, 2002).

Se tiene conocimiento de que la trehalosa es una molécula protectora ante el daño ocasionado por radicales libres de oxígeno (Thammahong *et al.*, 2017); como se mencionó, la mutante  $\Delta mca1$  es más resistente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; asimismo, esta mutación produjo que en las células  $\Delta mca1$  se acumulara mayor cantidad de trehalosa en comparación con cepa la silvestre; tanto en la condición control como en presencia de 2.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 22) esto podría deberse a que la eliminación del gen

*MCA1* en otros organismos genera acumulación de proteínas oxidadas, con la consecuente activación del proteosoma 20S (Khan *et al.*, 2005), y que como mecanismo compensatorio se incrementa la síntesis de trehalosa (Figura 27); ya que la trehalosa por sí misma se considera una chaperona que protege proteínas y membranas en condiciones que comprometen el bienestar celular y promueve la actividad de enzimas antioxidantes en *S. cerevisiae* y *C. albicans*, y como se plantea en el modelo hipotético de la figura 27 (Zaragoza *et al.*, 2003; Benaroudj *et al.*, 2001). Este dato concuerda con lo reportado en la mutante  $\Delta mca1$  de *C. albicans*, en la que se observó una mayor cantidad de trehalosa en 2 mM de  $H_2O_2$  (Cao *et al.*, 2009), sugiriendo que la capacidad de supervivencia de la mutante  $\Delta mca1$  ante  $H_2O_2$  se debe a la acumulación de trehalosa promoviendo la actividad antioxidante de otras enzimas, reflejándose en la reducción de células muertas durante el estrés oxidativo mostrando así una relación entre la metacaspasa y la síntesis de trehalosa (Figura 23). A pesar de que la cepa  $\Delta tps2::\Delta mca1$  se ve en un punto intermedio entre el fenotipo de  $\Delta mca1$  y  $\Delta tps2$ , la cantidad de células muertas es similar a la cantidad presentada por  $\Delta mca1$ , aunque tenga los dos sistemas de protección comprometidos.



**Figura 27. Modelo hipotético de la actividad chaperona de la metacaspasa (Mca1) y trehalosa.** La metacaspasa podría estar implicada en la proteostasis celular como un co-chaperona para el control de calidad de proteínas (PQC), ante el estrés oxidativo. Y la síntesis de trehalosa se activa ante la presencia de agentes oxidativos, a partir de la ruta conocida TPS/TPP donde están involucradas dos enzimas Tps1 y Tps2, para producir trehalosa y proteger proteínas y membranas.

### 8. 3 La trehalosa ayuda a soportar el estrés ácido pero el daño a mitocondria está comprometido en $\Delta mca1$

El ácido acético (AA) es un inductor de la apoptosis. En varias especies de *Candida*, éste indujo la muerte celular acompañada de la activación de la metacaspasa (Lastauskiené *et al.*, 2014). En *S. cerevisiae* el AA ingresa a la célula por difusión facilitada por los canales de aquagliceroporina (Fps1p), se acumula en la célula y acidifica el ambiente intracelular, resultando en apoptosis (Giannattasio *et al.*, 2013; Ludovico *et al.*, 2001). *U. maydis* en presencia de 4 mM de AA, la cepa  $\Delta mca1$  creció mejor que el resto de las cepas (Figura 16), sugiriendo la participación de la metacaspasa para conducir este proceso de PCD, como se ha visto en *S. cerevisiae* donde *YCA1* regula actividades del sistema de ubiquitinación-proteosoma y regulación de proteínas chaperonas durante la presencia de AA (Longo *et al.*, 2015).

En presencia de este ácido, y en ausencia de trehalosa por la eliminación de *TPS2* en *S. cerevisiae* se observó una mayor cantidad de ROS, así como mayor actividad de la caspasa (*Yca1*) en presencia de AA (Petitjean *et al.*, 2017), un escenario que pudiera presentarse en *U. maydis*, puesto que la cepa  $\Delta tps2$  fue muy sensible al ataque de este ácido, indicando que la trehalosa protege a *U. maydis* en presencia de ácidos orgánicos, como en el caso de *S. cerevisiae* (Yoshiyama *et al.*, 2015) y es posible que tenga mayor actividad de metacaspasa, según lo observado en nuestros estudios de RT-PCR, aunque en presencia de otros tipos de estrés (Figura 21). En cuanto a la cepa  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , mostró un fenotipo más sensible que la cepa  $\Delta tps2$  al AA, muy contrario al fenotipo de *S. cerevisiae*, ya que la doble eliminación de *TPS1* y *MCA1* no afectó la viabilidad celular teniendo el mismo fenotipo que la mutante  $\Delta yca1$  (Petitjean *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha descrito que la PCD generada por AA, también juega una función importante en la liberación del citocromo C (cyt-c) acompañado de defectos en la cadena respiratoria de la mitocondria (Guaragnella *et al.*, 2010). En la caso de la mutante  $\Delta yca1$  de *S. cerevisiae*, ésta no libera el cyt-c al citosol para su función como donador de electrones y secuestrador de ROS, por lo que hay una aumento de ceramidas en la mitocondria como mecanismo de compensación; sin embargo, sí disminuye la proteólisis, reduciendo así la disponibilidad de aminoácidos (Longo

*et al.*, 2015).

De acuerdo al análisis del proteoma de la mutante  $\Delta yca1$ , se observó que la proteína Mmf1p, que está involucrada en el mantenimiento del genoma mitocondrial, está en menor cantidad que en la cepa WT, la cual también es requerida en la transaminación de isoleucina, por lo que explica que haya acumulación de isoleucina (Ždravlević *et al.*, 2015), este dato sugiere que en la cepa  $\Delta mca1$  de *U. maydis* pueda existir cierto daño mitocondrial.

Como se explicó anteriormente, la mitocondria está implicada en la muerte celular por el estrés con AA (Giannattasio *et al.*, 2013). Recientemente, en *U. maydis*, se utilizó el acetato de sodio (AcNa) para inducir la muerte celular, donde la captación de acetato provoca la acidificación del citoplasma, influye en la glucólisis y en el metabolismo de los aminoácidos, dañando la función de la mitocondria (Kretschmer *et al.*, 2018; Marques *et al.*, 2013). Al estudiar el efecto de diferentes concentraciones de AcNa en las mutantes y dobles mutantes de *U. maydis* (Figura 25). La mutante  $\Delta mca1$  mostró resistencia a la condición 1.5% de AcNa, sugiriendo que al no estar presente la metacaspasa, no puede conducir a la muerte por un mecanismo similar al reportado en *S. cerevisiae* o en *U. maydis*, dañando las funciones de la mitocondria o acidificación del citoplasma (Kretschmer *et al.*, 2018; Ludovico *et al.*, 2001), pero no así cuando el AcNa se incrementó al 3% y al 4%, su fenotipo estuvo comprometido, mostrando un menor crecimiento al compararlo con la cepa silvestre (Figura 25), sugiriendo la vulnerabilidad de la mitocondria debida a un umbral de AcNa. Mientras que la mutante  $\Delta tps2$  y la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  son vulnerables a 1.5% de AcNa (Figura 25), la ausencia de trehalosa puede ser la causa en la mutante  $\Delta tps2$  y en la doble mutante sea debido a una causa compensatoria, puesto que no existe la metacaspasa. Por lo que, el fenotipo mostrado por la cepa  $\Delta mca1$  en ambas condiciones, donde el AA induce a apoptosis y la liberación del cyt-c mientras que AcNa altera el funcionamiento de mitocondria, está comprometido por la carencia de la metacaspasa, aludiendo que Mca1 tienen una actividad dual, en pro de la apoptosis y en la proteólisis.

#### 8. 4 En ausencia de trehalosa el estrés osmótico no incrementa la muerte celular

El crecimiento de *U. maydis* en estrés osmótico (1.3 M NaCl, 1.8 mM sorbitol y 1.4 mM KCl), mostró que la cepa  $\Delta tps2$  fue sensible en todas las condiciones de estrés osmótico (Figura 17), según el fenotipo de la mutante  $\Delta tps2$  descrito por Cervantes-Chávez *et al.* (2016); un comportamiento similar fue observado en el caso de *F. graminearum*, donde se afectó el crecimiento micelial de la mutante *TPS2*, en presencia de NaCl y sorbitol (Song *et al.*, 2014), así como en *C. neoformans* ( $\Delta tps1$ ) fue sensible al estrés osmótico con 1 M sorbitol (Petzold *et al.*, 2006). En cuanto a la mutante  $\Delta mca1$ , esta mostró un mejor crecimiento que las demás cepas, reiterando la capacidad de la metacaspasa para favorecer la muerte celular, como se observó en *S. cerevisiae*, la presencia de agentes de que conducen al estrés osmótico, como lo es el sorbitol; incrementan la producción de ROS, la actividad de la metacaspasa y daña la mitocondria para promover la apoptosis (Silva *et al.*, 2005). Sin embargo, cabe señalar que la cantidad de trehalosa que acumuló la mutante  $\Delta mca1$  durante el estrés osmótico fue igual que la obtenida por la cepa FB1 en condiciones control (Figura 22), por lo que la trehalosa en *U. maydis* no se acumula en respuesta al estrés osmótico, caso contrario a lo observado durante el estrés oxidativo (Figura 22), sugiriendo que la protección al estrés osmótico está regulado por otras rutas de protección por moléculas osmoreguladoras como el glicerol por la vía de Hog I descrito en la levadura (Rodríguez-Peña *et al.*, 2010), asimismo en *S. cerevisiae* la acumulación de trehalosa incrementó la osmolaridad intracelular simulando un estrés hipotónico ambiental, provocando la activación de la vía PKC1 (por sus siglas en inglés, protein kinase C1) (Mensonides *et al.*, 2005).

Así como se observó en la cuantificación de células muertas en presencia de NaCl, que hubo una menor cantidad en la mutante  $\Delta tps2$ ; sin embargo, no existe diferencia significativa respecto a las demás cepas tanto silvestre, como mutante  $\Delta mca1$  y doble mutante, por lo que el escenario sugiere que la muerte celular no es dependiente de *MCA1* (Figura 23), como se ha visto en *S. cerevisiae* donde la apoptosis producida por NaCl, puede ser dependiente o independientemente de *Yca1* (Wadskong *et al.*, 2004). En *U. maydis*, la doble mutación en la cepa

$\Delta tps2::\Delta mca1$  provocó un precario crecimiento, ya que carece de los mecanismos necesarios de supervivencia; la metacaspasa como una enzima en favor de la proteostasis y la síntesis de trehalosa en pro del mantenimiento celular.

### **8. 5 La sensibilidad de la pared celular se debe a la ausencia de la metacaspasa en *U. maydis***

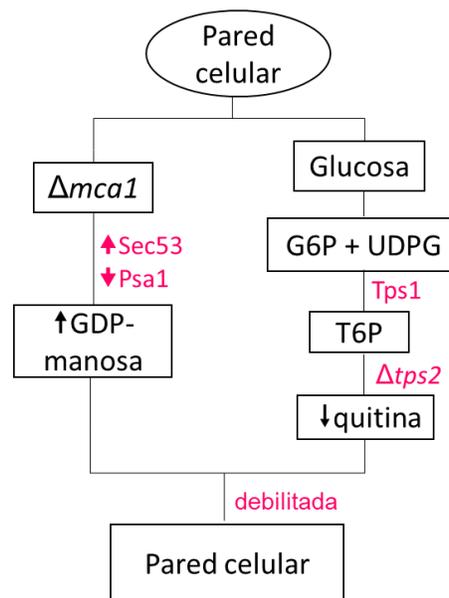
La pared celular es la primer estructura de la célula que está en contacto con el medio ambiente y da protección; ésta se caracteriza por su plasticidad, y su capacidad de remodelación (Wang *et al.*, 2018). La integridad de la pared celular es importante durante la interacción patógeno-huésped, como en el caso de *U. maydis* donde la alteración de la biosíntesis de quitina conduce a la completa o parcial pérdida de la virulencia en maíz (Garcerá-Teruel *et al.*, 2004). Nosotros, detectamos cierta afectación de la pared celular por la eliminación de los genes *TPS2* y *MCA1*, hecho que se observó cuando las células fueron retadas con diversos agentes que perturban la construcción o la remodelación de la pared celular. Analizamos el efecto de 3.5 mM de cafeína, 12  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de rojo congo (RC) y 0.003% de SDS (Figura 18).

La cafeína es comúnmente utilizada para evaluar el fenotipo de la vía para la integridad de la pared celular, en la cual existe una regulación mediada por cinasas (Kuranda *et al.*, 2006). En el caso de las mutantes  $\Delta tps2$  el crecimiento se vio disminuido como lo menciona Cervantes-Chávez *et al.* (2016), demostrando que la integridad de la pared celular está comprometida por la falta de trehalosa y posiblemente debido a la acumulación de T6P, inhibiendo la actividad de las cinasas involucradas en la integridad de la pared celular, como se reportó en *Aspergillus fumigatus* y *S. cerevisiae* (Eleutherio *et al.*, 2014; Puttikamonkul *et al.*, 2010). Por otro lado, la cepa  $\Delta tps2::\Delta mca1$  mostró mejor crecimiento que la  $\Delta tps2$ , sin embargo no se restauró la capacidad de crecimiento totalmente al compararla con el fenotipo de la mutante  $\Delta mca1$ , que creció mejor incluso que la cepa control (WT) (Figura 18), lo que sugiere que la cafeína puede inducir la muerte celular mediada por la metacaspasa, como se ha reportado en células de ratón, puesto que cafeína aumenta la actividad de la caspasa 3 (Lu *et al.*, 2002).

En cuanto al análisis del ensamble de la pared celular, encontramos un dato muy interesante, puesto que al utilizar RC, reactivo que interfiere con la unión de los  $\beta$ -1,-3 glucanos en la pared (Ram & Klis, 2006); detectamos que la cepa  $\Delta mca1$  que es resistente a la cafeína, ahora mostró un fenotipo de alta sensibilidad ante este agente (Figura 18), seguida de la cepa  $\Delta tps2::\Delta mca1$  influyendo así la ausencia del gen de la metacaspasa en el fenotipo de la doble mutante más que la deficiencia de trehalosa, puesto que la  $\Delta tps2$  mostró un fenotipo menos sensible que la doble mutante. Estos datos pueden estar relacionados con lo observado en *S. cerevisiae*, en esta levadura existe un aumento de GDP-manosa en la cepa  $\Delta yca1$ , lo cual puede influir en la capacidad del remodelamiento de la pared celular como respuesta a una condición de estrés (Ždravlević *et al.*, 2015). Retomando lo observado con la mutante  $\Delta tps2$ , ésta fue más sensible que la WT al RC, pero aun así fue más resistente que  $\Delta mca1$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , no obstante se ha descrito que otros hongos presentan sensibilidad a RC en ausencia de *TPS2* como en el caso de *A. fumigatus*, además de defectos en la formación de la matriz de quitina-glucano, y en la biosíntesis de quitina (Puttikamonkul *et al.*, 2010). Asimismo, en *F. graminearum* en la mutante  $\Delta tps2$  se observaron varias alteraciones, como menor cantidad de quitina debida a una menor actividad de quitina sintasa, resultando en una expansión lateral anormal de la pared celular, al ser más gruesa (Song *et al.*, 2014).

Es bien conocido que el SDS es un agente que solubiliza manoproteínas de la pared celular (Ram *et al.*, 2004; Garcerá *et al.*, 2003). En la condición de SDS la cepa  $\Delta tps2$  tuvo mejor crecimiento que la cepa  $\Delta mca1$  y la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , denotando una participación menor de la trehalosa en el mantenimiento de la pared celular, pudiendo estar más relacionada la actividad de la metacaspasa, o bien que la ausencia de trehalosa origine cambios en la composición de la pared celular como se reportó en *F. graminearum* (Song *et al.*, 2014). Como se mencionó anteriormente, la mutante  $\Delta yca1$  de *S. cerevisiae* tiene comprometida la vía de la biosíntesis de la pared celular, presenta un aumento del 50% de GDP-manosa, debido a una mayor actividad de la enzima Sec53p (fosfomannomutasa) involucrada en la síntesis de GDP-manosa y dolicol-fosfato-

manosa, misma que es requerida para el plegamiento y la glicosilación de proteínas secretoras en el lumen del retículo endoplasmático, y una disminución en la enzima Psa1p que cataliza la síntesis de GDP-manosa, y manosa-1-fosfato (Ždravlević *et al.*, 2015), influyendo así en la dinámica del remodelamiento de la pared celular en ambientes de estrés; una situación similar podría estar operando en *U. maydis* en la mutante  $\Delta mca1$ ; dado el fenotipo observado en la pared celular ante el RC y SDS, con estos datos generamos el modelo hipotético explicado en la figura 28.



**Figura 28. Posibles escenarios de la afectación de la pared celular en la ausencia de Mca1 y Tps2.** La delección de la *MCA1* ocasiona cambios en la síntesis de GDP-manosa al variar la expresión de Sec53p (sobrexpresión) y Pas1p (represión) como sucede en *S. cerevisiae*, esto podría estar afectando la remodelación de la pared celular al aglomerar cadenas largas de residuos de manosa. Asimismo, la ausencia de *Tps2* podría hacer que la cantidad quitina en la pared celular sea menor, afectando en la formación de hifas y en la virulencia.

## 8. 6 La viabilidad celular está comprometida en $\Delta tps2$ por metales pesados, exposición a la luz UV, choque térmico y estrés salino

La presencia de metales pesados como  $CdSO_4$ ,  $CoCl_2$  y  $CdCl_2$ , solo afectaron el crecimiento de la cepa  $\Delta tps2$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , mientras que la cepa  $\Delta mca1$  se comportó igual que la cepa WT (Figura 19). El  $CoCl_2$  induce condiciones similares

a hipoxia (Kretschmer *et al.*, 2018), mientras que el cadmio es tóxico ( $\text{CdSO}_4$  y el  $\text{CdCl}_2$ ), provoca mutagénesis al alterar la capacidad de la célula para reparar el daño a ADN (Nargund *et al.*, 2008). Según nuestros hallazgos, la eliminación de *TPS2* generó vulnerabilidad ante estos agentes, por lo que la trehalosa es una molécula protectora contra metales pesados (Figura 19), como en *Schizosaccharomyces pombe* donde se observó que el estrés por cadmio (II) provoca la sobreexpresión de los genes de la síntesis de trehalosa *TPS1* y *TPS2* (Guo *et al.*, 2012). Aunque el cadmio no cataliza la producción de ROS, sí promueve el estrés oxidativo agotando las defensas antioxidantes (Nargund *et al.*, 2008), como podría ser el caso de la presencia de la trehalosa como agente protector.

En otras condiciones, como es la radiación UV con  $50 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$  las mutantes simples  $\Delta tps2$ ,  $\Delta mca1$  y la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , presentaron un fenotipo sensible a la radiación, más que la cepa WT (Figura 20), sugiriendo que ambos genes son importantes en la señalización desencadenada por la radiación para ejecutar un mecanismo de protección, ya que la radiación UV causa estrés oxidativo, acelerando la oxidación de proteínas, así como daño al ADN (Angelova *et al.*, 2005), como se ha reportado en *S. cerevisiae* que la inhibición de apoptosis dependiente de caspasa ( $\Delta yca1$ ) incrementa los niveles de proteínas oxidadas (Khan *et al.*, 2005), por lo que reitera la vulnerabilidad de *U. maydis* al estar ausente la proteína Mca1, disminuyendo la viabilidad celular, asimismo las mutantes deficientes de trehalosa acumulan más proteínas oxidadas durante el estrés oxidativo que la WT (Benaroudj *et al.*, 2001).

Respecto al estrés térmico, la única cepa que toleró dicha condición fue  $\Delta mca1$ , debido tal vez a una mayor actividad de chaperonas y del proteosoma, ya que este dato se correlaciona con la coexistente interacción proteolítica de Mca1 con el conjunto de enzimas involucradas en la PQC (control de la calidad de proteínas) como Ydj1, Ssa1, Ssa3 y Hsp104, para la posterior eliminación de proteínas vía el proteosoma en *S. cerevisiae* (Hill *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2010). Sugiriendo un rol de Mca1 como una chaperona, ante diferentes tipos de estrés, como el estrés oxidativo o por choque térmico según lo planteado en nuestro modelo (Figura 27) (Madeo *et al.*, 2009). Esta característica de supervivencia al calor fue

comprobado en la cepa  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , la cual toleró mejor la condición térmica que la mutante individual  $\Delta tps2$ , debido a que en *S. cerevisiae* el estrés por calor produjo un incremento de trehalosa y la síntesis de proteína de choque de térmico (Hsp104), la cual tiene mayor actividad en la mutante que no sintetiza la trehalosa (Saleh *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2009). De forma similar, en *A. nidulans* la eliminación del *TPS2* produjo lisis celular a 42 °C (Eleutherio *et al.*, 2014), por lo que ambos casos demuestran la importancia de la trehalosa para favorecer la supervivencia de *U. maydis* ante situaciones de estrés por calor, así como la importancia de la chaperona Hsp104, por lo que es un dato importante a analizar, en ambas mutantes de *U. maydis*.

En algunos ensayos de estrés, como: KCl, cafeína, RC y LiCl; observamos una coloración amarilla-café en la cepa  $\Delta mca1$  y WT (FB1), excepto  $\Delta tps2$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , la cual podría deberse a la presencia de melanina (comunicación personal de Rodríguez Piña, IPICYT), y en la condición de NaCl se observó que todas producen este pigmento, sugiriendo que la trehalosa y el estrés osmótico por NaCl promueven su síntesis. Es importante mencionar, que la melanina es un compuesto natural que reduce agentes oxidantes, disminuye el efecto tóxico de especies reactivas de oxígeno y cloro, brinda protección a algunos hongos durante el proceso infectivo como es el caso de *Wangiella dermatitidis* y *Sporothrix schenckii* (Missall *et al.*, 2004). Aunado a ello, en *C. neoformans* y *A. fumigatus* la melanina es un factor de virulencia (Samarasinghe *et al.*, 2018; Couger *et al.*, 2018), sugiriendo que la ausencia de este pigmento en la mutante  $\Delta tps2$  y la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , podría contribuir a la reducida virulencia presentada por estas cepas.

### **8. 7 La ausencia de trehalosa afecta el dimorfismo en *U. maydis***

*U. maydis* es un hongo dimórfico, a partir de la formación de un filamento dicariótico, que resulta de fusión de dos esporidias compatibles, es capaz de infectar al maíz (Redkar *et al.*, 2017). Por lo que se analizó el cambio dimórfico en células haploides de las cepas  $\Delta tps2$ ,  $\Delta mca1$ , y  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , la forma de micelio se obtiene en MM pH 3 y la levadura en MM pH 7 (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995). La levadura no mostró diferencias morfológicas entre las cepas mutantes y las cepas silvestres (FB1 y

FB2). Respecto a la forma de micelio, en células teñidas con calcoflúor white se observó que la cantidad de septos por parte de las mutantes y las doble mutantes se ve reducida en comparación con las cepas silvestres, figura 24. La cepa más alterada en la formación de hifas fue la mutante  $\Delta tps2$ , puesto que éstas fueron ovaladas y no elongadas. Esta alteración, concuerda con varios reportes donde se inhibe la síntesis de trehalosa, como en el caso de *A. fumigatus*, cuyas hifas se vieron severamente afectadas, puesto que éstas fueron de menor longitud, no presentaron conidióforos en las puntas y presentaron ramificaciones anormales (Puttikamonkul *et al.*, 2010). De igual manera las hifas de la cepa  $\Delta tps2$  en *F. graminearum* son hinchadas y muy ramificadas, presentan una pared celular más gruesa, respecto a la WT (Song *et al.*, 2014). En *M. grisea* el apresorio producido por células  $\Delta tps1$  tuvo menor fuerza de turgencia por lo que las hifas no penetraron eficientemente las hojas de arroz (Foster *et al.*, 2003); estos datos contrastan con lo que se observó en *C. albicans*, en esta levadura no hubo diferencias entre la cepa WT y la cepa  $\Delta tps2$  en la formación de hifa, pero si afecto la virulencia (van Dijck *et al.*, 2002; Zaragoza *et al.*, 2002).

Por otro lado, la mutante  $\Delta mca1$  y la doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$ , no se vieron alteradas en la formación de las hifas de forma dramática, solo presentan menor ramificaciones que la cepa silvestre, dato que contrasta con lo reportado en *C. albicans*, puesto que la delección de la metacaspasa produjo células con severas alteraciones en la morfología de la hifa, en relación al dimorfismo existe un retraso en el crecimiento de la hifa, por lo que la metacaspasa juega un rol importante en el crecimiento filamentoso de *C. albicans* (Jeong *et al.*, 2016).

## **8. 8 El grado de virulencia difiere en la ausencia de MCA1 y TPS2**

En cuanto a la virulencia, las cepas  $\Delta mca1$  no mostraron diferencia significativa respecto a la mostrada por las cepas silvestres (Figura 26), aunque tuviera comprometida la pared celular como se vio en la figura 18, y se mencionó anteriormente; este fenotipo coincide con el caso de *A. fumigatus* donde las mutantes de las metacaspasas CasA y CasB conservaron el patrón de virulencia, en ratón, respecto a la cepa silvestre (Richie *et al.*, 2007). En el caso de *C. albicans*,

la mutante  $\Delta mca1/\Delta mca1$ , retardó la muerte de los ratones, sugiriendo que la actividad caspasa es requerida en la virulencia (Jeong *et al.*, 2016). Una respuesta similar fue observada en ratones inoculados con la mutante  $\Delta mca4$  de *Trypanosoma brucei* (Proto *et al.*, 2011), señalando la importancia de este gen en el proceso de virulencia. Por otro lado, la cepa  $\Delta tps2$  al mostrar una hifa alterada morfológicamente, como se describió anteriormente, al infectar maíz mostró ser una cepa menos virulenta, ya que los signos presentados fueron, 45% asintomáticas, 50% con clorosis y un 5% agallas pequeñas (Figura 26), como ya había sido observado por Cervantes-Chávez *et al.*, 2016; este dato es similar al comportamiento menos virulento que se observó en las mutantes de *TPS2* en *A. fumigatus*, *C. albicans* y *F. graminearum*, por otra parte la eliminación de *TPS1* también generó menor virulencia en *C. neoformans* y *M. oryzae* (Song *et al.*, 2014; Puttikamonkul *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2007; Petzold *et al.*, 2006; van Dijck *et al.*, 2002; Zaragoza *et al.*, 2002). Aunque estadísticamente los signos presentados por las cepas  $\Delta tps2::\Delta mca1$  son significativamente similares a las mutantes  $\Delta tps2$ , se puede apreciar que la cepa doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  presentó mayor cantidad de plantas con agallas, sugiriendo que esto se debe a la restauración de su capacidad para formar hifas como se mencionó anteriormente, así como a su capacidad para tolerar algunos tipos de estrés en comparación con las cepas silvestres y la parental  $\Delta tps2$ .

## IX. CONCLUSIONES

1. La expresión del gen *MCA1* se induce en respuesta a estrés oxidativo en la cepa silvestre y en ausencia de *TPS2*, cuya expresión es mayor en la mutante  $\Delta tps2$ .
2. La resistencia de las cepas  $\Delta mca1$  en condiciones de estrés oxidativo se debe a la alta concentración de trehalosa, destacando así la función protectora de este disacárido, activando otras vías de protección celular como PKC1.
3. La mutante  $\Delta mca1$  muestra una respuesta diferencial en cuanto al estrés de pared celular, respecto a las demás cepas mutantes y silvestre, disminuyendo el crecimiento en rojo congo y SDS, pero más resistente en la condición con cafeína.
4. La muerte celular está regulada por Mca1 en respuesta a estrés oxidativo, pero no al estrés osmótico, así como la trehalosa no está involucrada en la protección durante la presencia de NaCl.
5. La eliminación de ambos genes, *TPS2* y *MCA1*, en las dobles mutantes  $\Delta tps2::\Delta mca1$  genera mayor vulnerabilidad al estrés, ya sea oxidativo, osmótico o térmico.
6. La ausencia de *TPS2* altera la morfología de la hifa influyendo en su capacidad infectiva en maíz, siendo menos virulenta.
7. La doble mutante  $\Delta tps2::\Delta mca1$  recupera la capacidad de formar hifas, por lo que forma agallas pequeñas, aunque sigue siendo significativamente similar a la cepa  $\Delta tps2$  en la infectividad.

## X. PERSPECTIVAS

- Cuantificación de glucanos en las cepas  $\Delta tps2$ ,  $\Delta mca1$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$ .
- Medir la cantidad de ROS que produce la  $\Delta tps2$  y  $\Delta mca1$ , durante estrés oxidativo.
- Estudiar el autoprocesamiento de Mca1.
- Determinar la actividad de Mca1 en el fondo genético  $\Delta tps2$ .
- Cuantificar la actividad de catalasas en cepas  $\Delta tps2$ ,  $\Delta mca1$  y  $\Delta tps2::\Delta mca1$ .

## XI. LITERATURA CITADA

- Agrios, G.** (2008). *Plant Pathology* (Vol. I). Gainesville: Elsevier.
- Al-Bader, N., Vanier, G., Liu, H., Gravelat, F.N., Urb, M., Hoareau, C. M., Campoli, P., Chabot, J., G., Filler S., Sheppard, D. C.** (2010). Role of trehalose biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* development, stress response, and virulence. *Infection and Immunity*, 78(7), 307-318.
- Alvarez-Peral, F. J., Zaragoza, O., Pedreno, Y., & Arguelles, J. C.** (2002). Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiology*, 148(8), 2599-2606.
- Ambit, A., Fasel, N., Coombs, G., & Mottram, J.** (2008). An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. 15(1), 113-122.
- Angelova, M. B., Pashova, S. B., Spasova, B. K., Vassilev, S. V., & Slokoska, L. S.** (2005). Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycological research*, 2(109), 150-158.
- Argüelles, J. C.** (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Archives of Microbiology*, 174(4), 217-224.
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E., & Iturriaga, G.** (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC evolutionary biology*, 6(109), 1-15.
- Badaruddin, M., Holcombe, L. J., Wilson, R. A., Wang, Z. Y., Kershaw, M. J., & Talbot, N. J.** (2013). Glycogen metabolic genes are involved in trehalose-6-phosphate synthase-mediated regulation of pathogenicity by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS pathogens*, 9(10), e1003604.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, A Fungal Pathogen that Induces Tumors in Maize. *Annual Review of Genetics*, 29, 179-208.
- Banuett, F., & Herskowitz, I.** (1988). *Ustilago maydis*, smut of maize. En G. S. Sidhu (Ed.), *Advances in Plant Pathology* (Vol. VI, págs. 427-455). Londres: Academic Press.
- Banuett, F., & Herskowitz, I.** (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 86(15), 5878-5882.

**Banuett, F., & Herskowitz, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut. *Development*, 122(10), 2965-2976.

**Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., Van der Zee, P., Wiemken, A.** (1992). Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation. *European Journal of Biochemistry*, 209(3), 951-959.

**Benaroudj, N., Lee, D. H., & Goldberg, A. L.** (2001). Trehalose Accumulation during Cellular Stress Protects Cells and Cellular Proteins from Damage by Oxygen Radicals. *The journal of biological chemistry*, 276(26), 24261-24267.

**Borgia, P. T., Miao, Y., & Dodge, C. L.** (1996). The *orlA* gene from *Aspergillus nidulans* encodes a trehalose-6-phosphate phosphatase necessary for normal growth and chitin synthesis at elevated temperatures. *Molecular Microbiology*, 20(6), 1287-1296.

**Bozhkov, P. V., Smertenko, A. P., & Zhivotovsky, B.** (2010). Aspasing out metacaspases and caspases: proteases of many trades. *Science Signaling*, 3(152), pe48.

**Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., & Kahmann, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 423-445.

**Cao, Y., Huang, S., Dai, B., Zhu, Z., Lu, H., Dong, L., Cao, Y., Wang, Y., Gao, P., Chai, Y., Jiang, Y.** (2009). *Candida albicans* cells lacking *CaMCA1*-encoded metacaspase show resistance to oxidative stress-induced death and change in energy metabolism. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 46(2), 183-189.

**Cervantes-Chávez, J. A., Ortiz-Castellanos, L., Tejeda-Sartorius, M., Gold, S., & Ruiz-Herrera, J.** (2010). Functional analysis of the pH responsive pathway Pal/Rim in the phytopathogenic basidiomycete *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 47(5), 446-457.

**Cervantes-Chávez, J. A., Valdés-Santiago, L., Bakkeren, G., Hurtado-Santiago,**

- E., León-Ramírez, C. G., Esquivel-Naranjo, E. U., Landeros-Jaime, F., Rodríguez-Aza, Y., Ruiz-Herrera, J.** (2016). Trehalose is required for stress resistance and virulence of the Basidiomycota plant pathogen *Ustilago maydis*. *Microbiology*, 162(6), 1009-1022.
- Chavan, S., & Smith, S. M.** (2014). A Rapid and Efficient Method for Assessing Pathogenicity of *Ustilago maydis* on Maize and Teosinte Lines. *Journal of Visualized Experiments*(83), 1-7.
- Chilvers, K. F., Reed, R. H., & Perry, J. D.** (1999). Phototoxicity of Rose Bengal in mycological media – implications for laboratory practice. *Letters in Applied Microbiology*, 28(2), 103-107.
- Choi, C., & Berges, J.** (2013). New types of metacaspases in phytoplankton reveal diverse origins of cell death proteases. *Cell Death and Disease*, 4(2), e490.
- Coll, N. S., Smidler, A., Puigvert, M., Popa, C., Valls, M., Dangl, J. L.** (2014). The plant metacaspase AtMC1 in pathogen-triggered programmed cell death and aging: functional linkage with autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 21(9), 1399-1408.
- Coll, N. S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., Van Breusegem, F., Dangl, J. L., & Epple, P.** (2010). *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death. *Science*, 330(6009), 1393-1397.
- Couger, B., Weirick, T., Damásio, A. R. L., Segato, F., Polizeli, M. D. L. T. D. M., de Almeida, R. S. C., Goldman, G. H., Prade, R. A.** (2018). The genome of a thermo tolerant, pathogenic albino *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in microbiology*, 9(1827), 1-11.
- Crowe, L. M., & Crowe, J. H.** (1988). Trehalose and dry dipalmitoylphosphatidylcholine revisited. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 946(2), 193-201.
- da Costa Morato Nery, D., da Silva, C. G., Mariani, D., Fernandes, P. N., Pereira, M. D., Panek, A. D., & Eleutherio, E. C.** (2008). The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(12), 1408-1411.
- De Virgilio, C., Burckert, N., Bell, W., Jenö, P., Boller, T., & Wiemken, A.** (1993).

Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *European Journal of Biochemistry*, 212(2), 315-323.

**Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G. D.** (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430.

**Eastmond, P. J., van Dijken, A. J., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A. F., Dickinson, H. G., Jones, J. D., Smeekens, S. C., Graham, I. A.** (2002). Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *The Plant Journal*, 29(2), 225-235.

**Elbein, A. D., Pan, Y., Pastuszak, I., & Carroll, D.** (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17R-27R.

**Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E., & Magalhães, R.** (2014). Revisiting yeast trehalose metabolism. *Springer*, 61(3), 263-274.

**Erhardt, M., Wegrzyn, R. D., & Deuerling, E.** (2010). Extra N-Terminal Residues Have a Profound Effect on the Aggregation Properties of the Potential Yeast Prion Protein Mca1. *PloS one*, 5(3), e9929.

**Fekete, A., Emri, T., Gyetvai, A., Gazdag, Z., Pesti, M., Varga, Z., Balla, J., Cserhádi, C., Emody, L., Gergely, L., Pócsi, I.** (2007). Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS yeast research*, 7(6), 834-847.

**Feofilova, E. P., Usov, A. I., Mysyakina, I. S., & Kochkina, G. A.** (2014). Trehalose: Chemical structure, biological functions, and practical application. *Microbiology*, 83(3), 184-194.

**Ferreira, J. C., Paschoalin, V. M., Panek, A. D., & Trugo, L. C.** (1997). Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts. *Food*

*Chemistry*, 60(2), 251-254.

- Figuroa-Resendiz, E. J.** (2016). Caracterización fenotípica de las mutantes nulas en el gen de la metacaspasa "MCA1" en el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*. *Tesis de Licenciatura*. Ciudad de Hidalgo: Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo.
- Fillinger, S., Chaveroche, M. K., van Dijck, P., de Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J., & d'Enfert, C.** (2001). Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 147(7), 1851-1862.
- Foster, A. J., Jenkinson, J. M., & Talbot, N. J.** (2003). Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The EMBO journal*, 22(2), 225-235.
- Garcerá, A., Martínez, A. I., Castillo, L., Elorza, M. V., Sentandreu, R., & Valentín, E.** (2003). Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology*, 149(8), 2137-2145.
- Garcerá-Teruel, A., Xoconostle-Cázares, B., Rosas-Quijano, R., Ortiz, L., León-Ramírez, C., Specht, C. A., Sentandreu, R., Ruiz-Herrera, J.** (2004). Loss of virulence in *Ustilago maydis* by *Umchs6* gene disruption. *Research in microbiology*, 155(2), 87-97.
- García-Pedrajas, M. D., Nadal, M., Kapa B., L., Perlin H., M., Andrews L., D., & Scott, G. E.** (2008). DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method. 45, 379-388.
- Giannattasio, S., Guaragnella, N., Ždravlević, M., & Marra, E.** (2013). Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Frontiers in microbiology*, 4(33), 1-7.
- González, I. J.** (2009). Las metacaspasas y su rol en la vida y muerte de los parásitos protozoarios humanos. 29(3), 485-493.
- González-Párraga, P., Sánchez-Fresneda, R., Zaragoza, Ó., & Argüelles, J. C.** (2011). Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously

activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. *1810*(8), 777–783.

- Guaragnella, N., Bobba, A., Passarella, S., Marra, E., & Giannattasio, S.** (2010). Yeast acetic acid-induced programmed cell death can occur without cytochrome c release which requires metacaspase YCA1. *FEBS Letters*, *584*(1), 224-228.
- Guo, L., Ghassemian, M., Komives, E. A. & Russell, P.** (2012). Cadmium-induced proteome remodeling regulated by Spc1/Sty1 and Zip1 in fission yeast. *Toxicological sciences*, *129*(1), 200-212.
- Hamann, A., Brust, D., & Osiewacz, H. D.** (2007). Deletion of putative *apoptosis factors leads to lifespan extension in the fungal ageing model Podospora anserina*. *65*(4), 948-958.
- Helms, M., Ambit, A., Appleton, P., Tetley, L., Coombs, G., & Mottram, J.** (2006). Bloodstream form *Trypanosoma brucei* depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes. *119*, 1105-1117.
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Fröhlich, Kai-Uwe, Wissing, S., Büttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., Madeo, F.** (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *Journal of Cell Biology*, *164*(4), 501-507.
- Hill, S. M., & Nyström, T.** (2015). The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger. *BioEssays*, *37*(5), 525-531.
- Hill, S., H. X., Liu, B., & Nyström, T.** (2014). Life-span extension by a metacaspase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Scienceexpress*, *344*(6190), 1389-92.
- Holliday, R.** (1960). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genetics Research* , *2*, 204-233.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. En R. C. King (Ed.), *Handbook of Genetics* (Vol. 1, págs. 575-595). New York: Plenum Press.
- Hottiger, T., Schmutz, P., & Wiemken, A.** (1987). Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, *169*(12), 5518-5522.
- Jamieson, D. J.** (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces*

*cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1511-1527.

**Jeong, J. H., Lee, S. E., & Kim, J.** (2016). Mutational analysis of metacaspase CaMca1 and decapping activator Edc3 in the pathogenicity of *Candida albicans*. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 97, 18-23.

**Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J.** (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *nature*, 444(7115), 97-101.

**Kampinga, H. H.** (2014). A cell death avenue evolved from a life-saving path. *Cell Biology*, 344(6190), 1341-42.

**Kandror, O., DeLeon, A., & Goldberg, A. L.** (2002). Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 99(15), 9727-9732.

**Kaushal, G. P., Ueda, N., & Shah, S. V.** (1997). Role of caspases (ICE/CED 3 proteases) in DNA damage and cell death in response to a mitochondrial inhibitor, antimycin A Rapid Communication. *Kidney International*, 52, 438-445.

**Khan, M. A., Chock, P. B., & Stadtman, a. E.** (2005). Knockout of caspase-like gene, YCA1, abrogates apoptosis and elevates oxidized proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 102(48), 17326-17331.

**Kim, I. S., Sohn, H. Y., & I., J.** (2011). Adaptive stress response to menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *The journal of microbiology*, 49(5), 816-823.

**Kramer, P., Jung, A. T., Hamann, A., & Osiewacz, H. D.** (2016). Cyclophilin D Is Involved in the Regulation of Autophagy and Affects the Lifespan of *P. anserina* in Response to Mitochondrial Oxidative Stress. *Frontiers in Genetics*, 7(165), 1-11.

**Kretschmer, M., Lambie, S., Croll, D., Kronstad, J. W.** (2018). Acetate provokes

mitochondrial stress and cell death in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, 107(4), 488-507.

**Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V., Malorni, W., Knight, R. A., Piacentini, M., Nagata, S., Melino, G.** (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 12(2), 1463-1467.

**Kumar, S.** (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 14(1), 32-43.

**Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., & François, J.** (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Molecular Microbiology*, 61(5), 1147-1166.

**Lam, E.** (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5 (4), 305-315.

**Lastauskienė, E., Zinkevičienė, A., Girkontaitė, I., Kaunietis, A., & Kvedarienė, V.** (2014). Formic acid and acetic acid induce a programmed cell death in pathogenic *Candida* species. *Current Microbiology*, 69(3), 303-310.

**Lee, C., Robin, E., Brunette, S., G. Puente, L., & Megeney, L. A.** (2010). Metacaspase Yca1 is required for clearance of insoluble protein aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 107(30), 13348–13353.

**Lee, R. E., Brunette, S., Puente, L. G., & Megeney, L. A.** (2008). A non-death role of the yeast metacaspase: Yca1p alternates cell cycle dynamics. *PLoS One*, 3(8), e2956.

**Li, L., Ye, Y., Pan, L., Zhu, Y., Zheng, S., & Lin, Y.** (2009). The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387(4), 778-783.

**Longo, V., Ždravlević, M., Guaragnella, N., Giannattasio, S., Zolla, L., & M., T. A.** (2015). Proteome and metabolome profiling of wild-type and YCA1-knock-out

- yeast cells during acetic acid-induced programmed cell death. *Journal of Proteomics*, 128, 173-188.
- Lu, H.; Zhu, Z., Dong, L., Jia, X., Sun, X., Yan, L., Chai, Y., Jiang, Y., Cao, Y.** (2011). Lack of Trehalose accelerates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced *Candida albicans* apoptosis through regulating Ca<sup>2+</sup> signaling pathway and caspase activity. *PLoS One*, 6(1), e15808.
- Lu, Y. P., Lou, Y. R., Li, X. H., Xie, J. G., Lin, Y., Shih, W. J., & Conney, A. H.** (2002). Stimulatory effect of topical application of caffeine on UVB-induced apoptosis in mouse skin. *Oncology research*, 13(2), 61-70.
- Ludovico, P., J., S. M., Silva, M. T., Leão, C., & Côrte-Real, M.** (2001). *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147(9), 2409-2415.
- Macakova, E., Kopecka, M., Kukacka, Z., Veisova, D., Novak, P., Man, P., Obsila, T., Obsilova, V.** (2013). Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1. *Biochimica et biophysica acta (BBA)*, 1830(10), 4491-4499.
- Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Buttner, S., Eisenberg, T., & Kroemer, G.** (2009). Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(2), 227-231.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S., Fröhlich, Kai-Uwe** (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Molecular Cell*, 9(4), 911-917.
- Marques, C., Oliveira, C. S., Alves, S., Chaves, S. R., Coutinho, O. P., Côrte-Real, M., & Preto, A.** (2013). Acetate-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin D release. *Cell death and disease*, 4(2), e507 .
- Matei, A., & Doehlemann, G.** (2016). Cell biology of corn smut disease - *Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 60-66.

- McTaggart, A. R., Shivas, R. G., Boekhout, T., Oberwinkler, F., Vánky, K., Pennycook, S. R., & Begerow, D.** (2016). Mycosarcoma (*Ustilaginaceae*), a resurrected generic name for corn smut (*Ustilago maydis*) and its close relatives with hypertrophied, tubular sori. *IMA fungus*, 7(2), 309-315.
- Mensonides, F. I., Brul, S., Klis, F. M., Hellingwerf, K. J., Teixeira de Mattos, M. J.** (2005). Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), 4531-4538.
- Michelitsch, M. D., & Weissman, J. S.** (2000). A census of glutamineyasparginerich regions: Implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 97(22), 11910-11915.
- Minina, E. A., Coll, N. S., Tuominen, H., & Bozhkov, P. V.** (2017). Metacaspases versus caspases in development and cell fate regulation. *Cell death and differentiation*, 24(8), 1314-1325.
- Missall, T. A., Lodge, J. K., & McEwen, J. E.** (2004). Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryotic cell*, 3(4), 835-846.
- Nadal, M., García-Pedrajas, M. D., & Gold, S. E.** (2008). Dimorphism in fungal plant pathogens. *FEMS microbiology letters*, 284(2), 127-134.
- Nargund, A. M., Avery, S. V., & Houghton, J. E.** (2008). Cadmium induces a heterogeneous and caspase-dependent apoptotic response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Apoptosis*, 13(6), 811-821.
- Ngamskulrungraj, P., Himmelreich, U., Breger, J. A., Wilson, C., Chayakulkeeree, M., Krockenberger, M. B., Malik, R., Daniel, H. M., Toffaletti, D., Djordjevic, J. T., Mylonakis, E., Meyer, W., Perfect, J. R.** (2009). The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. *Infection and Immunity*, 77(10), 4584-4596.
- Nikolaou, E., Agrafioti, I., Stumpf, M., Quinn, J., Stansfield, I., & Brown, A. J.**

- (2009). Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evolutionary Biology*, 44(9), 1-18.
- Paiva, C., & Panek, A.** (1996). Biotechnological Applications of the Disaccharide Trehalose. *Biotechnology Annual Review*, 2, 293-314.
- Patist, A., & Zoerb, H.** (2005). Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40(2), 107-113.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., & Zhang, Y.** (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 59(2/6/2008), 417-441.
- Petitjean, M., Teste, M. A., Léger-Silvestre, I., Francois, J. M., & Parrou, J. L.** (2017). A new function for the yeast trehalose-6P synthase (Tps1) protein, as key pro-survival factor during growth, chronological ageing, and apoptotic stress. *Mechanisms of Ageing and Development*, 161(Pt B), 234-246.
- Petzold, E. W., Himmelreich, U., Mylonakis, E., Rude, T., Toffaletti, D., Cox, G. M., L., Miller J., Perfect, J. R.** (2006). Characterization and Regulation of the Trehalose Synthesis Pathway and Its Importance in the Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 74(10), 5877-5887.
- Piper, P. W., & Lockheart, A.** (1988). A temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective in the specific phosphatase of trehalose biosynthesis. *FEMS microbiology letters*, 49(2), 245-250.
- Prats, G.** (2005). *Microbiología clínica* (Primera ed.). Madrid: Edit. Médica Panamericana.
- Proto, W. R., Castanys-Munoz, E., Black, A., Tetley, L., Moss, C. X., Juliano, L., Coombs, G. H., Mottram, J. C.** (2011). *Trypanosoma brucei* Metacaspase 4 Is a Pseudopeptidase and a Virulence Factor. *The Journal of biological chemistry*, 286(46), 39914 –39925.
- Puttikamonkul, S., Willger, S. D., Grahl, N., Perfect, J. R., Movahed, N., Bothner, B., Park, S., Paderu, P., Perlin, D. S., Cramer Jr., R. A.** (2010). Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for cell wall integrity and fungal virulence but not trehalose biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology*, 77(4), 891-911.

- Ram, A. F., & Klis, F. M.** (2006). Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature protocols*, 1(5), 2253-2256.
- Ram, A. F., Arentshorst, M., Damveld, R. A., vanKuyk, P. A., Klis, F. M., & van den Hondel, C. A.** (2004). The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall. *Molecular Microbiology*, 150(10), 3315-3326.
- Reddy, V. P., Kumar, V., & Sivaraman, J.** (2013). Linkers in the structural biology of protein–protein interactions. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 22(2), 153-167.
- Redkar, A., Matei, A., & Doehlemann, G.** (2017). Insights into host cell modulation and induction of new cells by the corn smut *Ustilago maydis*. *Frontiers in plant science*, 8(899), 1-7.
- Richie, D., Miley, M., Bhabhra, R., Robson, G., Rhodes, J., & Askew, D.** (2007). The *Aspergillus fumigatus* metacaspases CasA and CasB facilitate growth under conditions of endoplasmic reticulum stress. *Molecular Microbiology*, 63(2), 591-604.
- Rodríguez-Peña, J. M., García, R., Nombela, C. & Arroyo, J.** (2010). The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast*, 27(8), 495-502.
- Rivera-Coto, G.** (2007). *Conceptos introductorios a la Fitopatología*. Costa Rica: EUNED.
- Rudolph, B., Chandrasekhar, I., Gaber, B., & Nagumo, M.** (1990). Molecular modeling of saccharide-lipid interactions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 53(2-3), 243-261.
- Ruiz-Herrera, J.** (2008). *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano. *Nova Scientia. Revista Electrónica*, 1(1), 118-135. Recuperado el 21 de Abril de 2014, de Nova Scientia. Revista de Investigación de la Salle Bajío: [http://nova\\_scientia.delasalle.edu.mx/numero\\_1/articulos/NovaScientia\\_01\\_118.pdf](http://nova_scientia.delasalle.edu.mx/numero_1/articulos/NovaScientia_01_118.pdf)

- Ruiz-Herrera, J., & León-Ramírez, C. G.** (2012). CHAPTER 8. Development and Dimorphism of the Phytopathogenic Basidiomycota *Ustilago maydis*. En *Dimorphic Fungi. Their Importance as Models for Differentiation and Fungal Pathogenesis* (págs. 105-116). Irapuato, México: Bentham Science Publishers.
- Ruiz-Herrera, J., León, C. G., Guevara-Olvera, L., & Cárabez-Trejo, A.** (1995). Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology*, 141(3), 695-703.
- Saleh, A. A., Gune, U. S., Chaudhary, R. K., Turakhiya, A. P., & Roy, I.** (2014). Roles of Hsp104 and trehalose in solubilisation of mutant huntingtin in heat shocked *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1843(4), 746-757.
- Samarasinghe, H., Aceituno-Cacedo, D., Cogliati, M., Kwon-Chung, K. J., Rickerts, V., Velegraki, A., Ackaglar, S., Xu, J.** (2018). Genetic factors and genotype-environment interactions contribute to variation in melanin production in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Scientific reports*, 8(1), 9824.
- Sambrook, J., & Rusell, D. W.** (1999). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3 ed.). New York: Cold Spring Harbor.
- Sanmartín, M., Jaroszewski, L., Raikhel, N., & Rojo, E.** (2005). Caspases. Regulating death since the origin of life. *Plant Physiology*, 137, 841-847.
- Schade, B., Jansen, G., Whiteway, M., D., E. K., & Thomas, D. Y.** (2004). Cold adaptation in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), 5492–5502.
- Schiraldi, C., Lernia, I. D., & Rosa, M. D.** (2002). Trehalose production: exploiting novel approaches. *TRENDS in Biotechnology*, 20(10), 420-425.
- Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S., & Paul, M.** (2003). Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 100(11), 6849-6854.
- Shleeva, M. O., Trutneva, K. A., Demina, G. R., Zinin, A. I., Sorokoumova, G. M.,**

- Laptinskaya, P. K., Shumkova, E. S., Kaprelyants, A. S.** (2017). Free trehalose accumulation in dormant *Mycobacterium smegmatis* cells and its breakdown in early resuscitation phase. *Frontiers in Microbiology*, 8(524), 1-12.
- Silva, R. D., Sotoca, R., Johansson, B., Ludovico, P., Sansonetty, F., Silva, M. T.; M., Peinado J., M., Côrte-Real** (2005). Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 58(3), 824–834.
- Song, X. S., Li, H. P., Zhang, J. B., Song, B., Huang, T., Du, X. M., Gong, A. D., Liu, Y. K., Feng, Y. N., Agboola, R. S., Liao, Y. C.** (2014). Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for development, virulence and mycotoxin biosynthesis apart from trehalose biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal genetics and biology: FG & B.*, 63, 24-41.
- Stanley, J. T., Gunsalus, R. P., Lory, S., & Perry, J. J.** (2007). *Microbial life* (Segunda ed.). Sunderland, Massachusetts, Estados Unidos: Sinauer Associates, Inc.
- Szallies, A., Kubata, B., & Duszenko, M.** (2002). A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 517(1-3), 144-150.
- Thammahong, A., Puttikamonkul, S., Perfect, J. R., Brennan, R. G., & Cramer, R. A.** (2017). Central role of the trehalose biosynthesis pathway in the pathogenesis of human fungal infections: opportunities and challenges for therapeutic development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(2), e00053-16.
- Trevisol, E. T., Panek, A. D., De Mesquita, J. F., & Eleutherio, E. C.** (2014). Regulation of the yeast trehalose-synthase complex by cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1840(6), 1646-1650.
- Tsiatsiani, L., Van Breusegem, F., Gallois, P., Zavialov, A., Lam, E., & Bozhkov, P. V.** (2011). Metacaspases. *Cell Death and Differentiation*, 18(8), 1279–1288.

- Ulloa, M., & Herrera, T.** (1994). *Etimología e iconografía de géneros de hongos* (Primera ed.). México: Universidad Nacional Autónoma de México .
- Uren, A. G., O'Rourke, K., Aravind, L., Pisabarro, M., Seshagiri, S., Koonin, E., & Dixit., V.** (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell*, 6(4), 961-967.
- Váchová, L., & Palková, Z.** (2007). Caspases in yeast apoptosis-like death: facts and artefacts. *FEMS yeast research*, 7(1), 12-21.
- van Dijck, P., De Rop, L., Szlufcik, K., van Ael, E., & Thevelein, J. M.** (2002). Disruption of the *Candida albicans* *TPS2* gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase decreases infectivity without affecting hypha formation. *Infection and Immunity*, 70(4), 1772-1782.
- Vercammen, D., van de Cotte, B., De Jaeger, G., Eeckhout, D., Casteels, P., Vandepoele, K., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Inzé, D., Van Breusegem, F.** (2004). Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *The Journal of biological chemistry*, 279(44), 45329-45336.
- Vercammen, D., Declercq, W., Vandenamele, P., Van Breusegem, F.** (2007). Are metacaspases caspases? *The Journal of cell biology*, 179(3), 375-380.
- Wadskong, I., Maldener, C., Proksch, A., Madeo, F., & Adler, L.** (2004). Yeast Lacking the *SRO7/SOP1*-encoded Tumor Suppressor Homologue Show Increased Susceptibility to Apoptosis-like Cell Death on Exposure to NaCl Stress. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1436-1444.
- Wang, Z. A., Li, L. X. & Doering, T. L.** (2018). Unraveling synthesis of the cryptococcal cell wall and capsule. *Glycobiology*, 28(10), 719-730.
- Watanabe, N., & Lam, E.** (2005). Two *Arabidopsis* Metacaspases AtMCP1b Y AtMCP2b Are Arginine/Lysine-specific Cysteine Proteases and Activate Apoptosis-like Cell Death in Yeast. *The Journal of biological chemistry*, 280(15), 14691-14699.
- Watanabe, N., & Lam, F.** (2011). Calcium-dependent activation and autolysis of *Arabidopsis* metacaspase 2d. *The Journal biological chemistry*, 286(12),

10027-10040.

- Wilson, R. A., Jenkinson, J. M., Gibson, R. P., Littlechild, J. A., Wang, Z. Y., & Talbot, N. J.** (2007). Tps1 regulates the pentose phosphate pathway, nitrogen metabolism and fungal virulence. *The EMBO journal*, 26(15), 3673-3685.
- Wong, A. H., C. Y., & Shi, Y.** (2012). Crystal Structure of the Yeast Metacaspase Yca1. *The Journal of biological chemistry*, 287(35), 29251-29259.
- Yoshiyama, Y., Tanaka, K., Yoshiyama, K., Hibi, M., Ogawa, J., & Shima, J.** (2015). Trehalose accumulation enhances tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to acetic acid. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(2), 172-175.
- Zalila, H., González, I. J., El-Fadili, A. K., Delgado, M. B., Desponds, C., Schaff, C., & Fasel, N.** (2011). Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in *Leishmania major*. *Molecular Microbiology*, 79(1), 222-239.
- Zaragoza, O., Blazquez, M. A., & Gancedo, C.** (1998). Disruption of the *Candida albicans* *TPS1* gene encoding trehalose-6-phosphate synthase impairs formation of hyphae and decreases infectivity. *Journal of bacteriology*, 180(15), 3809-3815.
- Zaragoza, O., de Virgilio, C., Ponton, J., & Gancedo, C.** (2002). Disruption in *Candida albicans* of the *TPS2* gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase affects cell integrity and decreases infectivity. *Microbiology*, 148(5), 1281-1290.
- Zaragoza, O., González-Párraga, P., Pedreño, Y., Alvarez-Peral, F. J., & Argüelles, J. C.** (2003). Trehalose accumulation induced during the oxidative stress response is independent of *TPS1* mRNA levels in *Candida albicans*. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 6(2), 121-125.
- Ždravević, M., Longo, V., Guaragnella, N., Giannattasio, S., Timperio, A. M., & Zolla, L.** (2015). Differential proteome-metabolome profiling of *YCA1*-knock-out and wild type cells reveals novel metabolic pathways and cellular

processes dependent on the yeast metacaspase. *Molecular BioSystems*,  
11(6), 1573-1583.

## **XII. APÉNDICE**

### **12. 1 Preparación de medios de cultivo**

Todas las soluciones y medios se disolvieron con agua destilada

#### **Medio Completo (MC) 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
- 20 g Agar Bacteriológico\*

\* Medio Sólido

#### **Elementos trazas 500 mL**

- 30 mg Ácido bórico
- 70 mg Cloruro de magnesio
- 200 mg Molibdato de sodio dihidratadodihidratado
- 50 mg Cloruro de hierro
- 200 mg Sulfato de cobre

#### **Solución de Sales 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

#### **LB 1000 mL**

- 10 g Bacto-triptona
- 10 g NaCl
- 5 g Extracto de levadura

### **Medio Mínimo pH 3 (MM pH 3) 1000 mL**

- 1 % (m·v<sup>-1</sup>) Glucosa
  - 3 g Nitrato de potasio
  - 62.5 mL Solución de sales
- \* Ajustar el pH con el potenciómetro

### **Medio Mínimo pH 7 (MM pH 7) 1000 mL**

- 1 % (m·v<sup>-1</sup>) Glucosa
  - 3 g Nitrato de amonio
  - 62.5 mL Solución de sales
  - 2% Agar Bacteriológico\*
  - 30 mM Tris·HCl pH 7\*\*
- \* Medio sólido
- \*\* Ajustar el pH con el potenciómetro o agregar el amortiguador

### **DCM-S 250 mL**

- 45.5 g Sorbitol
  - 5 g Extracto de levadura
  - 2.5 g Peptona
  - 0.75 g Nitrato de amonio
  - 31.25 mL Solución de sales
  - 2% (m·v<sup>-1</sup>) Agar Bacteriológico\*
  - 1% (m·v<sup>-1</sup>) Glucosa\*\*
- \* Medio Sólido
- \*\* Añadir después de esterilizar

### **Medio Completo (MC) con carbón activado 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
- 20 g Agar Bacteriológico\*
- 10 g Carbón Activado

\* Medio Sólido

## 12. 2 Preparación de soluciones

### 12. 2. 1 Extracción de plásmido

#### Solución I

- 50 mM Glucosa
- 25 mM Tris·HCl pH 8
- 10 mM EDTA pH 8

#### Solución II

- 200 mM NaOH
- 1% (m·v<sup>-1</sup>) SDS

#### Solución III

- 3 M Acetato de potasio
- 2 M Ácido acético glacial

### 12. 2. 2 Formación de protoplastos y transformación de *U. maydis*

#### STC

- 10 mM Tris·HCl pH 7.5
- 100 mM CaCl<sub>2</sub>
- 1 M Sorbitol

#### SCS

- 20 mM Citrato de sodio pH 5.8
- 1 M Sorbitol

#### Amortiguador II

- 25 mM Tris·HCl pH 7.5
- 25 mM CaCl<sub>2</sub>
- 1 M Sorbitol

#### Enzimas líticas (Sigma®)\*

- 100 mg Enzimas líticas
- 1 mL amortiguador II

\* Almacenar en frío

### **Heparina**

- 15 mg Heparina
- 1 mL STC frío

### **40% PEG\***

- 4 g Polietilenglicol
  - 10 mL STC
- \* Almacenar en frío

## **12. 2. 3 Electroforesis**

### **Tris Ácido Acético EDTA (TAE)**

- 40 mM Ácido acético
- 40 mM Tris-HCl pH 8
- 1 mM EDTA

## **12. 2. 4 Extracción de ADN**

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

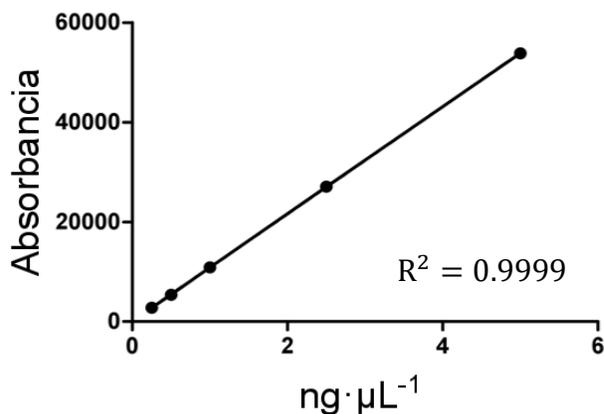
- 10 mM Tris-HCl pH 8
- 1 mM EDTA

### **TSNTE**

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

### 12.3 Curva de calibración para la cuantificación de la trehalosa

La cuantificación de trehalosa se realizó por medio de HPLC en el Laboratorio de Cromatografía PlanTECC en CINVESTAV Unidad Irapuato. La curva se preparó con trehalosa Sigma *Sigma-Aldrich*®, donde se preparó la curva de calibración (Figura 29)

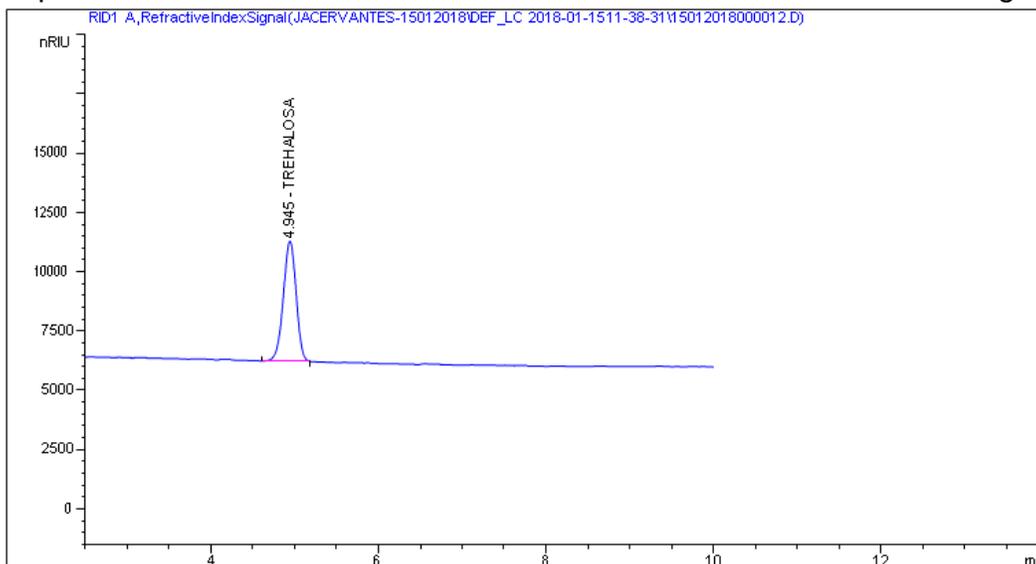


**Figura 29. Curva de calibración de la trehalosa.** Se utilizó D-(+)-trehalosa a 5 mg·mL<sup>-1</sup>, 2.5 mg·mL<sup>-1</sup>, 1 mg·mL<sup>-1</sup>, 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>, 0.25 mg·mL<sup>-1</sup>.

La ecuación de la recta fue:

$$\text{Absorbancia} = (10763.4057)(\text{Concentración de trehalosa}) + 62.555074$$

El tiempo de retención de la trehalosa fue de 4.945 min como lo indica la Figura 30.



**Figura 30. Cromatograma de la curva de calibración de trehalosa.** Se muestra el cromatograma de 5 mg·mL<sup>-1</sup> de D-(+)-trehalosa de Sigma-Aldrich®.